

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Verificação dos Possíveis
Efeitos Mutagênicos e
recombinogênicos do
Cetoconazol, pelo "Somatic
Mutation and Recombination
Test" (SMART) em Pêlos de Asas
de *Drosophila Melanogaster*.

Autor: Ana Cecília Silva Santos

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas,
para a obtenção do Grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG.
Dezembro - 1993

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Verificação dos Possíveis
Efeitos Mutagênicos e
recombinogênicos do
Cetoconazol, pelo "Somatic
Mutation and Recombination
Test" (SMART) em Pelos de Asas
de *Drosophila Melanogaster*.

Autor: Ana Cecília Silva Santos

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas,
para a obtenção do Grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG.
Dezembro - 1993

Verificação dos Possíveis
Efeitos Mutagênicos e
recombinogênicos do
Cetoconazol, pelo "Somatic
Mutation and Recombination
Test" (SMART) em Pelos de Asas
de *Drosophila Melanogaster*.

Aprovada pela Comissão Examinadora
em ____/____/____.

Orientador
Prof. Dr. Mario A. Spano

1º Conselheiro
Prof. Drª Ana Maria Bonetti

2º Conselheiro
Prof. Júlio César Nepomuceno

Uberlândia-MG.
Dezembro-1993

Dedico

A meus pais, por tanto amor, carinho e incentivo empregados.

Exemplos de dedicação e companherismo para comigo, durante todo o meu curso de graduação.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Dr. Mario Antonio Spanó, pela confiança, pela orientação e acima de tudo, pela oportunidade de aprimoramento a nível profissional e pessoal.

Ao professor Júlio César Nepomuceno, pela amizade, atenção e disponibilidade concedidos no decorrer do trabalho.

As minhas amigas do laboratório de Citogenética, Sheilla e Alba, pelos grandes momentos vivenciados, para mim inesquecíveis, que sentirei saudades.

As pessoas que participaram direta ou indiretamente para tornar este trabalho realidade.

INDICE

RESUMO.....	i
1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Drosophila melanogaster</i> como Sistema Teste.....	4
1.2. Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)....	9
1.2.1. Coleção de Fêmeas.....	15
1.2.2. Coleção de Machos.....	15
1.2.3. Coleção de Larvas.....	16
1.3. Cetoconazol.....	17
1.4. Ciclofosfamida.....	20
2-OBJETIVOS.....	21
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Substâncias Químicas Empregadas no Teste.....	22
3.2. Meio de Cultura para <i>Drosophila</i>	25
3.3. Cruzamentos Realizados com <i>Drosophila Melanogaster</i> ..	26
3.3.1. Cruzamento "Standard".....	26
3.3.2. Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação..	26

3.4.Verificação do Efeito Mutagênico do Cetoconazol pelo método "Somatic Mutation and Recombination Test" (SMART).....	27
3.5.Preparação das Asas de <i>Drosophila</i>	28
3.6.Análise das Asas ao Microscópio.....	29
3.7.Análise Estatística.....	31
4-RESULTADOS.....	33
5-DISCUSSÃO.....	41
6-CONCLUSÕES.....	45
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

RESUMO

O Somatic Mutation and Recombination Test (SMART), foi realizado utilizando-se dois estoques parentais de *Drosophila melanogaster*, que apresentam os marcadores genéticos *mwh* (multiple wing hair) e *flr3* (flare 3), localizados no cromossomo 3.

Neste trabalho foram realizados dois cruzamentos diferentes:

1) "Standard", (fêmeas virgens *Flr 3/TM3*, Ser X Machos *mwh*):

2) Alta capacidade de bioativação (fêmeas virgens ORR: *flr 3/TM3*, Ser X machos *mwh*), sendo este caracterizado por uma maior sensibilidade a promutágenos e procarcinógenos.

As larvas obtidas destes cruzamentos foram tratadas com Cetoconazol: um fungicida oral imidazol usado na medicina clínica em largo espectro de infecções cutâneas.

Como controle positivo foi usado a Ciclofosfamida, que é um agente alquilante comprovadamente mutagênico, clastogênico, teratogênico e carcinogênico.

As asas das moscas foram analisadas quanto a ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, sendo estas resultantes de mutação, recombinação, deleção e não disjunção cromossômica.

Os resultados observados indicam que, com o aumento da concentração do Ketoconazol não há aumento na frequência de manchas, tanto na linhagem de baixa, como na de alta capacidade de bioativação, mostrando que o Ketoconazol não necessita de enzimas Citocromo P-450 para produzir metabólitos genotóxicos ativos.

Em relação a Ciclofosfamida, os resultados observados mostraram que as frequências de manchas em ambas as linhagens são praticamente as mesmas (1,1% na linhagem "Standard" e 1,2% na linhagem de alta capacidade de ativação metabólica), sugerindo que a linhagem "Standard" apesar de baixa capacidade de ativação metabólica, possui enzimas suficientes para metabolizar a Ciclofosfamida a metabólitos ativos.

1. INTRODUÇÃO

Muitos trabalhos tem sido desenvolvidos nos últimos anos, com o objetivo de verificar os possíveis efeitos mutagenicos dos agentes físicos e químicos com os quais os organismos vivos estão em contato constante ou casual.

Entre os agentes químicos com propriedades mutagênicas comprovadas, encontram-se aqueles utilizados na terapêutica humana e animal; na agricultura (fertilizantes, agrotóxicos); na indústria (conservantes, cosméticos).

As mutações são uma fonte extremamente importante de variabilidade genética nas populações de seres vivos.

Além das mutações contribuírem para a variação genética de um organismo, elas são muito importantes para o geneticista na compreensão de processos básicos, pois sem estas mutações não haveria variação disponível para a compreensão do comportamento gênico (BURNS, 1991).

O termo mutação foi usado pela primeira vez por De Vries, ao estudar mudanças repentinas na hereditariedade de *Oenothera*. Em 1914, Morgan descreveu suas tentativas em induzir mutações em *Drosophila*, pelo tratamento com álcool e éter, sem, contudo, obter sucesso (Auerbach, 1974).

Müller (1927) foi o primeiro a verificar uma alta incidência de mutações gênicas induzidas pelos raios- λ em esperma de *Drosophila*.

Auerbach e Robson (1942) foram os primeiros a obterem sucesso relacionado a indução de mutação por agentes químicos, ao tratarem a *Drosophia melanogaster* com mostarda nitrogenada.

Estes autores estabeleceram que os agentes físicos e químicos presentes em nosso ambiente são capazes de produzir profundas modificações no genoma, podendo estas resultar no desenvolvimento de câncer, produzindo defeitos congênitos hereditários, ou promover outros tipos de danos (Skankel, 1986. in: Cólus, 1992).

Mutações em células germinativas podem originar alterações no genoma, enquanto que mutações em células somáticas podem ter um papel fundamental sobre certos estágios da progressão de uma célula do estado normal para o estado canceroso (Baan, 1987 in: Santos, 1990).

Em *Drosophila*, cerca de 85% dos agentes carcinogênicos testados mostraram atividades mutagênicas em células germinativas (Vogel et al, 1980, in: Graf et al, 1984).

Existe uma elevada correlação entre efeitos mutagênicos e carcinogênicos.

A correlação existente entre atividade mutagênica e carcinogênica induzidas por agentes químicos tem gerado um grande interesse com relação a atividade genotóxica de agentes químicos em células somáticas (Graf et al, 1984).

No entanto, a utilização de testes mutagenicos de triagem para a detecção de agentes carcinogênicos tem sido muito questionada, pois embora seja possível verificar que a maioria dos carcinogênicos é mutagênica, essas inferências não devem ser interpretadas de uma maneira simples (Prival e Dellarco, 1989, in: Santos, 1990).

Para outros autores como Ishidate e Odashima (1977), a maioria dos carcinogenos é mutagenica quando sofre ativação metabólica por enzimas, embora nem todos os agentes mutagênicos sejam carcinogênicos (Santos, 1990).

E necessário salientar que um mesmo composto pode ser mutagênico para um organismo e não ser para outro, devendo cada caso ser analisado separadamente, pois espécies diferentes podem reagir diferentemente a ação de mutagênicos.

Não somente atividade mutagênica, mas também atividade recombinogênica de agentes químicos e agora discutido em conexão com sua carcinogenicidade (Cains, 1981; Rodman e Rincella, 1989; in: Graf et al, 1984).

Com isto, foi exercida uma grande pressão sobre a comunidade científica no intuito de se utilizar testes de mutagenicidade, não só como uma medida do potencial de um composto em provocar efeitos adversos ao organismo, mas também em testes para a carcinogenicidade (Santos, 1990).

Graf et al. (1984) descreveram um teste rápido e barato que permite a detecção de efeitos mutagênicos e recombinogênicos, utilizando como sistema teste, pêlos de asas de *Drosophila melanogaster*.

1.1. *Drosophila melanogaster* como sistema teste

A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* é, sem dúvida, um organismo ideal para a detecção de efeitos genotóxicos de agentes físicos e químicos. Este organismo eucarioto oferece, como vantagens, o fato de possuir um período de geração bastante curto (aproximadamente 10 dias a 25°C), utilizar meios de cultura de baixo valor financeiro e desenvolvimento de grande número de indivíduos em espaços bastante reduzidos.

O ciclo de vida da *Drosophila melanogaster* passa por uma completa metamorfose, sendo um inseto holometabólico.

