

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ESTUDO CITOLÓGICO E CITOFOTOMÉTRICO  
DE ERITROBLASTOS DA MEDULA ÓSSEA DE  
RATOS TRATADOS COM CICLOFOSFAMIDA.

CÉLIA MARIA TURRI TELIS

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Mestre, sob  
orientação do Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

1 9 7 9

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais e irmãos

Ao meu esposo

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pela valiosa orientação.

À Dra. Irene G. H. Lorand, pela amizade e estímulo constante.

Ao Prof. Dr. José Lopes de Faria pelo importante auxílio na análise histológica.

Ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas pelo incentivo.

A todos os amigos, professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas, que direta ou indiretamente auxiliaram em todas as etapas deste trabalho.

## ÍNDICE

| Capítulo |                                                         | Página |
|----------|---------------------------------------------------------|--------|
| I        | INTRODUÇÃO .....                                        | 1      |
| II       | OBJETIVOS .....                                         | 12     |
| III      | MATERIAL E MÉTODOS .....                                | 13     |
| IV       | RESULTADOS                                              |        |
|          | 1. Estudo Histológico de Diversos Órgãos..              | 18     |
|          | 2. Estudo Citológico da Medula Óssea .....              | 19     |
|          | 3. Estudo do Conteúdo de DNA dos<br>Eritroblastos ..... | 27     |
| V        | DISCUSSÃO .....                                         | 35     |
| VI       | CONCLUSÕES .....                                        | 42     |
| VII      | RESUMO .....                                            | 43     |
| VIII     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                        | 45     |

## LISTA DE FIGURAS

| Figura |                                                                         | Página |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1.1    | Fórmula Química da Ciclofosfamida .....                                 | 1      |
| 1.2    | Esquema Metabólico Parcial da Ciclofos-<br>famida .....                 | 4      |
| 4.1    | Medula Óssea de Rato do Grupo Controle<br>Coloração de Leishman .....   | 21     |
| 4.2    | Medula Óssea de Rato do Grupo 1<br>Coloração de Leishman .....          | 22     |
| 4.3    | Medula Óssea de Rato do Grupo 3<br>Coloração de Leishman .....          | 23     |
| 4.4    | Medula Óssea de Rato do Grupo 3<br>Reação de Feulgen .....              | 24     |
| 4.5    | Medula Óssea de Rato do Grupo Controle<br>Reação de Feulgen .....       | 29     |
| 4.6    | Medula Óssea de Rato do Grupo 3<br>Reação de Feulgen .....              | 30     |
| 4.7    | Curvas de Extinção de DNA em Eritroblas-<br>tos do Grupo Controle ..... | 31     |
| 4.8    | Histograma do Grupo Controle .....                                      | 32     |
| 4.9    | Histograma do Grupo 1 .....                                             | 33     |
| 4.10   | Histograma do Grupo 3 .....                                             | 34     |

## LISTA DE TABELAS

| Tabela |                                                                                                           | Página |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 3.1    | Média dos Valores das Áreas de Núcleos<br>Grandes e Pequenos do Grupo Controle e<br>Razão $A_2/A_1$ ..... | 17     |
| 4.1    | Percentagem de Eritroblastos na Medula<br>Óssea de Ratos do Grupo Controle .....                          | 25     |
| 4.2    | Percentagem de Eritroblastos na Medula<br>Óssea de Ratos do Grupo 1 .....                                 | 25     |
| 4.3    | Percentagem de Eritroblastos na Medula<br>Óssea de Ratos do Grupo 2 .....                                 | 26     |
| 4.4    | Percentagem de Eritroblastos na Medula<br>Óssea de Ratos do Grupo 3 .....                                 | 26     |

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

A Ciclofosfamida (Fig. 1.1) é um derivado da mostarda nitrogenada, sintetizado em 1957 por Arnold e Boureaux (BOUGHTON et al., 1972), enquanto se tentava criar agentes antitumorais com maior especificidade anti neoplásica e menor toxicidade. Desde a sua produção original e subseqüentes estudos iniciais, o uso clínico da Ciclofosfamida tem se estendido das neoplasias a diversas doenças, tais como, artrite reumatóide, lupus eritematoso, pênfigo vulgar, etc. (GERSHWIN et al., 1974).

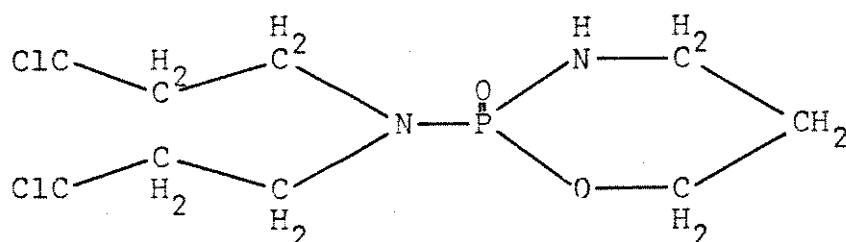


Fig. 1.1 Fórmula Química da Ciclofosfamida.

A Ciclofosfamida é quimicamente descrita como N, N bis ( $\beta$ -cloroetil)-N', O-propileno fosfodiamida. É uma mostarda nitrogenada com substituição em duas funções (GERSHWIN et al., 1974). É um agente alquilante, ou seja, um com-

posto que direta ou indiretamente, contribui com um grupo alquila, que se liga a algum outro composto, íon ou elemento. Sua capacidade alquilante, no entanto, é fraca.

Os ácidos nucleicos são o alvo principal dos agentes alquilantes, sendo que as moléculas de purina e pirimidina são os sítios de alquilação; eles inibem a síntese de DNA e RNA (ROSENCOFF et al., 1975; SHORT & GIBSON, 1973). As alterações dos ácidos nucleicos incluem alquilações simples, ligação cruzada, depurinação ou quebras da fita simples ou dupla. Bases alquiladas ou alteradas podem produzir erros na síntese de RNA e proteínas ou alterações no padrão de replicação, causando transformações neoplásicas (CREASEY, 1976).

A Ciclofosfamida é inativa e somente através de oxidação enzimática do anel e de uma série de reações subsequentes, produz moléculas com atividade alquilante (WHEELER, 1973). Ela é transportada numa forma inativa para ser ativada em sítios especiais do organismo (BROCK, 1967). Os microsossomos hepáticos parecem ser os principais responsáveis pela sua ativação (WHEELER, 1973; BROCK, 1967; CONNORS et al., 1970; - SLADEK, 1971; COHEN & JAO, 1970). As enzimas hepáticas do sistema de oxidação microsossomal de função mista parecem ser tanto induzidas e/ou quebradas por outras drogas, de tal modo, que a vida média plasmática da Ciclofosfamida diminui com injeções repetidas e é grandemente influenciada pela administração de outras drogas. Altas doses de barbituratos ou corticosteróides podem aumentar a toxicidade aguda (GERSHWIN et al., 1974).

O esquema metabólico da Ciclofosfamida (FENSELAU et al., 1977) pode ser visto na Fig. 1.2.

Alguns experimentos sugerem que pode haver ativação da Ciclofosfamida em outros locais que não o fígado (SYRKIN & ZAITZEVA, 1970). Observou-se inibição do crescimento de células Hela em cultura com Ciclofosfamida, quando se adicionava fragmentos de medula óssea de coelho, rim de camundongo, medula óssea humana, células de tumor sólido (sarcoma de Yoshida, tumores humanos como câncer gástrico, retal, etc.) e fibroblastos (KONDO & MURAGISHI, 1970).

Rapidamente após a administração de Ciclofosfamida a camundongos, ratos, cachorros, a atividade citotóxica é observada no soro e em menor grau em vários extratos de órgãos. Altas concentrações do produto ativado são eliminadas na urina e bile. Dependendo da dose, a atividade máxima no soro é atingida 15-30 minutos após a administração da droga e permanece praticamente constante por 90 a 120 minutos. Após 24 horas não é mais detectável (BROCK, 1967). A captação e a distribuição da Ciclofosfamida foi estudada no trabalho de GERSHWIN et al., 1974, em pacientes que receberam doses endovenosas de 6 a 80 mg/kg/dia. Segundo estes autores, o material radioativo (Ciclofosfamida marcada com  $^{14}\text{C}$ ) é rapidamente distribuído em 64% do peso corporal e a vida média é de 6,5 horas. Cerca de 56% dos metabólitos alquilantes são ligados a proteínas plasmáticas e 68% do material marcado é excretado na urina. Não existe excreção significativa pulmonar ou fecal. Estudos autoradiográficos mostram que poucos minutos após a injeção de Ciclofosfamida, existe acúmulo em vários órgãos, principalmente rins e fígado (GERHARDS & GRAUL, 1970).

