

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VERIFICAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS GENOTÓXICOS DO OMEPRAZOL, PELO  
"SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST" (SMART) EM ASAS DE  
*Drosophila melanogaster*.

SHEILLA MARIA DE ARRUDA CHAVES

Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para 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 GENOTÓXICOS DO OMEPRAZOL, PELO  
"SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST" (SMART) EM ASAS DE  
*Drosophila melanogaster*.

SHEILLA MARIA DE ARRUDA CHAVES

Orientador: Prof. Dr. MARIO ANTONIO SPANO

Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG  
Dezembro - 1993

VERIFICAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS GENOTÓXICOS DO OMEPRAZOL, PELO  
"SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST" (SMART) EM ASAS DE  
*Drosophila melanogaster*.

Aprovado pela comissão examinadora em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

---

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó  
Orientador

---

Profª Dra. Ana Maria Bonetti  
Conselheira

---

Prof. Júlio César Nepomuceno  
Conselheiro

Uberlândia - MG  
Dezembro - 1993

### AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, professor do Departamento de Biociências da Universidade Federal de Uberlândia, por ter proporcionado as condições para realização deste trabalho, pela orientação e sugestões que me dedicou.

Ao Prof. Júlio César Nepomuceno, professor do Departamento Biociências da Universidade Federal de Uberlândia, pela contribuição na orientação deste trabalho, pelas sugestões, carinho, amizade e apoio constante.

A Sr<sup>a</sup> Edna Bruns Navarro, secretária da Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, pelo carinho, apoio, presteza e dedicação.

Aos meus amigos, em especial, Edwiges Zanini e Daniela Guimarães Simão, pela amizade, carinho, apoio e estímulos constantes.

Ao meu noivo, Luis Fernando de Freitas Manzano, pelo carinho, afeto, paciência, apoio e incentivo constante.

Aos meus pais, Sr. Leone Rodrigues Chaves e Sr<sup>a</sup> Maria de Arruda Chaves, pelo apoio, carinho e afeto que sempre me dedicaram.

## INDICE

RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. <i>Drosophila</i> como organismo teste.....	03
1.2. Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	05
1.3. OMEPRAZOL.....	10
1.4. Ciclosfamida.....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1. OMEPRAZOL.....	16
2.2. <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema teste.....	17
3. RESULTADOS.....	24
4. DISCUSSÃO.....	34
5. CONCLUSÕES.....	37
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	38

**RESUMO**

O Omeprazol é um agente quimioterápico encontrado no mercado com o nome de Losec. é empregado no tratamento da Síndrome Zollinger-Ellison, úlcera duodenal, úlcera gástrica e esofagite de refluxo.

Foi empregado o "Somatic Mutation and Recombination Test" (SMART), em *Drosophila melanogaster*, para verificar os possíveis efeitos genotóxicos do Omeprazol.

Foram utilizadas duas linhagens de *Drosophila melanogaster*: Flr3/TM3, Ser (de baixa capacidade de ativação metabólica) e; ORR:Flr3/TM3, Ser (de alta capacidade de ativação metabólica).

Nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg de Omeprazol, foi verificado efeito negativo na linhagem de baixa capacidade de ativação metabólica; e efeito positivo na linhagem de alta capacidade de ativação metabólica, para as concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg.

Como controle positivo foi usada a ciclofosfamida, na concentração de 1 mM, a qual induziu efeito genotóxico em ambas as linhagens.

Os resultados obtidos com o Omeprazol indicam que o mesmo é um promutágeno e necessita da enzima citocromo P-450 para ser ativado.

Estes resultados demonstram a sensibilidade e a versatilidade do teste de manchas em asa de *Drosophila* para avaliação da atividade genotóxica de promutágenos e procarcinógenos.

## SUMMARY

The Omeprazole is a chemotherapeutic agent known commercially as Losec, which is used in the treatment of Zollinger-Ellison Syndrome, duodenal ulcer, gastric ulcer and reflux esophagitis.

The Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster* has been used to analyse the genotoxic effects of Omeprazole.

It was used two different strains of *Drosophila melanogaster* : Flr3/TM3, Ser (standard cross) and ORR: Flr3/TM3, Ser (high bioactivation cross).

The doses of 0,5; 1,0; 2,5 and 5,0 mg of Omeprazole demonstrated negative effect in the standard cross. A positive effect was observed in the high bioactivation cross at the concentrations of 1,0; 2,5 and 5,0 mg.

As a positive control it was used the cyclophosphamide in a 1,0 mM concentration that induced genotoxic effects in both strains.

The results obtained for Omeprazole denote that it is a promutagen and it requires the cytochrome P-450 enzyme to be active.

These results demonstrate the sensitivity and versatility of the *Drosophila* wing spot test for the evaluation of genotoxic activity of promutagens and procarcinogens.