A sequência e duração aproximada dos diferentes estágios do ciclo de vida a uma temperatura de 25°C são:

Período embrionário - 1 dia

1º estágio larval - 1 dia

2º estágio larval - 1 dia

3º estágio larval - 2 dias

Pré-pupa - 4 horas

Pupa - 4.5 dias

Estado adulto (imago) - 40 - 50 dias

Os machos tornam-se sexualmente maduros e férteis em pequeno espaço de tempo depois de emergir do estágio de pupa.

As fêmeas tornam-se maduras menos rapidamente, após um período de 6 a 12 horas, dependendo da linhagem.

Uma fêmea sexualmente madura se acasala repetidamente com diferentes machos.

É importante salientar que o período de vida de uma *Drosophila* adulta é de aproximadamente 40-50 dias, podendo existir casos de indivíduos sobreviverem por até 80 dias.

Contudo, quando se faz os cruzamentos, é aconselhável utilizar moscas mais jovens, de

aproximadamente 10 dias, pois normalmente a medida que vão envelhecendo seu período de fertilidade vai diminuindo.

Em condições padrão (25°C e 60% de umidade relativa) todo o desenvolvimento da *Drosophila* desde a fase de ovo até o indivíduo adulto ocorre em 10 dias.

Em temperaturas mais baixas, o ciclo de vida alonga-se: 14 dias a 23,5°C; 21 dias a 18°C.

O desenvolvimento pode ser acelerado com aumento da temperatura, mas em torno de 29-30°C há um aumento drástico na letalidade das pupas, e em muitas linhagens, as fêmeas ficam estereis a temperaturas acima de 30°C (Grat. et al, 1992).

Em *Drosophila melanogaster* verifica-se um controle genético especial na meiose.

Durante a oogénese em fêmeas ocorre, regularmente, o crossing-over meiótico.

Esta peculiaridade em *Drosophila melanogaster* é muito útil, particularmente na construção de novos estoques marcados geneticamente.

Existem algumas diferenças morfológicas entre fêmeas e machos adultos que podem ser facilmente observados ao microscópio estereoscópico.

Dentre elas podemos citar:

-Pente sexual:

Os machos possuem um tufo de pêlos no segmento proximal do tarso, diferenciando-os das fêmeas que não os possui.

O pente sexual possui 10 pelos pequenos, espessos, com cerdas pretas, localizados próximos a parte distal da perna.

-Genitália e coloração do abdômen:

A genitália externa nos 2 sexos é bem diferente. As diferenças podem somente ser vistas ao microscópio estereoscópico.

A impressão geral da genitália do macho é uma estrutura preta e proeminente.

As fêmeas possuem 7 segmentos abdominais, enquanto que os machos possuem somente 5 segmentos, e a parte posterior do abdômen é preta.

-Tamanho do corpo:

Em geral as fêmeas são maiores que os machos. Mas isto é relativo, porque o tamanho real do corpo nos

indivíduos adultos e grandemente dependente das condições de alimentação durante o período larval.

-Tamanho das asas:

As asas das fêmeas são maiores que as dos machos, mas este fato é relativo nos adultos em todos os casos.

Além das vantagens descritas, verificou-se que a *Drosophila* tem um amplo espectro de atividades metabólicas capazes de ativar promutágenos e procarcinógenos.

Moffet e Würigler, 1974 (in: Graf et al, 1984) sugeriram o uso de células somáticas de *Drosophila* para testes de mutagenicidade.

O uso de marcadores celulares recessivos trans-heterozigotos permite a detecção de um espectro de danos genéticos mais amplo. Além dos tipos de mutação registrados nos testes de detecção de mutações recessivas letais ligadas ao sexo (mutações de ponto, deleções e certos tipos de aberrações cromossômicas), os testes somáticos podem detectar recombinações mitóticas, assim como conversões gênicas. (Graf et al, 1984).

1.2.- "Somatic Mutation and Recombination Test"

(SMART)

O Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) é realizado utilizando-se 2 estoques parentais que apresentam os marcadores genéticos mwh (multiple wing hair) e flr3 (flare - 3), localizados no cromossomo número 3.

O cruzamento "standard" (padrão) para produção de larvas trans-heterozigotas faz uso das linhagens mwh e flr3/TM3, Ser (Graf et al, 1984).

Larvas trans-heterozigotas para mwh e flr3, são obtidas, sendo que constituem a metade da progênie larval. A outra metade consiste de heterozigotos mwh/TM3, Ser. O cromossomo com o gene TM3 é necessário para balancear o gene flare, porque este é letal em homozigose. No entanto, células da asa que possuem o fenótipo flare (flr) são viáveis em mosaicos somáticos. Os 2 tipos de larvas obtidas não são distinguíveis. Assim sendo, são tratadas juntas, pelo agente que deseja-se determinar o potencial mutagênico ou recombinogênico.

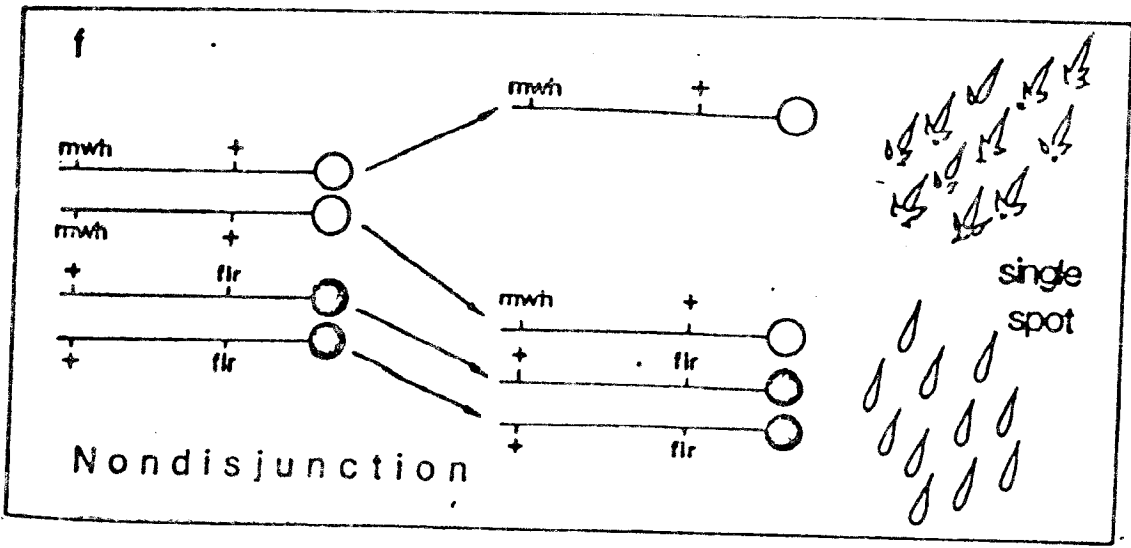
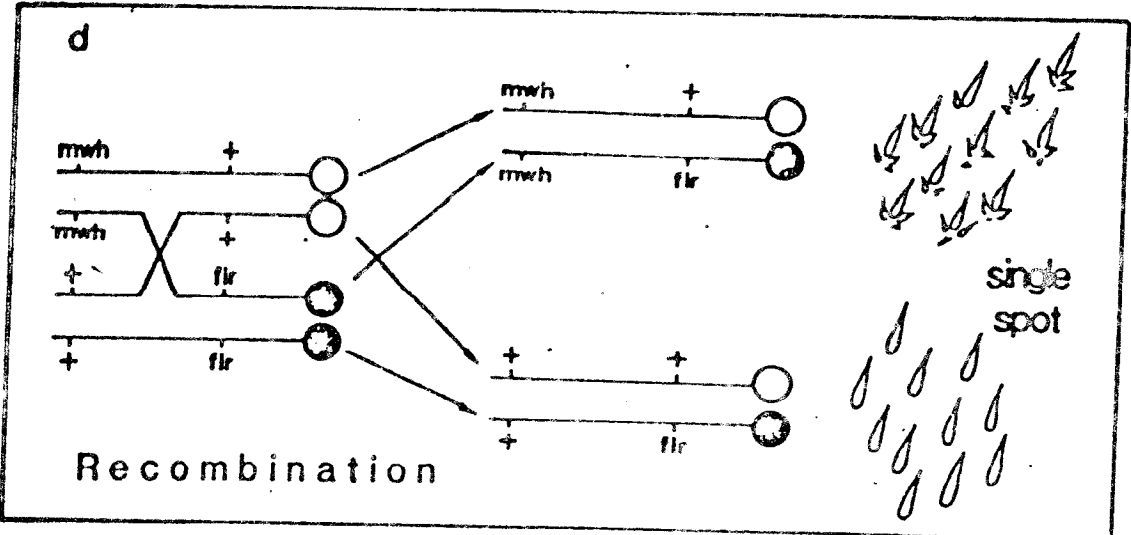
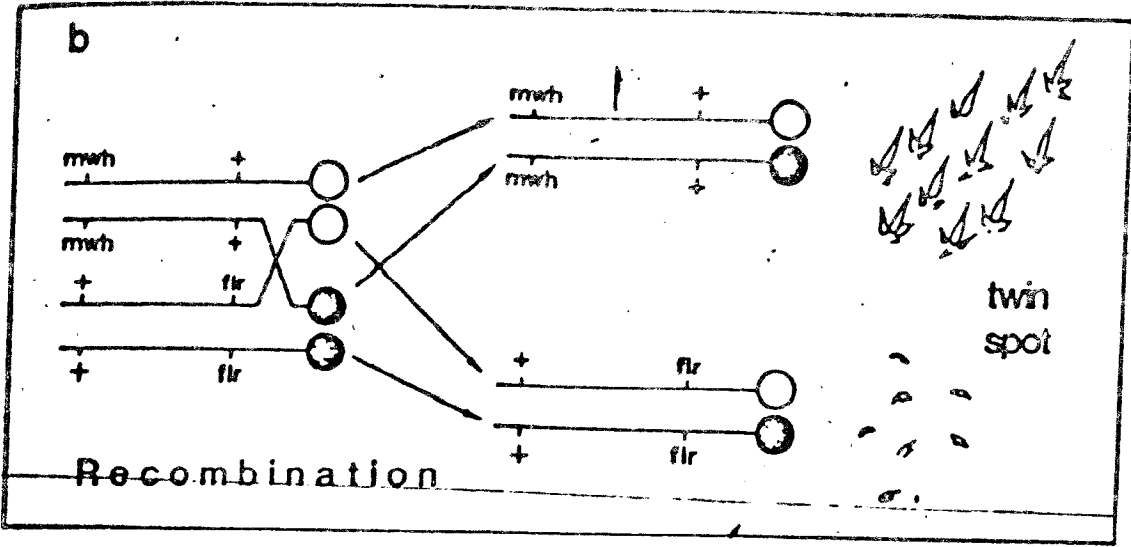
Após a metamorfose, as moscas que carregam $mwh + / + flr$ apresentam o corpo com coloração selvagem, podendo, desta forma, serem distinguidos dos seus irmãos $mwh/TM3$, que são amarelos (y).