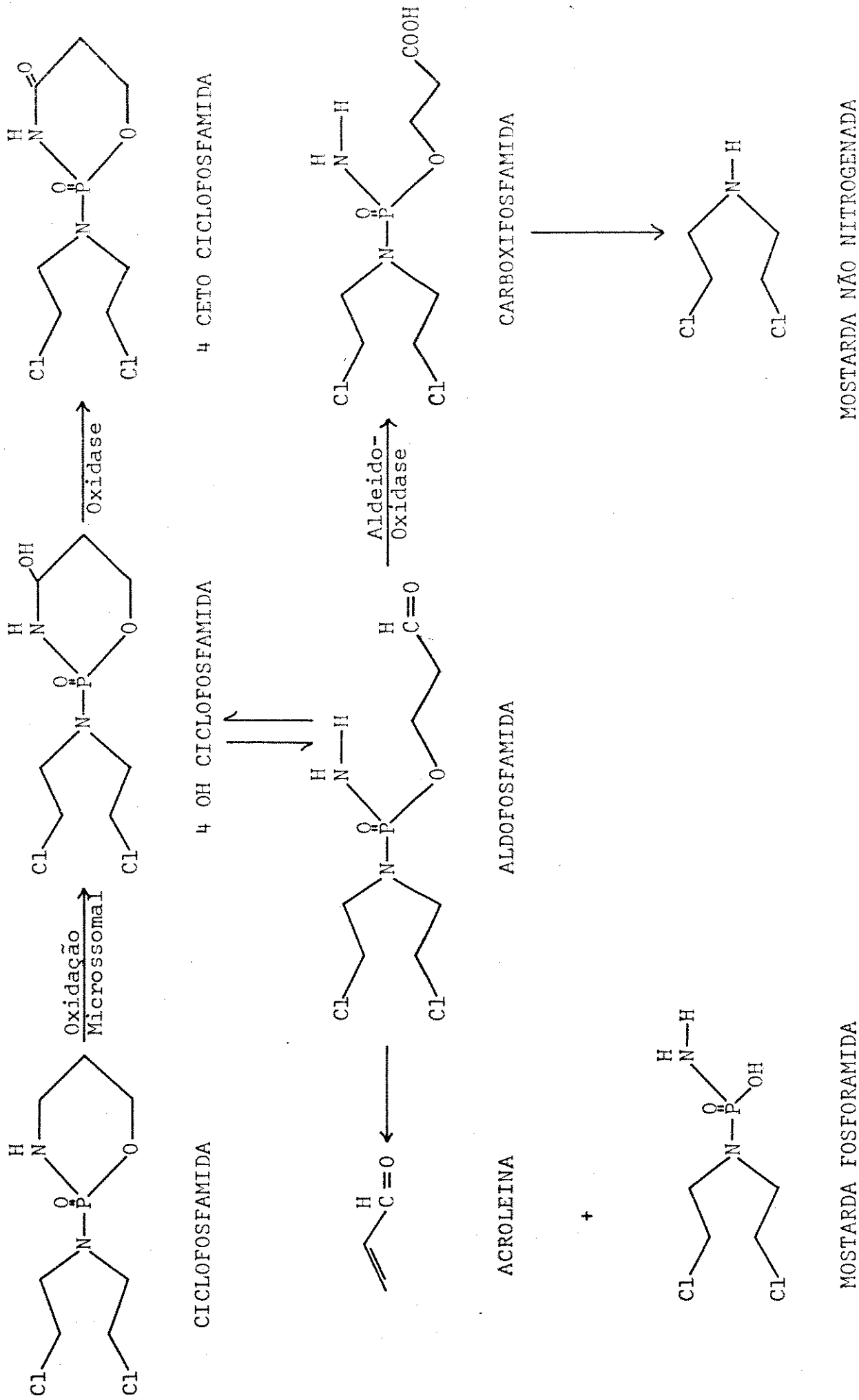


Fig. 1.2 Esquema Metabólico Parcial da Ciclofosfamida.

Os agentes alquilantes são venenos não específicos para a proliferação celular. A Ciclofosfamida inibe a taxa de reprodução da população de células normais que se dividem rapidamente e destrói linfócitos maduros. Isto pode ser visto por alopecia, depressão medular e toxicidade gastrointestinal (GARCIA & SEDANE, 1968). Outros órgãos também sofrem o efeito tóxico desta droga.

A cistite hemorrágica aguda é uma complicação frequente da terapia com Ciclofosfamida, particularmente em pacientes insuficientemente hidratados (SCETBON et al., 1974; WATSON & NOTLEY, 1973; WISEMAN & HOMBLBY, 1971; LIEDEBERG et al., 1970). As manifestações clínicas são disúria, polaciúria, hematúria macro e microscópica e urgência urinária. A hematúria, no entanto, pode ocorrer sem sintomas. O início é extremamente variável e pode ocorrer 24 horas após a primeira dose endovenosa, ou pode demorar várias semanas ou meses. Esta toxicidade é devida à excreção de metabólitos ativos pelos rins. O exame cistoscópico mostra um grande espectro de alterações na mucosa, incluindo hiperemia, telangiectasia dos vasos, sangramento focal ou difuso subepitelial, necrose e ulceração.

A cistite aguda, em geral, se resolve espontaneamente com a suspensão da terapia e hidratação. Entretanto, a hematúria microscópica pode perdurar por meses, ou mesmo se iniciar após interromper o uso da droga. O padrão geral do dano causado pela Ciclofosfamida na bexiga é necrose epitelial, seguida por reparo e hiperplasia. Em camundongos, o epitélio volta ao normal somente em 70 dias (CAMPOBASSO & BERRINO, 1972) e em ratos

já se nota uma intensa reação proliferativa dentro de 1 a 4 dias após a suspensão da droga (LIEDBERG et al., 1970). Em estudo realizado em pacientes que fizeram uso da Ciclofosfamida, verificou-se à necropsia, que 25% das bexigas examinadas apresentavam fibrose, em graus variados. Esta alteração era proporcional à dose total e à duração da terapêutica (JOHNSON & MEADOWS, 1971). Além destas alterações, estudo realizado com microscopia eletrônica, mostrou necrose de fibras da musculatura lisa da parede da bexiga de ratos (BONIKOS & KOSS, 1974).

Em pacientes que usaram Ciclofosfamida em altas doses ( $\geq 50$  mg/kg), houve alteração na absorção de água, visto por ganho de peso, hiponatremia e urina muito concentrada. A diminuição da osmolaridade sérica e o aumento da osmolaridade urinária apareceu concomitantemente com a excreção de metabólitos alquilantes da Ciclofosfamida (DE FRONZO et al., 1974). Em ratos injetados com dose única de Ciclofosfamida e sacrificados após uma hora, observou-se à microscopia óptica vacúolos nas porções apicais das células dos túbulos proximais e distais. À microscopia eletrônica notou-se dilatação das cisternas do retículo endoplasmático liso e rugoso e do complexo de Golgi, 10 minutos após a administração da droga (LAVIN & KOSS, 1971).

As células epiteliais da base das criptas da mucosa intestinal têm alta taxa de mitose e, são assim, um alvo importante e precoce para a Ciclofosfamida. O dano tem sido detectado pela presença de células necróticas e pela diminuição do número de células viáveis nas criptas. Além disto, ob-

servou-se em ratos tratados com doses altas de Ciclofosfamida, hemorragias predominantemente do íleo terminal e mesentério (LEVINE & SOWINSKI, 1974).

Como o fígado é o local principal de ativação da Ciclofosfamida no organismo, foram estudadas as alterações deste órgão após a administração da droga. À microscopia óptica as alterações dos hepatócitos são moderadas e caracterizadas por inchaço e discreta diminuição na basofilia citoplasmática. Os sinusóides são hiperêmicos. Não existe, entretanto, alteração específica no fígado. O fato dele não apresentar danos importantes, como são vistos na bexiga, sugere que os hepatócitos são mais resistentes à ação da Ciclofosfamida e isto pode ser devido à presença de enzimas adequadas para metabolizar a droga (LAVIN & KOSS, 1971). Existe porém, relato na literatura de um caso de necrose hepática maciça em paciente que fez uso de Ciclofosfamida (AUBREY, 1970).

Foi reconhecido há tempos, que a Ciclofosfamida produz efeitos adversos no sistema reprodutivo dos animais. O efeito sobre as gônadas é da maior importância em pacientes jovens. A ovulação pára, talvez permanentemente numa proporção substancial, provavelmente em 20-30% das mulheres mantidas com doses efetivas de Ciclofosfamida e o exame histológico dos ovários mostra ausência de folículos e óvulos, restando apenas células do estroma (MILLER et al., 1971; WARNE et al., 1973). Recentes evidências da análise do sêmen, biópsia testicular e níveis séricos de FSH, mostram efeitos mais profundos ainda na espermatogênese, um sistema celular com taxa de "turn over" mui

to rápida e assim presumivelmente mais suscetível a agentes citotóxicos (FAIRLEY et al., 1972). Pacientes tratados com Ciflofosfamida são oligospérmicos ou azoospérmicos quando examinados 12 meses (PENSO et al., 1974) ou até 2 1/2 anos após a cessação do tratamento (MILLER, 1971).

A Ciclofosfamida é um agente conhecido por sua ação mutagênica (EMERIT et al., 1976; PAYNE et al., 1974; TOLCHIN et al., 1974). O aumento da frequência de anormalidades cromossômicas pode ser atribuído à atividade farmacológica da droga sobre o DNA. Ela interfere com a integridade estrutural deste ácido nucleico por um dos vários mecanismos:

- a) Alteração da seqüência natural de bases
- b) Quebra das cadeias de ácidos nucleicos
- c) Ligação cruzada entre uma porção da molécula de DNA com outras partes da mesma molécula, outras moléculas de DNA ou proteínas.

Estas mudanças na molécula de DNA, prejudicam a habilidade da célula de se replicar, previnem a divisão eqüitativa do material cromossômico para as células-filhas, ou resultam em fragmentação de cromossomos individuais (TOLCHIN et al., 1974).

Estudos citogenéticos em animais indicam que grandes doses de Ciclofosfamida causam aberrações similares àsque-las observadas com a irradiação. Em pacientes portadores de artrite reumatóide e esclerose sistêmica progressiva e que fazem uso de Ciclofosfamida por tempo prolongado, observam-se anormalidades cromossômicas, tais como, aumento das metáfases -

com número de cromossomos menor do que 46, e uma frequência maior de quebras cromossômicas (TOLCHIN et al., 1974).

Existe um grande número de mecanismos teratogênicos possíveis para a Ciclofosfamida. Primeiramente, a molécula total pode ser lentamente degradada, espontânea ou enzimaticamente, dentro do embrião, já que ele não possui enzimas microsossomais para a sua ativação, produzindo produtos alquilantes teratogênicos. Isto parece pouco provável, porque as características teratogênicas da Ciclofosfamida são aquelas de um agente alquilante de ação rápida. É possível também, que a molécula toda entre no embrião e aja teratogenicamente sem quebra, talvez por inibição do processo de diferenciação mediado por enzimas. Alternativamente, a entrada da molécula toda no embrião, pode ser coincidente com a entrada de metabólitos maternos, ou com o metabolismo placentário da droga. Finalmente, a homeostase materno-fetal pode ser afetada pela droga ou seus metabólitos. As evidências apresentadas sugerem que a droga é um teratôgeno potente, exercendo um rápido efeito, e que apesar da bem estabelecida entrada da droga no embrião, os possíveis efeitos do agente na mãe e na troca materno-fetal não podem ser descartados (ASHBY et al., 1976).

A ação da Ciclofosfamida sobre o tecido hemopoiético tem sido muito estudada, porque os efeitos são rápidos e facilmente observados ao exame do sangue periférico.

Na medula óssea, as células tronco pluripotenciais (CTP) estão em sua grande maioria em fase não proliferativa ( $G_0$ ), mas podem sair desta condição, para entrar no ciclo de divisão

celular ou para se diferenciar numa célula tronco unipotencial (CTU). A natureza do controle de proliferação e diferenciação destas células é desconhecida. Existem evidências de que fatores locais, mais do que fatores circulantes é que controlam a sua proliferação. Uma diminuição na sua concentração seria o sinal necessário para haver divisão celular ou diferenciação. Durante a recuperação do dano causado por radiação ou droga citotóxica a sua concentração na medula óssea pode aumentar muito (LAJTHA, 1975).

A Ciclofosfamida, primeiramente agiria sobre as células que estão se dividindo, causando diminuição da linhagem eritroblástica, granulocítica e megacariocítica na medula óssea. Quando esta droga é usada em dose muito elevada, ou então por tempo prolongado, poderia haver esgotamento do reservatório de CTP, cujas células entram maciçamente no reservatório de CTU e sofrem maturação.

