

antonio
ANTONIO MEIRA BARROS *N*

VERIFICAÇÃO DOS EFEITOS COLATERAIS DA BLEOMICINA
(BLENOXANE (R)). ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Orientador: Dr. Luiz Valdrighi *Luiz*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba - UNICAMP, para a obtenção do grau
de Mestre em (Farmacologia Aplicada à Clínica Odon-
tológica.)

PIRACICABA - SP
1980

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais ROMEU e OLGA,
que, com amor e sacrifícios, me ensinaram a
lutar por ideais verdadeiramente dignos ;

A minha esposa CLARICE,
pelo afeto e apoio ;

Aos meus filhos
GILSON e TÂNIA ;

DEDICO ESTE TRABALHO.

AGRADEÇO

Ao Professor Doutor LUIZ VALDRIGHI, grande amigo e incentivador, a quem devo a dedicada, segura e paciente orientação deste trabalho.

AGRADEÇO

- ao Prof. Dr. Antonio Carlos Neder, Coordenador do Curso de Pós-Graduação de Farmacologia Aplicada à Clínica Odontológica, atual Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, por propiciar o Curso de Mestrado e o presente trabalho;
- ã Prof.^a Livre Docente Dr.^a Sônia Vieira, da Disciplina de Bioestatística, pela elaboração das análises estatísticas;
- ao Dr. David Erlich, Diretor do Centro de Pesquisas de Combate ao Câncer do Hospital A. C. Camargo, São Paulo, pelo apoio, sugestões e propiciar o elo de comunicação com o Dr. Hamao Humezawa e Dr. Akira Matsuda, do Japão;
- ao Prof. Livre Docente Dr. Dêcio Teixeira e Prof. Assistente Dr. Alcides Guimarães, da Disciplina de Fisiologia e Biofísica, pela colaboração na determinação da prenhez;
- ã Área de Endodontia, através de seu Coordenador, Prof. Dr. Renato Roberto Biral, pela colaboração na realização do material histológico deste trabalho;
- ao Prof. Assistente Dr. Jaime Cury, da Disciplina de Bioquímica, pela colaboração no estudo das fórmulas dos agentes quimioterápicos;

- ã Sr.^a Ivany do Carmo Guidolin Gerola, Bibliotecária, pela revisão das referências bibliográficas;
- ao Prof. Dr. José Fernando Pereira Arena e Prof. Assistente Dr. Francisco José Chagas Pisani, da Disciplina de Genética Clínica, pela colaboração em teratologia;
- ao Prof. Leando Guerrini; pelo vernáculo.
- ao Sr. Moyses José Maria da Silva, técnico de laboratório, pelo cuidado diário dos animais;
- ã Sr.^a Maria Aparecida Dalcheco Buscariol, pela colaboração no preparo do material histológico.

Í N D I C E

	Pág.
I - INTRODUÇÃO	1
II - MATERIAL E MÉTODOS	8
A - MATERIAL	8
1 - Animais	8
2 - Droga	8
B - MÉTODOS	8
1 - Delineamento Experimental	8
1.1 - Grupo controle	8
1.2 - Grupo com bleomicina a 0,6 mg/kg ...	9
1.3 - Grupo com bleomicina a 1,0 mg/kg ...	9
2 - Sistematização Experimental	9
2.1 - Experimentação com as fêmeas <u>pre</u> nhas	9
2.1.1 - Determinação da Prenhez	9
2.1.2 - Administração do soro fisiolô- gico e da bleomicina	10
2.1.3 - Pesagem diária	10
2.1.4 - Verificação diária dos aspectos físicos externos gerais	10
2.2 - Observação dos fetos, após laparo- tomia	10
2.2.1 - Registro ao nascimento do núme- ro dos vivos e dos mortos	11

2.2.2 - Verificação macroscópica com lupa, dos aspectos físicos <u>ex</u> ternos gerais	11
X 2.2.3 - Verificação microscópica dental...	11
2.3 - Experimentação dos recém nascidos, com parto natural	13
2.3.1 - Registro ao nascimento do número dos vivos e dos mortos	13
2.3.2 - Verificação macroscópica com lupa, dos aspectos físicos externos gerais	13
2.3.3 - Verificação macroscópica semanal com lupa, dos aspectos físicos <u>ex</u> ternos gerais, alterações de <u>com</u> portamento e contagem de mortos até a 24. ^a semana de idade	13
2.3.4 - Verificação do crescimento dental, na 12. ^a semana de idade	14
2.3.4.1 - Marcação dos dentes	14
2.3.4.2 - Medição do crescimento dental ..	15
2.3.4.3 - Avaliação estatística das <u>men</u> surações	17
2.3.4.4 - Verificação microscópica dental.	17
III - RESULTADOS	18
A - EXPERIMENTAÇÃO COM AS FÊMEAS PRENHAS	18
A.1 - Pesagem Diária	18

A.2 -	Verificação Diária dos Aspectos Físicos Externos Gerais	18
B -	OBSERVAÇÃO DOS FETOS, APÓS LAPAROTOMIA	18
B.1 -	Registro ao Nascimento do Número dos Vivos e dos Mortos, e o Respectivo Percentual de Mortos	18
B.2 -	Verificação Macroscópica com <u>Lu</u> pa, dos Aspectos Físicos Externos Gerais	19
B.3 -	Verificação Microscópica Dental	19
C -	EXPERIMENTAÇÃO COM OS RECÉM NASCIDOS, DE PARTO NATURAL	20
C.1 -	Registro ao Nascimento do Número dos Vivos e dos Mortos, e o Respectivo Percentual de Mortos	20
C.2 -	Verificação Macroscópica com <u>Lu</u> pa, dos Aspectos Físicos Externos Gerais	20
C.3 -	Verificação Macroscópica Semanal com Lupa, dos Aspectos Físicos Externos Gerais, Alterações de <u>Com</u> portamento e percentual de mortos até a 24 ^a Semana de Idade	20
C.4 -	Avaliação Estatística das Mensurações do Crescimento Dental, na 12. ^a Semana de Idade	21

Pág.

IV - DISCUSSÃO	33
V - CONCLUSÕES	39
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

I - INTRODUÇÃO

Na luta contra o câncer, uma grande variedade de compostos tem sido investigada e alguns têm-se mostrado suficientemente úteis no tratamento clínico das neoplasias humanas, em planos aceitáveis de toxicidade, a ponto de receberem a designação de agentes quimioterápicos GOODMAN & GILMAN⁽¹⁸⁾.

Até pouco tempo, julgava-se que nenhum composto químico seria capaz de curar qualquer forma de câncer, entretanto, atualmente, com os agentes quimioterápicos, há dados estatísticos que demonstram a remissão completa, por mais de dez anos, em uma grande porcentagem de casos de coriocarcinoma e tumores trofoblásticos correlatos. Esse é um fato importante, embora tais neoplasias se originem das membranas fetais e possam ser considerados como tumores transplantados. Remissão completa por mais de 5 e 10 anos de metástase pulmonar de tumor de Wilms e de mais de 5 anos de linfoma de Burkitt e 42% de mal de Hodgkin, estádios III B e IV, sobrevivem do mais de 5 anos só com quimioterapia ERLICH⁽¹⁴⁾.

O tratamento do câncer, até a pouco tempo, era feito através de cirurgia e radioterapia, associadas ou isoladamente [BERTELLI & FREITAS⁽⁴⁾; BERTELLI *et al.*⁽⁵⁾; SARNAT & SCHOUR⁽⁴⁵⁾; STOLL⁽⁴⁹⁾]. A quimioterapia representa um recurso a mais, no combate ao câncer. Pode ser utilizada só ou em complementação à cirurgia ou à radioterapia, a critério dos oncologistas.

Dentre os quimioterápicos, os antibióticos a-

presentam-se sob a forma de azacerina, actinomicina D, mitomicina C, estreptonigrina, estreptozotocina, mitramicina, antramicina, daurorubina, adriamicina e bleomicina ERLICH⁽¹⁴⁾.