A formação de manchas mutantes no "SMART", com os marcadores de células da asa mwh e $flr3$, podem ser obtidos por meio de defeitos genéticos produzidos durante o seu cruzamento.

As manchas gêmeas são obtidas por meio de recombinação entre o marcador $flr3$ e o centrômero, enquanto que recombinações mais distais produzem apenas manchas simples de mwh .

As manchas simples mwh ou sua forma análoga, as manchas simples do tipo $flr3$, são obtidas por meio de deleção, mutação de ponto e não disjunção cromossômica.

A figura 1 ilustra os esquemas genéticos responsáveis pela formação de manchas no "SMART", com os marcadores de células da asa mwh e $flr3$.



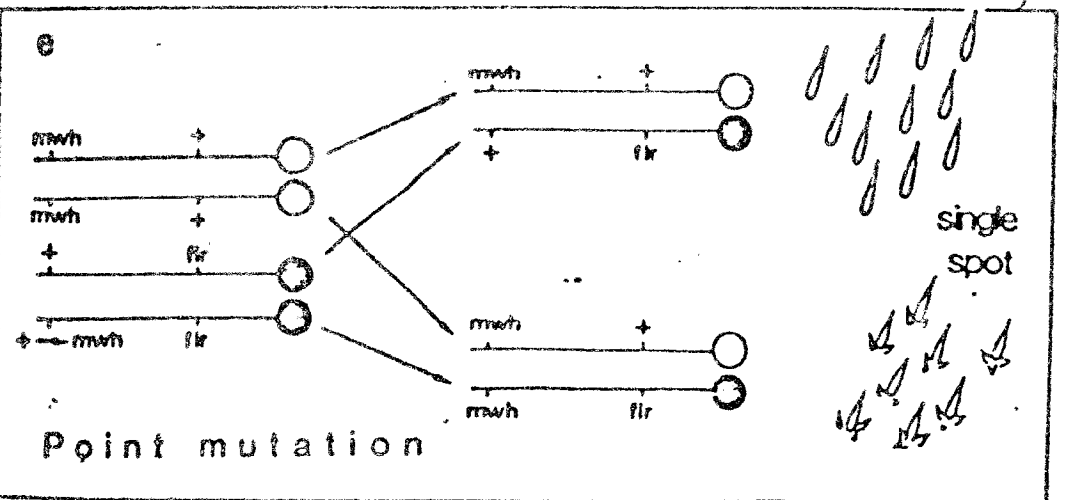
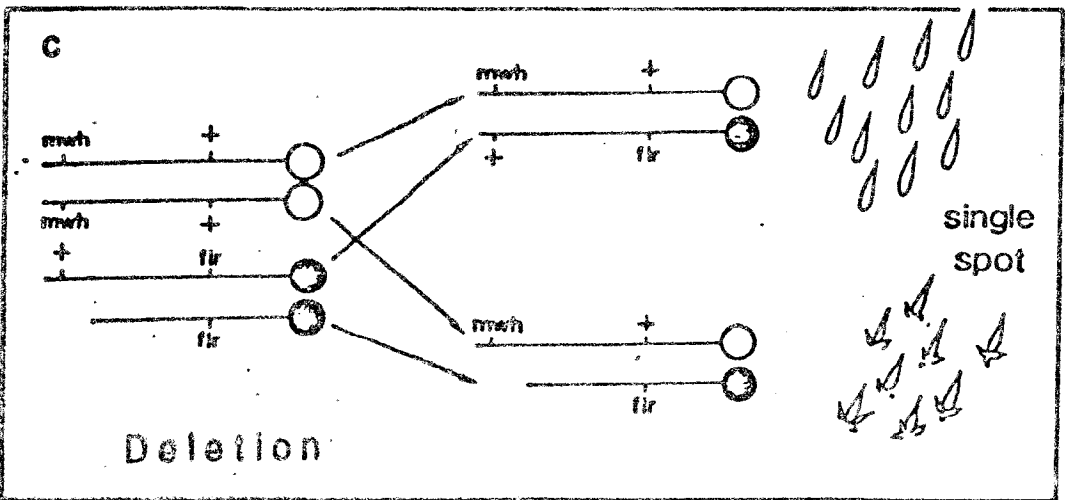
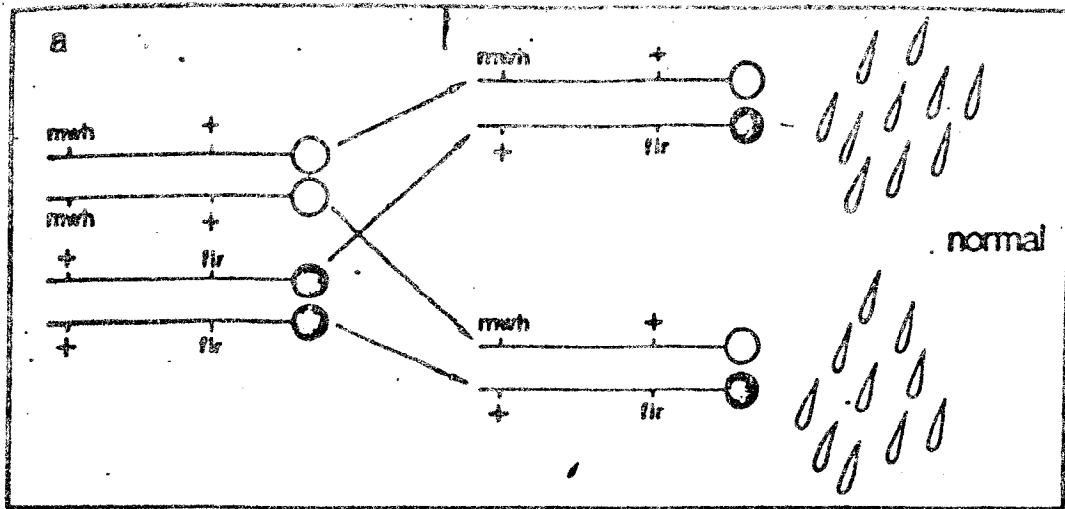


Figura 1: Esquemas genéticos ilustrativos da formação de manchas mutantes no SMART

Frölich e Würigler (1989) desenvolveram nova linhagem de *Drosophila melanogaster* para detecção de agentes promutagenicos, que necessitam ser ativados pelo citocromo P-450. Essa linhagem carrega os cromossomos 1 e 2 de uma linhagem denominada Oregon R (R), que era resistente ao DDT e na qual se verificava um alto grau de citocromo P-450 (Hollstron e Blanck, 1985).

A ativação metabólica é feita pela enzima citocromo P-450.

Em *Drosophila* esta enzima citocromo P-450 tem a capacidade de metabolizar uma variedade de substâncias; com isto, elas assemelham-se aos mamíferos, apesar de suas atividades não serem elevadas quanto nestes organismos.

A linhagem Oregon R (R) (ORR) possui enzimas responsáveis para bioativação, fazendo com que aumentem a sensibilidade a um grande número de promutágenos.

O cruzamento de fêmeas mwh com machos ORR; E1r3 mostrou um resultado positivo aumentado em relação a linhagem Standard, quando um grande número de promutagenos foi testado.

No entanto, esta linhagem apresenta distúrbios nas distribuições de pelos, baixa produção de ovos e atraso no desenvolvimento das larvas (Frölich e Würigler, 1991).

Graf e van Schaik (1992), realizaram o cruzamento com a linhagem de alta capacidade de

bioativação, utilizando fêmeas ORR, Flr3/PM3, Ser e machos mwh, produzindo assim descendentes heterozigotos ORR.

Verificaram que os descendentes apresentavam padrão de pelos normais, produção de ovos normais, apesar de apresentarem alta capacidade de bioativação.

1.2.1.Coleção de Fêmeas

Para a coleta de fêmeas virgens, deve-se selecionar as culturas, preferencialmente de 9-10 dias, onde suas pupas devem estar escuras e de coloração marron.

