

ESTUDO COMPARATIVO DA TOXICIDADE DE  
DIFERENTES QUIMIOTERÁPICOS NAS  
ESTRUTURAS DE OVÁRIO E EPITÉLIO VAGINAL

Trabalho experimental em camundongos

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Robert Kiss, PhD

**VINICIUS MILANI BUDEL**

---

---

ESTUDO COMPARATIVO DA  
TOXICIDADE DE DIFERENTES  
QUIMIOTERÁPICOS NAS  
ESTRUTURAS DE OVÁRIO E  
EPITELIO VAGINAL

Trabalho experimental em camundongos

---

---

ORIENTADOR : PROF. ROBERT KISS, PhD

Tese apresentada ao Colegiado do  
Curso de Pós-Graduação em  
Clínica Cirúrgica do Setor de  
Ciências da Saúde da  
Universidade Federal do Paraná  
como requisito parcial à obtenção  
do grau de Mestre

Curitiba / 1993

---

*À querida esposa Anelise pela sua  
companhia maravilhosa e mãe  
generosa, aos nossos filhos João  
Henrique e Lucas, pela convivência e  
por seus ensinamentos.*

---

---

# *Agradecimentos*

Com muita estima e admiração que dirijo um muito obrigado

# Ao Prof. Dr. Laerte Justino de Oliveira pela orientação pelos sábios **conselhos** fazendo do convívio de nosso trabalho uma sincera amizade e exemplo **admirável**.

# Ao Prof. Dr. Osvaldo Malafaia pelo incentivo e profundo respeito pela **ciência médica**.

# Ao Prof. Dr. Plinio Gasperin Jr. um grande amigo que nos ajudou **incansavelmente** na documentação gráfica.

# A Prof. Dr. Paula Schimidt pela colaboração na realização dos cortes **histológicos** e leitura das estruturas.

# Ao Dr. Leo Leone Jr. pela sua participação efetiva no TECPAR. Sem sua **ajuda** este trabalho não poderia ter sido realizado.

# Ao Dr. Cassio Seleme Zandonat pela disponibilidade e ajuda no árduo **trabalho** da execução do experimento.

# Ao Prof. Dr. Acir Mulinari por sua colaboração na realização do exame **anatomopatológico** e revisão do texto histológico.

# Ao Prof. Dr. João Carlos Repka pelos seus conselhos e grande colaboração na **diluição** e acondicionamento das drogas.

---

---

# Sumário

LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1.0 INTRODUÇÃO .....	1
2.0 REVISÃO DA LITERATURA .....	6
3.0 MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1 Animais utilizados .....	14
3.2 Esquema experimenta .....	14
3.3 Injeções dos quimioterápicos .....	15
3.4 Avaliação clinica .....	15
3.5 Sacrificio .....	16
3.6 Obtenção do esfregaço vaginal .....	16
3.7 Acondicionamento dos ovários .....	17
3.8 Processamento histológico .....	17
3.9 Observação microscópica .....	18
3.9.1 Contagem de cada entidade ovariana .....	18
3.9.2 Índice de K.P.I. e relação hormonal indireta .....	20
3.10 Método estatístico .....	20
4.0 RESULTADOS .....	21
4.1 Generalidades .....	22
4.2 Folículos pré-cavitários .....	22
4.3 Folículos cavitários .....	23
4.4 Folículos atrésicos .....	23
4.5 Corpo luteo .....	23
4.6 Esfregaço vaginal .....	23
4.7 Avaliação ponderal .....	24
4.8 Taxa de mortalidade .....	24
4.9 Avaliação clinica .....	24

---

---

5.0	DISCUSSÃO .....	25
6.0	CONCLUSÕES .....	30
7.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
8.0	ANEXOS .....	44
	ANEXO 1- Banco de dados dos animais experimentais.....	45
	ANEXO 2 - Tabela - Média (+/-SEM) das contagens das estruturas ovarianas nos diferentes grupos experimentais.....	48

---

---

# *Lista de Gráficos*

Gráfico 1 -Média (+/- SEM) da contagem dos folículos pré cavitários nos ovários dos diferentes grupos experimentais .....	39
Gráfico 2 -Média (+/- SEM) da contagem dos folículos cavitários nos ovários dos diferentes grupos experimentais .....	40
Gráfico 3 -Média (+/- SEM) da contagem dos folículos atrésicos nos ovários dos diferentes grupos experimentais .....	41
Gráfico 4 - Gráfico 3 -Média (+/- SEM) da contagem doos corpos luteos nos ovários dos diferentes grupos experimentais .....	42
Gráfico 5 - Distribuição em porcentagem dos esfregaços vaginais nos diferentes grupos experimentais.....	43

*quatro lupicos são em  
estruturas do ovario*

---

# *Lista de Figuras*

Fig 1- Início da divisão das células foliculares .....	3
Fig 2 -Efeito inibidor do Danazol, estrgênio, estrogênio + progesterona sobre a secreção de gonadotrofina .....	4
Fig 3 - Tratamento empregado para os grupos de estudo .....	14
Fig.4 - Folículos ovarianos em seus diferentes estágios de desenvolvimento	19



---

---

## Resumo

O trabalho avalia lesões em ovários de camundongos causadas por diferentes quimioterápicos - ciclofosfamida (CPA), doxorubicina (DOX), 5-fluorouracil (5FU), vincristina (VCR), e compara-as a um grupo controle (CT) que recebeu placebo (solução de NaCl a 0.9%). Todos os animais foram sacrificados 24 horas após a parada do tratamento. Houve, para cada esquema terapêutico e placebo, uma duração de tratamento de 10 e 20 dias. Foram retirados os ovários e colhido esfregaço vaginal em cada um deles. Processados histologicamente, os ovários foram submetidos à contagem de 4 estruturas, definidas como: folículos pré-cavitários, folículos cavitários, folículos atrésicos e corpos lúteos. Os resultados, comparados ao controle, mostraram que houve aumento significativo ( $p < 0.001$ ) da média da contagem de folículos cavitários e atrésicos, e uma diminuição significativa ( $p < 0.001$ ) da média da contagem dos corpos lúteos. Com relação ao percentual de cariopícnose dos esfregaços vaginais, houve uma redução nos grupos tratados por quimioterapia. Apesar das doses utilizadas serem consideradas subletais pela avaliação clínica, conclui-se que são suficientes para causar lesão ovariana com repercussão hormonal.

---

---

## *Abstract*

The aim of this work is characterize chemotherapy induced ovarian damage with cyclophosphamide (CPA), doxorubicin (DOX), 5-fluorouracil (5FU) and vincristin (VCR), compared with a control group (NaCl 0.9%). The animal were sacrificed 24 hours after treatment stopped. They were treated during 10 and 20 days. After sacrifice, vaginal pap smears were carried out and histological procedure for each ovary were performed; 4 structures named: pre-antral, antral, atresic follicles and corpora lutea were counted. Results shown increased in antral and atretic follicles ( $p < 0.001$ ), and decreased of corpora lutea ( $p < 0.001$ ), compared with the control group. The karyopycnotic index were decreased in the animals treated by chemotherapy. Despite the sub lethal doses clinically observed, this drugs induced ovarian damage and hormonal deficiency.

# *Introdução*

# Introdução

## 1.0 INTRODUÇÃO

O aparecimento de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento dos tumores aumentou a chance de sobrevivência de pacientes portadores de câncer, anteriormente incuráveis, como a doença de Hodgkin, o coriocarcinoma, a leucemia linfoblástica aguda, etc. Estes medicamentos proporcionaram, igualmente, considerável melhora no prognóstico de outras doenças como a síndrome nefrótica, a nefrite lúpica e diversas doenças letais do colágeno. Surgem, porém, alguns efeitos secundários ligados a este tipo de tratamento e distinguem-se habitualmente em efeitos agudos e crônicos.

A toxicidade aguda da terapêutica quimioterápica afeta rapidamente as populações celulares de proliferação elevada, tais como medula óssea, pele, e epitélio gastro-intestinal. As manifestações clínicas destas entidades são bem conhecidas: pancitopenia, estomatites, alopecia, náuseas, vômitos e diarreia que usualmente são resolvidas com a interrupção do uso da medicação.

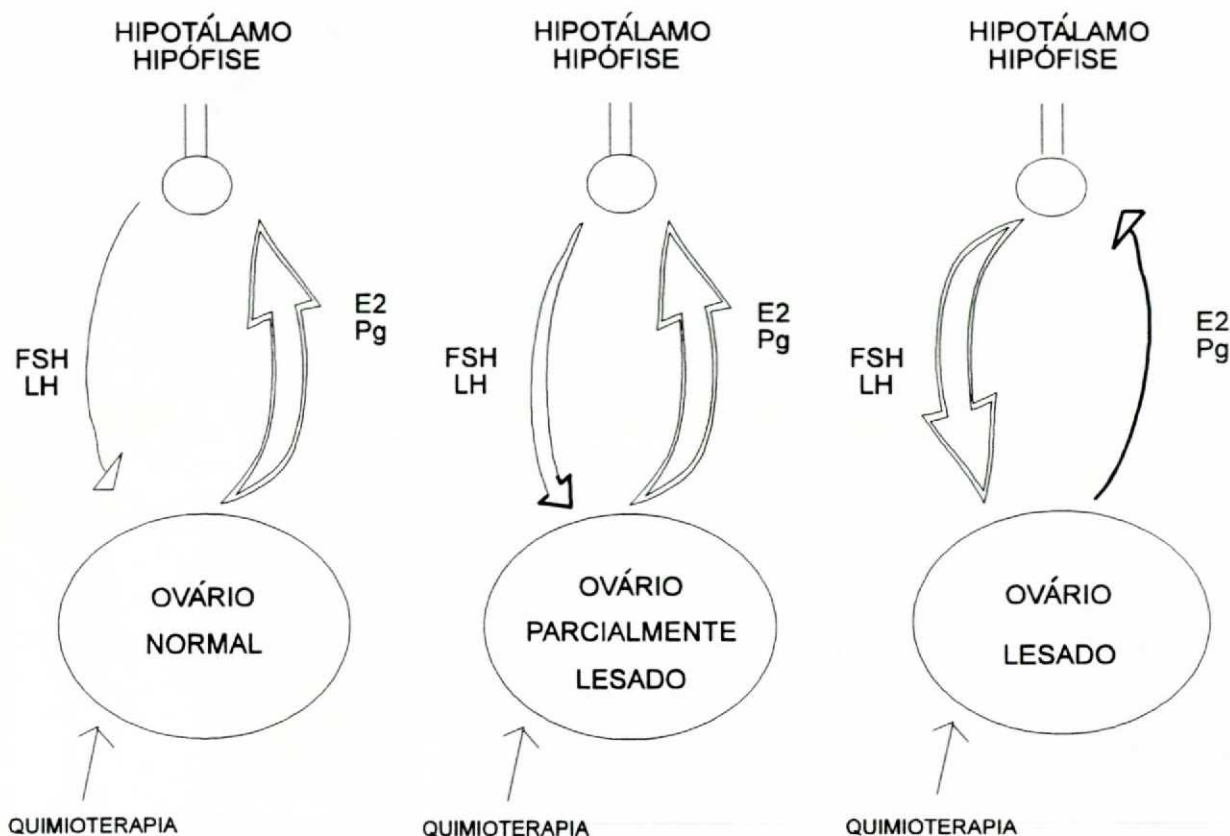
Algumas drogas são mais frequentemente associadas ao efeito tóxico retardado, tais como a cardiomiopatia da doxorubicina ou a fibrose pulmonar associada com a bleomicina, que podem tornar-se clinicamente manifesta mesmo após o término do tratamento.

À medida em que se torna mais longa a sobrevivência destes pacientes após o tratamento, surgem injúrias não identificadas previamente, sobretudo ao sistema reprodutor, levando à disfunções endócrinas e, conseqüentemente, à perturbação na produção dos gametas. A esterilidade mais frequentemente irreversível, acompanhada de insuficiência gonádica crônica, foi observada em 80% dos homens (azoospermia) e em 60% das mulheres (amenorréia), tratadas por quimioterapia do tipo MOPP, MVPP ou COPP na doença de Hodgkin. ( GLODE 1981, SCHILSKI 1981, HREUSER 1990, AVERETTE 1990 ).

Sabe-se que os agentes citotóxicos, notavelmente os agentes alquilantes, exercem um forte efeito letal sobre as células em proliferação ( SAMAAN 1978; SHALET 1980 ) e que os hormônios gonadotróficos ( FSH, LH ), responsáveis pela proliferação de células ovarianas, mostram uma grande elevação quando dosados durante a quimioterapia. A elevação da taxa dos hormônios FSH e LH é devida à interrupção do retro controle ( feed-back ) ovário-hipofisário-hipotalâmico, conseqüente à redução do número de células foliculares que são fontes dos hormônios sexuais. Este aumento da proliferação ( suicidária ) das células foliculares descritas no mecanismo fisiopatológico abaixo foi demonstrado, com a ciclofosfamida, em camundongos, numa análise detalhada da fração proliferativa do ovário através de

exames autoradiográficos com índices de marcagem de timidina triciada ( % TLI ), bem como pelo aumento do índice de marcagem imunohistoquímica nas células gonadotróficas ( BUDEL, KISS, de LAUNOIT, DANGUY, ATASSI, PASTEELS, PARIDAENS 1988).