Numa tentativa de facilitar o entendimento de seus vários tipos, ERLICH⁽¹⁴⁾ classifica em:

1. Agentes alquilantes: mostardas nitrogenadas; derivados da etilenimina; alquilsulfinatos.
2. Antimetabólitos: antagonistas do ácido fólico; análogos da pirimidina.
3. Hormônios: adrenocorticóides; progestina; estrógenos; andrôgenos.
4. Isótopos radiativos: ouro; fósforo; ítrio; iodo.
5. Outros agentes: derivados da uréia; derivados da metil-hidrazina; supressor adrenocortical.
6. Produtos naturais: alcalóides de colchicina; alcalóides da vinca; alcalóides da podofilina; enzimas; antibióticos.

Os agentes quimioterápicos, como outros, apresentam uma inespecificidade de ação, não se conseguindo ainda um medicamento que seja ativo somente sobre as células tumorais. Esta é a principal limitação para o emprego de tais substâncias, requerendo atenção dos pesquisadores no sentido de melhorar a fórmula tornando-a mais satisfatória JUNQUEIRA⁽²⁹⁾; SILVA⁽⁴⁸⁾.

Os diferentes tecidos, normais e tumorais, apresentam quimiossensibilidade variável aos agentes quimio-

rápicas. De maneira geral, observa-se que os tumores apresentam uma sensibilidade um pouco maior àqueles dos tecidos que lhes dão origem. Isto ocorre em virtude do tecido tumoral apresentar maior número de mitoses que o tecido normal, do qual procede. Em geral, observa-se um comportamento semelhante ao da radiosensibilidade. Pode-se até aplicar à quimiossensibilidade a mesma "lei", da radioterapia, de Bergonié e Tribondeau, que diz: "A radiosensibilidade de um tecido normal ou tumoral é diretamente proporcional à sua atividade mitótica e indiretamente proporcional à sua diferenciação celular". Esta característica de quimiossensibilidade representa outra dificuldade e requer cuidados especiais na administração dos agentes quimioterápicos JUNQUEIRA⁽³⁰⁾; RAMOS Jr.⁽⁴³⁾; STOLL⁽⁴⁹⁾.

Em relação à idade, a sensibilidade e a tolerância dos indivíduos variam de uma forma bem evidente, aos agentes quimioterápicos. As crianças, principalmente nas idades mais tenras, são mais sensíveis e mostram uma tolerância menor. O organismo de pessoas senis, pelo seu metabolismo menos intenso, revela menor sensibilidade. Por outro lado, sabendo-se que há uma redução da quantidade de medula óssea vermelha, à medida que a idade avança, tem-se a considerar que este fator conduz a riscos nos tratamentos. Isto porque o quadro hematológico tem fundamental importância vital a ser lesado pela maioria dos agentes quimioterápicos JUNQUEIRA⁽³⁰⁾.

Em organismos submetidos anteriormente à radiação e aos agentes quimioterápicos, geralmente observam-se uma

queda na tolerância e efeito menor a esses agentes, JUNQUEIRA⁽³⁰⁾; STOLL⁽⁴⁹⁾.

As pesquisas relacionadas à ação antineoplásica pelos antibióticos foram iniciadas a partir da observação feita na Alemanha em 1952 por HACKMANN⁽²⁰⁾. Essa observação indicava que a actinomicina C, antibiótico extraído de microrganismos do gênero *Streptomyces*, possuía, além de potente efeito antimicrobiano, também ação antitumoral JUNQUEIRA⁽²⁹⁾.

Esse novo campo de pesquisa despertou interesse no Japão, que, com o trabalho de UMEZAWA *et al.*⁽⁵⁹⁾, em 1954, relacionado ao antibiótico por ele descoberto e denominado sarcomicina, isolado do *Streptomyces erythrochromogenes*, representou a retomada nessa linha de pesquisa JUNQUEIRA⁽²⁹⁾.

Seguiram-se as pesquisas de MAEDA *et al.*⁽³⁵⁾ em 1956; TAKITA⁽⁵²⁾ e TAKITA *et al.*⁽⁵³⁾, ambos em 1959, sobre o novo antibiótico denominado "phleomycin" produzido a partir do *Streptomyces verticillus*, que propiciaram a descoberta da bleomicina por UMEZAWA *et al.*⁽⁵⁸⁾, em 1966. A produção da bleomicina também se deu a partir do "*Streptomyces verticillus*", cuja cepa foi isolada de uma amostra de solo coletada de uma mina de carvão em Kaño - gun. no Japão, UMEZAWA *et al.*⁽⁵⁷⁾.

A bleomicina é um antibiótico glicopeptídico de ação sobre bactérias Gran-positivas e Gran-negativas; entretanto sua ação mais importante, se dá sobre as células tumorais, principalmente sobre o carcinoma das células escamosas [BLUM *et al.* (6); CROOKE & BRADNER (12); GREY & MICHAELS (19); HUNTINGTON *et al.* (26); ISHIZUKA *et al.* (28); KAPSTAD & BANG (32); SUZUKI *et al.* (50) e TAKEUCHI & YAMAMOTO (51)].

No mecanismo de ação, a bleomicina liga-se ao DNA, produzindo divisão de sua cadeia [CLARKSON & HUMPHREY (9); COX *et al.* (11); CROOKE & BRADNER (12); HAIDLE (21); HAIDLE & BEARDEN (22); HAIDLE *et al.* (23, 24); MIYAKI *et al.* (38); SUZUKI *et al.* (50) e TANAKA (55)].

Com os trabalhos de BORSTEIN *et al.* (8), HITTELMAN & RAO (25), KURTEN & OBE (33), PAIKA & KRISHAN (41) e TAMURA *et al.* (54), demonstrou-se que a bleomicina induz aberrações cromossômicas.

Na fase de desenvolvimento embrionário, podem ocorrer alterações de maior ou menor gravidade, podendo resultar ao recém nascido marcantes diferenças em relação aos demais de sua espécie.

Quando o anormal resulta em defeito morfológico, denomina-se malformação. As malformações leves não impõem restrições à vida do indivíduo, como por exemplo os dedos extra-numerarios (polidactilia). Na malformação grave, ocasionando acentuada deformidade, denomina-se monstruosidade ou teratogenia (do greg. teratos = monstro). A teratogenia tem entretan-

to, um sentido mais amplo, ocupando-se de todos os tipos de malformações [JUNQUEIRA & ZAGO⁽³¹⁾; LANGMAN⁽³⁴⁾].

Pelo exposto, fica explícito a importância das drogas antineoplásicas e o estudo de seus efeitos colaterais.

O presente trabalho se propõe a estudar os efeitos da bleomicina, em ratos da raça Wistar (var. *Swiss albinus*), procurando verificar:

1. As variações de peso e aspectos físicos externos gerais, em ratas prenhas.
2. O número de nascimentos, número de vivos e de mortos e aspectos físicos externos gerais dos fetos após laparotomia.
3. O número de nascimentos, número de vivos e de mortos e de aspectos físicos externos gerais, ao nascimento e até a 24ª semana de idade, dos nascidos com parto natural.
4. Os aspectos microscópicos de desenvolvimento dental.
5. O crescimento dental na 12ª semana de idade.

II - MATERIAL E MÉTODOS

A. MATERIAL

1. ANIMAIS

Foram utilizadas 30 ratas da raça Wistar (var. *Swiss albinus*) virgens, com três meses de idade e com peso médio de 211 g. Essas ratas foram acasaladas com 15 machos da mesma raça e idade.

Durante todo o experimento, os animais receberam ração da marca Ceres do tipo granulado e água potável *ad libitum*.

2. DROGA

Foi utilizada a Bleomicina (Blenoxane^R) - Labor-terápica Bristol. Apresentação em ampolas com 15 mg, em forma de pó, para diluição em solução fisiológica.

B. MÉTODOS

1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No presente trabalho, foram estabelecidos os seguintes grupos:

1.1. Grupo controle

Constituído por 10 fêmeas prenhas que receberam 0,1 ml/kg de animal, de solução fisiológica (placebo) por via intraperitoneal.

1.2. Grupo com bleomicina a 0,6 mg/kg

Constituído por 10 fêmeas prenhas que receberam 0,6 mg/kg de bleomicina por via intraperitoneal.