Deve-se fazer a remoção de todas as moscas adultas (machos e fêmeas).

Depois de um período de 6 horas após esta remoção, deve-se fazer a coleta das moscas nascidas neste intervalo de tempo, separando as fêmeas e descartando os machos.

Este processo deve ser feito a cada período de 4-6 horas, onde as moscas serão anestesiadas e separadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico e um pincel fino.

1.2.2.Coleção de Machos

Os machos podem ser coletados a qualquer hora. Porém é aconselhável que não sejam muito jovens.

Geralmente mantêm-se os machos isolados antes do cruzamento por 1-2 dias e bem alimentados.

1.2.3. Coleção das Larvas

Os ovos são coletados por um período de 8 horas, em frascos contendo meio de fermento mais glicose, sobre uma base sólida de ágar.

Após 3 dias, quando as larvas possuem 72 ± 4 horas, as mesmas são retiradas do meio de fermento por meio da lavagem em água corrente e coletadas em peneira de malha fina.

1.3. Cetoconazol

O Cetoconazol é um fungicida oral imidazol com longo espectro usado na medicina clínica. Entretanto, induz sérios efeitos endócrinos colaterais como ginecomastia, impotência sexual, azoospermia, oligospermia e inibição da síntese de esteróides.

Em relação aos efeitos farmacológicos, o Cetoconazol é um composto branco ou suavemente bege, sem odor e solúvel em ácido.

Cetoconazol é o primeiro agente fungicida oral que possui uma boa absorção após a sua administração oral. Alcança concentrações no plasma que podem ser úteis contra um largo espectro de fungos. (Jacobs & Nall, 1988).

No entanto, o Cetoconazol apresenta solubilidade aumentada em pH gástrico alto, enquanto que o fluconazol, (fungicida triazol), pelo fato de ser altamente solúvel em água parece ser minimamente afetado pelo pH gástrico (Kowalsky & Dixon, 1991).

Estudos feitos por Saag e Dismukes (1988 in: Kowalsky & Dixon, 1991) mostravam que o fluconazol é mais efetivo que o Cetoconazol em *Aspergillus flavus*; *C. albicans* e *Blastomyces dermatitidis* e se mostrou igual ao Cetoconazol em relação ao *Coccidioides immitis*.

O Cetoconazol se mostrou menos solúvel em água do que o Fluconazol sendo, portanto, menos absorvido pelo trato gastro-intestinal (Laine et al, 1992).

Esta droga rapidamente provou ser altamente efetiva em muitas infecções cutâneas, mas foi verificado que, em altas dosagens, causam problemas na redução da produção de testosterona e na síntese de cortisona (Graybil & Shrkey, 1990).

Em tratamento de *Pityriases versicolor* mostrou-se eficaz em alguns casos e com uma toxicidade mínima (Goodless et al, 1991).

O Cetoconazol foi ineficaz no combate ao *Cryptococcus meningitis*, enquanto que outras triazoles como o Fluconazol e o Itraconazol mostraram-se bastante eficazes, particularmente em pacientes com Síndrome de Imuno Deficiência Adquirida (AIDS) (Sugar, et al, 1990).

Pacientes com AIDS tratados com Fluconazol e Cetoconazol mostraram cura endoscópica em 91% dos tratados com Fluconazol e exito em apenas 52% nos tratados com Cetoconazol (Laine et al, 1992). No entanto, esses autores admitiram que ambas as drogas parecem ser seguras e bem toleradas.

Entretanto, existem pesquisas que sugerem que 800mg/dia é a dose máxima tolerada por um paciente (Sugar et al, 1987).

Existem alguns efeitos colaterais observados em relação ao Fluconazol e Cetoconazol como náuseas e diarreias (Laine et al, 1992).

Pacientes com AIDS apresentam hiposecreção de ácido gástrico. No entanto, quando se administra Cetoconazol esta hiposecreção diminui (Laine et al, 1992).

Estudos citogenéticos realizados em células de medula óssea de Hamster infectados experimentalmente por *P.brasiliensis* e tratados com Cetoconazol demonstraram que o Cetoconazol não causa aberrações cromossômicas estruturais (Freire-Maia & Rocha, 1993).

1.4. Ciclotosfamida

A ciclotosfamida (2 - (bis (2 cloroetil) amino) tetrahydro - 2-H 1,3,2 - oxazafosforino 2 oxido) é uma substância derivada do agente alquilante mustarda nitrogenada, que é um composto descrito como sendo a primeira substância conhecida que induz rearranjos cromossômicos e mutações em células germinativas de animais experimentais (Auerbach & Robson, 1946; in: Spanó, 1981).

Alguns trabalhos desenvolvidos por Hampel (1968) e Hampel et al.(1966) mostraram que a ciclotosfamida é inócua quando testada *in vitro*, pois é uma substância pré-mutagênica que necessita ser metabolizada ou passar por esquemas de ativação para que os seus produtos ativos tenham ação sobre o organismo. (In: Spanó, 1981).

Numerosos trabalhos têm demonstrado os efeitos mutagênicos, clastogênicos, teratogênicos e carcinogênicos da ciclotosfamida quando testada *in vivo* (in: Spanó, 1981).

Devido aos efeitos acima descritos, a ciclotosfamida foi utilizada, neste experimento, como controle positivo, com o objetivo de verificar a eficácia do sistema teste empregado, no que diz respeito à detecção de mutações induzidas.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi verificar os possíveis efeitos mutagênicos e recombinogênicos do fungicida Cetoconazol em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, utilizando o "Somatic Mutation and Recombination test" (SMART), proposto por Graf et al, 1984.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. Substâncias químicas empregadas no tratamento: Cetoconazol.

O Cetoconazol, fabricado pelo Laboratório Marjan, conhecido com o nome comercial de Ketonan, é utilizado no tratamento das micoses superficiais, como nas micoses profundas.

Cada comprimido contém:

-Cetoconazol....200mg

-Excipientes: lactose, amido de milho, Plasdone esterato de magnésio.

O Ketonan comprimidos não deve ser utilizado durante a gravidez, por não se dispor de dados clínicos seguros que possam recomendá-lo durante este período. Embora não existam trabalhos de determinação do Cetoconazol no leite materno, sua estrutura química leva a crer que seja eliminado no leite materno.

Pacientes que estejam tomando Ketonan comprimido, não devem amamentar.

A posologia usada para pacientes que utilizam este medicamento é a seguinte:

-Candidiase vaginal - 2 comprimidos por dia - 5 dias

-Micoses superficiais - 1 comprimido por dia - 2 a 3 meses.

-Pitíriase versicolor - 1 comprimido por dia 2 a 4 semanas.

No decorrer do tratamento podem surgir alguns efeitos colaterais como: náuseas, vômitos, dor abdominal, prurido, icterícia, astenia, urina de coloração marrom e fezes esbranquiçadas.

A hepatotoxicidade pode aparecer com o Cetoconazol e ser evidenciada como hepatomegalia e sintomas de colestase. Ela é geralmente reversível com a suspensão do medicamento mas pode se confundir com uma hepatite viral. Pode suprimir a atividade adrenocortical e acarretar uma diminuição dos níveis séricos de testosterona levando a uma oligospermia, azoospermia, impotência e diminuição da libido.

Sintomas gastrointestinais como náuseas, vômitos, dores epigástricas, adinamia, icterícia e diarreia podem aparecer.

As fezes podem se apresentar descoloradas e a urina colúrica.

Também foram relatados casos de ginecomastia, fotofobia e insônia em alguns pacientes.

O Ketonan (Cetoconazol) é um derivado imidazólico sintético com amplo espectro sobre fungos patológicos e vai atuar contra:

Candida sp; Trichophyton sp; Microsporum sp; Epidermophyton floccosum; Blastomyces dermatidis; Histoplasma capsulatum; Malassezia furfur; Coccidioides immitis e Cryptococcus neoformans.

O mecanismo de ação do Cetoconazol se dá pela inibição da biossíntese do ergosterol, impedindo a proliferação dos fungos. Em altas dosagens pode afetar também a biossíntese de colesterol no fígado e nas adrenais, fato já evidenciado em ratos e cães.

Este medicamento (Ketonan) tem o risco de hepatotoxicidade do Cetoconazol quando este é aumentado com o uso de drogas com ação hepatotóxica como nitrofurantoina e o álcool.

O Cetoconazol pode potencializar a ação dos anticoagulantes. O uso da Ciclosporina potencializa o efeito nefrotóxico do Cetoconazol.

Os antagonistas H₂ reduzem a absorção do Cetoconazol. O paciente em tratamento de tuberculose com

isoniazida e/ou rifampicina tem as concentrações plasmáticas de Cetoconazol e da rifampicina reduzidas*.

Ciclofosfamida

A ciclofosfamida (Cfm) (fabricada pelo laboratório Pravaz Recordati) tem como sinônimos: Asta B 518; Cholen; Cytoxan; Enduxan e Mitoxan. (Spanó, 1981).

É um pó branco, solúvel em água destilada e em soro fisiológico ou glicosado. A solução conserva-se estável por até 3 horas e a maior estabilidade ocorre nos primeiros 30 minutos (Spanó, 1981).

Existe ainda sob a forma de comprimidos.

3.2. Meio de cultura para *Drosophila*

820 ml de água

11 g de agar

156 g de banana

25 g de fermento

11 ml de nipagin

* dados retirados do folheto de apresentação da droga

Dissolve-se o ágar em aproximadamente metade do volume de água necessária para a preparação do meio de cultura.