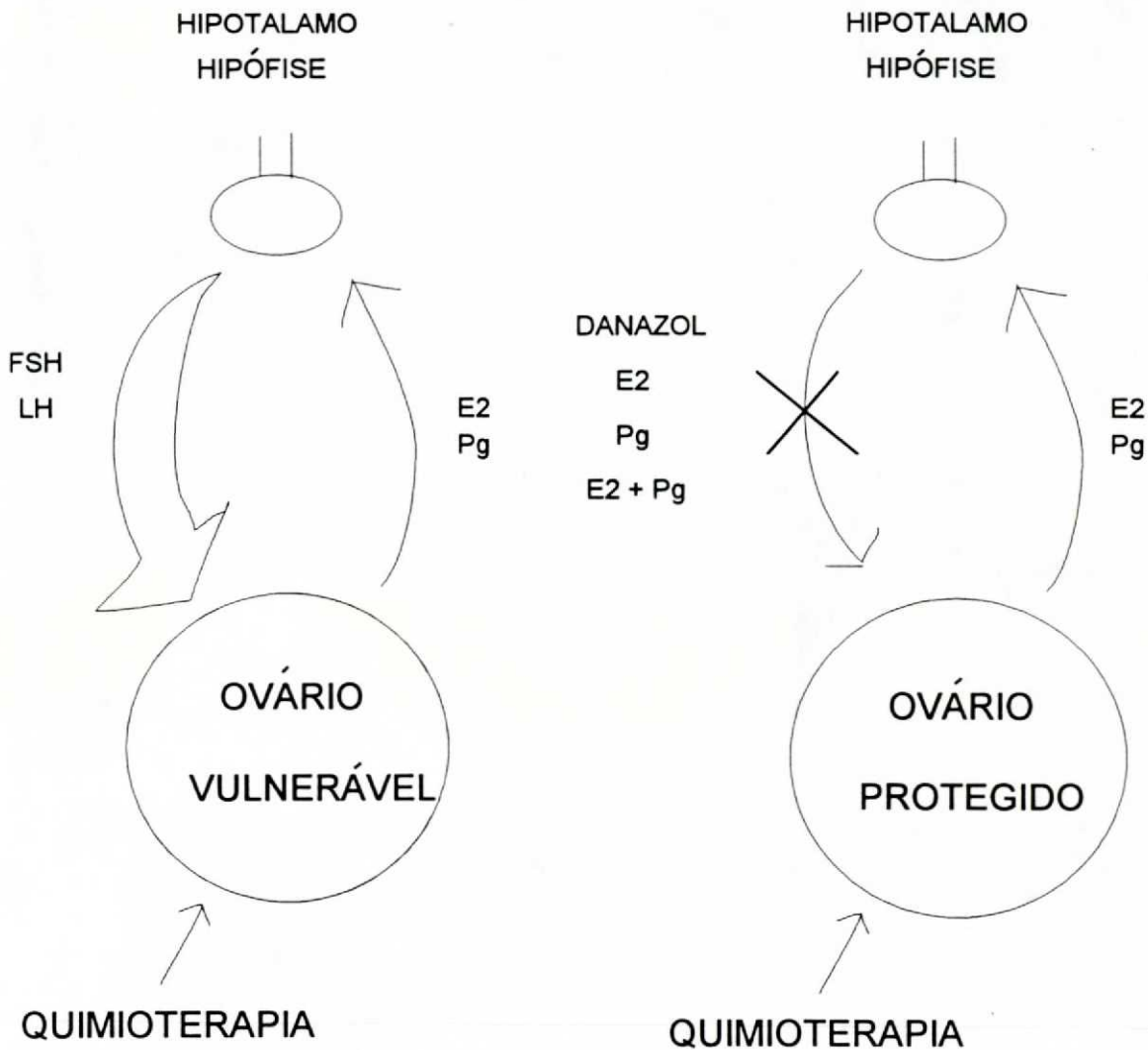
Figura 1



Esta figura representa o possível mecanismo pelo qual o ovário inicia a divisão das células foliculares, com progressivo aumento da produção dos hormônio gonadotróficos, tornando as células remanescentes mais suscetíveis à ação da quimioterapia

Este mesmo mecanismo recebe um suporte em sua demonstração quando o bloqueio da liberação de hormônios gonadotróficos ( FSH e LH ), através de manipulações hormonais, interrompem este mecanismo suicidário e permitem proteger os ovários das ações agressivas da ciclofosfamida sobre o capital de ovócitos.

Figura 2



Esta figura ilustra o efeito inibidor do Danazol, estrogênio, estrogênio + progesterona sobre a secreção de gonadotrofina que resulta em redução marcante da proliferação celular nos folículos, os quais são protegidos dos efeitos tóxicos da ciclofosfamida

Apesar dos mecanismos fisiopatológicos anteriormente descritos, as conclusões sobre as lesões crônicas causadas pela poliquimioterapia no ovário, não podem ser totalmente esclarecidas, devido a que as informações são fragmentadas, por não haver acesso fácil aos ovários para realização de biópsias sucessivas. Além das dificuldades de avaliação direta deste órgão, a maioria dos trabalhos experimentais normalmente utilizam monoquimioterapia como modelo de estudo (MILLER 1970; MIETKREWSKI 1973; BURKL 1978; SCHIROMIZU 1984; KHALID 1988; BUDEL 1988; ATAYA 1988; MORETZ 1991.)

O presente trabalho tem como objetivo comparar vários agentes quimioterápicos ( Ciclofosfamida, Adriblastina, 5 Fluorouracil, Vincristina, Ciclofosfamida + Vincristina.), separadamente, em grupos de camundongos fêmeas e observar as lesões nas diferentes estruturas ovarianas. Serão também avaliadas as alterações hormonais, de modo indireto, através do índice de cariopícnose do epitélio vaginal. Utilizando o mesmo modelo experimental onde foram observadas as alterações foliculares nos ovários dos animais, tratados com ciclofosfamida, este trabalho tem ainda por finalidade repetir a experiência anterior, acrescentando a análise comparativa das novas drogas ainda não testadas.

# *Revisão da Literatura*



# Revisão da Literatura

## 2.0 REVISÃO DA LITERATURA

SPITZ (1948)

Foi o primeiro autor a descrever a destruição gonádica causada por agentes citotóxicos. Encontrou em necrópsias, ausência de espermatogênese em 27 de 30 homens tratados com mostarda nitrogenada.

BELOHORSKY, SIRACKY, SANDOR E KLAUBER (1960)

Foram os primeiros autores a observar o desenvolvimento de amenorréia em pacientes com leucemia mielogênica crônica, tratadas com myleram.

FOSDICK, PARSONS, HILL (1968)

Da mesma forma estes autores relataram o aparecimento de amenorréia secundária, observado em um grupo de mulheres tratadas com myleram por artrite reumatóide.

FRIES, SHARP, Mc DEVITT (1970)

Como as informações do trabalho do FOSDICK, também referiram o aparecimento de amenorréia em 13 de 17 pacientes tratadas com myleram por Lupus Eritematoso sistêmico.

MILLER E COLE (1970)

Primeiro trabalho experimental em camundongo usando monoquimioterapia (ciclofosfamida) com doses subletais, durante 52 semanas, demonstraram interferência no desenvolvimento normal de ovócitos, folículos e corpo lúteo do ovário. Em cortes histológicos observaram apenas o aparecimento de um estroma uniforme interrompido apenas por espaços vasculares e camada de epitélio germinativo intacto.

MILLER, WILHANS E LEISSRING (1971)

Descreveram o desaparecimento dos folículos em uma adolescente de 14 anos que tinha recebido ciclofosfamida durante dois anos, para o tratamento de uma forma rebelde de artrite reumatóide, mesmo tendo sido realizado o corte histológico proveniente da autópsia três meses após a parada do tratamento.

SOBRINHO, LEVINE, De CONTI (1971)

Referiram falência ovariana em mulheres com doença de Hodgkin tratadas com múltiplos agentes quimioterápicos sequenciais (MOPP), as quais apresentaram incidência de 100% de amenorréia em 10 pacientes que foram submetidas a esta modalidade terapêutica.

KUMAR, BIGGART, Mc EVOY (1972)

Relataram casos de pacientes tratadas por ciclofosfamida que ficaram amenorreicas, porém também observaram que após um período de interrupção do tratamento, algumas das pacientes voltaram a ter ciclos regulares.

ULDALL, KERR, TACCHI (1972)

Sugeriram tratamento com reposição estrogênica para alívio dos fenômenos vasomotores e dos outros sintomas da menopausa relacionados à deficiência hormonal, devida às lesões ovarianas causadas por quimioterapia.

WARNE, FAIRLEY, HOBBS (1973)

Em trabalho retrospectivo observaram uma idade média de 29,6 anos para o agravamento de falência ovariana após tratamento com ciclofosfamida.

BONADONNA E VERONESI (1976)

Demonstraram que o uso prolongado da combinação de poliquimioterapia com ciclofosfamida, metotrexate e fluorouracil (CMF) para pacientes operadas com cirurgia radical para câncer de mama estadio clinico II, 50% das pacientes não menopausadas apresentavam amenorréia enquanto recebiam quimioterapia, porem reversível em 27% dos casos.

ROSE, DAVIS (1977)

Apresentaram evidência, através de dosagens hormonais seriadas, da falência ovariana progressiva, avaliadas em pacientes com 6 e/ou 12 meses após quimioterapia para tratamento de câncer de mama. O esquema utilizado era CMF.

KOYAMA , WADA, NISHIZAWA (1977)

Calcularam a dose de ciclofosfamida recebida antes do aparecimento de amenorréia em pacientes pertencentes às três etapas de idade seguintes: 40 a 49 anos; 30 a 39 anos e 20 a 29 anos. As dosagens eram respectivamente 5.2g., 9.3g. e 20g. Neste estudo ele observou igualmente que a ciclofosfamida induz a 94% de amenorréia, enquanto que um outro agente quimioterápico, a mitomicina C, induz a somente 27% de amenorréia.

SAMAM E BLUMENSCHHEIN (1978)

Determinaram elevados níveis hormonais gonadotróficos (FSH - LH) e baixos níveis de estradiol (E2), indicando que a amenorréia desenvolvida nas várias pacientes com câncer de mama, após o tratamento com fluorouracil, adriamicina e ciclofosfamida (FAC), é resultado da falência ovariana primária e não de lesão hipotalâmica ou hipofisária.

CHAPMANN, SUTALIFFE, MALPAS (1979)

Confirmaram, em 41 mulheres tratadas com MVPP para doença de Hodgkin, que a falência ovariana progressiva era relacionada à idade e à dose recebida em cada paciente e que mesmo após o tratamento quimioterápico, 27 pacientes engravidaram dando prova de funcionamento normal da vida reprodutiva. Porém, referiram que o aparecimento da menopausa precoce é independente da capacidade reprodutiva.

FISHER, SHERMAN, ROCKETTE (1979)

Em estudo prospectivo da função ovariana em mulheres pré-menopausadas, recebendo Melfalan (L-fenilalanina mostarda) ou combinado com 5-fluorouracil, demonstraram a ocorrência de amenorréia em 22% das pacientes mais jovens que 39 anos, porém em 73% de mulheres acima de 40 anos. Os níveis de FSH-LH eram semelhantes aos de pacientes castradas mesmo após o início de um ou dois ciclos de quimioterapia neste grupo de pacientes mais velhas.

---

SCHILSKY, LEWIS, SHERINS, YOUNG (1980)

Sugeriram, em artigo de revisão, que os agentes alkilantes parecem acelerar o início da menopausa, sobretudo em pacientes mais idosas, enquanto que as mais jovens toleram doses totais mais elevadas antes da amenorréia tornar-se irreversível. Observaram que, em pacientes pré-puberes, as drogas citotóxicas não causam profunda disfunção ovariana. Sugeriram ainda que, este efeito depende, além da idade das pacientes, da quantidade da droga administrada.

CHAPMAN, SUTCLIFFE (1981)

Em 6 mulheres jovens com idade inferior a 31 anos, referiram efeito protetor dos ovários com contraceptivos orais e comprovaram com biópsias, realizadas em ovário de 3 pacientes submetidas ao tratamento com quimioterapia tipo H.V.P.P.

HORNING, HOPPE, KAPLAN, ROSENBERG (1981)

Confirmaram, em grande série de pacientes (103), o efeito da quimioterapia nos ovários e sua relação com a idade de cada paciente, bem como o tempo de exposição da droga. Em sua série, as mulheres que receberam a associação terapêutica da radioterapia e quimioterapia, tiveram redução marcante em seu potencial reprodutivo e o desenvolvimento de menopausa precoce, enquanto que a incidência de gravidez era mais elevada quando comparadas com as pacientes que receberam apenas tratamento quimioterápico. Nas pacientes que engravidaram não se observou más formações em seus conceptos. (24 crianças nascidas de mães pertencentes a esta série).