1.3. Grupo com bleomicina a 1 mg/kg

Constituído por 10 fêmeas prenhas que receberam 1 mg/kg de bleomicina por via intraperitoneal.

As dosagens utilizadas, tanto da solução fisiológica como da bleomicina, são aquelas preconizadas por MATSUDA *et al.* (37).

2. SISTEMATIZAÇÃO EXPERIMENTAL

2.1. Experimentação com as fêmeas prenhas

2.1.1. Determinação da prenhez

Os animais foram acasalados na proporção de duas fêmeas para um macho. Na manhã seguinte ao acasalamento, foram examinadas as características das células do muco vaginal das ratas, ao microscópio óptico, para se detectar a fase de estro, que corresponde ao início da prenhez [GANONG⁽¹⁷⁾; MATSUDA *et al.* (37); NICHOLAS⁽⁴⁰⁾]. Ao sétimo dia, antes de se iniciar a administração da droga, foram analisadas novamente as características das células do muco vaginal das ratas, bem como o aumento de peso e de volume abdominal.

A partir desses exames, as ratas prenhas foram divididas em três grupos, de dez animais e colocadas nas respectivas gaiolas.

2.1.2. Administração do soro fisiológico e da bleomicina

Para cada grupo, as respectivas doses foram administradas diariamente, do 9º ao 14º dia da prenhez [MATSUDA *et al.* (37)].

2.1.3. Pesagem diária das fêmeas prenhas

Diariamente foram registrados os pesos das fêmeas prenhas, até o parto natural ou laparotomia por volta do 20º ou 21º dia.

2.1.4. Verificação diária dos aspectos físicos externos gerais, das fêmeas prenhas

Diariamente, durante a prenhez, verificaram-se os aspectos físicos externos gerais das fêmeas prenhas, segundo FARRIS & GRIFFITH⁽¹⁵⁾.

2.2. Observação dos fetos

No 21º dia de prenhez, cinco ratas de cada grupo, sob o efeito do éter sulfúrico por inalação, conforme Fig. 2, foram sacrificadas e laparotomizadas imediatamente, conforme

Fig. 3. A seguir procedeu-se a observação dos fetos.

2.2.1. Registro ao nascimento do número dos vivos e dos mortos

2.2.2. Verificação macroscópica com lupa, dos aspectos físicos externos gerais

A seguir, procedeu-se a observação macroscópica, a través de lupa, dos pêlos, olhos, orelhas, troncos, membros e genitália. Registrou-se também os casos de morte, conforme FARRIS & GRIFFITH⁽¹⁵⁾ e MATSUDA *et al.*⁽³⁷⁾.

2.2.3. Verificação microscópica dental

Os fetos sob o efeito do éter sulfúrico por inalação foram decapitados. As mandíbulas foram removidas e fixa das em formal a 10%, por 12 horas. A seguir foram submetidas ao processamento histológico, sendo obtidos cortes seriados de 7 micrômetros, dos incisivos, no sentido sagital e dos molares, no frontal, corados em hematoxilina eosina para os exames ao microscópio óptico das estruturas dentais. Nos exames histológicos a preocupação foi no sentido de analisar as zonas embrionária, de diferenciação, secretora e pós secretora dos incisivos inferiores dos ratos, conforme descrito por COSTA⁽¹⁰⁾, 1978.

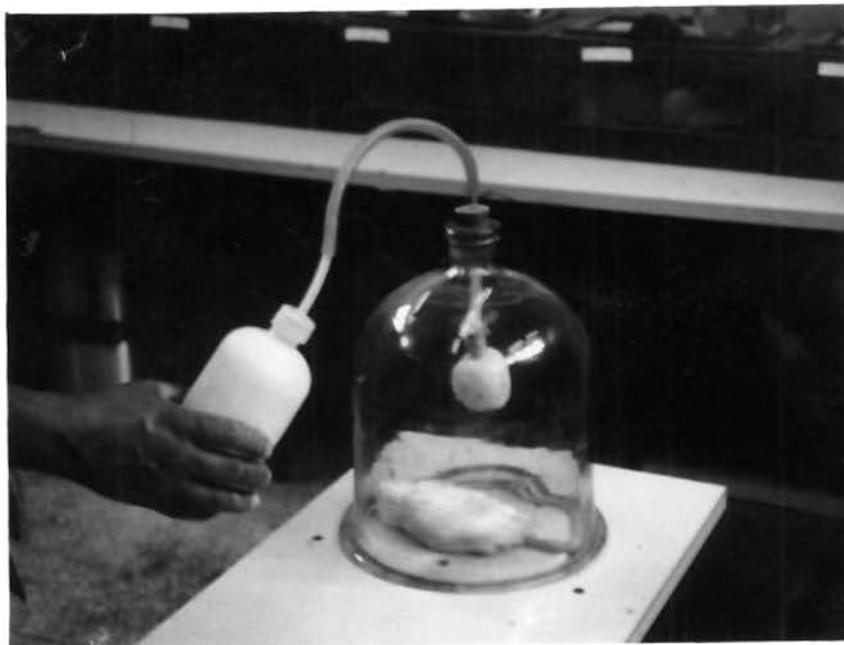


FIG. 2 - Anestesia por inalação com éter sulfúrico, sob campânula de vidro.

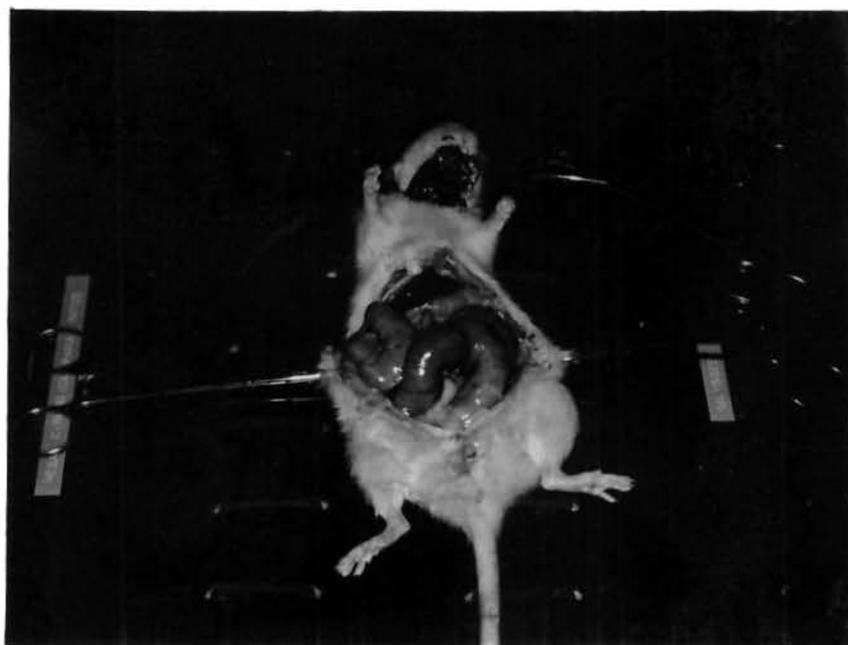


FIG. 3 - Sacrifício e laparotomia das ratas prenhas, para experimentação com os fetos.

2.3. Experimentação dos recém nascidos, com parto natural

As cinco fêmeas prenhas restantes de cada grupo foram deixadas para o parto natural. Procedeu-se então à experimentação com os recém nascidos.

2.3.1. Registro ao nascimento do número dos vivos e dos mortos

2.3.2. Verificação macroscópica com lupa, dos aspectos físicos externos gerais

Verificaram-se os aspectos macroscópicos dos pêlos, olhos, orelhas, troncos, membros e genitália. Registraram-se também os casos de morte.

2.3.3. Verificação macroscópica semanal com lupa, dos aspectos físicos externos gerais, alterações de comportamento e contagem de mortos, até a 24ª semana de idade

Os recém nascidos de ambos os sexos permaneceram juntos, nos respectivos grupos até a 3ª semana de idade, quando então foram desmamados. Depois foram separados os machos das fêmeas e reagrupados nos respectivos grupos. Receberam água potável e ração da marca Ceres do tipo granulado, *ad libitum*.