Após 18 semanas de uso diário de Ciclofosfamida em doses pequenas, em camundongos, verifica-se que a leucopenia se torna mais pronunciada e que o conteúdo de CTP da medula óssea declina, pelo menos em comparação com os altos valores nas primeiras semanas (PANNACCIULLI et al., 1977).

Vários trabalhos mostram que a Ciclofosfamida tem efeito maior sobre a série eritroblástica do que sobre a série granulocítica, e que a recuperação das células mielóides é mais rápida do que a da série eritroblástica (SCARO et al. 1972; NINKOV & PILETIC, 1974; KAUL & HUDSON, 1969a; KAUL & HUDSON, 1969b; CONSTABLE & BLACKETT, 1972). Em camundongos, a utiliza-

ção de dose única elevada produz destruição completa do tecido hemopoiético da medula óssea após 2 dias, sendo que a recuperação dos granulócitos se faz após 4 a 5 dias e dos eritroblastos após 10 dias (SCARO et al., 1972).

O trabalho de ROSENOFF et al., 1975 que estuda as alterações causadas pela Ciclofosfamida através da incorporação de timida -  $^3\text{H}$  no DNA de células normais em camundongos (medula óssea e trato gastrintestinal) e células tumorais, mostra que já existe inibição da síntese de DNA após 6 horas da administração da droga, independente da dose usada e que a inibição atinge o máximo em 12 horas. A recuperação da síntese de DNA começa a ocorrer em 24 horas e existe retorno aos níveis normais em 36 horas. A celularidade da medula óssea se altera mais lentamente. A diminuição ocorre após 12 horas e atinge o valor mais baixo em 48 horas; a recuperação a níveis normais se dá em torno do 6º dia.

Na literatura pesquisada não foram encontradas referências a estudos realizados, em medula óssea, através do método citofotométrico. Assim, considerando-se que a citofotometria é um método útil para a avaliação da síntese de ácidos nucleicos, resolveu-se estudar o padrão de distribuição de síntese de DNA em eritroblastos de ratos tratados com Ciclofosfamida. Foram escolhidos os eritroblastos porque são as células da medula óssea, que sofrem mais a ação da Ciclofosfamida (NINKOV & PILETIC, 1974; CONSTABLE & BLACKETT, 1972).

## CAPÍTULO II

### OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

1. Verificar a ação da Ciclofosfamida sobre a celularidade total da medula óssea e as alterações quantitativas e qualitativas da série eritroblástica, em animais submetidos a duas doses de 50 mg/kg.
2. Detectar as alterações do ciclo celular dos eritroblastos, causadas pela droga e estudar a fase precoce da recuperação desta série.
3. Observar os danos histológicos causados pela droga sobre fígado, bexiga, intestino e estômago.

### CAPÍTULO III

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado estudo preliminar, baseando-se no trabalho de ROSENOFF et al., 1975. Utilizaram-se 20 ratos machos que foram injetados com Ciclofosfamida 200 mg/kg intraperitoneal, em duas doses, com intervalo de 24 horas. Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a última dose do medicamento.

Com base nos resultados da experiência acima, que revelou grande toxicidade, procedeu-se a um segundo experimento, reduzindo-se a dose do medicamento para 50 mg/kg e mantendo-se o mesmo esquema de aplicação. Foram utilizados 20 ratos machos, brancos, de idade aproximada de 2 a 3 meses, que pesavam de 86 a 155 gramas e que foram divididos em grupos de cinco animais. Três destes grupos foram injetados e cinco ratos usados como controle.

Os animais injetados foram sacrificados 24 horas (Grupo 1), 48 horas (Grupo 2) e 72 horas (Grupo 3), após a aplicação da última dose do medicamento. A morte foi induzida por éter. Foram retirados os seguintes órgãos: fígado, estômago, intestino e bexiga. Foram analisados macroscopicamente e fragmentos foram fixados em formol 10% e incluídos em parafina, obtendo-se cortes de 6  $\mu$ m, que foram corados com hematoxilina-eosina

O osso esterno foi retirado e através da expressão

do mesmo se obteve material medular, com o qual foram feitos esfregaços em lâmina. Deste material, uma parte foi fixada e cora da pelo Leishman (LILLIE & FULLMER, 1976) e contadas 500 cêlulas, para estudo quantitativo e qualitativo da sêrie eritroblás tica e avaliação da celularidade total. Foi realizada reação da mieloperoxidase pela técnica de Sato (LILLIE & FULLMER, 1976) em esfregaços dos ratos do grupo 3, para estudo diferencial dos elementos jovens encontrados na fase de recuperação. Outra par te do material foi tratada pela reação de Feulgen (MELLO, 1976a), para estudo quantitativo do DNA em núcleos de eritroblastos, pelo método citofotométrico.

A determinação dos valores Feulgen - DNA em unida des arbitrárias foi realizada citofotometricamente através do metodo de duplo comprimento de onda (ORNSTEIN & PATAU, 1952). Por este método a quantidade total do cromóforo é dada pela fórmula:

$$m = \frac{B L_a C}{K_a \ln 10}$$

onde:

$$C = \frac{1}{2 - Q} \quad \ln \frac{1}{Q - 1}$$

$$Q = \frac{L_b}{L_a} = \frac{1 - T_b}{1 - T_a}$$

sendo:

$m$  = quantidade total do cromóforo, no caso, valor  
Feulgen - DNA em unidades arbitrárias.

$B$  = área do campo fotometrado

$T$  = transmitância medida por área fotometrada

$K$  = absortividade

$L = 1 - T$

$\ln$  = logaritmo neperiano

Os índices a e b referem-se aos valores relativos  
aos dois comprimentos de onda escolhidos, tais que

$$K_b = 2K_a$$

No presente caso sendo as determinações relativas  
e não absolutas, a fórmula utilizada foi:

$$m = B L_a C$$

Para a seleção dos comprimentos de onda a e b a se  
rem utilizados, foram determinadas curvas espectrais de absor-  
ção com um microespectrofotômetro Zeiss equipado com fotômetro  
01 e fotomultiplicador EMI 6256. Os diferentes  $\lambda$  foram estabe-  
lecidos com o uso de régua monocromadora Schott, diafragma de  
campo 0,3 nm, objetiva 40, optovar 2, diâmetro de medida 0,25  
mm.

Uma vez determinado o pico de cada curva de absor-  
ção de Feulgen, considerou-se este valor de extinção como cor-  
respondente a 100% e a partir deste, calculou-se a extinção re  
lativa para os valores obtidos em outros  $\lambda$ . Determinou-se a

seguir a média aritmética, o desvio padrão e o coeficiente de variação desses novos valores para cada comprimento de onda. Com os valores dessas médias foram obtidas curvas de absorção relativa e a partir destas escolheram-se os dois comprimentos de onda operacionais a e b (Fig. 4.7).

Levou-se em consideração a recomendação de GARCIA & IORIO, 1966, de que, sendo  $E_a$  a extinção no  $\lambda$  mais curto e  $E_b$  a extinção no  $\lambda$  mais longo, a razão  $E_a/E_b$  deve ser levemente superior a 0,50 (0,51 - 0,53). Esse pequeno excesso compensará o efeito promovido pela presença de espaços não absorventes em meio ao material não corado.

Um fator importante para o procedimento citofotométrico de duplo comprimento de onda é também o estabelecimento de uma razão, área de medida/área de material absorvente, adequada (GARCIA & IORIO, 1966) para a determinação dos valores  $T_a$  e  $T_b$ . Segundo MELLO, 1976b, é aconselhável que o valor desta razão não ultrapasse 3,41, quando as medidas são efetuadas com citofotômetro Zeiss, para núcleos com contorno circular e elipsoidal, submetidos à reação de Feulgen. No presente trabalho foram utilizados valores da razão  $A_2/A_1$  não maiores que os discriminados na Tabela 3.1.

|                  | $A_2$ = Área de Mensuração ( $\mu\text{m}^2$ ) | $A_1$ = Média da Área Nuclear ( $\mu\text{m}^2$ ) | $A_2 / A_1$ |
|------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------|
| Núcleos Grandes  | 122,76                                         | 41,11                                             | 2,99        |
| Núcleos Pequenos | 48,70                                          | 24,19                                             | 2,01        |

Tabela 3.1 - Média dos Valores das Áreas de Núcleos Grandes e Pequenos do Grupo Controle e Razão  $A_2 / A_1$

Assim, determinados os dois comprimentos de onda (480 nm e 530 nm), mediram-se os valores de transmitância de núcleos pequenos e grandes. Foram medidos 60 núcleos do grupo controle (28 núcleos de um rato e 32 de outro); 38 núcleos do grupo 1 (29 núcleos de um rato e 9 de outro); 60 núcleos do grupo 3 (10 núcleos de um rato, 19 de outro e 31 de um outro). Usou-se objetiva 40, optovar 2, diâmetro de medida 1,0 mm para núcleos grandes e 0,63 mm para núcleos pequenos.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

No experimento inicial no qual foi utilizada dose elevada de Ciclofosfamida, observou-se intensa toxicidade, sendo que os ratos apresentaram inapetência, diarreia, emagrecimento, cistite hemorrágica. O estudo microscópico da medula óssea em todos os tempos (24, 48 e 72 hs), revelou aplasia total dos elementos eritroblásticos, granulocíticos e megacariocíticos. Restavam apenas linfócitos maduros, plasmócitos e histiócitos. Assim, seria impossível realizar o estudo da série eritroblástica e reduziu-se a dose da Ciclofosfamida para 50 mg/kg.

Os ratos tratados com doses mais baixas apresentavam-se hígidos na hora do sacrifício e procedeu-se então à análise histológica dos diversos órgãos e ao estudo citológico e citofotométrico dos eritroblastos da medula óssea.

#### 1. Estudo Histológico de Diversos Órgãos.

O exame do estômago (piloro, corpo gástrico), intestino delgado, grosso e bexiga não revelou alterações macro e microscópicas em nenhum dos grupos tratados. No grupo 3, encontrou-se em quatro dos cinco animais estudados aspecto microvacuolado na região centro lobular do fígado, o que não foi visto nos outros dois grupos tratados, nem no grupo controle.

## 2. Estudo Citológico da Medula Óssea.

No grupo controle as três séries medulares estavam normalmente representadas (Fig. 4.1). O estudo diferencial da série eritroblástica revelava predominância de eritroblastos policromatófilos e ortocromáticos, mas existiam numerosos elementos jovens (Tabela 4.1).