GLODE, ROBINSON, GOULD (1981)

Com trabalho experimental em ratos machos, porém não randomizados e com pequenos números de animais, referiram efeito protetor dos análogos do fator inibidor de gonadotrofina após injeção de ciclofosfamida.

CHAPMAN (1982)

Em extenso artigo de revisão, advertiu que no tratamento dos pacientes de ambos os sexos submetidos à quimioterapia, deve ser incluída a concientização dos efeitos secundários de ordem hormonal, sexual e vida reprodutiva, bem como o tratamento clínico de reposição hormonal em ambos os sexos. Referiu também que a prevenção das lesões gonádicas devem ser melhor investigada.

WHITEHEAD, SHALET, BLACKLEDGE, CROWTHER, BEARDWELL.  
(1983)

Descreveram, em 44 mulheres tratadas com M.V.P.P. para doença de Hodgkin, com estratificação adequada de diferentes idades, que o efeito do contraceptivo oral não oferece proteção contra os efeitos da quimioterapia em relação à falência ovariana precoce, porém recomenda a substituição com estrogênio para diminuição dos sintomas da menopausa.

CHOO, STEVEN, CHAN, WONG, MA (1985)

Descreveram, em 22 pacientes tratadas com monoquimioterapia de etoposide (VP-16-213) por neoplasia trofoblástica gestacional residual, que esta droga produz os mesmos efeitos de lesão ovariana constatadas clinicamente por amenorréia hipergonadotrófica e hipoestrogênica.

WAXMAN (1985)

Não somente criticou o trabalho experimental desenvolvido por GLODE, mas também observou que não existe efeito protetor contra lesão testicular, usando análogos do fator liberador da gonadotrofina, em homens submetidos à quimioterapia.

BUDEL, KISS, deLAUNOIT, DANGUY, ATASSI, PASTEELS, PARIDAENS  
(1985)

Descreveram o possível mecanismo fisiopatológico da lesão ovariana causada pela ciclofosfamida, com a demonstração da elevação do índice de proliferação das células foliculares de ovário de camundongos, através do índice de marcagem de timidina. Demonstraram também sua relação com a dosagem da droga e a duração do tratamento. Estabeleceram a relação diretamente proporcional da lesão, a estes dois fatores. Referiram efeito protetor através de manipulações hormonais com estrogênio, progesterona, associação estrogênio + progesterona e danazol.

ATAYA, PALMER, BLACKER, MOGHISSI, MOHAMMAD (1988)

Em trabalho experimental com ratas, demonstraram que, a utilização de análogos do LH-RH (inibidor do hormônio gonadotrófico) reduz o índice de marcagem de timidina em células da granulosa do ovário, de forma estatisticamente significativa, em relação aos controles de animais não tratados, sugerindo efeito protetor desta droga à lesão celular causada pela quimioterapia.

## GRADISHAR E SCHILSKY (1989)

Referiram uma lista de quimioterápicos que podem causar lesões de ovário e os dividiram nos seguintes grupos:

Definitivos: clorambucil, ciclofosfamida, L-PAN, mustarda nitrogenada, busulfan, procarbazona.

Prováveis: doxorubicina, vinblastina, cisplatina, nitrosureia, etoposide.

Improváveis: metotrexate, 5-fluorouracil, vincristina, mercaptopurina.

Desconhecido: bleomicina.

Referiram também que os efeitos protetores dos análogos LH-RH não devem, em humanos, oferecer na realidade um bloqueio adequado da divisão das células foliculares, por apresentar uma capacidade maior de bloquear seletivamente o LH que o FSH.

## KREUSER, HETZEL, BILLIA, THIEL (1990)

Em estudo prospectivo com objetivo de avaliar os efeitos protetores dos bloqueadores dos hormônios hipofisotrópicos (LH-RH) contra os agentes quimioterápicos em gônadas masculinas humanas, demonstraram falha no método mesmo com o uso da droga antes, durante e depois da quimioterapia. Sugeriram que a reposição com esteroides são eficazes somente para diminuir os sintomas do hipogonadismo post-quimioterapia.

## PLOWCHALK E MATTISON (1990)

Em trabalho experimental com camundongos, desdobrando os produtos finais da degradação da ciclofosfamida que são a fosforamina mustarda e a acroleína, definiram que apenas a fosforamina mustarda tem ação tóxica lesiva em estruturas ovarianas, enquanto a acroleína não apresenta toxicidade nestas estruturas.

## MONTZ, WOLFF, GAMBONE (1991)

Em trabalho experimental com ratas, demonstraram, em estudo comparativo, o efeito protetor da progesterona em relação aos antagonistas (LH-RH) e encontraram melhores resultados com a progesterona que os antagonistas, observando a taxa de fecundidade e taxa de fertilidade para animais submetidos a doses sub letais de ciclofosfamida.

# *Material e Métodos*

# Material e Métodos

## 3.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Este estudo foi realizado no laboratório de Pesquisa do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) e nos departamentos de Ginecologia e Obstetrícia e Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

Utilizou-se 120 camundongos isogênicos de linhagem balbC fêmeas adultas com idade variando entre 22 e 25 semanas e pesando entre 22 e 25 g. provenientes do Instituto de Tecnologia do Paraná.

Estes animais foram mantidos em condições semelhantes de temperatura ( $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .) e luminosidade a razão de 14 h. de luz e 10 h. de obscuridade por nictemero.

A alimentação e a água foram dispensadas *ad libitum*.

Todos os animais foram distribuídos de maneira aleatória por tiragem a sorte (randomização) em gaiolas de 30 cm de comprimento por 15 cm de largura e 12cm de altura que permitiam a convivência de 5 animais.

Durante a experiência os animais foram pesados: no início da experiência, seguidas de pesagens de 3/3 dias, e antes do sacrifício. Foi usada uma balança eletrônica digital "Marte AH5500".

### 3.2 ESQUEMA EXPERIMENTAL

O esquema a seguir resume o modo de tratamento utilizado na experiência.

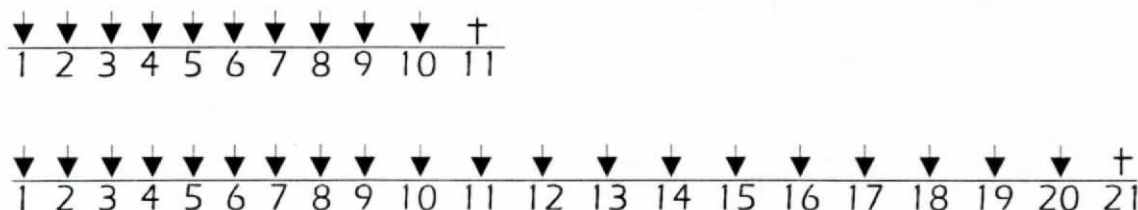


Figura 2

Este esquema representa o tratamento empregado para todos os grupos do estudo. As setas indicam inoculação do placebo ou das drogas (10 ou 20 inoculações). A cruz indica o dia do sacrifício dos animais.



### 3.3 INJEÇÃO DOS QUIMIOTERÁPICOS

Dois grupos controles (CT1, CT2) contendo cada um 10 animais receberam diariamente uma injeção intra peritoneal (ip) de solução salina fisiológica (NaCl 9g/l) durante 10 dias (grupo CT1) e durante 20 dias (grupo CT2). Os animais dos 5 outros grupos (cada grupo contendo 20 animais) foram tratados das seguinte maneira: grupo A = ciclofosfamida (Abbott Laboratorios do Brasil Ltda); grupo B = doxorubicina (Farmitalia Carlo Erba S.A.); grupo C = 5 fluorouracil (Roche Produtos Quimicos e Farmacêuticos S.A.); grupo D = vincristina (Farmitalia Carlo Erba S.A.); grupo E = ciclofosfamida + vincristina. Todos os grupos foram divididos em quatro outros subgrupos de cinco animais (C-10d; C-20d; A-10d; A-20d), seja quanto ao tempo de inoculação, durante 10 dias nomeados por (10d), durante 20 dias nomeados por (20d); seja quanto à dosagem da medicação, dosagem convencional (C) e alta dosagem (A), que corresponderam respectivamente conforme cada droga, segundo o esquema abaixo:

- Grupo A (CPA = Ciclofosfamida) 20 mg/Kg (C) e 40mg/Kg (A)
- Grupo B (DOX = doxorubicina) 1mg/Kg (C) e 2mg/Kg (A)
- Grupo C (5FU = 5 fluorouracil) 15 mg/Kg (C) e 30mg/Kg (A)
- Grupo D (VCR = Vincristina) 0,015mg/Kg(C) e 0,03mg/Kg(A)
- Grupo E (CPA+VCR = Ciclofosfamida + vincristina) 20mg/Kg (CPA) +0,015mg/Kg (VCR) (C) e 40mg/Kg (CPA) + 0,03mg/Kg (VCR) (A)

### 3.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Foi feita observação diária do comportamento dos animais e como parâmetros de avaliação clínica, considerou-se a atividade física do animal, a aceitação da alimentação, observação de áreas de alopecia, alteração no aspecto das fezes e observação das vísceras e da cavidade abdominal após o sacrifício.

### 3.5 SACRIFÍCIO

Os animais recebiam injeções intraperitoneais diárias conforme as concentrações acima, e 24 horas após a última injeção eram sacrificados da seguinte maneira: trazidos à sala de experimentação na gaiola, apanhados com a mão direita do experimentador fixando-se sobre o seu dorso mantendo seus membros craniais imobilizados contra a parede torácica pela pressão exercida pelos dedos polegar e indicador.

Em seguida eram colocados em uma câmara anestésica fechada, onde permaneciam durante 2 minutos. A câmara anestésica constituía-se de um recipiente de vidro transparente, fechado com tamp com 10 cm de altura e 10 cm de diâmetro que continha no seu interior bolas de algodão previamente embebidas com 20 ml de éter sulfúrico.

Constatado o óbito, o animal era posicionado sobre uma prancheta retangular feita de madeira aglomerada, com dimensões 20cm de largura e 30cm de comprimento que foi colocada sobre uma mesa de procedimentos de forma a apontar a cauda do animal para o experimentador, e a extremidade cranial para o auxiliar. Ao lado da prancheta posicionava-se a bandeja com o instrumental cirúrgico.

Os animais eram então fixados na prancheta cirúrgica em decúbito dorsal, com os membros craniais e caudais fixados através de alfinetes que transfixavam os quatro membros de modo a permitir adequada exposição da área a ser submetida à dissecação. Efetuava-se uma grande incisão em U vertical, iniciando-se com bisturi e completando-se com tesoura interessando todos os planos da parede abdominal, começando no rebordo costal esquerdo descendo à face lateral esquerda da parede abdominal, passando junto ao pube e terminando no rebordo costal direito, junto à linha axilar média.

O objetivo desta incisão era obter uma ampla exposição da cavidade abdominal para observação e estudo de todas as estruturas intraabdominais e a eventual ação da quimioterapia. Após rebater-se o retalho cranialmente, repousando sobre a parede torácica do animal, procedia-se à inspeção sistemática da cavidade abdominal e então procedia-se à retirada dos ovários bilateralmente com dissecação da gordura em excesso para facilitar a fixação e inclusão em parafina.

### 3.6 OBTENÇÃO DO ESFREGAÇO VAGINAL

Após a retirada dos ovários era introduzido um cotonete na cavidade vaginal do animal, fazendo-se movimentos rotatórios de modo a colher amostragem de toda a extensão vaginal. Em seguida, eram esfregados contra uma lâmina em toda sua extensão, cobrindo toda a superfície e logo em seguida fixados com solução de álcool e éter a 50% (1/1 = v/v). Posteriormente foram corados com a técnica de Papanicolaou.

### 3.7 ACONDICIONAMENTO DOS OVÁRIOS

Os ovários foram acondicionados separadamente em frascos previamente identificados conforme seu grupo de tratamento, contendo solução de formol a 10% e, após um período de fixação de 48h., foram encaminhados para processamento histológico.

### 3.8 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os ovários foram submetidos à técnica histológica de rotina cumprindo as seguintes etapas no processador de tecidos:

**1. Desidratação:** Utilizou-se álcool etílico em três concentrações crescentes em grau alcoólico, iniciando-se com 70% de álcool e 30% de formalina, e passando a 80% e 90% de álcool. Esta fase demorou 1 hora e 30 minutos, com os ovários permanecendo em cada solução alcoólica por 30 minutos.

**2. Diafanização:** Após passar por mais dois frascos de álcool absoluto, sendo completada a desidratação, os ovários foram mergulhados, inicialmente em um frasco com xilol para retirar o excesso de álcool e, a seguir, em um frasco com 90% de xilol e 10% de ácido fênico, no qual ocorria a diafanização. Esta etapa durava 1 hora e os ovários permanecia durante 15 minutos em cada frasco.