## 1. INTRODUÇÃO

Muitos compostos químicos naturais e sintéticos, além de agentes físicos, podem induzir alterações genéticas permanentes nas células dos organismos vivos. Estas alterações são denominadas mutações e, por sua vez, os agentes indutores das mesmas são denominados agentes mutagênicos.

Mutação é toda alteração do material genético de uma célula que não resulta de segregação ou recombinação. Quando não é letal para a própria célula, ela pode propagar-se pelo corpo em crescimento (mutação somática) ou transmitir-se às gerações seguintes (mutação germinativa). Se ocorrer nestas segundas, pode produzir doenças ou má formações futuras. Sobre as células somáticas pode levar a um processo carcinogênico no próprio indivíduo (Rabello-Gay et al., 1991).

A toxicologia genética tem-se desenvolvido muito rapidamente, pois é cada vez maior o número de agentes químicos utilizados em terapêutica humana ou não. É sabido que muitas substâncias químicas foram condenadas como sendo altamente tóxicas, mas nenhum controle efetivo pode ser feito com relação ao seu emprego nos países pobres e mesmo nos mais industrializados.

O termo mutação foi empregado pela primeira vez por De Vries, ao estudar mudanças repentinas na hereditariedade de

*Drosophila*. Foi ele também o primeiro a sonhar com a indução de mutações diretas (Auerbach, 1974).

Morgan (1914) descreveu suas tentativas em produzir mutações em *Drosophila*, por meio de tratamentos com álcool e éter, porém não obteve sucesso. Com o mesmo intuito, Mann (1923) (em Auerbach, 1974) testou várias substâncias químicas, inclusive morfina, quinina e sais metálicos, utilizando como organismo teste a *Drosophila*. Contudo também não obteve sucesso.

Müller (1927) foi o primeiro a estabelecer efeitos mutagênicos em raios X. Em seu trabalho "Transmutação Artificial do Gene" descreveu a produção de moscas mutantes através do tratamento de esperma de *Drosophila* com doses relativamente elevadas de raios X.

Auerbach e Robson citados por Barthelmess (1970) foram os primeiros a estabelecer efeitos mutagênicos de agentes químicos, que tiveram resultados positivos em *Drosophila* com gás mostarda. Motivo pelo qual tal substância tenha sido escolhida foi a similaridade entre as lesões produzidas na pele por raios X e as produzidas pelo gás mostarda (efeito radiomimético).

Estes resultados positivos obtidos por Müller, e Auerbach e Robson levou a uma rápida expansão no campo de pesquisa relacionado à mutagênese física e química.

No entanto, o teste mais comum utilizado, por muitos anos, em testes genotóxicos com *Drosophila* foi o teste para o recessivo letal ligado ao sexo. Porém, este teste é relativamente caro e demorado, especialmente porque as condições experimentais têm de ser variadas para evitar resultados falso-negativos. Além destas desvantagens, existem outras como o fato de que, para mutagênicos fracos ou não mutagênicos, um grande número de cromossomos precisa ser testado, e ainda este teste leva, pelo menos, duas gerações para completar um experimento (Mollete & Würigler, 1974). Por estas razões, testes genotóxicos

somáticos foram desenvolvidos, em *Drosophila*. Estes foram baseados na identificação de eventos genéticos induzidos na divisão mitótica de células primordiais do disco imaginário em desenvolvimento (recombinação mitótica, mutação gênica e deleções). Estes testes têm a vantagem que eles são mais rápidos e menos caros que os recessivos letais (Frölich & Würzler, 1989).

### 1.1. *Drosophila* como organismo teste:

A *Drosophila* tem sido usada em estudos hereditários desde 1909 começando com T. H. Morgan e seus associados (Strickberger, 1962). Tem um grande espectro de atividade metabólica, capaz de ativar promutágenos e procarcinógenos, in vivo.

A *Drosophila* é idealmente escolhida para demonstração prática de fenômenos genéticos, pois, apresenta marcadores genéticos facilmente reconhecidos, um tempo de geração de apenas 10 dias e métodos de cultura simples.

É um organismo eucarioto pequeno, porém, grande suficiente para se notar características mutantes. O tamanho da prole é grande, baixo número cromossômico e é o mais barato e menos exigente de todos os organismos de laboratório.

É holometabólico, o qual se desenvolve por metamorfose completa. Em uma temperatura ótima de 25°C, tem a seguinte seqüência dos estágios:

Desenvolvimento embrionário	1 dia
1º estágio larval	1 dia
2º estágio larval	1 dia
3º estágio larval	2 dias
Prepupa	4 horas

## 1.2. Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas em *Drosophila melanogaster*:

O teste para detecção de mutações e recombinações somáticas em *D. melanogaster* (Somatic mutation and recombination test - SMART) foi descrito por Graf et al. (1984). É um teste de detecção da atividade genotóxica de agentes químicos em células somáticas. O método utiliza, para análise, as asas da *D. melanogaster* que têm como vantagens:

- a preparação permanente das asas. Desta forma, verificações e reconsiderações são sempre possíveis com base no material original.
- a possibilidade de estocar as moscas tratadas em álcool 70% para posterior montagem das asas.