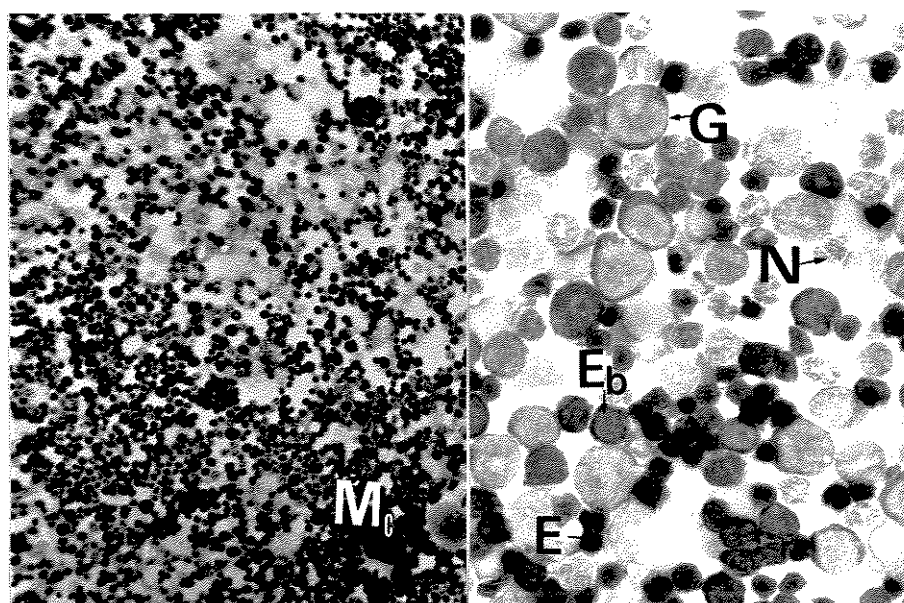
A medula óssea dos ratos do grupo 1 mostrava-se intensamente hipocelular em relação ao grupo controle. Esta hipoplasia era devida à diminuição das séries eritroblástica, granulocítica e megacariocítica. Predominavam células da linhagem linfomonoplasmocitária, eritroblastos ortocromáticos e neutrófilos segmentados (Fig. 4.2). O estudo diferencial da série eritroblástica revelava ausência total de eritroblastos jovens (Tabela 4.2).

No grupo 2 notava-se discreta regeneração da série granulocítica e eritroblástica, sem predominância de nenhuma delas. Isto era representado por pró-eritroblastos, eritroblastos basófilos, mieloblastos e pró-mielócitos. Na Tabela 4.3 verifica-se que predominavam formas mais maduras, mas haviam reaparecido eritroblastos jovens e em três ratos notava-se aumento do número de eritroblastos basófilos em relação ao grupo controle.

No grupo 3 a regeneração era mais intensa, às custas principalmente de grande proliferação da série granulocítica. Observava-se assim, numerosos mieloblastos, pró-mielócitos e regular número de precursores vermelhos jovens (Fig. 4.3). Na reação da mieloperoxidase comprovou-se que as células que predominavam no material eram granulócitos, porque apareciam granulações cito

plasmáticas, que as dispunham em grumos em determinadas áreas (Fig. 4.4). O estudo dos eritroblastos mostrou que dois ratos não apresentavam regeneração, isto é, não se encontrava aumento do número destes e um rato apresentava maturação conservada (Tabela 4.4).

Nos grupos 2 e 3 notavam-se atipias nucleares e citoplasmáticas tanto na série eritroblástica, como na série granulocítica. Estas alterações eram mais evidentes no grupo 3. A cromatina nuclear das células era mais frouxa e com grumos e o citoplasma apresentava-se muito basófilo, lembrando as alterações megaloblásticas.



A

B

Fig. 4.1 - Medula Óssea de Rato do Grupo Controle  
Coloração de Leishman

A - aumento - 350x

Notar o grande número de elementos nucleados. As séries eritroblástica, granulocítica e megacariocítica estão normalmente representadas. (Mc) - Megacariócito

B - aumento - 1400x

(E) - Eritroblasto maduro

(Eb) - Eritroblasto jovem

(G) - Granulócito jovem

(N) - Neutrófilo maduro

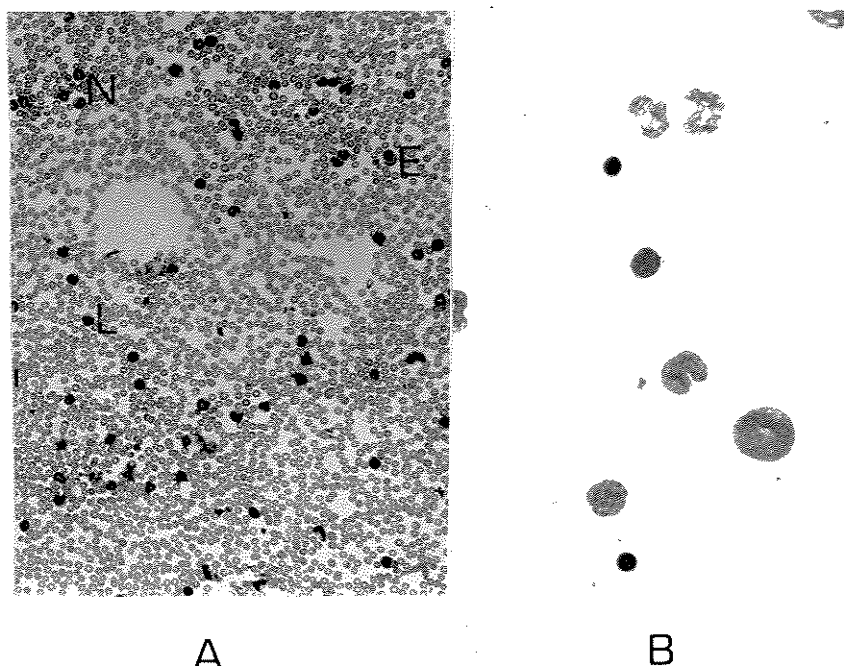


Fig. 4.2 - Medula Óssea de Rato do Grupo 1  
Coloração de Leishman

A - aumento - 350x

A celularidade está muito diminuída. Presença predominante de neutrófilos maduros (N); eritroblastos ortocromáticos (E) e linfócitos (L)

B - Aspecto em grande aumento - 1400x

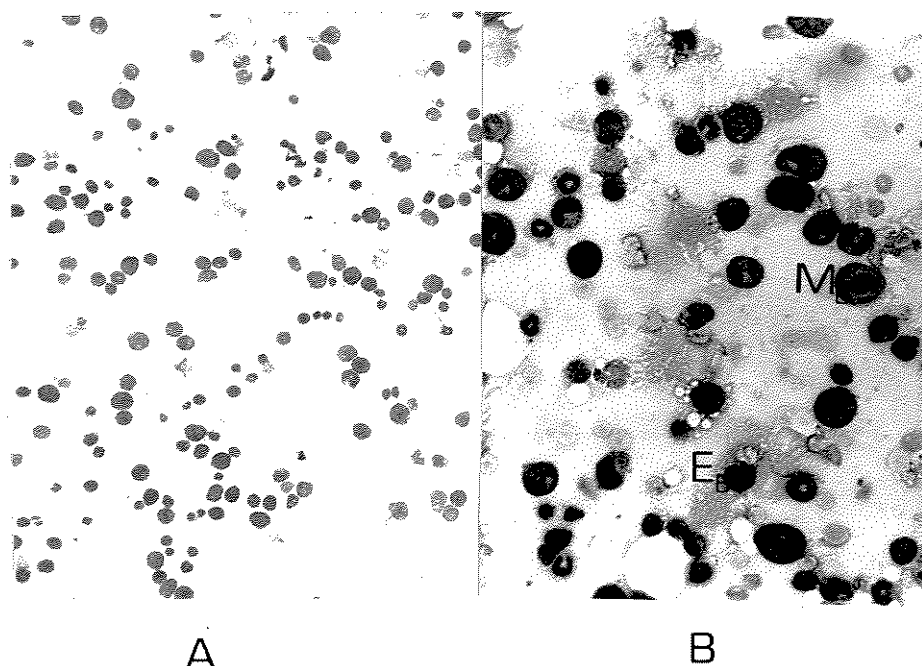


Fig. 4.3 - Medula Óssea de Rato do Grupo 3

Coloração de Leishman

A - aumento - 350x

Há regeneração celular. Presença de muitas células jovens.

B - aumento - 1400x

Grande número de mieloblastos (Mb) e eritroblastos jovens (Eb) com alterações megaloblásticas

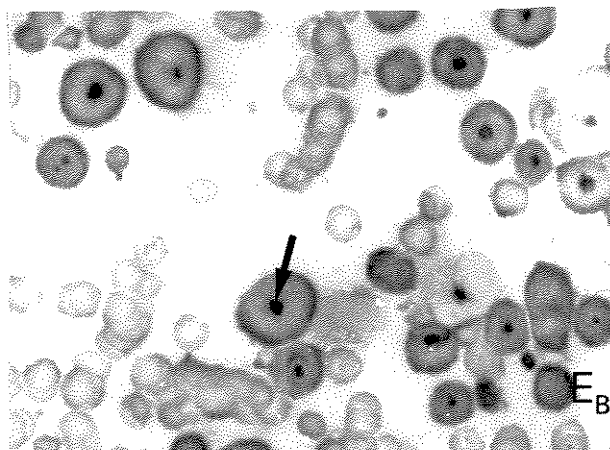


Fig. 4.4 - Medula Óssea de Rato do Grupo 3

Reação da Mieloperoxidase

aumento - 1720x

Notar os aglomerados de grânulos (seta) característicos das células da série granulocítica (G), que predominam no material. Presença também de eritroblastos jovens (Eb).

| Rato | Pró      | E.       | E.        | E.       |
|------|----------|----------|-----------|----------|
|      | Eritrob. | Basófilo | Policrom. | Ortocro. |
| 1    | 2,80     | 5,40     | 17,80     | 9,80     |
| 2    | 0,40     | 4,40     | 21,80     | 13,40    |
| 3    | 1,20     | 3,20     | 16,20     | 8,60     |
| 4    | 1,20     | 6,20     | 24,20     | 11,00    |
| 5    | 0,80     | 7,40     | 15,60     | 14,20    |

Tabela 4.1 - Percentagem de Eritroblastos na Medula  
Óssea de Ratos do Grupo Controle

| Rato | Pró      | E.       | E.        | E.        |
|------|----------|----------|-----------|-----------|
|      | Eritrob. | Basófilo | Policrom. | Ortocrom. |
| 1    | 0        | 0        | 0,20      | 12,84     |
| 2    | 0        | 0        | 0         | 12,60     |
| 3    | 0        | 0        | 0,35      | 6,87      |
| 4    | 0        | 0        | 0         | 7,57      |
| 5    | 0        | 0        | 0         | 5,78      |

Tabela 4.2 - Percentagem de Eritroblastos na Medula  
Óssea de Ratos do Grupo 1

| Rato | Pró      | E.       | E.        | E.       |
|------|----------|----------|-----------|----------|
|      | Eritrob. | Basófilo | Policrom. | Ortocro. |
| 1    | 0        | 0,60     | 0,60      | 15,06    |
| 2    | 1,00     | 9,55     | 14,84     | 7,72     |
| 3    | 0        | 0        | 4,11      | 3,50     |
| 4    | 1,36     | 8,95     | 21,40     | 18,29    |
| 5    | 0        | 7,50     | 23,00     | 6,00     |

Tabela 4.3 - Percentagem de Eritroblastos na Medula  
Óssea de Ratos do Grupo 2.

| Rato | Pró      | E.       | E.        | E.       |
|------|----------|----------|-----------|----------|
|      | Eritrob. | Basófilo | Policrom. | Ortocro. |
| 1    | 0,47     | 0,71     | 0,24      | 0,24     |
| 2    | 0        | 0        | 1,89      | 1,50     |
| 3    | 0        | 0        | 1,56      | 0,10     |
| 4    | 1,00     | 2,40     | 13,40     | 4,00     |
| 5    | 1,40     | 1,75     | 3,85      | 0,70     |

Tabela 4.4 - Percentagem de Eritroblastos na Medula  
Óssea de Ratos do Grupo 3.