Atê a 24ª semana de idade, observaram-se, com lupa, os aspectos físicos externos gerais dos pêlos, olhos, orelhas, troncos, membros e genitália. Registraram-se também os casos de alterações de comportamento e definhamento com morte, conforme FARRIS & GRIFFITH⁽¹⁵⁾ e MATSUDA *et al.*⁽³⁷⁾.

2.3.4. Verificação do crescimento dental, na 12ª semana de idade

Utilizou-se para a verificação do crescimento dental, cinco ratas de cada grupo. Tal verificação foi feita pelo método proposto por SCHOUR & MASSLER⁽⁴⁶⁾ e usado por MASSINI⁽³⁶⁾ 1976; RANALI⁽⁴⁴⁾ 1976 e COSTA⁽¹⁰⁾ 1978.

2.3.4.1. Marcação dos dentes

Na 12ª semana de idade, os animais foram anestesiados com éter sulfúrico por inalação, conforme Fig. 2. Seguiu-se a marcação base dos incisivos inferiores direito e esquerdo, preparando um pequeno sulco horizontal no limite dento gengival da face vestibular, não lesando a mucosa gengival, conforme a Fig. 4.

Para a marcação base, utilizou-se um disco metálico de 3/4 de polegada da marca Horico, movido por motor odontológico portátil de baixa rotação (6.000 rpm).

2.3.4.2. Medição do crescimento dental

A medida do crescimento dental é dada pela distância entre o limite dento gengival e a marcação base efetuada.

Efetuaram-se três medidas, em intervalos de três dias, isto é, no 4º, 7º e 10º dia após a marcação base. Para essas medidas foi usado um compasso de pontas secas, diretamente sobre os dentes. As medidas eram transferidas em paquímetro e lidas em milímetros.



FIG. 4 - Marcação base executada sobre a face vestibular dos incisivos inferiores.

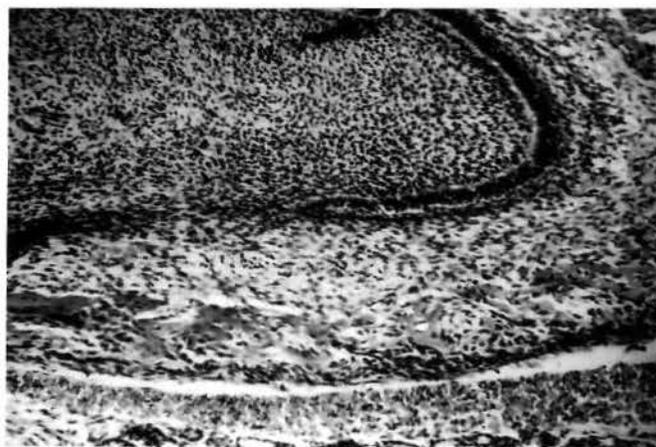


FIG. 5 - Aspectos microscópicos de amelogênese de filhotes de ratas que receberam bleomicina, onde pode ser notada a normalidade das estruturas da zona embrionária.

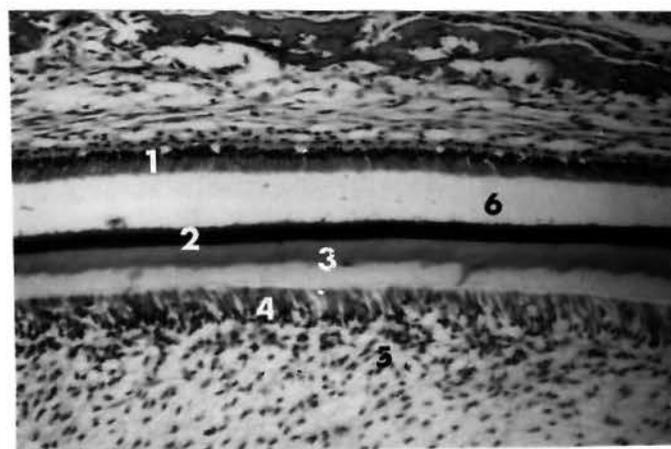


FIG. 6 - Aspectos microscópicos de amelogênese de filhotes de ratas que receberam bleomicina, onde pode ser notada a normalidade das estruturas da zona secretora, a saber: 1. camada de ameloblastos, sobreposta pelo estrato intermediário; 2. matriz de esmalte; 3. matriz dentinária; 4. camada odontoblástica; 5. tecido pulpar e 6. artifício de técnica.

2.3.4.3. Avaliação estatística das mensurações

Para a avaliação estatística das mensurações do crescimento dentário dos ratos, foi feita uma análise de variância em parcelas subdivididas ("Split-plot"). Foi utilizado o teste de Tukey para comparar médias de crescimento relativas aos três grupos.

2.3.4.4. Verificação microscópica dental

As observações microscópicas do desenvolvimento dental, em ratos feitos em cortes preparados, de acordo com o descrito no ítem 2.2.3.

III - RESULTADOS

A. EXPERIMENTAÇÃO COM AS FÊMEAS PRENHAS

A.1 - PESAGEM DIÁRIA

Os registros diários de pesos estão nas tabelas 1.a, 1.b e 1.c. A simples observação dessas tabelas mostra que o aumento de peso nos três grupos, foi semelhante, isto é, não existem diferenças entre o peso de ratas do grupo controle e dos grupos de bleomicina a 0,6 e 1 mg/kg.

A.2 - VERIFICAÇÃO DIÁRIA DOS ASPECTOS FÍSICOS EXTERNOS GERAIS

Não se observou anormalidade nos aspectos físicos externos gerais de ratas do grupo controle e dos grupos de bleomicina a 0,6 e 1 mg/kg.

B. OBSERVAÇÃO DOS FETOS, APÓS LAPAROTOMIA

B.1 - REGISTRO AO NASCIMENTO DO NÚMERO DOS VIVOS E DOS MORTOS, E O RESPECTIVO PERCENTUAL DE MORTOS

O número dos fetos vivos e mortos, através da laparotomia, bem como o percentual de natimortos, estão apre-

sentados na tabela 2. Essa tabela mostra que o número de fetos nascidos vivos, no grupo controle é bem maior do que em ambos os grupos de bleomicina e também mostra que o percentual de natimortos é maior em ambos os grupos de bleomicina do que no grupo controle. Também pode-se observar que o percentual de natimortos é mais alto para o grupo de bleomicina a 1 mg/kg.

B.2 - VERIFICAÇÃO MACROSCÓPICA COM LUPA, DOS ASPECTOS FÍSICOS EXTERNOS GERAIS

As observações dos aspectos físicos externos gerais, não revelaram qualquer anomalia.

B.3 - VERIFICAÇÃO MICROSCÓPICA DENTAL

A análise microscópica do desenvolvimento dental, com a atenção voltada mais para o órgão do esmalte de incisivo do rato, permitiu observar, nas diversas zonas de amelogenese - embrionária, de diferenciação, secretora e pós secretora-, aspectos que indicavam a normalidade destas estruturas, sem que pudesse ser notada qualquer alteração provocada pela administração de bleomicina nas doses de 0,6 e 1 mg/kg, Figuras 5 e 6.

C. EXPERIMENTAÇÃO COM OS RECÊM NASCIDOS, DE PARTO NATURAL

C.1 - REGISTRO AO NASCIMENTO DO NÚMERO DOS VIVOS E DOS MORTOS, E O RESPECTIVO PERCENTUAL DE MORTOS

O número de nascidos vivos, no grupo controle, foi bem maior do que em ambos os grupos de bleomicina, conforme mostra a tabela 2. Registre-se que o percentual de mortes foi proporcional à dose administrada, sendo mais elevado para a dose mais alta, isto é, de 1 mg/kg.

C.2 - VERIFICAÇÃO MACROSCÓPICA COM LUPA, DOS ASPECTOS FÍSICOS EXTERNOS GERAIS

Não se observou anormalidade nos aspectos físicos externos gerais de recém-nascidos de parto natural do grupo controle e dos grupos de bleomicina a 0,6 e 1 mg/kg.