Coloca-se a banana no resto da água e bate-se em liquidificador.

Coloca-se a água com ágar no fogo até ferver, mexendo sempre para não empelotar.

Adiciona-se a água com a banana e o fermento até ferver novamente. Desliga-se o fogo e acrescenta-se o nipagin.

3.3. Cruzamentos realizados com *Drosophila melanogaster*

3.3.1. Cruzamento "Standard":

Fêmeas virgens Flr3/TM3, Ser x machos mwh.

3.3.2. Cruzamento de alta capacidade de bioativação:

Fêmeas virgens ORR; flr3/TM3, Ser x machos mwh.

3.4. Verificação do efeito mutagênico do
Cetoconazol pelo método "Somatic Mutation
and Recombination Test" (SMART).

Tratamento:

Fêmeas virgens Flr3/TM3, Ser; e fêmeas virgens ORR: flr3/TM3, Ser foram cruzadas com machos mwh. Os ovos foram coletados em um período de 8 horas. Após 72 horas \pm 4 horas as larvas foram coletadas e transferidas para frascos contendo 1,5 g de meio de cultura instantâneo (fórmula 4-24, Carolina Biological Supply Co. Burlington NC) e adicionados 5,0 ml das seguintes concentrações: 1,5; 3,125; 6,25 e 12,5 mg de Cetoconazol, dissolvidos em 1% de Tween 20 + 3% de etanol.

Como controle foram utilizados 3 frascos contendo cada um: 1,5 g de meio de cultura instantâneo, mais 5,0 ml de água; 5,0 ml de solvente; 5,0 ml de ciclofosfamida (0,1 mg) (controle positivo).

3.5. Preparação das asas de *Drosophila*

Para se fazer preparações permanentes, as asas de *Drosophila melanogaster*, foram embebidas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 ml de Glicerol, 50 g de hidrato de cloro, 50 ml água) e distendidas em lâminas.

Após um período de 24 horas, as lâminas foram cobertas com laminulas em solução de Faure, e secas na estufa a uma temperatura de 37 graus C, colocando-se sobre as mesmas, pesos de aproximadamente 250 g, para permitir uma melhor distensão das asas.

3.6. Análise das asas ao microscópio:

As asas de *Drosophila* foram analisadas em microscópio óptico, com um aumento de 40x.

Durante a análise microscópica das asas, a posição das manchas foi anotada de acordo com o setor em que se encontra na asa.

O tamanho de uma mancha é visto de acordo com o número de células afetadas, bem com o tipo de alteração existente.

Estas manchas podem ser pequenas (com 1-2 células) ou grandes (com mais de 2 células), mas só em manchas simples.

Em pêlos *f1r3* é verificado que sua forma é bastante variada, podendo ser pequenas manchas ou pêlos mais espessos.

Em pêlos *mwh* é verificado a existência de 3 pêlos, sendo um mais no centro e dois menores em cada lado.

Podem existir também "falsos" pêlos *mwh*, ocorrendo na forma de 3 pêlos, mas só que estes são todos grandes e ao redor existem um espaço sem outros pêlos. Esta anomalia pode ser causada por fatores ambientais ou por temperaturas mais elevadas (acima de 25°C).

Quando aparecer nas asas, células com somente 2 pêlos, estes não são considerados como *mwh*, só podendo ser

considerado, se estes estiverem juntos a outros que contêmham 3 pêlos.

Ao final do trabalho foram analisadas 20 asas de cada tratamento, num total de 140 asas para o cruzamento "Standard" e de 140 asas para o cruzamento com alta capacidade de bioativação.

3.7. Análise Estatística

Teste do χ^2 para proporções (Frei e Würgler, 1988).

Avaliação de resultados positivos:

Teste contra a hipótese nula (H_0)

H_0 : não há diferença entre o controle e o grupo tratado.

Em um experimento com N_c moscas não tratadas no grupo controle e N_t moscas tratadas no grupo de tratamento, testamos contra a hipótese nula H_0 na qual a frequência de manchas nas asas do grupo experimental não está aumentada com relação ao grupo controle.

A expectativa de X_c manchas nas moscas controle e de X_t manchas nas moscas tratadas é proporcional ao número de moscas de cada grupo.

Assim sendo, temos:

$N_c = p \cdot G = n^{\circ}$ de moscas do grupo controle

$N_t = q \cdot G = n^{\circ}$ de moscas do grupo tratado

$(p + q) \cdot G = n^{\circ}$ total de moscas

$p = n^{\circ}$ de moscas do grupo controle / n° total de moscas.

$q = n^{\circ}$ de moscas do grupo tratado / n° total de moscas

$\lambda =$ nº de manchas observadas

$\lambda_c =$ nº de manchas observadas no controle

$\lambda_t =$ nº de manchas observadas no tratamento

$T =$ nº total de manchas observadas (controle +
tratado).

$E\lambda =$ nº de manchas esperadas

$p.T =$ nº de manchas esperadas no controle

$q.T =$ nº de manchas esperadas no tratamento

$(p + q) T =$ nº total de manchas esperadas
(controle + tratamento).

$(p + q) = 1$

Portanto: $(p + q) = 1$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^k k_i \frac{x_i - E(x_i)}{E(x_i)}^2}{E(x_i)}$$

4. RESULTADOS

Neste experimento foram utilizadas duas linhagens de *Drosophila melanogaster*: 1) linhagem "Standard" (flr/TM3, Ser); 2) linhagem de alta capacidade de ativação metabólica (OKR; flr3/TM3, Ser).

Fêmeas virgens de ambas as linhagens foram cruzadas com machos da linhagem mwh.

Na geração F1 de tais cruzamentos são obtidos descendentes trans-heterozigotos (mwh +/flr3 +) e descendentes balanceadores heterozigotos (mwh +/TM3, Ser +).

Nos descendentes trans-heterozigotos (mwh +/flr3 +) podem ser detectadas manchas induzidas por processos de mutação, deleção, recombinação e não-disjunção cromossômica.

Nos descendentes balanceadores, devido à inversão TM3, Ser, que impede os processos de recombinação, é possível detectar apenas manchas induzidas por processos de mutação e deleção.

Larvas de 72 ± 4 h foram transferidas para tubos contendo 1,5 g de meio de cultura instantâneo (4-24 Carolina Biological Supply Co. Burlington N.C) aos quais foram acrescentados diferentes concentrações de Cetoconazol (1,5; 3,125; 6,25; 12,5 mg) diluído em 5 ml de solvente (1% Tween 20 + 3% etanol).

Como controle, fez-se tratamento de larvas apenas com o solvente utilizado na preparação das diferentes concentrações de Cetoconazol.

Com o objetivo de verificar a eficácia do sistema teste empregado, fez-se um controle positivo, utilizando-se como agente químico a ciclofosfamida. Devido ao fato de a ciclofosfamida ter sido diluída em água (e não no solvente utilizado na preparação de diferentes concentrações de Cetoconazol) fez-se um tratamento de larvas apenas com água (controle negativo).

Devido ao fato de as larvas trans-heterozigotas e larvas balanceadoras-heterozigotas serem indistinguíveis, ambas foram tratadas. No entanto, procedeu-se a análise apenas dos descendentes trans-heterozigotos devido ao fato de se poder detectar nestes um maior número de manchas induzidas pelos diferentes mecanismos de genotoxicidade.

A tabela 1 apresenta as frequências de manchas observadas nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento "Standard", tratados com diferentes concentrações de cetoconazol e ciclofosfamida (1mM).

A tabela 2 Apresenta os valores de χ^2 para proporções obtidos nos descendentes trans-heterozigotos da linhagem "Standard" tratados com diferentes concentrações de Cetoconazol (1,5; 3,125; 6,25; 12,5mg/ 5 ml de solvente) e ciclofosfamida (1mM).

A tabela 3 apresenta as frequências de manchas observadas nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento de alta capacidade de ativação metabólica, tratados com diferentes concentrações de Cetoconazol e ciclofosfamida (1mM).

A tabela 4 Apresenta os valores de χ^2 para proporções obtidos nos descendentes trans-heterozigotos da linhagem de alta capacidade de ativação metabólica tratados com diferentes concentrações de Cetoconazol (1,5; 3,125; 6,25; 12,5mg/ 5 ml de solvente) e ciclofosfamida (1mM).

A análise estatística foi feita de acordo com Frei e Würgler 1988.

As figuras nº 1 e 2 mostram a distribuição de tamanho de manchas simples e gêmeas observadas nas moscas da linhagem "Standard" tratadas com 1mM de Ciclofosfamida.

As figuras nº 3 e 4 mostram a distribuição do tamanho de manchas simples e gêmeas observadas nas moscas na linhagem de alta capacidade de ativação metabólica tratadas com 1mM de Ciclofosfamida.

Tabela 1. Frequência de manchas observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (mwh/flr3) de *Drosophila melanogaster* da linhagem flr3/TM3, Ser. tratados no período de larva (48h de tratamento) com diferentes concentrações de Cetoconazol e com Ciclotosfamida.