**3. Inclusão em parafina:** Consistia na embebição dos ovários diafanizado em parafina derretida com ponto de fusão a 42°C, durante 1 hora e 30 minutos. Nesta fase, começava a infiltração de parafina nos ovários. Após este tempo; os ovários foram mergulhados em parafina derretida com ponto de fusão de 56°C, por 30 minutos. Com esta manipulação, a parafina de ponto de fusão mais alto, também era infiltrada nos ovários.

Completadas as fases realizadas no processador de tecidos, a peça envolvida em película de parafina, foi levada para:

**4. Parafinização em blocos:** Os ovários foram acondicionados em pequenas formas cúbicas, preenchidas com parafina líquida, mantida derretida em ponto de fusão de 56°C, constituindo os blocos de parafina.

**5. Microtomia:** esquema representa o tratamento empregado para todos os grupos d estudo. As setas indicam inoculação do placebo ou das drogas (10 ou 20 inoculações). A cruz indica o dia do sacrifício dos animais.

**6. Hidratação:** As lâminas montadas, foram desparafinizadas em banho de xilol e hidratadas em banhos de solução com teores alcoólicos decrescentes, até banhos com água

**7. Coloração:** Utilizou-se o método usual de hematoxilina-eosina (H.E.), recorrendo-se à solução de hematoxilina de Harris para coloração nuclear e à solução aquosa de eosina amarelada a 10% para coloração citoplasmática.

**8. Montagem da lâmina:** Após a coloração procedeu-se à desidratação e diafanização dos cortes montados na lâmina, respectivamente, através de rápidos banhos de imersão em frascos contendo soluções crescentes em teores alcoólicos, e frascos com xilol e xilol fenicado. Em seguida, os cortes montados nas lâminas, foram cobertos por uma lamínula de 20mm X 30mm, fixada à lâmina com resina sintética (Entelan\*, Merck).

### 3.9 OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA

Para a leitura das lâminas histológicas utilizou-se o microscópio AO Spencer, tetraocular, com objetivas de aumento de 4, 10 e 45 vezes e o ocular de 10 vezes.

#### *3.9.1 CONTAGEM DO NÚMERO DE CADA ENTIDADE OVARIANA*

Os ovários possuem na zona cortical ovócitos em diferentes estágios de maturidade. No camundongo fêmea adulta, distingue-se as seguintes estruturas em função do estágio de seu desenvolvimento:

**1. Folículos primordiais:** São constituídos por um ovócito cercado por três ou quatro células foliculares planas.

**2. Folículos primários:** O ovócito apresenta um núcleo maior que o precedente, e as células foliculares possuem forma cúbica, dispostas em somente uma camada que cerca o ovócito.

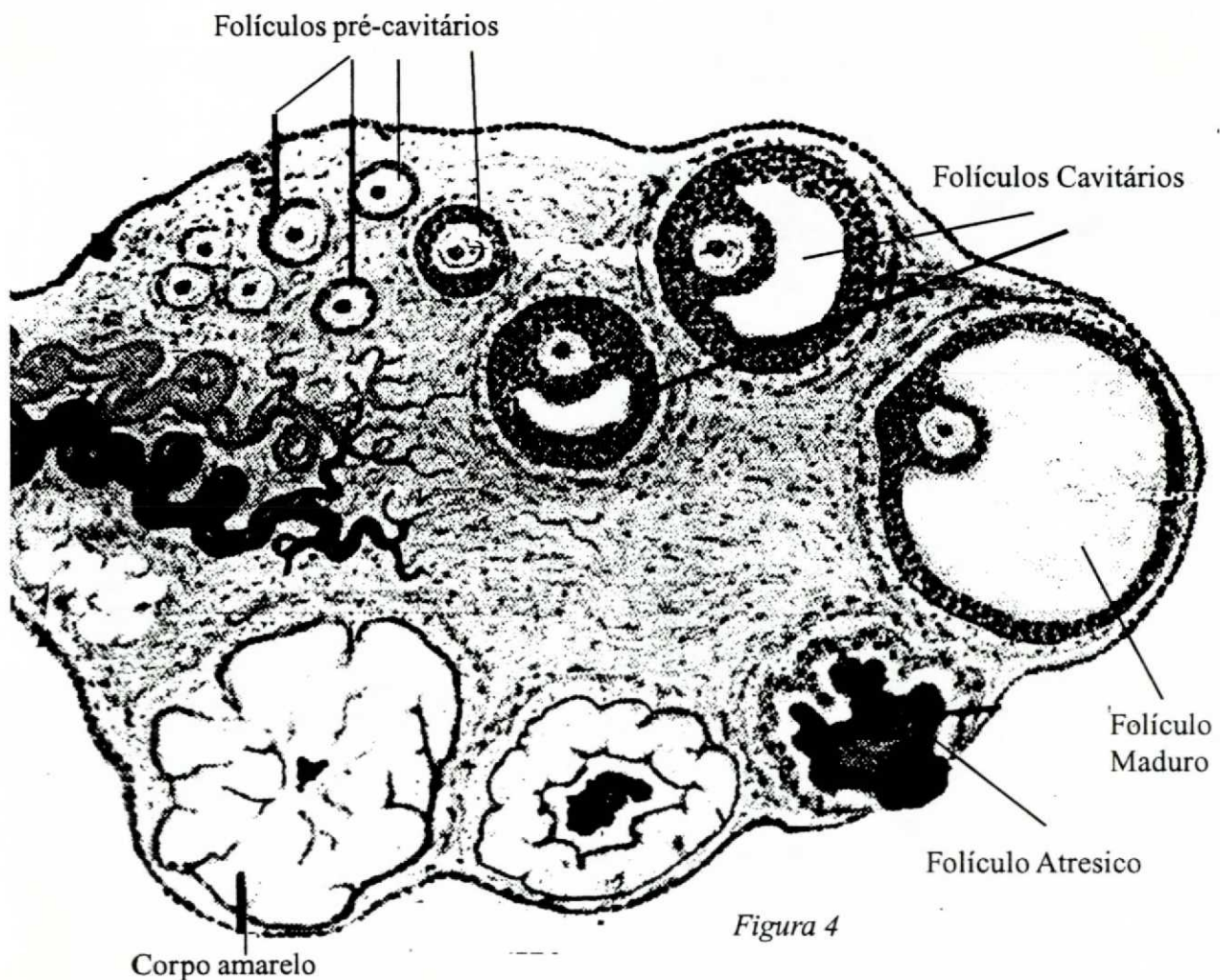
**3. Folículos secundários:** Contém um ovócito ainda maior e as células foliculares são dispostas em duas ou três camadas, constituindo a "membrana granulosa". Os folículos secundários mais volumosos começam a desenvolver uma cavidade.

**4. Folículos terciários:** O ovócito atinge o seu desenvolvimento máximo e as células foliculares delimitam uma cavidade folicular nítida (antrum), cheias de líquido (liquor folliculi).

**5. Folículos de Graaf:** O ovócito é excêntrico em relação ao folículo e cercado pela corona radiata. Estas estruturas formam o "cumulus oophorus".

**6. Folículos atresícos:** Correspondem a uma involução folicular que pode ocorrer em qualquer estágio de seu desenvolvimento. Apresenta uma desintegração da estrutura folicular, o ovócito não é mais reconhecido e as células foliculares estão picnóticas típicas de uma fase pré letal.

**7. Corpos amarelos:** Representa o estágio final da evolução dos folículos de Graaf. Estas estruturas são típicas com coágulo interno e constituem glândulas endócrinas, temporariamente.



Este esquema gráfico representa os folículos ovarianos em seus diferentes estágios de desenvolvimento

As diferentes estruturas foliculares, teoricamente bem definidas acima, não são sempre facilmente distinguidas na prática e para não cometer erros de identificação, fez-se divisão em quatro classes para facilitar a contagem:

- 1. Classe dos folículos pré-cavitários:** Agrupa os folículos primordiais, primários e secundários prococes. Então os folículos desta classe jamais são cavitários.
- 2. Classe dos folículos cavitários:** Agrupa todos os folículos que apresentam cavidade, ou seja, os folículos secundários, terciários.
- 3. Classe dos folículos atrésicos:** Os folículos jamais possuem ovócitos; possuem uma clara alteração morfológica, ou seja, picnose nuclear e ruptura das células foliculares.
- 4. Classe dos corpos amarelos:** Conforme descrito anteriormente.

### *3.9.2 ÍNDICE DE CARIOPICNOSE E RELAÇÃO HORMONAL INDIRETA*

Em cada animal o índice de Cariopicnose (CI) foi calculado. Este índice representa a porcentagem de células epiteliais com núcleo picnótico escamosas em uma contagem de 200 células, aproximadamente (MORSE, HUTTON, JACOBS e MURRAY, 1979). De acordo com seus índices de cariopicnose, esfregaços foram classificados como correspondendo à um estado atrófico (CI<1%), estado não específico ou intermediário (CI=1-10%) e estado estrogênico ou estimulado (CI>10%). Estas lâminas foram todas examinadas pelo mesmo investigador e foram codificadas para não haver vícios de leitura.

### *3.10 MÉTODO ESTATÍSTICO*

Foi utilizado o teste de Fisher (teste estatístico mono variado), onde as médias (+/- SEM) das contagens das estruturas ovarianas dos grupos de tratamento quimioterápico, foram comparadas com os grupos controles. Em todos os testes fixou-se  $p < 0.05$  como nível de significância de rejeição da hipótese de nulidade.

# *Resultados*

# Resultados

## 4.0 RESULTADOS

### 4.1 GENERALIDADES

A contagem do número de estruturas ovarianas, bem como a leitura das lâminas dos esfregaços vaginais, descritas na metodologia, foram realizadas por um pesquisador que desconhecia as condições da experiência e recebeu as lâminas codificadas para não haver vícios de leitura.

O número de folículos pré-cavitários, cavitários, atrésicos e corpo amarelo foram comparados e os resultados analisados são apresentados sequencialmente em cada gráfico, após a aplicação dos testes estatísticos comparando o grupo controle (animal tratado com solução salina de NaCl a 0,9%) com os grupos tratados com quimioterapia na ordem sequencial de tratamento com: ciclofosfamida (CPA), doxorubicina (DOX), 5-fluorouracil (5FU), vincristina (VCR) e associação ciclofosfamida + vincristina (CPA+VCR). Para cada grupo de animais tratados, foi realizada a contagem comparativa das seguintes estruturas:

- 1) folículos pré-cavitários;
- 2) folículos cavitários;
- 3) folículos atrésicos;
- 4) corpo amarelo ( ou corpo lúteo ).

Os esfregaços vaginais classificados de acordo com o índice de cariopícnose (mostrando o percentual de animais classificados como estimulados, intermediários e atróficos), representam a avaliação indireta da atividade estrogênica. São comparados os animais dos grupos controles com os diferentes grupos de tratamento.

### 4.2 FOLÍCULOS PRÉ-CAVITÁRIOS.

O gráfico N°1 representa os resultados (médias +/-SEM) das contagens dos folículos pré-cavitários segundo os diferentes grupos experimentais. Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos controles. O grupo tratado por CPA teve resultados semelhantes entre os 4 sub grupos, porém não significativos em relação aos resultados do grupo controle. Para os outros grupos de tratamento (DOX, 5-FU, VCR, CPA+VCR) houve uma grande variação nos resultados dos diferentes subgrupos, o que poderia espelhar a dificuldade do examinador no devido reconhecimento destas estruturas (Figura 1).



---

### 4.3 FOLÍCULOS CAVITÁRIOS

---

O gráfico n° 2 representa os resultados (médias +/-SEM) das contagens dos folículos cavitários nos diferentes grupos experimentais. Não existe diferença significativa entre os grupos controles, porém existe um aumento estatisticamente significativo do número de folículos cavitários presentes nos ovários de todos os grupos tratados. Os valores dos testes de Fisher variaram de  $p < 0.05$  a  $p < 0.001$ .

---

### 4.4 FOLÍCULOS ATRÉSICOS

---

O gráfico n° 3 representa os resultados (médias +/-SEM) das contagens dos folículos atrésicos nos diferentes grupos experimentais. Não existe diferença significativa entre as médias dos grupos controles. Ao contrário, as médias das contagens dos folículos atrésicos presentes em todos os grupos tratados por quimioterapia, são maiores de uma forma estatisticamente e altamente significativas em comparação aos valores das médias dos grupos controles ( $p < 0.001$ ).

---

### 4.5 CORPO LÚTEO

---

O gráfico n° 4 representa os resultados (médias +/-SEM) das contagens dos corpos lúteos nos diferentes grupos experimentais. Novamente não existe diferença significativa entre as médias dos grupos controles, porém os valores das médias das contagens dos corpos lúteos presentes nos ovários de todos os grupos tratados por quimioterapia são menores em comparação às médias dos grupos controles de uma forma estatisticamente e altamente significativa ( $p < 0.001$ ).