### 3. Estudo do Conteúdo de DNA dos Eritroblastos

Nos esfregaços de medula óssea tratados pela reação de Feulgen notou-se diferenças no aspecto da cromatina das células de ratos do grupo controle e daqueles injetados com Ciclofosfamida. Nestes últimos, os eritroblastos e os precursores granulocíticos apresentavam cromatina nuclear mais frouxa.

As figuras 4.5 (grupo controle) e 4.6 ( grupo 3) mostram aspectos da medula óssea tratada pela reação de Feulgen.

Para a realização do estudo citofotométrico, os comprimentos de onda operacionais (a - 480 nm e b - 530 nm ) foram escolhidos baseados nos resultados das curvas de extinção para diversos  $\lambda$  (Fig. 4.7).

No grupo controle obteve-se valores que se distribuíram em três populações bem distintas a saber:

A primeira que se distribuiu no intervalo 21,76 a 28,72, a segunda entre 30,78 a 40,61 e a terceira entre 43,53 a 81,23, que consideramos respectivamente  $G_1$ , S e  $G_2$ . Assim, comparando-se  $G_1$  com  $G_2$  verifica-se que neste último grupo, os valores são o dôbro do primeiro, ou seja, existe o dôbro da quantidade de DNA (Fig. 4.8).

No grupo 1 os eritroblastos que restavam eram os ortocromáticos, que não apresentam capacidade proliferativa e o estudo citofotométrico confirmou que a grande freqüência de valores estava no intervalo 26,82 a 32,99, ou seja em fase  $G_1$ .

Existiam ainda raros elementos em fase  $G_2$  (Fig. 4.9.).

No grupo 3 a grande freqüência dos valores se encontrava no intervalo 8,84 a 16,50, ou seja, as células tinham conteúdo de DNA abaixo do encontrado no grupo controle, e eram portanto hipodiplóides. Poucas células apresentavam valores maiores, entre 20,31 a 37,89, indicando ou células hipodiplóides em fase de síntese, ou então células diplóides que haviam persistido na medula óssea e estavam em fase  $G_1$  ou S (Fig. 4.10).

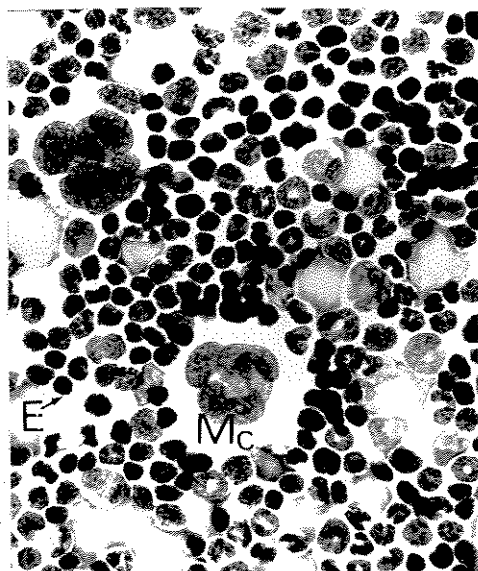


Fig. 4.5 - Medula Óssea de Rato do Grupo Controle

Reação de Feulgen

aumento - 1400x

(E) - Eritroblasto

(G) - Granulócito

(Mc) - Megacariócito

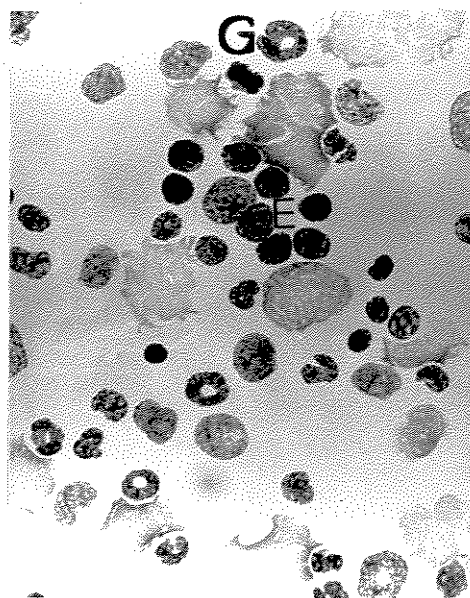


Fig. 4.6 - Medula Óssea de Rato do Grupo 3

Reação de Feulgen

aumento - 1400x

Notar que os núcleos são maiores do que os do grupo controle e a cromatina é mais frouxa tanto nos eritroblastos (E), como nos granulócitos (G)

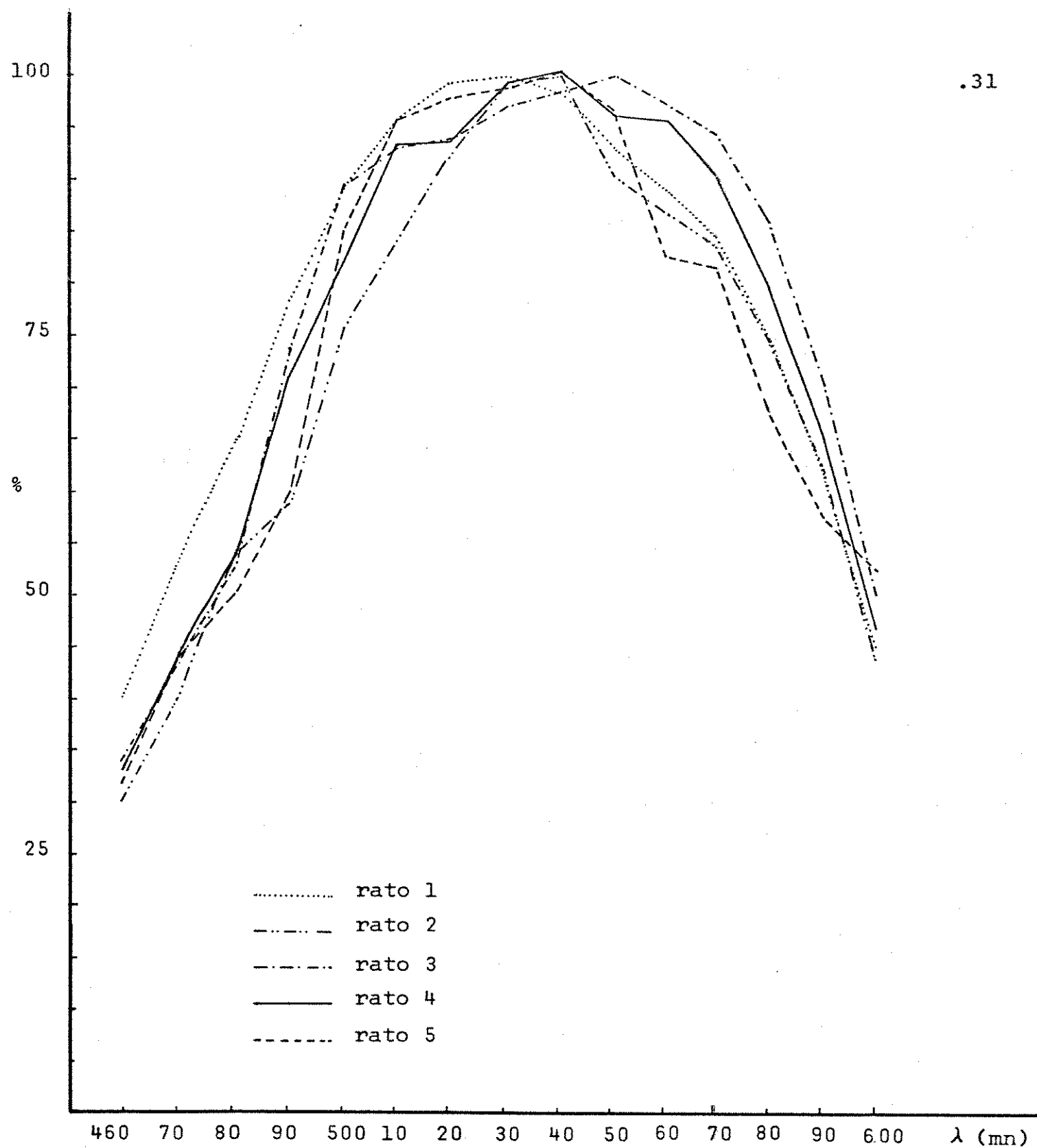
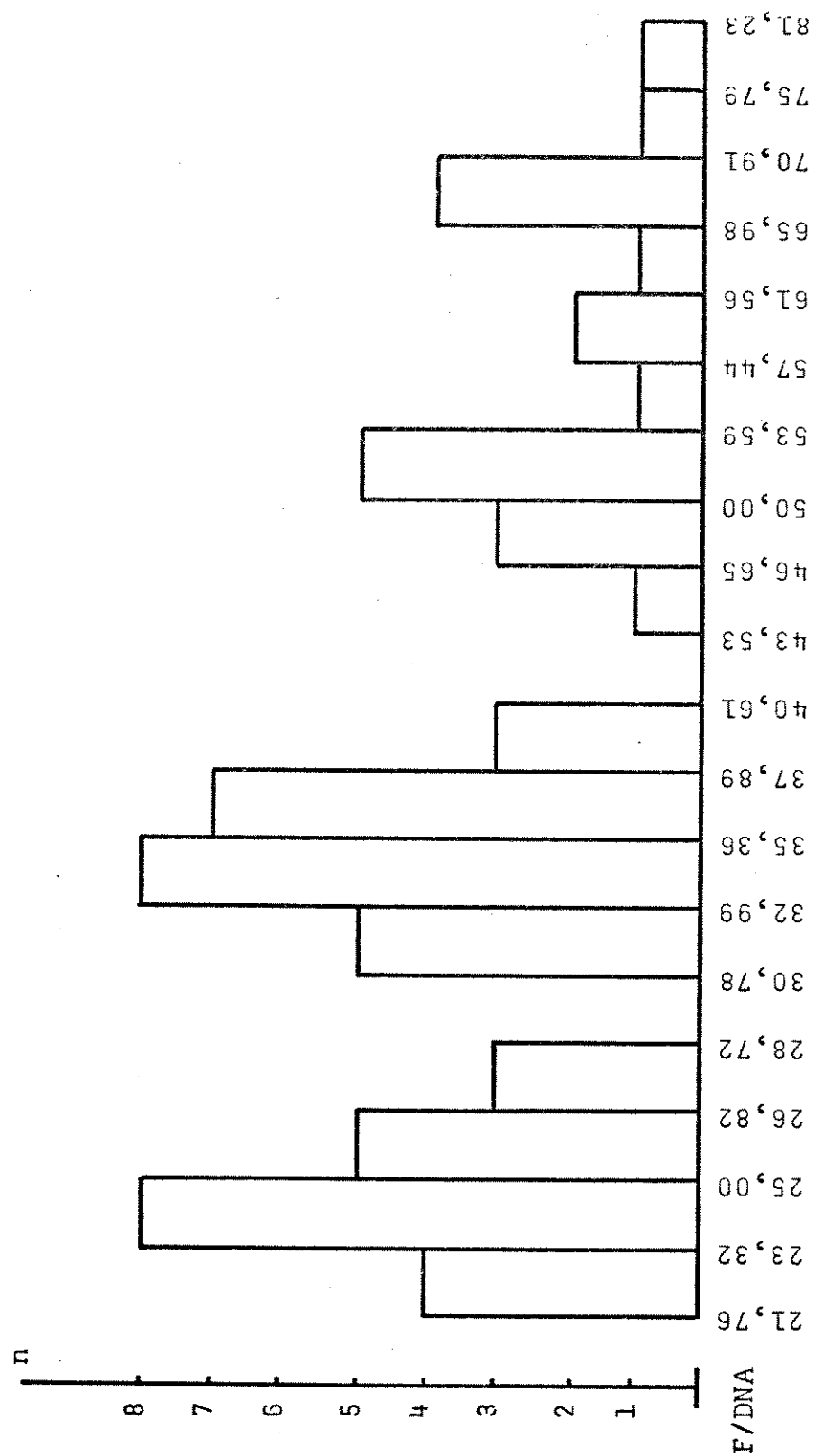