Tratamento	Marcador heterozigoto			*
	Nºasas	Nºmanchas	Freq.	
Controle (água)	20	04	0,2	
Solvente (1% Tween + 3% etanol)	20	01	0,05	
Ciclotosfamida (1,0mM)	20	22	1,1	+
Cetoconazol				
1,5 mg/5 ml solvente	20	04	0,2	-
3,125 mg/5 ml solvente	20	0	0,0	-
6,25 mg/5 ml solvente	20	03	0,15	-
12,5 mg/5 ml solvente	20	05	0,25	-

*Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988)

+ = positivo ; - = negativo
 $\alpha = 0,05$ $\chi^2 = 2,706$ g.l = 1

H₀ = não há diferença entre o controle e o grupo tratado.

Tabela 2: Valores de χ^2 para proporções obtidos nos descendentes trans-heterozigotos da linhagem "Standard" tratados com diferentes concentrações de Cetoconazol (1,5; 3,125; 6,25; 12,5mg/ 5 ml de solvente) e Ciclofosfamida (1mM).

Tratamento	χ^2 para proporções		Diagnóstico Estatístico
Controle (agua)	1,80	rejeita Ho	-
Ciclofosfamida (1 mM)	19,16	aceita Ho	+
Cetoconazol			
1,5 mg /5 ml solvente	1,80	rejeita Ho	-
3,125 mg /5 ml solvente	1,00	rejeita Ho	-
6,25 mg /5 ml solvente	1,00	rejeita Ho	-
12,5 mg /5 ml solvente	2,26	rejeita Ho	-

Ho= não há diferença entre o controle e o grupo tratado

$\alpha = 0,05$

$\chi^2 = 2,706$

g.l. = 1

Tabela 3. Frequência de manchas observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (mwh/flr3) de *Drosophila melanogaster* da linhagem ORR; flr3/IM3, Ser, tratados no período de larva (48h de tratamento) com diferentes concentrações de Cetoconazol e com Ciclofosfamida.

Tratamento	Marcador heterozigoto			*
	Nº asas	Nº manchas	Freq.	
Controle (água)	20	03	0,15	
Solvente (1% Tween + 3% etanol)	20	08	0,4	
Ciclofosfamida (1,0mM)	20	24	1,2	+
Cetoconazol				
1,5mg/ 5 ml solvente	20	03	0,15	-
3,125mg/ 5 ml solvente	20	08	0,4	-
6,25mg/ 5 ml solvente	20	06	0,3	-
12,5mg/ 5 ml solvente	20	04	0,2	-

* Diagnostico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988)

+ = positivo ; - = negativo

$$\alpha = 0,05 \quad \chi^2 = 2,706 \quad g.l = 1$$

H₀ = não ha diferença entre o controle e o grupo tratado.

Tabela 4: Valores do χ^2 para proporções obtidos nos descendentes trans-heterozigotos da linhagem de alta capacidade de ativação metabólica tratados com diferentes concentrações de Cetoconazol (1,5; 3,125; 6,25; 12,5mg/ 5 ml de solvente) e ciclofostamida (1mM).

Tratamento	χ^2 para proporção		Diagnóstico Estatístico
Controle			
(água)	2,26	rejeita Ho	-
Ciclofostamida			
(1 mM)	8,00	aceita Ho	+
Cetoconazol			
1,5 mg /5 ml solvente	2,26	rejeita Ho	-
3,125 mg /5 ml solvente	0,00	rejeita Ho	-
6,25 mg /5 ml solvente	0,28	rejeita Ho	-
12,5 mg /5 ml solvente	1,32	rejeita Ho	-

Ho = não há diferença entre o controle e o grupo tratado

$\alpha = 0,05$ $\chi^2 = 2,706$ g.l.=1

Ciclofosfamida / Controle

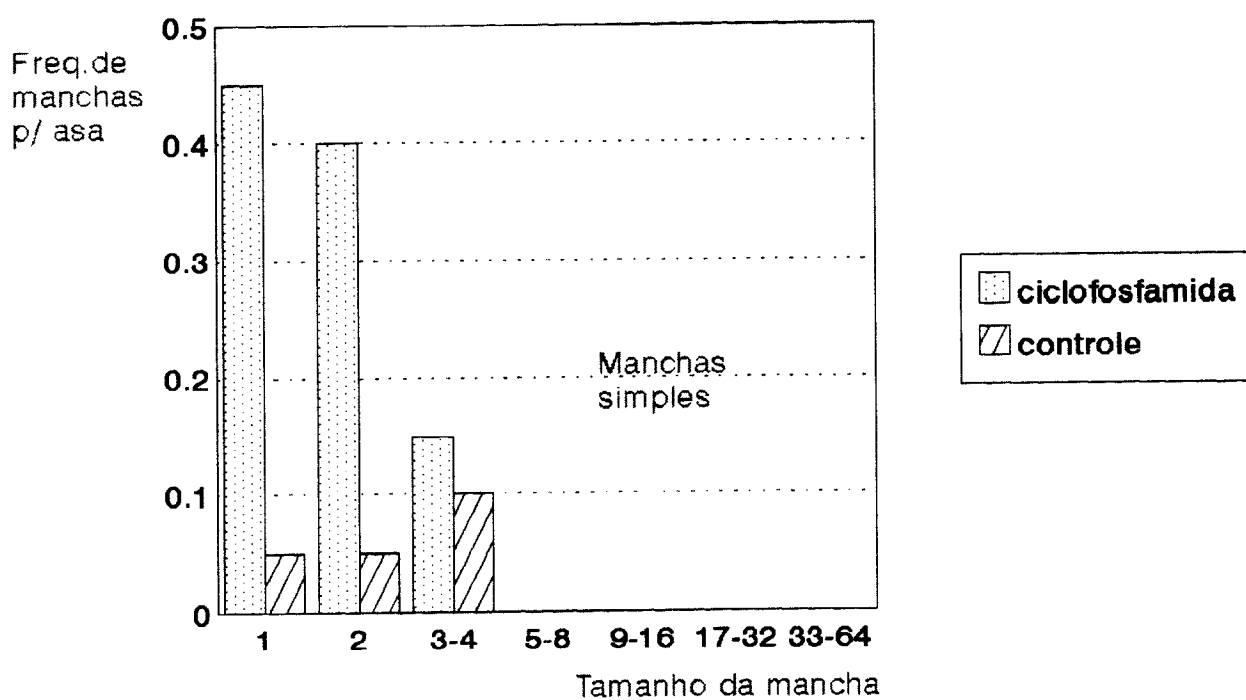


Fig.1: Distribuição do tamanho das manchas simples no cruzamento "Standard" (flr3/TM3, Ser), após tratamento com 1 mM de ciclofosfamida, por 48h.

ciclofosfamida

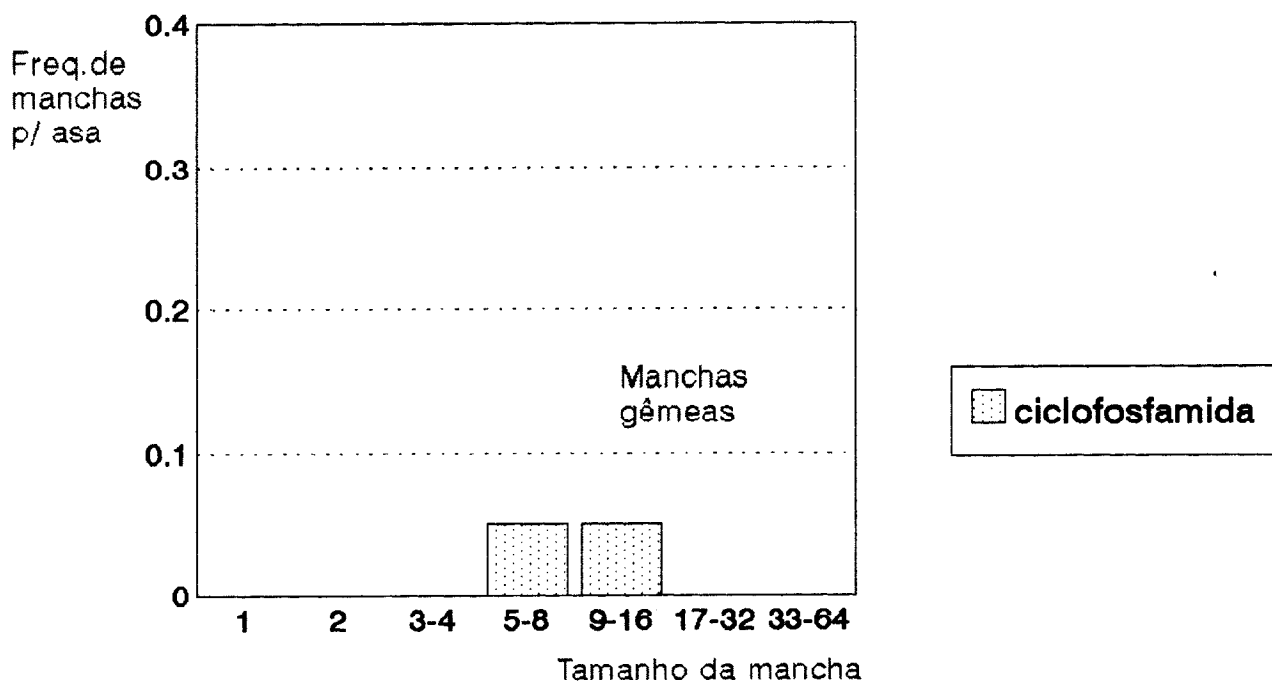


Fig.2 : Distribuição do tamanho das manchas gêmeas no cruzamento "Standard" (flr3/TM3,Ser), após tratamento com 1mM de ciclofosfamida, por 48h.