C.3.- VERIFICAÇÃO MACROSCÓPICA SEMANAL COM LUPA, DOS ASPECTOS FÍSICOS EXTERNOS GERAIS, ALTERAÇÕES DE COMPORTAMENTO E PERCENTUAL DE MORTOS, ATÉ A 24ª SEMANA DE IDADE

Não foram observadas alterações de comportamento

to, ou anormalidades nos aspectos físicos externos gerais, até a 24ª semana de idade, nos ratos do grupo controle e dos grupos de bleomicina a 0,6 e 1 mg/kg. Na tabela 3 estão apresentados os números de nascidos vivos, os números de mortos no período e os respectivos percentuais. É fácil verificar que o percentual de ratos mortos, durante o período de 24 semanas, aumenta em função da dose de bleomicina, isto é, para o placebo o percentual é 1,43%, para 0,6 mg/kg de bleomicina é 30,19% e para 1 mg/kg de bleomicina atinge o valor de 45,83%.

C.4 - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS MENSURAÇÕES DO CRESCIMENTO DENTAL, NA 12ª SEMANA DE IDADE

Os dados de crescimento dental em milímetros, dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos cujas mães receberam placebo (controle) e de ratos cujas mães receberam bleomicina nas dosagens de 0,6 a 1 mg/kg, estão apresentados nas tabelas 4, 5 e 6, respectivamente para o 40, 70 e 100 dia de observação.

Tais dados foram submetidos à análise de variância, em parcelas subdivididas ("Split-plot"). Os resultados dessas análises estão apresentados nas tabelas 4.a, 5.a e 6.a, referentes ao 40, 70 e 100 dia de observação.

Essas tabelas mostram que não existe variabilidade entre os dados obtidos no lado esquerdo e direito do mesmo rato, uma vez que a soma de quadrados, relativa a la-

dos, é sempre igual a zero.

O efeito da bleomicina foi avaliado estatisticamente através do teste F. Os valores de F nas tabelas 4.a e 5.a não são significantes ao nível de 5%. Podemos então concluir que, no 4º e 7º dia de observação, não se registrou diferença no crescimento médio aferido, dos ratos cujas mães foram submetidas a dosagens diferentes.

Por outro lado, o valor de F apresentado na tabela 6.a é significativa ao nível de 5%. Podemos então afirmar que, no 10º dia, se observou diferença significativa entre as médias de crescimento dental. Procedendo-se ao teste de Tukey, ficou demonstrado que a média do grupo controle é estatisticamente maior do que as médias dos grupos que receberam bleomicina a 0,6 e 1 mg/kg. Entretanto, não houve diferença significativa entre as médias de crescimento dental relativas às dosagens de bleomicina a 0,6 e 1 mg/kg.

Para melhor esclarecer os resultados, contidos na análise de variância, calcularam-se as diferenças entre as médias de crescimento dental, relativas aos 4º e 10º dias, para cada grupo. Tais valores estão apresentados na tabela 7. É fácil ver que as diferenças entre as médias de crescimento dental, no período entre o 4º e 10º dia, é maior para ratos do grupo controle do que de ambos os grupos de ratos cujas mães receberam bleomicina.

Em resumo, o experimento demonstrou que no 10º dia de observação, os ratos cujas mães receberam bleomicina

tanto na dosagem de 0,6 como 1 mg/kg, apresentavam crescimento dental significativamente menor, do que os ratos cujas mães receberam placebo.

Tabela 1.a - Pesos diários em gramas, das fêmeas prenhas, do grupo controle.

Ratas	Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1		234	235	235	240	244	247	247	253	255	261	261	273	285	304	311	328	323	330	340	345	
2		170	171	171	175	180	184	187	192	196	194	197	198	203	211	218	230	233	251	254	257	
3		181	182	185	188	190	190	192	194	193	198	202	203	209	212	223	231	241	245	252	258	267
4		242	241	245	246	247	245	248	252	258	269	275	280	287	290	296	299	301	309	315	319	325
5		239	241	245	246	247	245	248	251	258	260	265	269	274	278	280	287	295	300	304	307	
6		197	198	199	200	203	199	206	206	210	218	226	230	235	239	245	252	258	264	269	275	280
7		258	260	262	264	265	266	267	269	273	275	278	285	290	295	300	308	316	322	329	336	346
8		249	250	253	258	264	264	266	268	270	273	276	282	286	291	294	301	306	309	315	323	331
9		203	205	209	211	214	216	219	223	229	233	238	242	244	248	251	258	263	270	278	288	295
10		230	234	238	240	242	245	244	246	250	251	255	260	264	269	271	276	280	284	289	294	

Tabela 1.b - Pesos diários em gramas, das fêmeas prenhas, do grupo com bleomicina a 0,6 mg/kg.

Ratas	Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1		215	220	222	222	224	228	231	231	234	235	237	240	245	248	251	258	267	275	281	289	
2		230	232	234	234	237	239	246	247	251	255	259	264	268	273	278	282	287	291	297	303	
3		214	219	218	220	222	225	230	234	236	238	239	241	245	248	250	255	260	268	278	284	
4		212	214	216	217	218	221	225	231	231	233	234	236	240	242	245	249	253	260	266	273	280
5		222	227	229	227	229	234	238	239	242	244	248	249	253	258	263	269	275	281	288	296	301
6		237	238	238	240	242	247	246	249	250	251	253	250	253	261	260	264	274	286	297	300	308
7		264	268	267	271	274	279	281	280	278	283	285	292	294	298	299	302	307	309	311	318	
8		211	214	223	226	228	227	228	231	233	234	240	240	248	248	250	254	257	267	273	281	290
9		185	187	191	191	193	197	201	203	203	206	208	208	213	215	219	224	227	232	241	248	258
10		175	176	178	178	180	182	185	185	189	193	194	196	199	202	206	209	213	219	222	229	

Tabela 1.c - Pesos diários em gramas, das fêmeas prenhas, do grupo com bleomicina a 1 mg/kg.

Ratas	Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1		221	226	228	227	234	235	233	236	239	236	241	237	237	243	245	253	263	270	279	284	289
2		216	215	214	218	219	221	224	227	225	221	225	226	229	240	241	247	250	258	264	271	
3		210	213	219	219	222	225	223	228	233	232	241	237	246	247	258	267	276	286	294	299	305
4		229	233	235	234	238	241	244	245	249	247	253	247	249	252	256	262	282	289	295	299	308
5		260	257	261	262	266	266	272	277	279	277	280	281	285	293	308	313	319	323	341	347	350
6		215	220	221	222	227	227	228	227	230	230	237	237	238	242	249	254	266	271	275	282	
7		207	212	212	210	216	218	218	218	220	215	224	227	228	229	238	247	258	263	272	273	
8		202	207	212	213	217	220	218	222	225	221	230	225	223	227	239	240	253	259	275	279	
9		227	230	235	238	238	239	241	240	248	245	251	243	244	245	245	250	260	266	279	283	
10		220	222	225	220	222	219	224	228	228	230	231	228	236	242	236	243	248	255	265	276	

Tabela 2 - Registro do número dos vivos e dos mortos, ao nascimento com parto natural ou através de laparotomia e o respectivo percentual de natimortos.

Grupo	Parto natural			Laparotomia			Total		
	Nº de ratas	vivos	mortos %	Nº de ratas	vivos	mortos %	Nº de ratas	vivos	mortos %
Placebo	5	70	2 2,78	5	71	2 2,74	10	141	4 2,76
Bleomicina a 0,6 mg/kg	5	53	2 3,64	5	48	3 5,88	10	101	5 4,72
Bleomicina a 1 mg/kg	5	48	7 12,73	5	52	5 8,77	10	100	12 10,71

Tabela 3 - Registro do número de mortos e o respectivo percentual, de nascidos vivos com parto natural, até a 24ª semana de idade.