---

### 4.6 ESFREGAÇÃO VAGINAL

---

O gráfico n° 5 representa a porcentagem de esfregaços vaginais avaliados nos diferentes grupos de tratamento, onde foram classificados em esfregaços vaginais estrogênicos, intermediários e atróficos. Nos grupos controles os esfregaços apresentaram-se de 20-30% intermediários e 70-80% estrogênicos. Nos grupos tratados houve semelhança nos resultados e estes foram na maioria dos grupos 100% atróficos, e em outros grupos 20% intermediários e 80% atróficos.

---

#### 4.7 AVALIAÇÃO PONDERAL

Nos animais tratados não houve variação ponderal durante os dias de pesagens, antes e após o início da experiência, onde foram feitas pesagens a cada 3 dias, e no dia do sacrifício. (Anexo 2 - Tabela)

---

#### 4.8 TAXA DE MORTALIDADE

Não houve morte nos diferentes grupos desta experiência. (Tabela 2).

---

#### 4.9 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Não foram observadas alterações clínicas conforme descrito na metodologia, nos diversos grupos de tratamento e controle. Igualmente, não se observou alterações macroscópicas das vísceras no momento do sacrifício dos animais. No momento da dissecação não foi possível colher amostras de medula óssea ou sanguínea para avaliação hematológica, devido à dificuldade técnica de colher material, visto o tamanho do animal e o custo de execução.

# *Discussão*

# Discussão

## 5.0 DISCUSSÃO

O tratamento das neoplasias malignas com agentes quimioterápicos tem progredido enormemente desde a sua primeira utilização para o tratamento da doença de Hodgkin com agentes alquilantes. Com o resultado do desenvolvimento de uma combinação eficaz dos vários quimioterápicos em diferentes protocolos, 12 cânceres são considerados “curados”. (DEVITA e ROSENBERG, 1989). Porém, sem exceção, cada droga quimioterápica carrega consigo efeitos secundários reflexos de sua indiscriminada atividade contra os tecidos de reprodução.

A complicação ou efeitos secundários da quimioterapia podem ser arbitrariamente divididos em efeitos agudos e efeitos crônicos. A avaliação dos efeitos crônicos da quimioterapia sobre os ovários tem sido impedida pela relativa inacessibilidade do ovário por biópsia.

As dosagens séricas dos níveis de LH, FSH e estradiol podem corresponder às características da vida reprodutiva feminina em cada estágio de idade (pré-puberal, menarca, manacne, perimenopausa e menopausa). Tais características destes perfis hormonais podem prever o que ocorre em certas mulheres com distúrbios menstruais como os causados pela falência ovariana secundária, porém o real potencial de destruição do capital de ovócitos que a quimioterapia pode causar no ovário feminino, resta ainda ser elucidado.

A quimioterapia afeta mais provavelmente o processo de crescimento e maturação folicular. A lesão histológica mais comumente observada nos ovários de pacientes recebendo quimioterapia é a fibrose e destruição folicular. (MILLER e LEISSRING, 1971 - SOBRINHO, LEVINE e De CONTI, 1971). Clinicamente, a disfunção ovariana se manifesta por irregularidade menstrual e eventual amenorréia. A falência ovariana quando confirmada pelas dosagens hormonais hipofisárias (FSH, LH) elevadas e estradiol diminuído, é observada clinicamente pela atrofia do epitélio vaginal e do endométrio, e muitas pacientes apresentam sintomas precoces de menopausa como fogachos, irritabilidade, interrupção do sono, diminuição do libido e perda da auto estima. A deficiência estrogênica é mais observada pelos sintomas de secura vaginal, prurido e dispareunia. A duração e frequência destes sintomas são dependentes da dosagem da medicação, do tempo de exposição à droga, bem como da idade em que inicia o tratamento. Em geral as pacientes mais jovens podem tolerar melhor uma dose acumulativa quimioterápica antes do aparecimento da amenorréia em comparação às pacientes mais idosas. Isto se deve à maior proporção de folículos jovens em reserva ovariana relativas à idade.

As principais observações feitas em roedores e humanos das disfunções ovarianas são descritas com monoquimioterapia e geralmente com agentes alquilantes, como busulfan e ciclofosfamida. (SMALLEY 1966; GLATON 1968; MILLER E COLLE 1970; MIETKIEWSKI AND FICHNA 1973; KOYAMA E YAMAHOTO 1977; BURKL AND SCHIECHL 1978; ATAYA, MCKANA, CLARK E LEMAIRE 1985; BUDEL, KISS, PASTEELS E PARIDAENS 1988; ATAYA, VALERIOTE E ATAYA 1989; PLOWCHALK E MATTISON 1990; MORITZ, WOLF E GANBONE 1991).

As observações com outras drogas, isoladamente, são inconclusivas tendo em vista que a maior parte dos esquemas terapêuticos para as diferentes neoplasias constituem-se invariavelmente de poliquimioterapia. Poucos trabalhos apresentam provas de disfunção ovariana com utilização de monoquimioterapia e agentes não alquilantes. (CHOO, STEVEN, 1985).

Não existe na literatura modelo de experimentação animal que teste isoladamente agentes antimetabólicos como 5-fluorouracil ou antibióticos como a doxorubicina e plantas alcaloides como a vincristina e seus efeitos específicos no ovário.

GRADISHAR E SCHILSKY (1989) baseados em dados pessoais de observações isoladas, propuseram uma tabela de drogas relacionadas com a infertilidade e classificou como:

**DEFINITIVAS:** Clorambucil, ciclofosfamida, L-fenilalanina mustarda, nitrogênio mustarda, busulfan, procarbazona.

**PROVÁVEIS:** Doxorubicina, vinblastina, citosina arabinoside, cisplatina, nitrosureias, m-amsa, etoposide.

**IMPROVÁVEIS:** Metotrexate, fluorouracil, mercaptopurina, vincristina.

**DESCONHECIDAS:** Bleomicina.

Com o objetivo de observar especificamente cada droga e de compará-las entre si e com o grupo controle, escolheu-se o modelo de estudo já experimentado anteriormente com ciclofosfamida para descrição do mecanismo fisiopatológico e testou-se isoladamente cada droga para observar seus efeitos nas estruturas foliculares ovarianas já descritas. Surpreendentemente, observou-se que existem alterações significativas, quer pelo aumento dos folículos em crescimento, quer pela maior contagem de folículos atresicos em todos os grupos tratados, bem como uma diminuição altamente significativa do número de corpo amarelo nos ovários dos ratos tratados, em comparação àqueles do grupo controle. Isto evidencia, de fato, a maior morte de células foliculares, concordando com o mecanismo suicidário já descrito na introdução, e diminuindo, conseqüentemente, o número de folículos capazes de ovular, visto à pouca formação de corpo amarelo que os ocorre após a ovulação.

Concomitante a esta “perda” folicular provocado pela quimioterapia, observa-se, indiretamente, uma atividade estrogênica diminuída nos animais tratados em relação aos grupos controles não tratados.

Considerando que estas dosagens são insuficientes para provocar quaisquer alterações clínicas significativas como perda de peso ou alterações do comportamento dos animais como hipoatividade, perda do apetite, diarreia ou alopecia; e que não foram observadas macroscopicamente lesões viscerais importantes como cistites hemorrágicas, acredita-se que, mesmo em doses fracas subletais, estes diferentes agentes quimioterápicos são capazes de lesar o ovário de modo a provocar ao menos as perdas foliculares e possível diminuição da síntese de estrogênios que ocorre a partir de células foliculares visto que a maior parte dos animais tratados mostravam esfregaços vaginais atróficos, enquanto que os animais do grupo controle não tratados (que não apresentavam a mesma perda folicular), mantiveram seus níveis de estrogênio representados indiretamente por seus índices de cariopícnose padrão estimulados (estrogênicos), sugerindo produção adequada de estrógeno.

Particularmente nos animais tratados com as drogas 5-fluorouracil e vincristina, ou associação vincristina + ciclofosfamida, contrariamente às referências de GRADSHAR E SCHILSKY (1989) que consideram estas duas drogas como improváveis de causar lesões ovarianas, em nossa experiência estes animais mostraram importantes perdas foliculares (observadas no capítulo dos resultados). Notavelmente no número aumentado de folículos atrésicos, os quais representam o dano da quimioterapia dentro das estruturas do ovário, particularmente nestes folículos de alta expressão da divisão celular.

Resta ainda saber se estes animais teriam a mesma capacidade reprodutiva, o que não foi estudado, visto que todos foram sacrificados para avaliação das estruturas ovarianas. Acredita-se que estas dosagens seriam insuficiente para causar perda total da função reprodutiva visto que os folículos remanescentes observados nos grupos tratados ainda seriam viáveis uma vez que não foram todos destruídos. Porém, o objetivo era apenas avaliar a lesão folicular, mesmo com baixas doses, para determinar o limite das doses e a duração do tratamento.

Outras experiências devem ser realizadas observando, da mesma maneira, os possíveis efeitos em outros órgãos bem como a taxa de mortalidade de doses mais elevadas que, nas mesmas condições de experiência, devem alterar-se.

Da mesma forma, parece importante testar a associação destas drogas quimioterápicas com possíveis agentes protetores como Danazol, progesterona e os análogos LH-RH, que podem ser comparados, observando que, para isso, dois grupos controles se fazem necessários: animais tratados com placebo e animais tratados com quimioterapia, comparados então aos animais tratados com quimioterapia mais agentes protetores. Não existe consenso na literatura sobre este assunto que, por um lado mostra que estas drogas não possuem efeitos protetores como relatam os trabalhos de WAXMAN 1985 E 1987; KREUSER, HETZEL, BILLIA E THIEL, 1990; MORITZ E GAMBONE 1991, ou que oferecem efeitos protetores como mostram os trabalhos de GLODE 1981, 1982; CHAPMAN E SUTCLIFE 1981; ATAYA, MCKANA, HILARCK E LE MAIRE 1985; BUDEL, KISS, PASTEELS, E PARIDAENS, 1988; ATAYA, PALMER, BLACKER, MOGHISSI E MOHAMMAD, 1988; ATAYA,

VALERIOTE E ATAYA, 1989.

O modelo experimental utilizado pode oferecer algumas vantagens, como a facilidade de reunir vários grupos com diferentes drogas, pois o camundongo não traz dificuldades para o tratamento diário e o custo de utilização das drogas são compensadores, bem como a alimentação, acondicionamento e manuseio do animal. Algumas desvantagens, entretanto, devem ser salientadas: dosagens hormonais e colheitas de sangue tornam-se impraticáveis.

# *Conclusões*



# Conclusões

## 6.0 CONCLUSÕES

A partir das análises deste trabalho conclui-se que:

1 - As dosagens utilizadas causam lesão ovariana sem resultarem efeitos clínicos importantes, mesmo as drogas consideradas improváveis de tal efeito ( como 5- fluorouracil e a vincristina).

2 - As lesões ovarianas são facilmente observadas pelo envelhecimento precoce dos folículos, verificados pelo aumento de folículos atrésicos e pela diminuição do número de corpo amarelo.

3 - Estas lesões ovarianas são acompanhadas de diminuição importante da resposta hormonais, observadas pelo baixo índice de cariopcnose no epitélio vaginal.

# *Referências Bibliográficas*

# Referências Bibliográficas

## 7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, B.L. Sexual functioning morbidity among cancer survivors. Current status and future research directions. Cancer, v. 55, n.8, p.1835-1842, 1985.

ATAYA, K.M.; McKANNA, J.A.; WEINTRAUB, A.M.; CLARK, M.R.; LeMAIRE, W.J. A luteinizing hormone-releasing hormone agonist for the prevention of chemotherapy-induced ovarian follicular loss in rats. Cancer Research, v.45, p. 3651-3656, 1985.

ATAYA, K.M.; PALMER, K.C.; BLACKER, C.M.; MOGHISSI, K.S.; MOHAMMAD, S.H. Inhibition of rat ovarian [3H] thymidina uptake by luteinizing hormone-releasing hormone agonists: a possible mechanism for preventing damage by cytotoxic agents. Cancer Research, v.48, p.7252-7256, 1988.

ATAYA, K.M., VALERIOTE, F.A., RAMAHI-ATAYA, A.J. Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary. Cancer Research, v.49, p.1660-1664, 1989.

AVERETTE, H.E.; BOIKE, G.M.; JARREL, M.A. Effects of cancer chemotherapy on gonadal function and reproductive capacity. Ca.A Cancer Journal for Clinicians, v.40, n.4, p.199-209, 1990.

BLATT, J.; MULVIHILL, J.J.; ZIEGLER, J.L.; YOUNG, R.C.; POPLACK, D.G. Pregnancy outcome following cancer chemotherapy. The American Journal of Medicine, v.69, p. 828-832, dec. 1980.

BUDEL, V.; KISS, R.; ATASSI, G.; HEUSON, J.C.; PARIDAENS, R. Prevention of ovarian damage induced by cyclophosphamide in adult female mice by hormonal manipulations. - Trabalho apresentado: First International Conference of Anticancer Research, Loutraki, Greece, Oct. 1985.