Fig. 4.7 Curvas de Extinção de DNA em Eritroblastos  
do Grupo Controle.

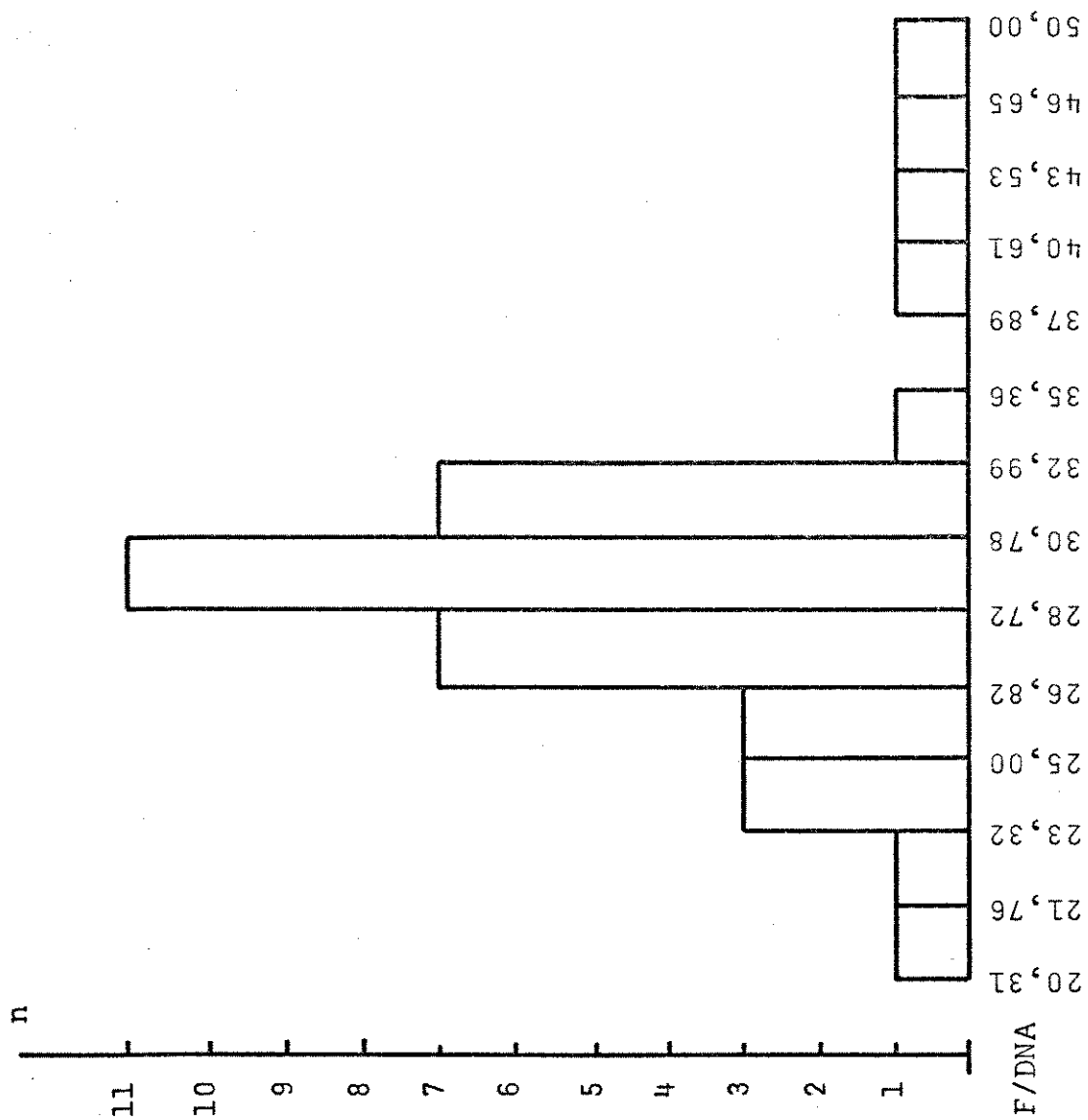
GRUPO CONTROLE



n = número de células

Fig. 4.8 Histograma do Grupo Controle

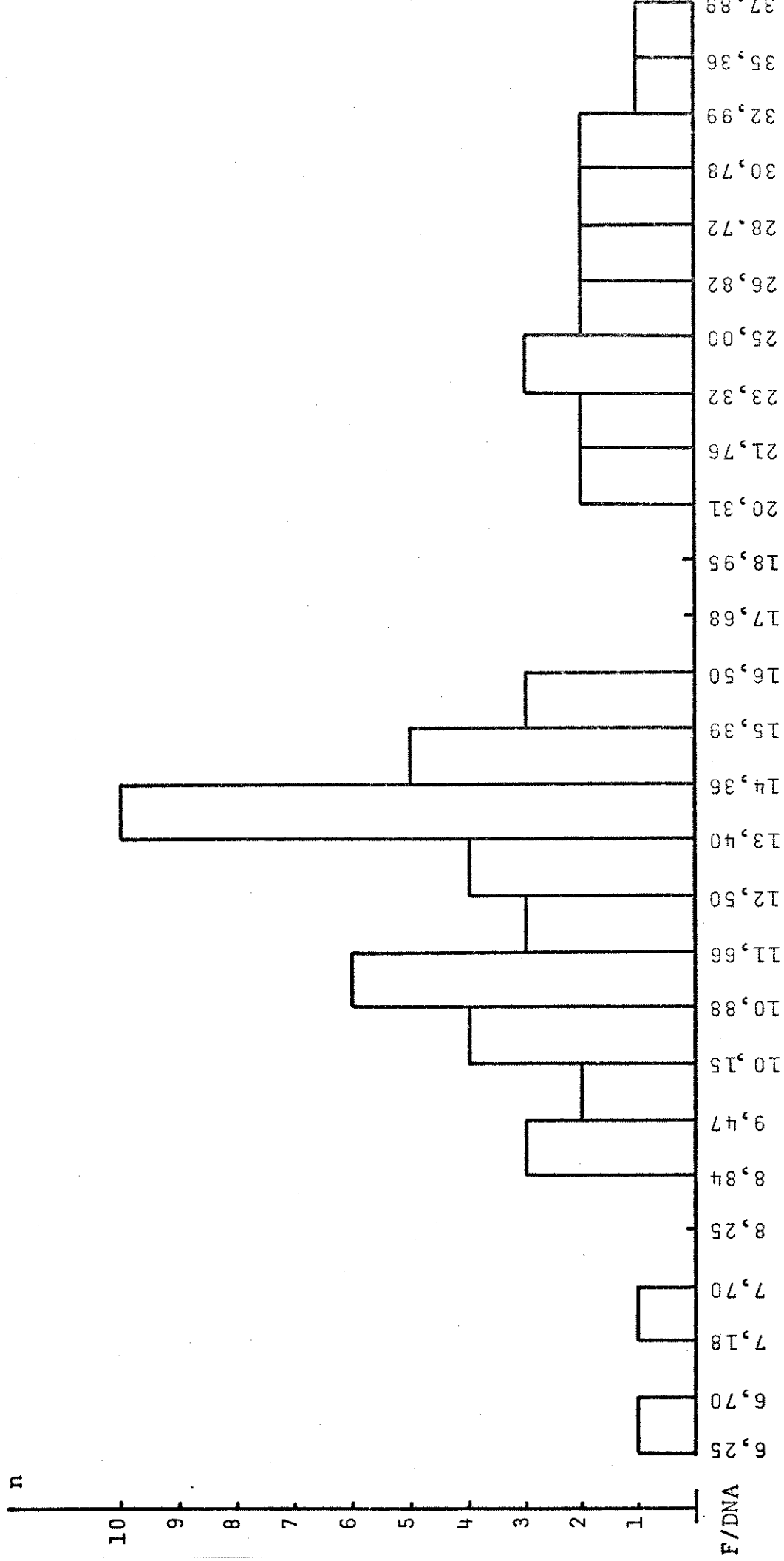
GRUPO - 1



n = número de células

Fig. 4.9 Histograma do Grupo 1

GRUPO - 3



n = número de células

Fig. 4.10 Histograma do Grupo 3

## CAPÍTULO V

### DISCUSSÃO

O estudo inicial foi realizado com duas doses de 200 mg/kg de Ciclofosfamida, porque os dados da literatura mostravam que assim se obtinha  $DL_{40}$  em camundongos (ROSENOFF et al., 1975). No entanto, a toxicidade observada foi muito grande; os ratos apresentaram diarreia, emagrecimento e cistite hemorrágica.