Grupos	Nascidos vivos	Mortos no período	%
Placebo	70	1	1,43
Bleomicina a 0,6 mg/kg	53	16	30,19
Bleomicina a 1 mg/kg	48	22	45,83

Tabela 4 - Crescimento em milímetros dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos cujas mães prenhas receberam bleomicina (0,6 e 1 mg/kg) e o grupo controle com soro fisiológico (placebo), no quarto dia de observação.

ratos	bleomicina										
	placebo			0,6 mg/kg			1 mg/kg				
	D	E	total	ratos	D	E	total	ratos	D	E	total
1	0,9	1,1	2,0	6	0,7	0,5	1,2	11	0,7	0,5	1,2
2	0,6	0,5	1,1	7	0,5	0,4	0,9	12	0,9	0,9	1,8
3	0,5	0,4	0,9	8	0,6	0,4	1,0	13	0,6	0,6	1,2
4	0,7	0,5	1,2	9	0,5	0,5	1,0	14	0,9	0,9	1,8
5	0,8	1,0	1,8	10	0,4	0,5	0,9	15	1,1	0,9	2,0
Médias			0,7				0,5				0,8

Tabela 4.a - Análise de variância relativa aos dados da tabela 4.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Dosagens	2	0,4667	0,2333	2,33
Resíduo(a)	12	1,2	0,10	
Ratos	14	1,6667		
Lados	1	0	0	
Resíduo(b)	14	0	0	
Total	29	1,6667		

Tabela 5 - Crescimento em milímetros dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos cujas mães prenhas receberam bleomicina (0,6 e 1 mg/kg) e o grupo controle com soro fisiológico (placebo), no sétimo dia de observação.

	bleomicina										
	placebo			0,6 mg/kg			1 mg/kg				
ratos	D	E	total	ratos	D	E	total	ratos	D	E	total
1	2,0	1,8	4,0	6	2,2	2,0	4,2	11	2,1	2,0	4,1
2	2,1	2,2	4,3	7	2,9	2,8	5,7	12	2,1	2,1	4,2
3	1,9	1,9	3,8	8	0,9	1,1	2,0	13	1,9	2,1	4,0
4	1,9	2,0	3,9	9	1,9	1,9	3,8	14	2,9	3,0	5,9
5	2,1	2,1	4,2	10	1,1	1,2	2,3	15	3,8	4,0	7,8
Médias			2,0				1,8				2,6

Tabela 5.a - Análise de variância relativa aos dados da tabela 5.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Dosagens	2	3,4667	1,7333	1,73
Resíduo(a)	12	12,00	1,000	
Ratos	14	15,4667		
Lados	1	0	0	
Resíduo(b)	14	0	0	
Total	29	15,4667		

Tabela 6 - Crescimento em milímetros dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos cujas mães prenhas receberam bleomicina (0,6 e 1 mg/kg) e o grupo controle com soro fisiológico (placebo), no décimo dia de observação.

ratos	bleomicina											
	placebo			0,6 mg/kg			1 mg/kg					
	D	E	total	ratos	D	E	total	ratos	D	E	total	
1	4,5	4,7	9,2	6	3,1	2,8	5,9	11	2,9	2,8	5,7	
2	4,9	4,8	9,7	7	3,9	3,9	7,8	12	3,1	3,0	6,1	
3	4,9	4,9	9,8	8	2,6	2,3	4,9	13	3,1	2,8	5,9	
4	4,8	5,2	10,0	9	3,2	3,1	6,3	14	4,1	4,1	8,2	
5	4,7	4,6	9,3	10	2,6	2,5	5,1	15	3,9	4,2	8,1	
Médias			4,8				3,0				3,4	

Tabela 6.a - Análise de variância relativa aos dados da tabela 6.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Dosagens	2	17,8667	8,9333	17,87
Resíduo(a)	12	6,00	0,5	
Ratos	14	23,8667		
Lados	1	0	0	
Resíduo(b)	14	0	0	
Total	29	23,8667		

Tabela 7 - Diferenças entre as médias de crescimento dental, do 40 e 100 dias.

Grupo	Diferença
Placebo	4,1
Bleomicina a 0,6 mg/kg	2,5
Bleomicina a 1 mg/kg	2,6

IV - DISCUSSÃO

Na clínica, a bleomicina tem ação, além das já mencionadas na introdução, sobre o carcinoma epidermóide, no carcinoma planicelular da cabeça e do pescoço, no linfossarcoma, no sarcoma de Kaposi, no reticulossarcoma, na doença de Hodgkin, no carcinoma do testículo e no coriocarcinoma. Apresenta ação também em certos casos de câncer da mama e pode ser útil na micose fungóide. A toxicidade renal da bleomicina é muito pequena ERLICH⁽¹⁴⁾ e ANDREI⁽²⁾. O efeito colateral mais severo da bleomicina se dá nos pulmões, podendo produzir sintomas com as características de uma pneumonia, que rapidamente pode progredir para fibrose pulmonar e até a morte em alguns pacientes, ANDREI⁽²⁾ e PASCUAL *et al.*⁽⁴²⁾. Contudo, freqüentes radiografias do tórax e medidas da função pulmonar devem ser realizadas, particularmente em pacientes idosos. Se um paciente desenvolver sinais de pneumonia, a administração da bleomicina deve ser imediatamente interrompida e substituída ANDREI⁽²⁾. Para a pele, a maioria dos pacientes desenvolvem alterações como: pigmentação, espessamento, vermelhidão e ulcerações dolorosas nos pontos de pressão como as pontas dos dedos e cotovelos. Alopecia e alterações das unhas e leitos ungueais são também comuns. A estomatite também se apresenta. Os efeitos de toxicidade sobre a pele e mucosa são reversíveis após o término do tratamento ANDREI⁽²⁾ e ERLICH⁽¹⁴⁾. Em camundongos apresenta fibrose cutânea ICHIHASHI *et al.*⁽²⁷⁾ e fibrose pulmonar ADAMSON⁽¹⁾.

Não apresenta ototoxicidade quando administrada por via parenteral, entretanto apresenta lesão coclear, se injetada no ouvido médio DAL *et al.* (13).

A característica mais notável da bleomicina é o fato de raramente causar lesão da medula óssea. Até a descoberta da bleomicina, a lesão da medula óssea era considerada um efeito colateral inevitável das drogas antineoplásicas ANDREI⁽²⁾; BOGGS *et al.* (7); BORSTEIN *et al.* (8) e ERLICH⁽¹⁴⁾.

No presente trabalho, verificou-se que o aumento de peso das fêmeas prenhas nos três grupos foi proporcional, não tendo ocorrido diferença significativa entre o grupo controle e os dois grupos com bleomicina. O mesmo se observou com respeito a algumas anormalidades que seriam produzidas pela droga, isto é, nada de anormal ocorreu. Isto vem demonstrar que as doses empregadas no presente trabalho não tiveram efeito de toxicidade sobre as fêmeas prenhas, confirmando as indicações e os resultados de MATSUDA *et al.* (37). As condições de manutenção e alimentação das fêmeas prenhas e dos animais que nasceram foram padronizadas e mantidas desde o início até o final do experimento.

Visto que, como a bleomicina induz aberrações cromossômicas BORSTEIN *et al.* (8); CROOKE & BRADNER⁽¹²⁾; HITTELMAN & OBE⁽²⁵⁾; KURTEN & ROE⁽³³⁾; PAIKA & KRISHAN⁽⁴¹⁾ e TAMURA *et al.* (54), era de se esperar que apresentasse efeito colateral sobre os fetos. Assim sendo, ao nascimento evidenciou-se o efeito colateral sobre os fetos, pela bleomicina, ve

rificando-se um menor número de nascidos vivos e um percentual maior de natimortos em ambos os grupos de bleomicina em relação ao grupo controle. Ficou demonstrado também que o percentual é mais alto para o grupo de bleomicina de dose maior, ou seja 1 mg/kg.

A partir do nascimento e no período até a 24ª semana de idade os ratos nos três grupos não apresentaram nenhuma anomalia dos aspectos físicos externos gerais, bem como de comportamento, confirmando os resultados de MATSUDA *et al.* (37). Por outro lado, o efeito colateral da droga afetou os animais sensivelmente inclusive neste período, pois, para ratos cujas mães receberam bleomicina, corresponderam percentuais de mortos muito elevados, ou seja aproximadamente 30 e 46% para as doses de 0,6 e 1 mg/kg respectivamente, comparados com o percentual ocorrido para o grupo com placebo, da ordem de 2%. Verifica-se também que o percentual de mortos aumenta em função da dose, isto é, para o grupo com placebo o percentual é de 1,43%, para o grupo de bleomicina com 0,6 mg/kg é de 30,19% e para o grupo de bleomicina com 1 mg/kg atinge 45,83%.