BUDEL, V.; KISS, R.; de LAUNOIT, Y.; DANGUY, A.; ATASSI, G.; PASTEELS, J.L.; PARIDAENS, R. Prevention of ovarian damage induced by cyclophosphamide in adult female mice by hormonal manipulations. J. Reprod. Fert., v.84, p.625-633, 1988.

- BURKL W. and SCHIECHL H. The growth of follicles in the rat ovary under the influence of busulphan and endoxan. Cell Tissue Res. v.186, p. 351-359, 1978.
- CHAPMAN, R.M.; SUTCLIFFE, S.B.; MALPAS, J.S. Cytotoxic induced ovarian failure in women with Hodgkin's disease . Hormone function. JAMA. v. 242, p. 1877-1881, 1979.
- CHAPMAN, R.M.; SUTCLIFFE S.B. Protection of ovarian function by oral contraceptives in women receiving chemotherapy for Hodgkin's disease. Blood. v.58, n.4, p.849-851, 1981.
- CHAPMAN, R.M. Effect of cytotoxic therapy on sexuality and gonadal function. Seminars Oncology. v.9, n.1, p.84-94, 1982.
- CHOO, Y.C.; STEVEN, Y.W.; CHAN, S.Y.W.; WONG, L.C.; MA, H.K. Ovarian dysfunction in patients with gestational trophoblastic neoplasia treated with short intensive courses of etoposide (VP-16-213). Cancer. v.55, n.10, p.2348-2352, 1985.
- DEVITA, V.T.; HELLMAN,S.; ROSENBERG, S.A. Cancer. Principles & Practise of Oncology. 3rd edition, 1989.
- DOWSETT, M.; RICHNER, J. Effects of cytotoxic chemotherapy on ovarian and adrenal steroidogenesis in pre-menopausal breast cancer patients. Oncology. v.48, p. 215-219, 1991.
- GLODE, L.M.; ROBINSON, J.; GOULD, S.F. Protection from cyclophosphamide-induced testicular damage with an analogue of gonadotropin releasing hormone. Lancet. v.23, p.1132-1134, 1981.
- GLODE, L.M.; ROBINSON, L.; GOULD, S.F. et al Protection of spermatogenesis during chemotherapy. Drug Exp Clin Res. v.8, p. 367-378, 1982.
- GRADISHAR, W.J.; SCHILSKY, R.L. Ovarian function following radiation and chemotherapy for cancer. Seminars in Oncology. v.16, n.5, p.425-436, 1989.
- HOLMES, G.E.; HOLMES, F.F. Pregnancy outcome of patients treated for Hodgkin's disease. Cancer. v. 41, n.4, p.1317-1322. 1978.
- HORNING, S.J.; HOPPE, R.T.; KAPLAN, H.S.; ROSENBERG, S.A. Female reproductive potential after treatment for Hodgkin's disease. The New England

Journal of Medicine, v.304, n.23, p.1377-1382, 1981.

JOHN, J.; MILLER III; COLE, L.J. Changes in mouse ovaries after prolonged treatment with cyclophosphamide. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. v. 11, p. 190-193, 1970.

JOHNSON, D.H.; LINDE, R.; HAINSWORTH, J.D.; et al Effect of a luteinizing hormone releasing hormone agonist given during combination chemotherapy on posttherapy fertility in male patients with lymphoma. Preliminary observations. Blood. v. 65, p. 832-836, 1985.

KOYAMA, H.; WADA, T.; NISHIZAWA, Y. et al Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. Cancer, v.39, p.1403-1409, 1977.

KREUSER, E.D.; HETZEL, W.D.; BILLIA, D.O.; THIEL, E. Gonadal toxicity following cancer therapy in adults: significance, diagnosis, prevention and treatment. Cancer Treatment Reviews, v.17, p.169-175, 1990.

KUMAR, R.; BIGGART, J.D.; McEVOY, J. Cyclophosphamide and reproductive function. Lancet. v.1, p.1212-1214, 1972.

MIETKIEWSKI K. and FICHMA P. Influence of endoxan on the rat testis. Folia Morphol. v. 32, p. 445-455, 1973.

MILLER III, J.J.; COLE, L.J. Changes in mouse ovaries after prolonged treatment with cyclophosphamide. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., v.133, p. 190-193, 1970.

MONTZ, F.J.; WOLFF, A.J.; GAMBONE, J.C. Gonadal protection and fecundity rates in cyclophosphamide-treated rats. Cancer Research, v.51, p.2124-2126, april 1991.

MORGENFELD, M.C.; GOLDBERG, V.; PARISIER, H.; BUGNARD, S.C.; BUR, G.E. Ovarian lesions due to cytostatic agents during the treatment of Hodgking's disease. Surgery, Gynecology & Obstetrics, v.134, p.826-828, 1972.

MORSE, A.R.; HUTTON, J.D.; JACOBS, H.S.; MURRAY, M.A.F. Relation between the kariopycnotic index and plasma oestrogen concentration. Br. J. Obst. Gyn., v. 86, p. 981-983, 1979.

NICOSIA, S.V.; MATUS-RIDLEY, M.; MEADOWS, A.T. Gonadal effects of cancer therapy in girls. Cancer, v.5, n.10, p.2364-2372, 1985.

- PLOWCHALK, D.R.; MATTISON, D.R. Phosphoramidate mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. Toxicology and Applied Pharmacology, v.107, p.472-481, 1991.
- ROSE, D.P.; DAVIS, T.E. Ovarian function in patients receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer. The Lancet, v.4, p.1174-1176, 1977.
- SAMAAN, N.A.; deASIS JR, D.N.; BUZDAR, A.U.; BLUMENSCHNEIN, G.R. Pituitary-ovarian function in breast cancer patients on adjuvant chemoimmunotherapy. Cancer, v.41, n.6, p.2084-2087, 1978.
- SCHILSKY, R.L.; LEWIS, B.J.; SHERINS, R.J.; YOUNG, R.C. Gonadal dysfunction in patients receiving chemotherapy for cancer. Annals of Internal Medicine, v.93, n.1, p.109-114, 1980.
- SHALET, S.M. Effects of cancer chemotherapy on gonadal function of patients. Cancer Treat. Reviews, v. 7, p. 141-152, 1980.
- SIRIS, S.S.; LEVENTHAL, B.G.; VAITUKAITIS, J.L. Effects of childhood leukemia and chemotherapy on puberty and reproductive function in girls. The New England Journal of Medicine, v.294, n.21, p.1143-1146, 1976.
- SOBRINHO, L.G.; LEVINE, R.A.; DeCONTI, R.C. Emenorrhea in patients with Hodgkin's disease treated with antineoplastic agents. Am. J. Obstet. Gynecol., v.109, p. 135-139, 1971.
- SPITZ, S. The histological effects of nitrogen mustards on human tumors and tissues. Cancer, v.1, p. 383-398, 1948.
- WAXMAN, J. Cancer, chemotherapy and fertility. British Medical Journal, v.290, p.1096-1097, 1985.
- WAXMAN J.H., AHMED R., SMITH D.; RICHARD, M.A.; GANESAN, T.S.; BESSER, G.M.; REES, L.H.; WRIGLEY, P.F.M.; MALPAS, J.S.; LISTER, T.A. The conservation of fertility by a long acting gonadotropin releasing hormone analogue in patients treated for Hodgkin's disease. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. v. 4, p. 201, 1985.
- WAXMAN J.H., AHMED R., SMITH D. Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease. Cancer Chemo Pharmac. v. 19, p. 159-162, 1987.

WHITEHEAD, E.; SHALET, S.M.; BLACKLEDGE, G.; TODD, I.; CROWTHER, D.; BEARDWELL, C.G. The effect of combination chemotherapy on ovarian function in women treated for Hodgkin's disease. Cancer, v.52, n.6, p. 988-993.

*Gráficos*



# FOLÍCULOS PRÉ CAVITÁRIOS

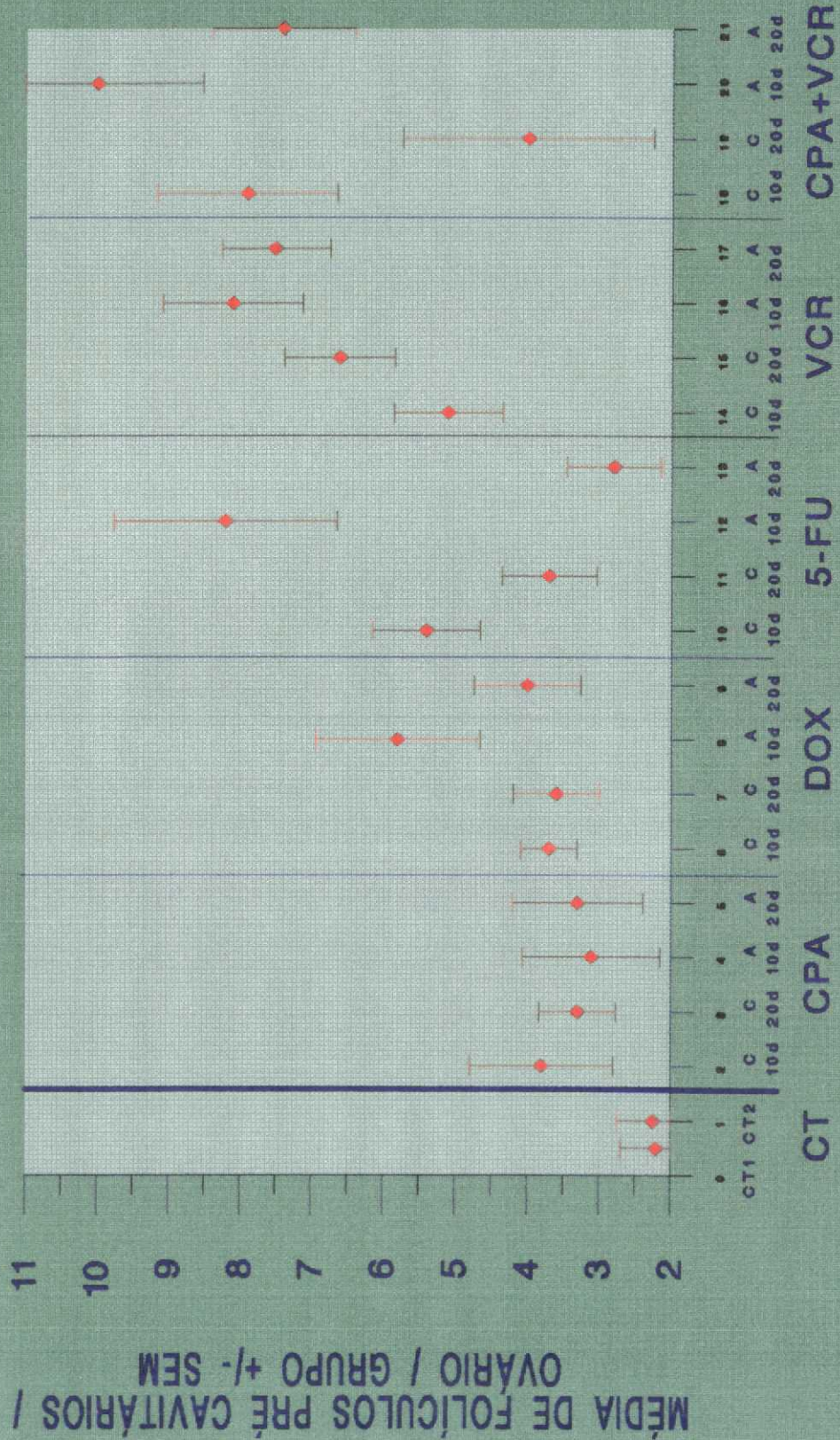


GRÁFICO N°1: Este gráfico representa a média (+/- SEM) da contagem dos folículos pré cavitários nos ovários dos diferentes grupos experimentais.

CT - grupo controle; CPA - ciclofosfamida; DOX - doxorubicina; 5-FU - fluorouracil; VCR - vincristina; CPA + VCR - ciclofosfamida + vincristina. C - dose convencional; A - alta dose; 10d - tratamento por 10 dias; 20d - tratamento por 20 dias.