A Ciclofosfamida causa diarreia porque lesa as células epiteliais da mucosa intestinal, que têm alta taxa de mitose. Este dano evidencia-se, no estudo histológico, pela presença de células necróticas (LEVINE & SOWINSKY, 1974).

A cistite hemorrágica também é um achado comum em pacientes que fazem uso de Ciclofosfamida e é proporcional à dose total e duração da terapêutica (SCETBON et al., 1974; WATSON & NOTLEY, 1973; WISEMAN & HOMBLBY, 1971; LIEBERG et al., 1970; JOHNSON & MEADOWS, 1971).

O estudo microscópico da medula óssea revelou intensa depressão, o que impediu a continuação do estudo e assim reduziu-se a dose da Ciclofosfamida para 50 mg/kg, dando-se sequência a novo experimento. Neste, observaram-se as mesmas normas do anterior, sendo que os ratos foram sacrificados 24 horas (grupo 1), 48 horas (grupo 2) e 72 horas (grupo 3) após a última dose do medicamento. O tempo de sacrifício foi estabelecido baseando-se em relatos da literatura (ROSENOFF et al., 1975). Segundo estes autores, com o uso de uma única dose de

200 mg/kg de Ciclofosfamida, em camundongos, observa-se que as células da medula óssea recuperam a capacidade de síntese de DNA em 36 horas, o que é visto pelo estudo da incorporação de timidina -  $^3\text{H}$  neste ácido nucleico. Com relação à celularidade, esta atinge o valor mais baixo em 48 horas e recupera a níveis encontrados no controle ao redor do 6º dia.

A redução da dose do medicamento fêz com que os ratos não perdessem peso e se mantivessem em bom estado geral até o fim do experimento.

Ao exame necroscópico não se notou nenhuma alteração importante de qualquer dos órgãos estudados (estômago, intestino e bexiga). Somente no estudo histológico do fígado foi observado aspecto microvacuolado na região centro lobular de quatro animais do grupo 3. Como a alteração era limitada, não foi dada maior importância ao achado, mesmo porque, admite-se a possibilidade do anestésico causar alteração nos hepatócitos, devido à anóxia que ele produz (PRICE & DRIPPS, 1973; FARIA, 1976). Não encontramos, no entanto, alterações nos outros grupos de ratos tratados e no grupo controle, que também foram sacrificados com éter. A lesão observada pode ser devido à ação da Ciclofosfamida, embora, segundo dados da literatura, não existe alteração específica no fígado causada por esta droga. Admite-se que os hepatócitos são mais resistentes, devido à presença de enzimas adequadas, que metabolizam a Ciclofosfamida (LAVIN & KOSS, 1977).

O estudo microscópico da medula óssea revelou que o grupo de ratos sacrificados após 24 horas (grupo 1), apresenta

va raros elementos proliferantes, isto é, formas jovens da série eritroblástica, granulocítica e plaquetária, só restando células maduras, ou seja, eritroblastos ortocromáticos, neutrófilo segmentados, linfócitos, plasmócitos, macrófagos e histiócitos. Persistiram na medula óssea somente células que não se multiplicam mais, e que por isto, não sofrem a ação da droga.

Os grupos 2 e 3 mostravam sinais de recuperação e, neste último, a celularidade se aproximava daquela do grupo controle, havendo predomínio de elementos jovens da série granulocítica, como mieloblastos e pró-mielócitos. Notava-se ainda, o aparecimento de pró-eritroblastos e eritroblastos basófilos, mas sempre em número menor do que os elementos granulocíticos.

Vários trabalhos mostram que a Ciclofosfamida tem efeito maior sobre a série eritroblástica do que sobre a série granulocítica e que a recuperação das células mielóides é mais rápida do que a dos eritroblastos (SCARO et al., 1972; NINKOV & PILETIC, 1974; KAUL & HUDSON, 1969a; KAUL & HUDSON, 1969b; CONSTABLE & BLACKETT, 1972). Em ratos e camundongos, a recuperação das células da linhagem vermelha só foi observada após o 10º dia (NINKOV & PILETIC, 1974; SCARO et al., 1972). Em nosso experimento, 72 horas após a última dose de Ciclofosfamida, já se notava proliferação discreta de eritroblastos jovens, mas não temos dados para afirmar quando se daria a recuperação completa desta série.

Nos grupos 2 e 3 foram visualizadas alterações nucleares e citoplasmáticas, tanto no material corado pelo Leishman, como naquele tratado pela reação de Feulgen. Observava-se

nas células jovens, cromatina nuclear frouxa e com grumos e intensa basofilia do citoplasma, ou seja, alterações megaloblásticas. Em pacientes que fazem uso de citostáticos é comum o aparecimento de megaloblastose na medula óssea, principalmente naqueles que utilizam drogas antagonistas do ácido fólico, como é o caso do Mathotrexate. A Ciclofosfamida alterando a síntese de DNA poderia ocasionar os achados descritos acima (KLIPPEL & DECKER, 1974).

O estudo citofotométrico da medula óssea foi realizado utilizando-se o método do duplo comprimento de onda que é o mais indicado quando o material não é homogeneamente distribuído e também é aquele cujo erro distribucional é reduzido (MENDELSON, 1966).

No grupo controle pudemos identificar, pela citofotometria, núcleos de eritroblastos policromatófilos na fase  $G_1$  do ciclo celular e para os quais obtivemos valores Feulgen/DNA entre 21,76 a 28,72; núcleos que se encontravam na fase S com valores variando de 30,78 a 40,61 e núcleos na fase  $G_2$ , com valores entre 43,53 a 81,23.

No grupo 1, como já se observara no estudo citológico, predominavam apenas eritroblastos ortocromáticos, que não se dividem, e que portanto, não sofreram a ação da Ciclofosfamida. Assim, os valores Feulgen/DNA, em sua maioria, estavam no intervalo 26,82 a 32,99, refletindo células em fase  $G_1$ ; raros eritroblastos, provavelmente policromatófilos, estavam na fase  $G_2$ .

Não foram realizadas determinações citofotométricas para o grupo 2, porque a regeneração era discreta e então decidiu-se medir o conteúdo de DNA dos eritroblastos do grupo 3, onde a recuperação era maior e existiam atipias nucleares e citoplasmáticas mais acentuadas do que no grupo 2. Além disto, neste tempo do experimento a síntese de DNA já deveria estar normal (ROSENOFF et al., 1975).

No grupo 3 verificou-se que a grande maioria dos valores Feulgen/DNA se encontrava no intervalo 8,84 a 16,50 e portanto, bem abaixo dos encontrados no grupo controle. Assim, este achado foi interpretado como presença de eritroblastos com menor conteúdo de DNA, ou seja, hipodiplóides. Ao lado disto, existia um pequeno número de células no intervalo 20,31 a 37,89, que poderiam estar representando células hipodiplóides, que persistiram na medula óssea e estariam em fase  $G_1$  ou S.

As medidas citofotométricas do grupo 3 foram realizadas por três pesquisadores, obtendo-se sempre valores muito próximos, o que exclui que tenha havido erro na realização do método.

O aparecimento de valores hipodiplóides nos leva a formular algumas hipóteses na tentativa de explicá-los:

a) A Ciclofosfamida eliminou as células hemopoiéticas que estavam em fase de multiplicação, o que foi visto por desaparecimento dos eritroblastos jovens no grupo 1. Houve então um efeito letal da droga sobre estes elementos. Esta também teria atuado sobre as células tronco pluripotenciais ou

unipotenciais em fase de multiplicação, inibindo parcialmente a síntese de DNA e fazendo com que as células-filhas recebessem menor quantidade de DNA, do que o esperado, devido a quebras cromossômicas causadas pela alteração na síntese deste ácido nucleico.

Existe relato na literatura de que a Ciclofosfamida interfere com a integridade estrutural do DNA, alterando a seqüência natural de bases, quebrando cadeias de ácidos nucleicos e fazendo ligação cruzada com partes de uma mesma molécula de DNA, com outras moléculas ou com proteínas. Isto prejudica a habilidade da célula de se replicar, impede a divisão equitativa do material cromossômico para as células-filhas, ou resulta em fragmentação de cromossomos individuais (TOLCHIN et al., 1974). Assim, no grupo 3, os eritroblastos hipodiplóides não conseguem se multiplicar, ou então originam outras células hipodiplóides, podendo persistir então uma linhagem celular mutante (EMERIT et al., 1976; PAYNE et al., 1974; TOLCHIN et al., 1974; CREASEY, 1976).

Para que houvesse recuperação normal de medula óssea, seria necessário que as células tronco pluripotenciais, que estão em  $G_0$ , e não foram afetadas pela droga, se dividissem, originando linhagens celulares com conteúdo de DNA normal.

b) O DNA alterado pela Ciclofosfamida, tornou-se mais frágil, e ao sofrer o processo de hidrólise ácida, durante a preparação técnica da reação de Feulgen, se solubilizou, perdendo partes do material que se cora pelo reativo de Schiff.

Assim, no estudo citofotométrico houve o aparecimento de valores Feulgen/DNA mais baixos do que os encontrados no grupo controle. Estudos de curvas de hidrólise revelam que estes valores variam com o tempo de hidrólise, porque depois de determinado tempo existe sempre solubilização do DNA. Podemos pensar que no grupo 3, o tempo de hidrólise deveria ser menor do que o usado no grupo controle, uma vez que o DNA estaria alterado pela Ciclofosfamida.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSÕES

1. A Ciclofosfamida, no esquema usado, causou desaparecimento total das formas proliferantes dos elementos hemopoiéticos da medula óssea dos ratos.
2. 72 horas após a última dose houve recuperação principalmente da série granulocítica e em menor grau da série eritroblástica.
3. Na fase de recuperação foram observados eritroblastos com características megaloblásticas e hipodiplóides quanto ao conteúdo de DNA.
4. A Ciclofosfamida agiu alterando a síntese de DNA, causando aplasia dos elementos proliferantes enquanto presente no organismo (24 horas). Observou-se efeito retardado da droga, representado pelo aparecimento de eritroblastos morfológicamente alterados e hipodiplóides. Este efeito seria o responsável pela perpetuação da hipoplasia da série vermelha, uma vez que as células alteradas não devem apresentar a mesma capacidade de multiplicação e maturação das células normais.

## CAPÍTULO VII

### RESUMO

A Ciclofosfamida é um agente alquilante que inibe a síntese de ácidos nucleicos e portanto reduz o número de células que estão se dividindo. Vários tecidos sofrem o efeito tóxico desta droga, principalmente bexiga, trato gastrintestinal e medula óssea.