Os dados acima são significativos, visto que 3% dos humanos que nascem apresentam anomalias congênitas SHEPARD & LEMIRE (47); JUNQUEIRA & ZAGO (31) e LANGMAN (34).

Nos seres humanos, o período teratogênico, altamente sensitivo, ocorre entre a terceira e oitava semana de gravidez, que corresponde à fase embrionária. Na fase fetal,

da nona semana até o nascimento, continua o período teratogênico, porém de menor sensibilidade que na fase embrionária [MOORE⁽³⁹⁾ e LANGMAN⁽³⁴⁾].

Torna-se importante lembrar que a talidomida, por volta de 1960, tomada pelas gestantes no período teratogênico, altamente sensitivo, causou 10.000 malformações graves ao nascimento, sendo portanto altamente teratogênico e determinando uma catástrofe [SHEPARD & LEMIRE⁽⁴⁷⁾ e LANGMAN⁽³⁴⁾].

O período teratogênico altamente sensitivo nos ratos da raça Wistar (var. *Swiss albinus*), corresponde do 9º ao 14º dia de prenhez.

O percentual de natimortos do presente trabalho não pode ser considerado como efeito teratogênico e, sim, efeito de toxicidade de bleomicina, pois os natimortos e os mortos no período de 24 semanas apresentavam aspectos físicos externos gerais idênticos nos três grupos e não apresentavam malformações. Assim sendo, a bleomicina não apresentou efeito teratogênico, coincidindo com os resultados de MATSUDA *et al.* (37).

O crescimento dental aferido com o grupo controle se ajustou dentro dos padrões de normalidades descritos por MASSINI⁽³⁶⁾; RANALI⁽⁴⁴⁾ e COSTA⁽¹⁰⁾, podendo ser considerados válidos para se fazer a comparação com o crescimento dental em ambos os grupos de bleomicina.

Com a verificação do efeito colateral sobre os fetos, pela bleomicina, em relação ao crescimento dental em ra

tos, ficou demonstrado que não existe variabilidade entre os lados esquerdo e direito do mesmo animal, o que era de se esperar. MASSINI⁽³⁶⁾ utilizando a ciclofosfamida, RANALI⁽⁴⁴⁾ e ametopterina e COSTA⁽¹⁰⁾ a colchicina, obtiveram idênticos resultados, sendo que as drogas foram aplicadas diretamente aos ratos. Podendo-se concluir que não haveria variabilidade de crescimento dental em ratos, com relação aos lados direito e esquerdo em novos experimentos com outros agentes quimioterápicos citostáticos, quer administradas à mãe ou ao animal diretamente, com medidas obtidas dessa forma.

De idêntica maneira, não se verificou diferença estatisticamente significativa no crescimento dental dos ratos com os três grupos no 49 e 79 dia de observação.

Resultado diferente verificou-se no 109 dia, pois os ratos, dos grupos com bleomicina a 0,6 e 1 mg/kg, apresentavam crescimento dental significativamente menor do que os ratos do grupo controle. Entretanto, não se verificou diferença significativa no crescimento dental relativas às doses de bleomicina a 0,6 e 1 mg/kg. Pode-se concluir, que o aumento da dosagem não é diretamente proporcional à inibição do crescimento dental e resultado idêntico verificou-se com os trabalhos de MASSINI⁽³⁶⁾; RANALI⁽⁴⁴⁾ e COSTA⁽¹⁰⁾.

A inibição do crescimento dental, no 109 dia de mensuração, não foi considerada como efeito teratogênico e, sim, efeito colateral de bleomicina, pois não se constituiu em malformação.

As observações microscópicas da amelogenese não revelaram qualquer alteração provocada pela administração de bleomicina, sendo que as estruturas das zonas embrionárias, de diferenciação, secretora e pós-secretora apresentaram-se normais, à semelhança dos resultados de COSTA⁽¹⁰⁾, aplicando colchocina.

V - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, nas condições experimentais do presente trabalho, permitem concluir que:

- 1 - Não se verificou efeito colateral nas ratas prenhas.
- 2 - A bleomicina determinou um aumento do número de mortes, tanto ao nascimento como até a 24^a semana, sendo que o percentual de mortes foi maior quando a dose era mais elevada.
- 3 - Uma redução no crescimento dental foi verificada ao 109 dia de mensuração, independente das doses administradas, não havendo diferenças entre os lados direito e esquerdo.
- 4 - Histologicamente, em microscopia de luz transmitida, não foi observada qualquer alteração de amelogenese provocada pela administração de bleomicina.
- 5 - Não foi notado qualquer efeito teratogênico.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ADAMSON, I.Y.R.; DRUMMOND, P.D.; BOWDEN, H. The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Am. J. Pathol., 77(2):185-97, Nov. 1974.
- 2 - ANDREI, E. Compêndio médico. 17.ed. São Paulo, Org. Andrei, 1976. p. 109-11.
- 3 - BARBOSA, J.F. Câncer da boca. 2.ed. São Paulo, Sarvier, 1968. 508 p.
- 4 - BERTELLI, A.P. & FREITAS, J.P.A. Carcinoma mucoepidermóide da parótida. Revta bras. cirurg. (Bol. oncol.), jul./ago. 1967./Separata.
- 5 - -----; COSTA, F.Q.; MIZIARA, J.E.A. Metastatic tumors of the mandible. Oral Surg., 30:21-8, July 1970.
- 6 - BLUM, R.H.; CARTER, S.K.; AGRE, K. A clinical review of bleomycin a new antineoplastic agent. Cancer, 31(4):903-914, Apr. 1973.
- 7 - BOGGS, S.S.; SARTIANO, G.P.; DE MEZZA, A. Minimal bone marrow damage. Cancer Res., 34:1938-42, Aug. 1974.
- 8 - BORSTEIN, R.S. et alii. Cytogenetic effects of bleomycin therapy in man. Cancer Res., 31:2004-7, Dec. 1971.
- 9 - CLARKSON, J.M. & HUMPHREY, R.M. The significance of DNA damage in the cell cycle sensitivity of chinese hamster ovary cells to bleomycin. Cancer Res., 36(7):2345-9, July 1976.

- 10 - COSTA, A.M.D.D. Estudos com a Colchicina no crescimento de dentes de ratos. Piracicaba, 1978. 79p. /Tese (Mestrado) - F.O.P. - UNICAMP/
- 11 - COX, R.; DAUD, A.H.; IRVING, C.C. Damage of rat liver DNA by bleomycin. Biochem. Pharmac., 23(22):3147-51, Nov. 1974.
- 12 - CROOKE, S.T. & BRADNER, W.T. Bleomycin. A review. J. Med., 7(5):334-427, 1976.
- 13 - DAL, I.; EDSMYR, F.; STAHL, J. Bleomycin therapy and ototoxicity. Acta otolar., 75:323-4, Apr. 1973.
- 14 - ERLICH, D. Antibióticos antineoplásicos. Jorn. bras. med., 27(2):42-6, ago. 1974.
- 15 - FARRIS, E.J. & GRIFFITH JR., J.Q., eds. The rat in laboratory investigation. 2.ed. New York, Hafner Publ., 1971. 542 p.
- 16 - FUJII, A.; TAKITA, T.; MAEDA, K.; UMEZAWA, H. Chemistry of bleomycin. XI. The structures of the terminal amines. J. Antibiot., Tokyo, 26(7):398-9, July 1973.
- 17 - GANONG, W.F. Fisiologia médica. 2.ed. São Paulo, Atheneu, 1972. p. 358-9.
- 18 - GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 4.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1973. p. 1242-89.
- 19 - GREY, P. & MICHAELS, L. Bleomycin in advanced squamous-cell carcinoma of head and neck. Med. J. Aust., 2:246-9, July 1972.