Ciclofosfamida / Controle

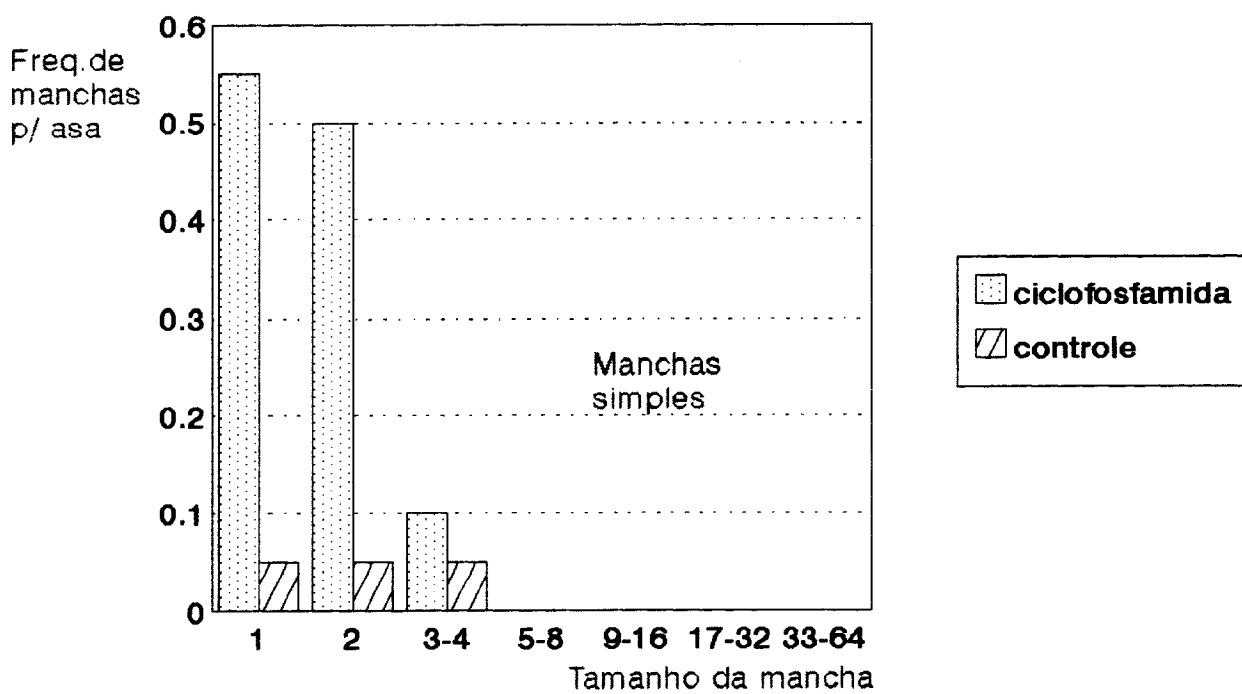


Fig.3: Distribuição do tamanho das manchas simples no cruzamento de alta capacidade de bioativação (ORR,flr3/TM,Ser), após tratamento com 1mM de ciclofosfamida, por 48h.

Ciclofosfamida

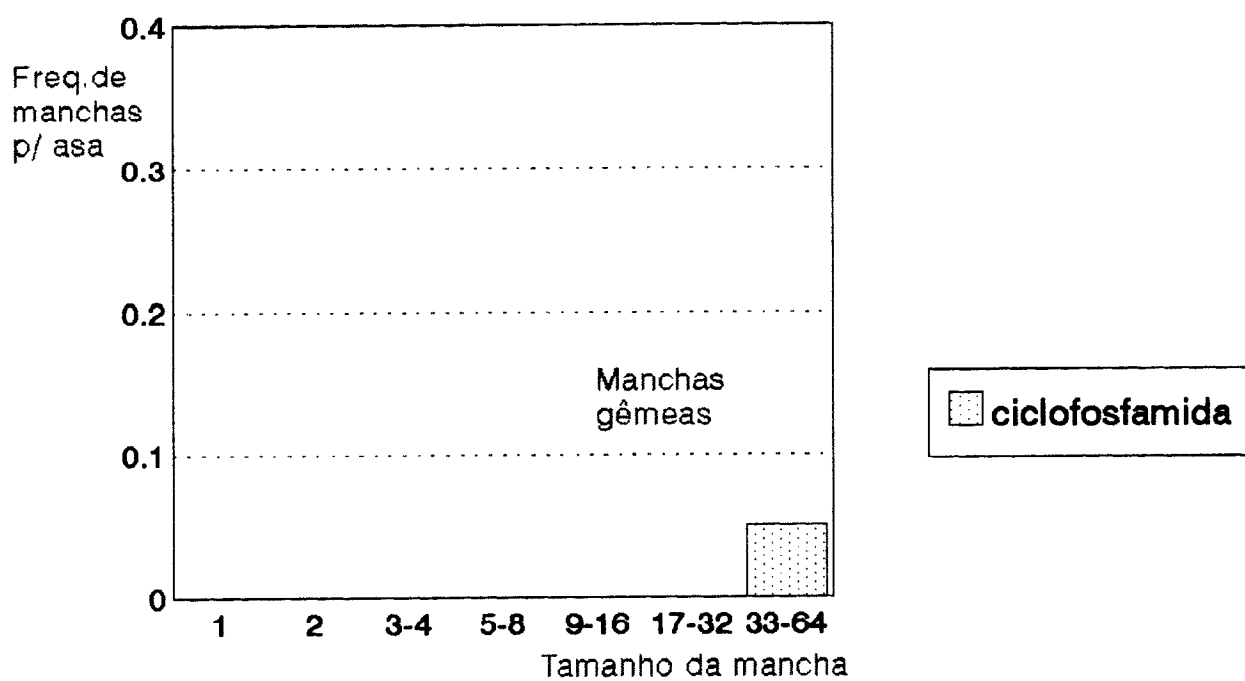


Fig. 4 : Distribuição do tamanho das manchas gêmeas no cruzamento de alta capacidade de bioativação (ORR;flr3/TM3,Ser), após tratamento com 1mM de ciclofosfamida, por 48h.

5. DISCUSSÃO

O Cetoconazol é um agente fungicida oral, do grupo dos imidazoles, que possui um largo espectro de ação.

Tem sido utilizado na Medicina Clínica, no tratamento de infeccões cutâneas (Graybil & Sharkey, 1990), de Pityriases versicolor (Goodless et al, 1991), de *Cryptococcus meningitis* (Sugar et al, 1990) etc.

O unico trabalho encontrado na literatura relacionado aos possiveis efeitos genotóxicos do Cetoconazol diz que, Hamster infectados e não infectados pela cepa 18 do *P. brasiliensis* e tratados com 80 mg/Kg/dia, durante 8 e 17 semanas, apresentaram 13,1% de aneuploidias no grupo de animais tratados com Cetoconazol; 12,6% no controle: 12,9% nos infectados tratados com Cetoconazol e 14,1% nos infectados e não tratados. A diferença não se mostrou estatisticamente significativa. Não foram encontradas aberracões estruturais e os resultados indicam que em Hamster o Cetoconazol, bem como a infeccão por *P. brasiliensis* não causam aberracões cromossómicas (Freire-Maia & Rocha, 1993).

Devido ao fato de não existirem na literatura outros dados relacionados aos possiveis efeitos genotóxicos do Cetoconazol, foi proposto este trabalho, com o objetivo

de verificar os seus possíveis efeitos genotóxicos utilizando, como organismo teste, *Drosophila melanogaster* de linhagem de baixa capacidade de ativação metabólica (flr3/TM3, Ser) e de alta capacidade de ativação metabólica (ORR; flr3/TM3, Ser), assim como da linhagem que apresenta pêlos múltiplos nas asas (mwh- multiple wing hair).

Do cruzamento de fêmeas das linhagens de baixa e alta capacidade de ativação metabólica, com machos da linhagem mwh obtêm-se em F₁ descendentes dos tipos:

1)trans-heterozigotos, nos quais é possível detectar a presença de manchas simples do tipo "mwh" ou "flare" e manchas gêmeas "mwh/flare" devido a mutação, deleção, recombinação gênica ou não disjunção cromossômica.

2)Balanceador heterozigoto, nos quais é possível detectar apenas manchas simples do tipo mwh devido a mutação, deleção e não-disjunção. Devido ao fato de apresentarem a inversão TM3,Ser, todos os eventos recombinacionais são eliminados.

Vários trabalhos têm demonstrado que no teste de detecção de mutações e recombinações somáticas (SMART) a grande maioria das manchas observadas é devida a processos recombinacionais, e, portanto, a minoria devido a mutação, deleção e não-disjunção (Spanó, 1993; Graf et al, 1992).

Assim sendo, neste trabalho foram analisadas apenas as asas de descendentes trans-heterozigotos, provenientes dos diferentes tipos de tratamento.

A análise dos balanceadores heterozigotos apenas se justificaria caso a frequência de manchas observadas nos trans-heterozigotos fosse extremamente elevada, o que permitiria detectar a porcentagem devida à recombinação gênica.

Os resultados observados indicam que, com aumento da concentração do Cetoconazol não há aumento na frequência de manchas, tanto na linhagem de baixa, como na de alta ativação metabólica.

Pode-se verificar que não há aumento na frequência de manchas na linhagem de alta capacidade de ativação metabólica. Assim sendo, o Cetoconazol não utiliza enzimas Citocromo P-450 para produzir metabólitos genotóxicos ativos.