# FOLÍCULOS CAVITÁRIOS

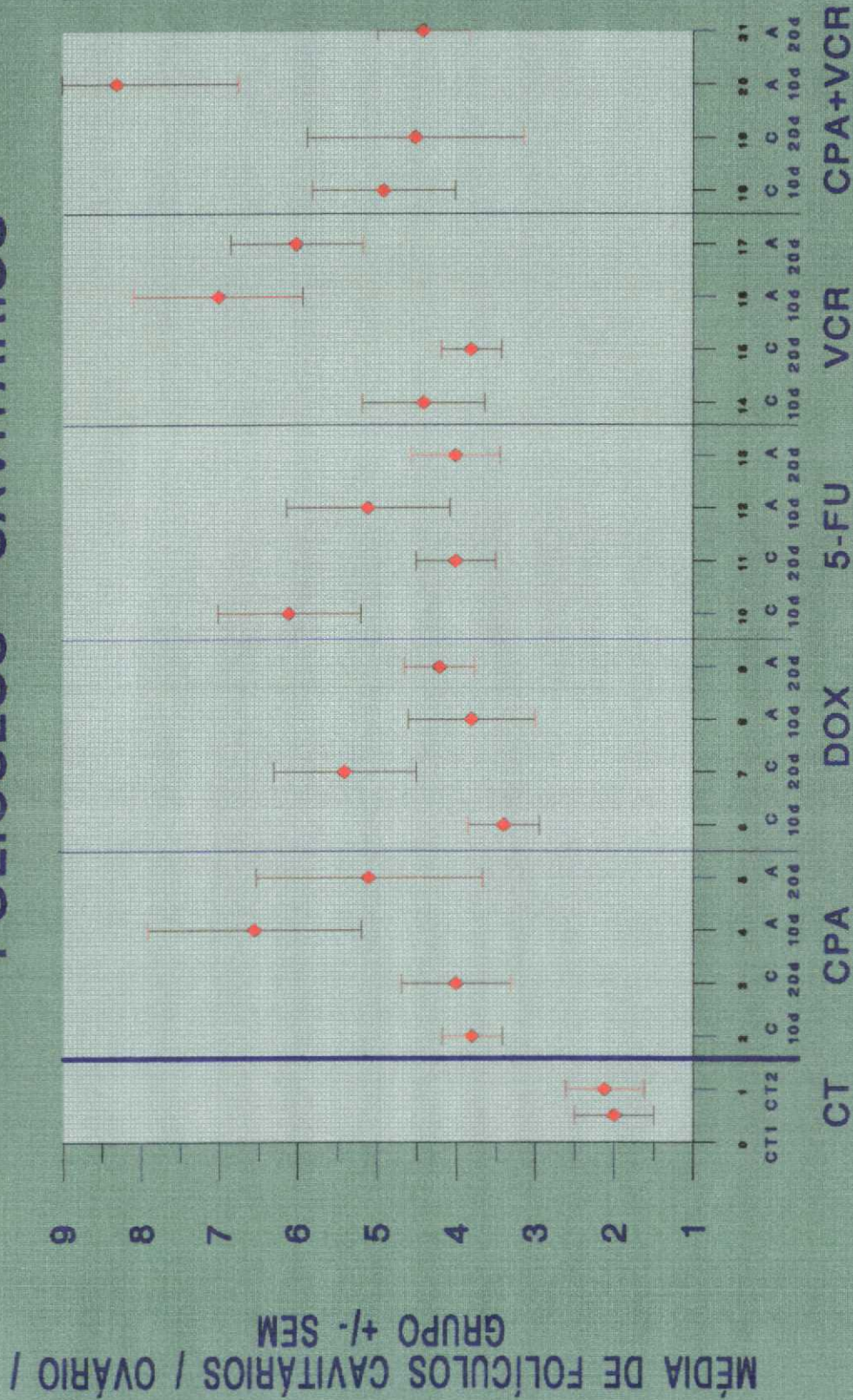


GRÁFICO N°2: Este gráfico representa a média (+/- SEM) da contagem dos folículos cavitários nos ovários dos diferentes grupos experimentais.

CT - grupo controle; CPA - ciclofosfamida; DOX - doxorubicina; 5-FU - fluorouracil; VCR - vincristina; CPA + VCR - ciclofosfamida + vincristina. C - dose convencional; A - alta dose; 10d - tratamento por 10 dias; 20d - tratamento por 20 dias.

# FOLÍCULOS ATRÉSICOS

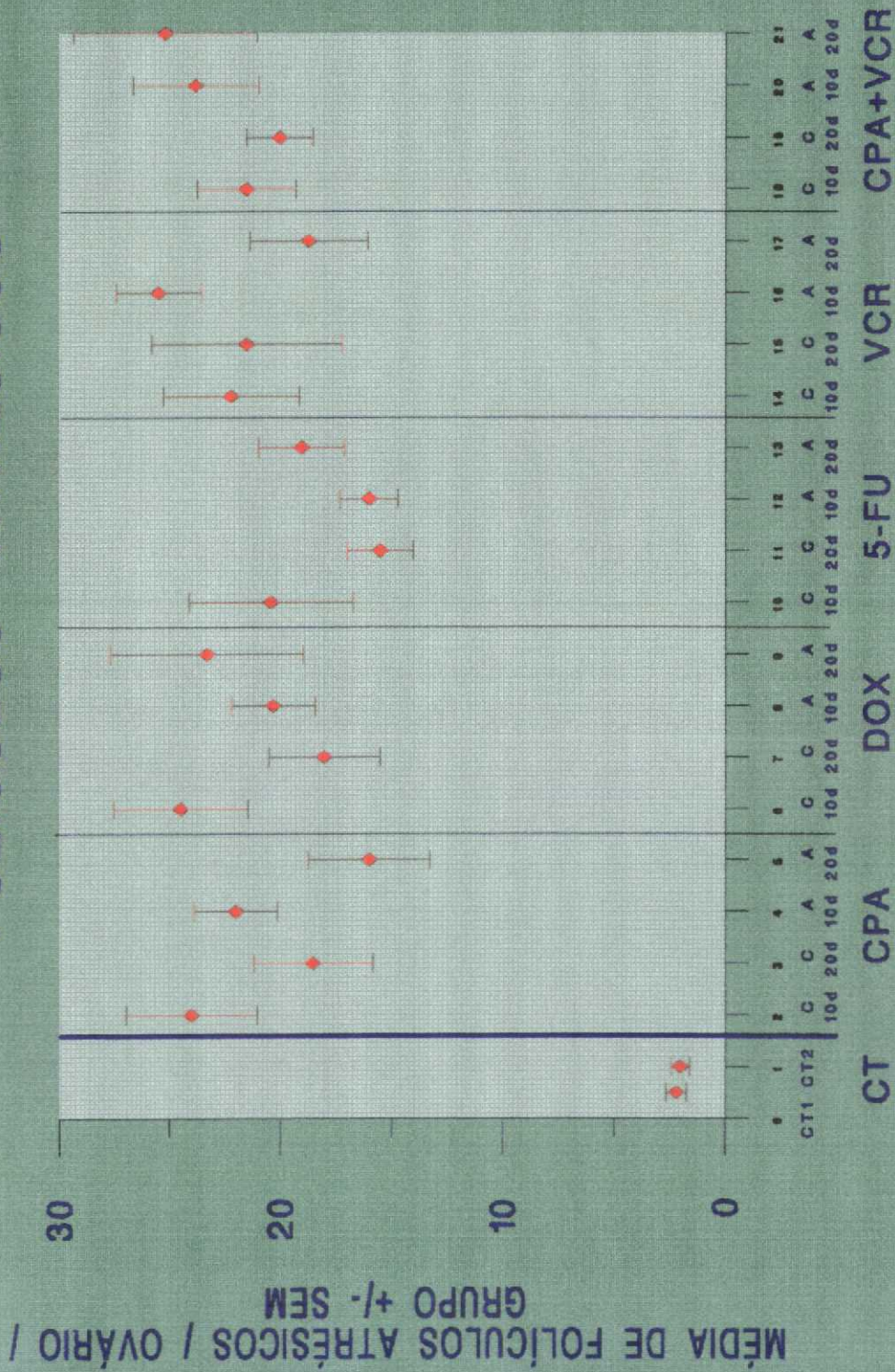


GRÁFICO Nº3: Este gráfico representa a média (+/- SEM) da contagem dos folículos atrésicos nos ovários dos diferentes grupos experimentais.

CT = grupo controle; CPA = ciclofosfamida; DOX = doxorubicina; 5-FU = fluorouracil; VCR = vincristina; CPA + VCR = ciclofosfamida + vincristina. C = dose convencional; A = alta dose; 10d = tratamento por 10 dias; 20d = tratamento por 20 dias.

# CORPOS LUTEOS

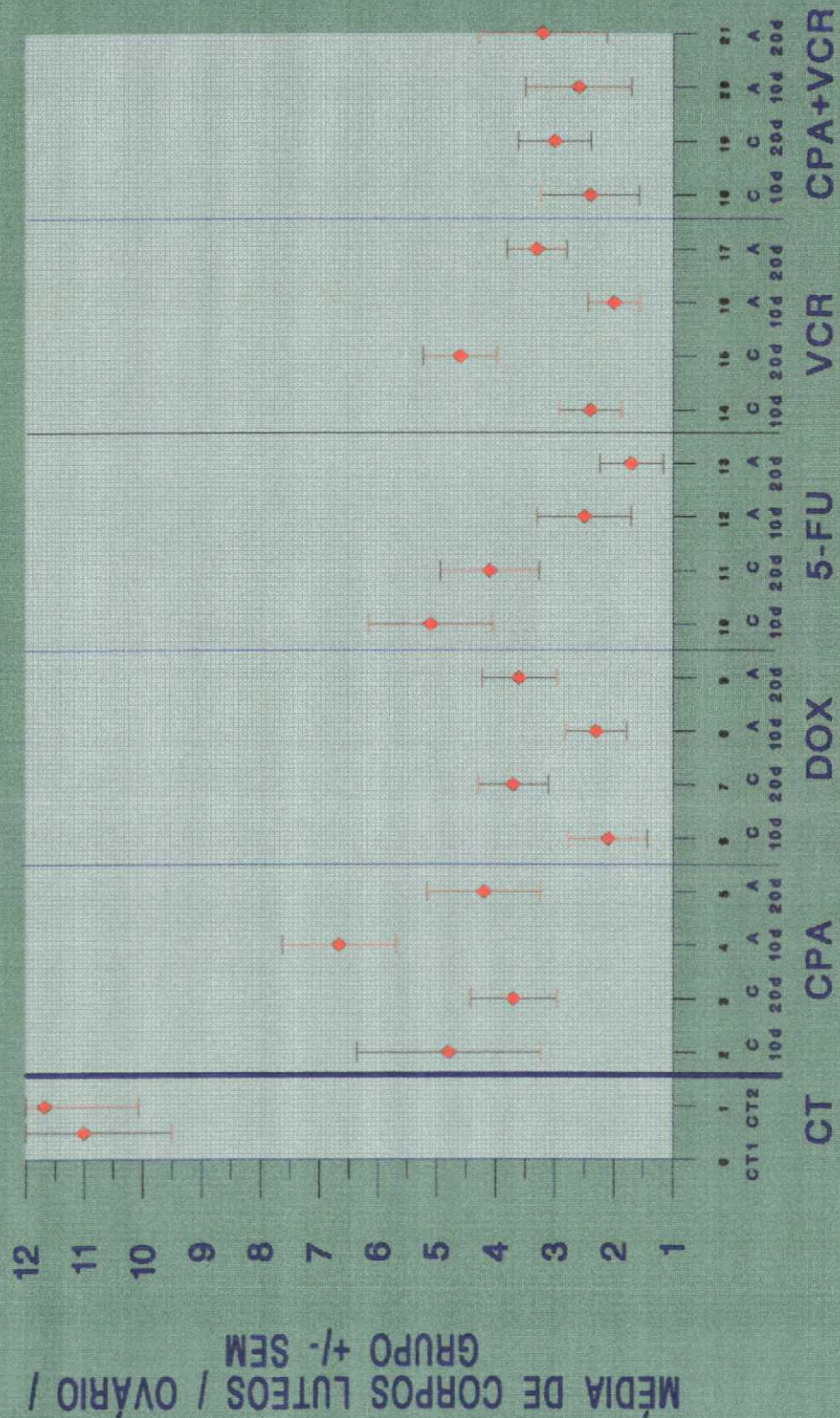


GRÁFICO Nº4: Este gráfico representa a média (+/- SEM) da contagem dos corpos luteos nos ovários dos diferentes grupos experimentais.

CT - grupo controle; CPA - ciclofosfamida; DOX - doxorubicina; 5-FU - fluorouracil; VCR - vincristina; CPA + VCR - ciclofosfamida + vincristina. C - dose convencional; A - alta dose; 10d - tratamento por 10 dias; 20d - tratamento por 20 dias.