- 20 - HACKMANN, C. Experimentelle untersuchungen uber wirkung von actinomycin. Apud JUNQUEIRA, A.C.C., op. cit. ref. 29.
- 21 - HAIDLE, C.W. Fragmentation of DNA by bleomycin. Molec. Pharmac., 7:645-52, 1971.
- 22 - ----- & BEARDEN, J. Effect of bleomycin on an RNA-DNA hibrid. Biochem. biophys. Res. Commun., 65(3): 815-21, 1975.
- 23 - -----; KUO, M.T.; WEISS, K.K. Nucleic acid - specificity of bleomycin. Biochem. Pharmac., 21:3308-12, 1972.
- 24 - -----; WEISS, K.K.; KUO, M.T. Release of free bases from DNA after reaction with bleomycin. Molec. Pharmac., 8(5):831-7, 1972.
- 25 - HITTELMAN, W.N. & RAO, P.N. Bleomycin-induced damage in prematurely condensed chromosomes and its relationship to cell cycle progression in CHO cells. Cancer Res., 34:3433-9, Dec. 1974.
- 26 - HUNTINGTON, M.C.; DU PRIEST, R.W.; FLEITCHER, W.S. Intra-arterial bleomycin therapy in inoperable squamous cell carcinoma. Cancer, 31(1):153-8, Jan. 1973.
- 27 - ICHIHASHI, M.; SHINKAI, H.; TAKEI, M.; SAN0, S. Analysis the mechanism of bleomycin-induced cutaneous fibrosis in mice. J. Antibiot., Tokyo, 26(4):238-42. 1973.
- 28 - ISHIZUKA, M.; TAKAYAMA, H.; TAKEUCHI, T.; UMEZAWA, H. Activity and toxicity of bleomycin. J. Antibiot., Tokyo, 20 A(1):15-24, Jan. 1967.

- 29 - JUNQUEIRA, A.C.C. Antibióticos de ação antineoplásica. In: LACAZ, C.S. Antibióticos. 2.ed. São Paulo, Sarvier, 1969. cap. 27, p. 528-36.
- 30 - ----- . Drogas antimitóticas. In: CORBETT, C.E. Farmacodinâmica. 4.ed. São Paulo, Artes Médicas, 1973. cap. 42, p. 595-615.
- 31 - JUNQUEIRA, L.C.U. & ZAGO, D. Fundamentos de embriologia humana. 2.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. p. 61-85.
- 32 - KAPSTAD, B. & BANG, G. Verrucous carcinoma of the oral cavity treated with bleomycin. Oral Surg., 42(5): 588-90, Nov. 1976.
- 33 - KURTEN, S. & OBE, G. Premature chromosome condensation in the bone marrow of chinese hamsters after application of bleomycin in vivo. Mutation Res., 27(2):285-94, Feb. 1975.
- 34 - LANGMAN, J. Embriologia médica. 2.ed. São Paulo, Atheneu, 1970. p. 85-101.
- 35 - MAEDA, K.; KOSAKA, H.; YAGISHITA, K.; UMEZAWA, H. A new antibiotic, phleomycin. J. Antibiot., Tokyo, 9A(2): 82-5, Mar. 1956.
- 36 - MASSINI, N. Estudo do crescimento dentário em ratos tratados com Ciclofosfamida (Enduxan(R)). Piracicaba, 1976. 35 p. /Tese (Mestrado) - F.O.P. - UNICAMP/
- 37 - MATSUDA, A. et alii. Teratogenicity of bleomycin. Tokyo, Nippon Kayaku Co, 1968. 72 p.

- 38 - MIYAKI, M.; ONO, T.; HORI, S.; UMEZAWA, H. Binding of bleomycin to DNA in bleomycin-sensitive and resistant rat ascites hepatoma cells. Cancer Res., 35:2015-9, Aug. 1975.
- 39 - MOORE, K.L. The developing human; clinically oriented embryology. 2.ed. Philadelphia, Saunders, 1977. p.134-41.
- 40 - NICHOLAS, J.S. Experimental methods and rat embryos. In: FARRIS, E.J. & GRIFFITH JR., J.Q., eds. The rat in laboratory investigation. New York, Hafner Publ., 1971. cap. 4, p. 51-67.
- 41 - PAIKA, K.D. & KRISHAN, A. Bleomycin-induced chromosomal aberrations in cultured mammalian cell. Cancer Res., 33:961-5, May 1973.
- 42 - PASCUAL, R.S.; MOSHER, M.B.; SIKAND, R.S.; DE CONTI, R.C.; BOUHYS, A. Effects of bleomycin on pulmonary function in man. Am. Rev. resp. Dis., 108:211-7, Aug. 1973.
- 43 - RAMOS JR, J. Princípios gerais sobre a quimioterapia do câncer. Regras de terapêutica clínica anticancerosa. In: BARBOSA, J.F. Câncer da boca. 2.ed. São Paulo, Sarvier, 1968. cap. 19, p. 432-41.
- 44 - RANALI, J. Influência da Ametopterina (methotrexato^(R)), sobre o crescimento dentário dos incisivos inferiores dos ratos. Piracicaba, 1976. 41 p. /Tese (Mestrado) - F.O.P. - UNICAMP/
- 45 - SARNAT, B.G. & SCHOUR, I. Câncer da face e da boca. Rio de Janeiro, Científica, 1956. 306 p.

- 46 - SCHOUR, I. & MASSLER, M. The teeth. In: FARRIS, E.J. & GRIFFITH JR., J.Q., eds. The rat in laboratory investigation. New York, Hafner Publ., 1971. cap. 6, p. 104-34.
- 47 - SHEPARD, T.H. & LEMIRE, R.J. The causes, mechanism and prevention of congenital defects. Univ. Wash. Med., 3(4):3-10, 1976.
- 48 - SILVA, J.R.O. Drogas antineoplásicas. Ars curandi, 5(9):60-2, dez. 1978.
- 49 - STOLL, B.A. Radioterapia. São Paulo, Sarvier, 1968. 280 p.
- 50 - SUZUKI, H.; NAGAI, K.; YAMAKI, H.; TANAKA, N.; UMEZAWA, H. On the mechanism of action of bleomycin: scission of DNA strands in vitro and in vivo. J. Antibiot., Tokyo, 22(9):446-8, Sept. 1969.
- 51 - TAKEUCHI, M. & YAMAMOTO, T. Effects of bleomycin on mouse transplantable tumors. J. Antibiot., Tokyo, 21(11):631-7, Nov. 1968.
- 52 - TAKITA, T. Studies on purification and properties of phleomycin. J. Antibiot., Tokyo, 12 A(6):285-9, Nov. 1959.
- 53 - -----; MAEDA, K.; UMEZAWA, H. Studies on phleomycin. J. Antibiot., Tokyo, 12 A(3):111, May 1959.
- 54 - TAMURA, H.; SUGIYAMA, Y.; SUGAHARA, T. Effect of bleomycin on the chromosomes of human lymphocytes at various cell phases. Gann, 65:103-7, Apr. 1974.

- 55 - TANAKA, N. Inhibition of transcription by pluramycin and bleomycin. J. Antibiot., Tokyo, 23(11):523-30, Nov. 1970.
- 56 - UMEZAWA, H. Studies on antitumor substances of microbial origin. Apud JUNQUEIRA, A.C.C., op. cit. ref. 29.
- 57 - -----; MAEDA, K.; TAKEUCHI, T.; OKAMI, Y. New antibiotics, bleomycin A and B. J. Antibiot., Tokyo, 19A (5):200-9, Sept. 1966.
- 58 - -----; SUHARA, Y.; TAKITA, T.; MAEDA, K. Purification of bleomycins. J. Antibiot., Tokyo, 19 A:210-5, Sept. 1966.
- 59 - ----- et alii. Sarkomycin an anti-cancer substance produced by "*Streptomyces*". Apud JUNQUEIRA, A.C.C., op. cit. ref. 29.
- 60 - VIEIRA, S. Introdução à bioestatística. Rio de Janeiro, Campus (no prelo).