Como controle foi utilizado o tratado com 1% Tween 20 + 3% de etanol que foi o solvente utilizado na diluição do Cetoconazol.

Como controle positivo foi utilizado a Ciclotosfamida que é um agente alquilante comprovadamente mutagênico, clastogênico, teratogênico e carcinogênico (Spanò, 1981).

A Ciclotosfamida é um agente pro-mutagenico que necessita ser ativado por enzimas citocromo P-450. Os resultados observados mostram que as frequências de manchas de ambas as linhagens são praticamente as mesmas (1,1% na linhagem "Standard" e 1,2% na linhagem de alta capacidade de ativação metabólica): o que sugere que a linhagem "Standard", apesar de ser de baixa capacidade de ativação metabólica, possui enzimas suficientes para metabolizar a Ciclotosfamida a metabólitos ativos.

Devido ao fato de ser utilizado água na diluição da Ciclotosfamida, fez-se um grupo controle com água.

A análise estatística foi feita, portanto, comparando as frequências de manchas observadas nos grupos tratados com Cetoconazol em relação as observadas nos tratados com solvente; e as frequências observadas nos tratados com Ciclotosfamida em relação às tratadas com água.

6. CONCLUSOES

Os dados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

1) O Cetoconazol não é mutagénico quando empregado nas concentrações de 1,5; 3,125; 6,25 e 12,5 mg/5ml de solvente (1% de Tween 20 + 3% de etanol) em *Drosophila melanogaster* das linhagens.

1-tlr3/TM3, Ser

2-ORR; tlr3/TM3, Ser

3-mwh

2) Cetoconazol não é convertido em metabólitos genotóxicos ativos pelos enzimas citocromo P-450.

3) O "Somatic Mutation and recombination Test" (SMART) é um sistema teste ideal na detecção de efeitos mutagénicos de agentes químicos, o que pode ser comprovado pelos resultados positivos observados com o agente, comprovadamente mutagénico, Ciclotofamida.

4) Na Medicina Clinica, não há necessidade de se substituir o Cetoconazol por outros agentes fungicidas, devido a efeitos genotóxicos induzidos pelo mesmo.

7.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLUM, A.R.; D'ANDREA, T.D.; FLORENTINO, M.B.; WILTON, H.J.; HILLIGOSS, M.D.; GARDNER, J.M.; HENRY, B.E; GOLDSTEIN, H. and SCHENIAG, J.J. Increased Gastric pH and The Bioavailability of Fluconazole and Ketoconazole. Annals of Internal Medicine. (1991) 114(9): 755-757.

BURNS, G.W. and BOTTINO P.J. Genetica. Guanabara Koogan. 6ª edição. 1991. 1- 381.

COLUS, I.M.S. Estudo dos possíveis efeitos mutagênicos do inseticida nematocida Carbofuran (Furadan) em organismos eucariotos. Tese de Doutorado.Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP. (1992) 1-107.

FREI H: CLEMENTS, J. HOWE, D. and WÜRGLER, F.E. The Genotoxicity of germ cells of *Drosophila melanogaster*. Mutation Res. (1992). 279: 21-33.

FREI, H. and WÜGLER, F.E. Somatic recombination and other mechanisms producing clonal genetic mosaics in the wing spot test of *Drosophila*. *Mutagenesis* (1992). 7: 156.

FREI, H., and F.E. WÜGLER. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result, *Mutation Research* (1988). 203, 297-308.

FREI, H.; CLEMENTIS, J. ; HOWE, D.; and WÜGLER, F. E. The Genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* (1992) . 279: 21-33.

FREIRE-MAIA, D.V. e ROCHA, R.H. Estudos citogenéticos em medula óssea de Hamster; infectados experimentalmente por *P.brasiiliensis* e tratados com Ketoconazole (KtZ). *Revista Brasileira de Genética. Supplement*. 1993, Sep. 16 (3): 248.

FRÖLICH, A. and WÜRGLER, F. E. The high bioactivation cross for the SMART assay with the wing. Drosophila Inf. Serv. (1991). 70: 246-247.

FRÖLICH, A. and WÜRGLER, F. E. Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype - controlled metabolic capacity. Mutation Research. (1990). 244: 201-208.

FRÖLICH, A. and WÜRGLER, F.E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* Wing spot test. Mutation Res. (1989). 216: 179-187.

GOODLESS, D.R.; RAMOS-CARO, F.A.; FLOWERS, F.P. Ketoconazole in the treatment of pityriasis versicolor: International review of Clinical trials. DDCP (1991) Apr. 25(4): 395-398.

GRAF, U. Temperature effect on mwh expression in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Research Notes. (1986) 63-65.

GRAF, U., van SCHAIK N. and PACELLA R. Improved "High Bioactivation" cross for the SMART wing assay. *Dros. Inf. Serv.* (1991).

GRAF, U., van SCHAIK N.; WÜRGLER, F.E. *Drosophila* Genetics. A Practical Course. Springer-Verlag (1992). 3-239.

GRAF, U.; HED, O. and RAMIREZ O.O. The genotoxicity of Chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutation Res.* (1992). 266: 197-203.

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON ; HALL, C.B. and KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* (1984). 6: 153-188.

GRAYBILL, J.R.; SHARKEY, P.K. Fungal infections and their management. Journal Clinical Practice Symp Supplement (1990) Sep. 71p. 23-31.

HALLSTRON, I., BLANCK, A. and AFUMAS, S. Genetic variation in cytochrome P-450 and Xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster* Biochem. Pharmacology (1984) 33: 13-20.

HAUGHEY, D.B. and JUSKO, W.J. Effect of Ketoconazole on Methylprednisolone Pharmacokinetics and Receptor/ Gene-Mediated Pharmacodynamics. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (1991) Nov. 259 (2): 826-832.

JACOBS, P.H.; NALL, L. The action safety of Ketoconazole: A brief literature review. Curtis (1988) Oct. 42(4): 276-282.

KOWALSKY, S.F. and DIXON D.M. Fluconazole: A new antifungal agent. Clinical Pharmacy. (1991)- 10: 179-192.

LAINÉ, L.; DRETLER, R.H.; CONIEAS, C.N.; TUAZON, C.;
KOSIER, F.M.; SAITLER, F.; SQUIRES, K. and ISLAM, M.Z.
Fluconazole compared with ketoconazole for the treatment
of Candida Esophagitis in AIDS. Annals of Internal
Medicine (1992). 117 (8): 655-660.

SAAG, M.S. and DISMUKES. Azole antifungal agents: Emphasis
on New thiazoles. Antimicrobial agents and Chemotherapy.
(1988) Jan. 32 (1): 1-8.

SANTOS, S.J. Estudo sobre a genotoxicidade do Antichagásico
Rochagan (Benzonidazol) em *Allium cepa* e linfocitos
humanos *in vitro*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto, USP - (1990): 1-107.

SCHAIK, N.V. and GRAF, U. Structure-activity relation
ships of tricyclic antidepressants and related compounds
in the wing somatic mutation and recombination test of
Drosophila melanogaster. Mutation Research. (1993).
286: 155-163.

SONINO, N.; BOSCARO, M.; MEROLA, G.; and MANIERO, F.
Prolonged treatment of Cushing's disease by
Ketoconazole. *Journal of Clinical Endocrinology and
Metabolism* (1985) Oct. 61 (4): 718-722.

SPANÓ, M. A. Efeitos clastogênicos de drogas Anti-
Neoplásicas (ciclofosfamida, 5 fluorouracil,
Methotrexate) em Raios X, *In Vivo e In Vitro*. Tese de
Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP
(1981) 1-163.

SPANÓ, M. A. Efeitos mutagenicos de substâncias químicas
de uso humano em diferentes organismos. Dissertação de
Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP
(1977) 1-90.

STRICKBERGER, M.W. Experiments in Genetics With
Drosophila. Edited by John Wiley & Sons, Inc. 6^a ed.
p.p. 1-144.

SUGAR, A. M.; ALSIP, S.G.; GALGIANI, J.N.; GRAYBILL, J.R.;
DISMUKES, W.F.; CLOUD, G.A.; CRAVEN, P.C.; and STEVENS,
D.A. Pharmacology and Toxicity of High - dose
Ketoconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
(1987) Dec. 31 (12): 1874-1878.

ULRICH, B.; FREY, F.J.; SPECK, R.F.; and FREY, B.M.
Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Ketoconazole
Prednisolone interaction. *Journal of Pharmacology and
Experimental Therapeutics*. (1992) Feb. 260 (2): 487-490.

WITJES, F.J.; DEBRUYNE, F.M.; FERNANDEZ, del MORAL, P.;
GEBOERS, A.D. Ketoconazole high dose in management of
hormonally pretreated patients with progressive metastatic
prostate cancer. *Urology* (1989). May. 33(5): 411-415.

YAMASHITA, S.K.; LUDWIG, E.A.; MIDDLETON, E.; and JUSKO,
W.J. Lack of pharmacokinetic and pharmacodynamic
interactions between Ketoconazole and prednisolone.
Clinical Pharmacology Therapeutics (1991) May 49(5):
558-570.

ZORDANI, M.; GRAF, U.; SINGER, D.; BELTRAMI, G.; VALLE,
L.D.; OSTI, M.; COSTA, R.; and LEVIS, A.G. The
genotoxicity of nitrotriacetic acid (NTA) in a somatic
mutation and recombination test in *Drosophila*
melanogaster. Mutation Research (1991), 262: 253-261.