No estudo citológico da medula óssea, observou-se que 24 horas após o uso de Ciclofosfamida, a celularidade total diminuiu intensamente e restaram apenas neutrófilos maduros, eritroblastos ortocromáticos, linfócitos, plasmócitos e histiócitos. Na análise citofotométrica da série vermelha verificou-se que a quase totalidade dos eritroblastos estavam na fase  $G_1$  do ciclo celular. Persistiram portanto, somente células que não se multiplicam mais e que por isso não sofrem ação da droga.

No grupo de ratos sacrificado após 72 horas do uso de Ciclofosfamida, houve regeneração celular, às custas, principalmente, da série granulocítica, o que foi visto pelo grande número de mieloblastos e pró-melócitos. Observou-se também o aparecimento de eritroblastos jovens (pró-eritroblastos e eritroblastos basófilos) com características megaloblásticas e que apresentaram valores Feulgen/DNA muito baixos, ou seja, eram hipodiplóides.

O achado de células com conteúdo de DNA inferior ao do grupo controle foi interpretado como decorrente de inibição parcial da síntese de DNA pela Ciclofosfamida. Ela teria causado quebras cromossômicas e as células-filhas receberam menor quantidade de material genético. Admite-se também, que possa ter havido durante a preparação técnica do material, solubilização e perdas de partes do DNA, devido à alteração causada pela Ciclofosfamida.

## CAPÍTULO VIII

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHBY, R. et al. Aspects of the teratology of cyclophosphamide. Cancer Treat. Rep., 60 (4): 477-482, April 1976.
- AUBREY, D.A. Massive hepatic necrosis after cyclophosphamide. British Medical Journal, 3: 588, Sept. 1970.
- BONIKOS, D.S. & KOSS, L.G. Acute effects of cyclophosphamide on rat urinary bladder muscle. Arch. Pathology, 97 (4): 242-245, April 1974.
- BOUGHTON, O.D. et al. Assay of cyclophosphamide. Journal of Pharmaceutical Sciences, 61 (1): 97-100, Jan. 1972.
- BROCK, N. Pharmacologic characterization of cyclophosphamide (NSC-26271) and cyclophosphamide metabolites. Cancer Chemotherapy Reports, 51(6): 315-325, Oct. 1967.
- CAMPOBASSO, O. & BERRINO, F. Early effects of cyclophosphamide on mouse bladder epithelium. Path. Microbiol., 38: 144-157, 1972.
- COHEN, J.L. & JAD, J.Y. Enzymatic basis of cyclophosphamide activation by hepatic microsomes of the rat. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 174 (2): 206-210, 1970.
- CONNORS, T.A. et al. Microsomal activation of cyclophosphamide in vivo. Biochemical Pharmacology, 19: 1533-1535, 1970.

- CONSTABLE, T.B. & BLACKETT, N.M. Comparison of effect of four cytotoxic agents on granulocytic and erythroid repopulating ability of rat bone marrow. The Journal of the National Cancer Institute, 48 (4): 941-948, April 1972.
- CREASEY, W. Basic Mechanisms. Cancer, 37: 999-1001, Feb. 1976.
- DE FRONZO, R.A. et al. Cyclophosphamide and the kidney. Cancer, 33 (2): 483-491, Feb. 1974.
- EMERIT, I. et al. Effet chromosomique de la cyclophosphamide chez différentes souches de souris. Ann. Génét., 19 (3): 203-206, 1976.
- FAIRLEY, K.F. et al. Sterility and testicular atrophy related to cyclophosphamide therapy. The Lancet, 1: 568-569, March 1972.
- FARIA J.L. Alteração vacuolar ou hidrópica. In: Anatomia Patológica Geral, 2ª ed. S.P. Guanabara-Koogan, 1977, pp. 13-14.
- FENSELAU, C. et al. Identification of aldophosphamide as a metabolite of cyclophosphamide in vitro and in vivo in humans. Cancer Research, 37: 2538-2543, Aug. 1977.
- GARCIA, A.M. & IORIO, R. Potencial sources of error in two-wavelength cytophotometry. In: WIED, G.L. Introduction to Quantitative Cytochemistry, New York and London, Acad. Press, 1966 pp. 215-237.
- GARCIA, L.D. & SEDANE, M.R. Toxicidad y efectos secundarios de la ciclofosfamida. Revista Clínica Española, 109 (1): 11-16, 15 Abril 1968.

- GERHARDS, H.J. & GRAUL, E.H. Autoradiographische untersuchungen über die verteilung von  $^3\text{H}$  - cyclophosphamid in der ratte. Arzneimittel-Forschung, 20: 601-607. Maio 1970.
- GERSHWIN, M.E. et al. Cyclophosphamide: use in practice. Annals of Internal Medicine, 80: 531-540, 1974.
- JOHNSON, W.W. & MEADOWS, D.C. Urinary bladder fibrosis and telangiectasis associated with long term cyclophosphamide therapy. The New England Journal of Medicine, 284 (6): 290-294, Feb. 1971.
- KAUL, M. & HUDSON, G. Recovery of hemopoiesis after cyclophosphamide. Acta Haemat., 41: 170-179, 1969a.
- KAUL, M. & HUDSON, G. Cell degeneration pattern in bone marrow and blood of guinea pigs following administration of cyclophosphamide. Acta Haemat., 42: 42-49, 1969b.
- KLIPPEL, J.H. & DECKER, J.L. Relative macrocytosis in cyclophosphamide and azathioprine therapy. JAMA, 229 (2): 180-181, July 1974.
- KONDO, T. & MURAGISHI, H. Mechanism of cyclophosphamide activation, Gann., 61: 145-151, April 1970.
- LAJTHA, L.G. Annotation - Haemopoietic stem cells. British Journal of Haematology, 29: 529-535, 1975.

- LAVIN, P. & KOSS, L.G. Effects of a single dose of cyclophosphamide on various organs in the rat. The American Journal of Pathology, 62 (2): 159-168, Feb. 1971.
- LEVINE, S. & SOWINSKI, R. A hemorrhagic diathesis with involvement of hypothalamus produced in rats by cyclophosphamide. The American Journal of Pathology, 74 (1): 171-176, Jan. 1974.
- LIEDBERG, C.F. et al. Cyclophosphamide hemorrhagic cystitis. Scand. J. Urol. Nephrol., 4: 183-190, 1970.
- LILLIE, R.D. & FULLMER, H.M. Enzymes. Smear Preparations, Bacteria, Protozoa and other Parasites. In: LILLIE, R.D. & FULLMER, H.M. Histopathologic Technic and Practical Histochemistry, 4a. ed. McGraw-Hill, 1976, pp. 357-719, 1976.
- MELLO, M.L.S. Comunicação pessoal, 1976a.
- MELLO, M.L.S. Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero e eucromatinas. Tese de Livre-Docência - Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (SP), 1976b.
- MENDELSON, M.L. Absorption cytophotometry: comparative methodology for heterogeneous objects, and the two wave length method. In: WIED, G.L. Introduction to Quantitative Cytochemistry, N. York & London, Acad. Press, 1966, pp-201-214.
- MILLER, D.G. Alkylating agents and human spermatogenesis. JAMA, 217 (12): 1662-1665, Sept. 1971.

- MILLER, J.J. et al. Multiple late complications of therapy with cyclophosphamide, including ovarian destruction. The American Journal of Medicine, 50: 530-535, April, 1971.
- NINKOV, V. & PILETIC, O. Hematopoietic response after treatment with cyclophosphamide and autotransplantation of non damaged bone marrow cells. Acta Biol. Med. Med. Germ., 32: 35-41, 1974.
- ORNSTEIN, L. The distributional error in microspectrophotometry. Lab. Invest., 1: 250-262, 1952.
- PANNACCIULLI, I.M. et al. The effects of chronic administration of cyclophosphamide on haematopoietic stem cells. Scand. J. Haematol., 19: 217-223, 1977.
- PATAU, K. Absorption microphotometry of irregular shape objects. Chromosoma, 5: 341-362, 1952.
- PAYNE, H.G. et al. Effects of cyclophosphamide on somatic cell chromosomes in rats. Toxicology and Applied Pharmacology, 30: 360-368, 1974.
- PENSO, J. et al. Testicular function in prepubertal and pubertal male patient treated with cyclophosphamide for nephrotic syndrome. The Journal of Pediatrics, 84 (6): 831-836, June 1974.
- PRICE, H.L. & DRIPPS, R.D. Anestésicos gerais. In: Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 4a. ed. 1973, Guanabara-Koogan, cap. VII, pp. 77-78.

- ROSENOFF, S.H. et al. Recovery of normal hematopoietic tissue and tumor following chemotherapeutic injury from cyclophosphamide: comparative analysis of biochemical and clinical techniques. Blood, 45 (4): 465-475, April 1975.
- SCARD, J.L. et al. Hematopoietic recovery after a single high dose of cyclophosphamide in the mouse. Acta Physiol. Latino-Am., 22: 258-265, 1972.
- SCETBON, V. et al. Hématurie incoercible par traitement prolongé par cyclophosphamide. Journal D'Urologie et de Nephrologie, 80 (1-2): 203-206, Jan/Fev. 1974.
- SHORT, R.D. & GIBSON, J.E. Biosynthesis of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and protein "in vivo" by neonatal mice after a toxic dose of cyclophosphamide. Biochemical Pharmacology, 22: 3181-3188, 1973.
- SLADEK, N.E. Metabolism of cyclophosphamide by rat hepatic microsomes. Cancer Research, 31: 901-908, June 1971.
- SYRKIN, A.B. & ZAITZEVA, L.A. The rate of cyclophosphamide activation. Neoplasma, 17 (4): 377-381, 1970
- TOLCHIN, S.F. et al. Chromosome abnormalities from cyclophosphamide therapy in rheumatoid arthritis and progressive systemic sclerosis. Arthritis and Rheumatism, 17 (4): 375-382, July/August 1974.
- WARNE, G.L. et al. Cyclophosphamide induced ovarian failure. The New England Journal of Medicine, 289 (22): 1159-1162, 1973.

WATSON, N.A. & NOTLEY, R.G. Urological complications of cyclophosphamide. British Journal of Urology, 45: 606-609, 1973.

WHEELER, G.P. Alkylating agents. In: Holland, J.F. & Frei, E. Cancer Medicine, Ed. LEA & Fabiger, Philadelphia, 1973, Cap. XIII, pp. 791-806.

WISEMAN, J.C. & HAMBLY, C.K. Cyclophosphamide and haemorrhagic cystitis. The Medical Journal of Australia, 2: 576-577, Sept. 1971.

OBS.: As referências bibliográficas foram citadas de acordo com o estudo de Documentação da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Rio de Janeiro, 1969.