# ESFREGAÇO VAGINAL

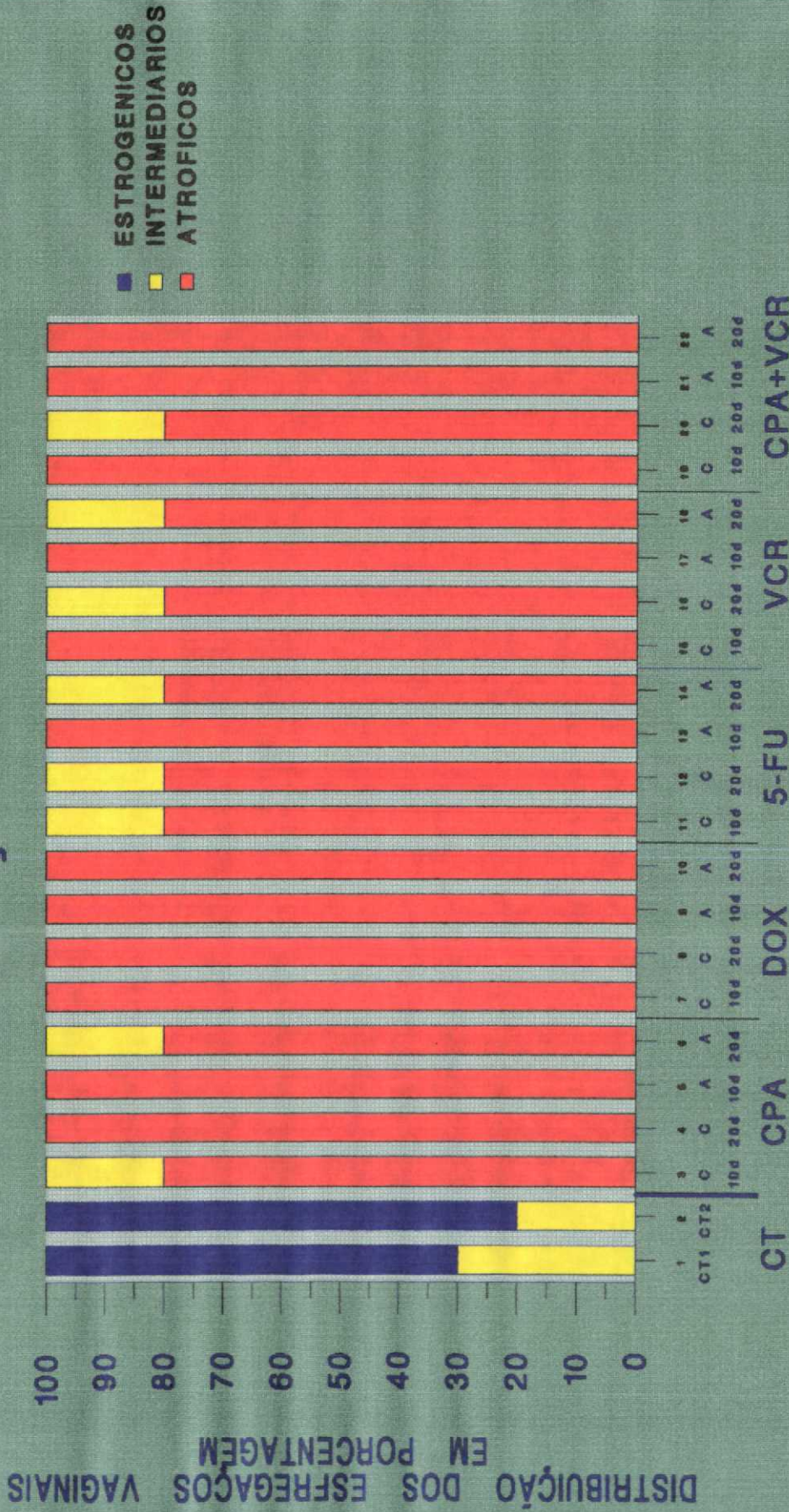


GRÁFICO Nº5: Este gráfico representa a distribuição em porcentagem dos esfregaços vaginais nos diferentes grupos experimentais.

CT = Grupo controle; CPA = ciclofosfamida; DOX = doxorubicina; 5-FU = fluorouracil; VCR = vincristina; CPA + VCR = ciclofosfamida + vincristina. C = dose convencional; A = alta dose; 10d = tratamento por 10 dias; 20d = tratamento por 20 dias.

*Anexos*

## ANEXO 1 - BANCO DE DADOS DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

	<i>N° observação</i>	<i>Peso inicial</i>	<i>Peso final</i>	<i>Variação Ponderal</i>	<i>Aspecto Clínico</i>	<i>Esfregaço vaginal</i>	<i>Avaliação órgãos abdominais</i>
	1	22	23	1	N	E	N
CT1	2	23	23	0	N	E	N
	3	22	22	0	N	I	N
	4	22	23	1	N	E	N
	5	24	23	-1	N	E	N
	6	23	23	0	N	E	N
	7	22	21	-1	N	I	N
	8	22	22	0	N	E	N
	9	22	22	0	N	I	N
	10	23	22	-1	N	E	N
		1	24	24	0	N	E
CT2	2	25	24	-1	N	E	N
	3	25	25	0	N	E	N
	4	22	22	0	N	E	N
	5	23	24	1	N	I	N
	6	22	23	1	N	E	N
	7	22	23	1	N	E	N
	8	23	23	0	N	I	N
	9	24	24	0	N	E	N
	10	22	22	0	N	E	N
		1	23	23	0	N	A
CPA	2	25	24	-1	N	A	N
	3	24	23	-1	N	I	N
	4	25	25	0	N	A	N
	5	23	24	1	N	A	N
	6	22	23	1	N	A	N
	7	22	22	0	N	A	N
	8	24	24	0	N	A	N
	9	25	25	0	N	A	N
	10	22	22	0	N	A	N
	11	22	22	0	N	A	N
	12	22	22	0	N	A	N
	13	22	23	1	N	A	N
	14	22	23	1	N	A	N
	15	24	23	-1	N	A	N
	16	22	23	1	N	I	N
	17	22	23	1	N	A	N
	18	23	22	-1	N	A	N
	19	23	22	-1	N	A	N
	20	25	25	0	N	A	N
		1	24	24	0	N	A
DOX	2	24	23	-1	N	A	N
	3	22	22	0	N	A	N
	4	23	24	1	N	A	N
	5	25	25	0	N	A	N
	6	22	23	1	N	A	N
	7	22	23	1	N	A	N
	8	23	24	1	N	A	N
	9	22	22	0	N	A	N
	10	22	23	1	N	A	N
	11	22	23	1	N	A	N
	12	22	23	1	N	A	N
	13	25	24	-1	N	A	N
	14	24	23	-1	N	A	N
	15	22	23	1	N	A	N

	<i>N° observação</i>	<i>Peso inicial</i>	<i>Peso final</i>	<i>Varição Ponderal</i>	<i>Aspecto Clínico</i>	<i>Esfregaço vaginal</i>	<i>Avaliação órgãos abdominais</i>
DOX	16	25	24	-1	N	A	N
	17	25	25	0	N	A	N
	18	23	23	0	N	A	N
	19	23	23	0	N	A	N
	20	22	23	1	N	A	N
	1	22	23	1	N	A	N
5-FU	2	22	23	1	N	I	N
	3	22	23	1	N	A	N
	4	22	23	1	N	A	N
	5	22	22	0	N	A	N
	6	22	22	0	N	A	N
	7	22	23	1	N	A	N
	8	22	22	0	N	A	N
	9	22	23	1	N	A	N
	10	22	22	0	N	I	N
	11	23	22	-1	N	A	N
	12	23	22	-1	N	A	N
	13	25	24	-1	N	A	N
	14	24	24	0	N	A	N
	15	24	25	1	N	A	N
	16	24	25	1	N	A	N
	17	22	23	1	N	A	N
	18	22	22	0	N	A	N
	19	22	22	0	N	I	N
	20	3	23	0	N	A	N
		1	25	24	-1	N	A
VCR	2	25	24	-1	N	A	N
	3	25	25	0	N	A	N
	4	22	23	1	N	A	N
	5	22	22	0	N	A	N
	6	22	22	0	N	I	N
	7	23	23	0	N	A	N
	8	24	23	-1	N	A	N
	9	22	23	1	N	A	N
	10	22	23	1	N	A	N
	11	23	23	0	N	A	N
	12	22	23	0	N	A	N
	13	22	22	0	N	A	N
	14	25	24	-1	N	A	N
	15	23	23	0	N	A	N
	16	25	24	-1	N	A	N
	17	22	22	0	N	I	N
	18	22	23	1	N	A	N
	19	22	22	0	N	A	N
	20	22	22	0	N	A	N



	<i>N° observação</i>	<i>Peso inicial</i>	<i>Peso final</i>	<i>Varição Ponderal</i>	<i>Aspecto Clínico</i>	<i>Esfregaço vaginal</i>	<i>Avaliação órgãos abdominais</i>
	1	22	23	1	N	A	N
CPA VCR	2	25	25	0	N	A	N
	3	25	24	-1	N	A	N
	4	22	23	1	N	A	N
	5	22	22	0	N	A	N
	6	22	22	0	N	A	N
	7	23	22	-1	N	A	N
	8	23	22	-1	N	I	N
	9	22	22	0	N	A	N
	10	22	23	1	N	A	N
	11	24	25	1	N	A	N
	12	22	23	1	N	A	N
	13	22	22	0	N	A	N
	14	25	24	-1	N	A	N
	15	22	23	1	N	A	N
	16	22	22	0	N	A	N
	17	23	22	-1	N	A	N
	18	22	23	1	N	A	N
	19	22	23	1	N	A	N
	20	24	24	0	N	A	N

Anexo 1: Esta tabela representa os bancos de dados dos animais utilizados nesta experiência. CT1 = animais controles tratados por placebo por 10 dias; CT2 = animais controles tratados por placebo por 20 dias; CPA = grupo de animais tratados por ciclofosfamida; DOX = grupo de animais tratados por doxorubicina; 5-FU = grupo de animais tratados por fluorouracil; VCR = grupo de animais tratados por vincristina; CPA + VCR = grupo de animais tratados por ciclofosfamida e vincristina. Em cada grupo de tratamento os animais numerados de 1-20 foram divididos nos seguintes grupos: 1-5 = tratados por dose convencional e por 10 dias; 6-10 = tratados por dose convencional e por 20 dias; 11-15 = tratados por alta dose e por 10 dias; 16-20 = tratados por alta dose e por 20 dias. g = gramas; N = normal; E = estrogênico; I = intermediário; A = atrófico.

## ANEXO 2

Tabela

	<i>FPC</i>	<i>SEM</i>	<i>FC</i>	<i>SEM</i>	<i>FA</i>	<i>SEM</i>	<i>CL</i>	<i>SEM</i>
<i>CT1</i>	2.2	0.5	2	0.5	2.2	0.45	11	1.5
<i>CT2</i>	2.25	0.5	2.12	0.5	2	0.41	11.68	1.61
<i>CPA C 10d</i>	3.8	1	3.8	0.38	24	2.98	4.8	1.56
<i>CPA C 20d</i>	3.3	0.53	4	0.69	18.5	2.67	3.7	0.73
<i>CPA A 10d</i>	3.11	0.96	6.55	1.36	22	1.88	6.66	0.97
<i>CPA A 20d</i>	3.3	0.91	5.1	1.43	18	2.71	4.2	0.96
<i>DOX C 10d</i>	3.7	0.39	3.4	0.45	24.5	3.04	2.1	0.67
<i>DOX C 20d</i>	3.6	0.6	5.4	0.9	19	2.5	3.7	0.59
<i>DOX A 10d</i>	5.8	1.14	3.8	0.8	20.3	1.89	2.3	0.51
<i>DOX A 20d</i>	4	0.74	4.2	0.44	23.3	4.39	3.6	0.63
<i>5-FU C 10d</i>	5.4	0.74	6.1	0.91	20.4	3.71	5.1	1.05
<i>5-FU C 20d</i>	3.7	0.66	4	0.5	15.5	1.46	4.1	0.84
<i>5-FU A 10d</i>	8.2	1.56	5.1	1.03	16	1.29	2.5	0.79
<i>5-FU A 20d</i>	2.8	0.66	4	0.56	19	1.94	1.7	0.53
<i>VCR C 10d</i>	5.1	0.75	4.4	0.77	22.2	3.07	2.4	0.52
<i>VCR C 20d</i>	6.6	0.77	3.8	0.38	21.5	4.31	4.6	0.63
<i>VCR A 10d</i>	8.1	0.98	7	1.08	25.5	1.95	2	0.44
<i>VCR A 20d</i>	7.5	0.76	6	0.84	18.7	2.66	3.3	0.51
<i>CPA+ VCR C 10d</i>	7.9	1.26	4.9	0.9	21.5	2.23	2.4	0.83
<i>CPA + VCR C 20d</i>	4	1.74	4.5	1.36	20	1.49	3	0.61
<i>CPA + VCR A 10d</i>	10	1.47	8.3	1.55	23.8	2.86	2.6	0.9
<i>CPA + VCR A 20d</i>	7.4	1	4.4	0.58	25.2	4.18	3.2	1.08

TABELA N°1: A tabela acima representa os valores das media (+/- SEM) das contagens das estruturas ovarianas nos diferentes grupos experimentais. FPC = folículos pré-cavitários; FC = folículos cavitários; FA = folículos atrésicos; CL = corpo luteo; CT1 = grupo controle tratado com placebo por 10 dias; CT2 = grupo controle tratado com placebo por 20 dias; CPA = grupo tratado por ciclofosfamida; DOX = grupo tratado por doxorubicina; 5-FU = grupo tratado por fluorouracil; VCR = grupo tratado por vincristina; C = dose convencional; A = alta dose; 10d = tratamento por 10 dias; 20d = tratamento por 20 dias.