São usados dois marcadores de células das asas mwh (multiple wing hair) e flr (flare), localizados no cromossomo nº 3. Informações detalhadas dos marcadores genéticos são encontradas em Lindsley e Grell (1968). A mutação flare é descrita por Garcia-Bellido & Dapena (1974). É utilizado um cruzamento padrão para produção de larvas trans-heterozigotas, que utiliza as linhagens mwh e flr 3 /TM3, Ser (Graf et al., 1984). A configuração trans-heterozigota dos marcadores genéticos mwh e flr permite a detecção de mutações somáticas (mutação de genes, deleções, etc) e recombinações mitóticas.

Recombinações mitóticas que ocorrem na região compreendida entre o gene marcador proximal e o centrômero conduzem à formação de manchas gêmeas (mwh e flr) nas asas das moscas adultas, depois de um tratamento com um dado composto.

Manchas simples (mwh ou flr) podem ser consequência de mutações somáticas ou recombinações mitóticas ocorridas na região compreendida entre os dois marcadores. Dependendo do

tempo de exposição ao composto, durante o desenvolvimento larval, maiores ou menores manchas são produzidas (Figura 1).

Ativação da ação indireta de mutagênese e carcinogênese é primariamente efetuada pela enzima citocromo P-450. Em *Drosophila*, o sistema enzima citocromo P-450 é induzido. Consiste de várias formas de isoenzimas e tem a capacidade de metabolizar uma variedade de substratos. Desta forma, em todas as circunstâncias, assemelham-se ao correspondente sistema dos mamíferos, apesar de as atividades não serem tão altas quanto nestes.

Variações genéticas substanciais na habilidade de metabolizar substratos diferentes, têm sido observadas entre as linhagens de *Drosophila* e, recentemente Frölich e Würigler (1989) produziram uma linhagem teste adicional, na qual cromossomos 1 e 2 da linhagem resistente ao DDT Oregon R (R) foram incorporados nas linhagens padrões mwh e flr3. Estas linhagens (mwh/ORR e flr3/ORR) constitutivamente produzem enzimas responsáveis pela bioativação e fornecem um aumento na sensibilidade a um grande número de promutágenos.

O cruzamento de alta bioativação como usado por Frölich e Würigler apresenta várias dificuldades:

- 1 - presença de uma distribuição irregular no padrão de pêlos da asa, tornando a classificação da mancha difícil.
- 2 - Uma indesejável alta variação nos resultados de experimentos repetidos.
- 3 - A baixa produção de ovos de fêmeas ORR/mwh.

1 Cell

Mitosis

2 Cells

Ensuing clones

7

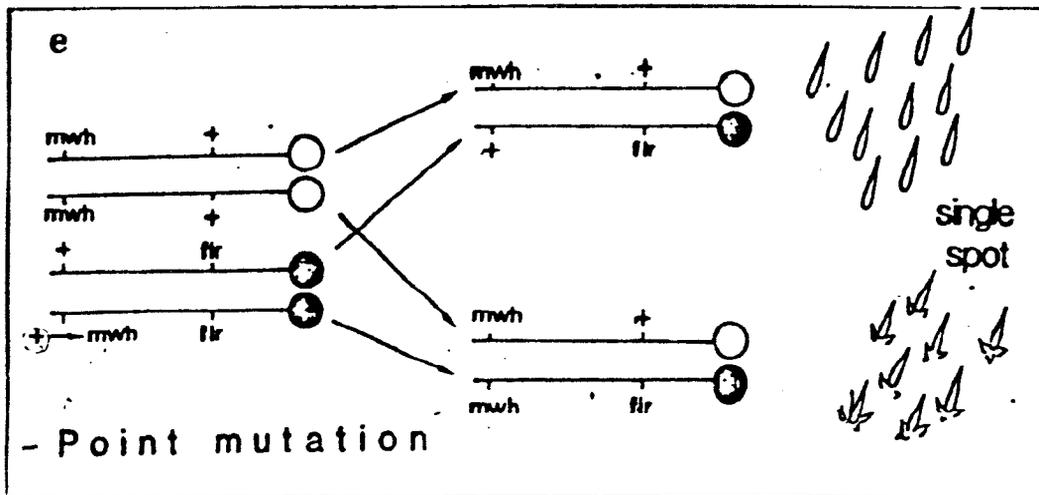
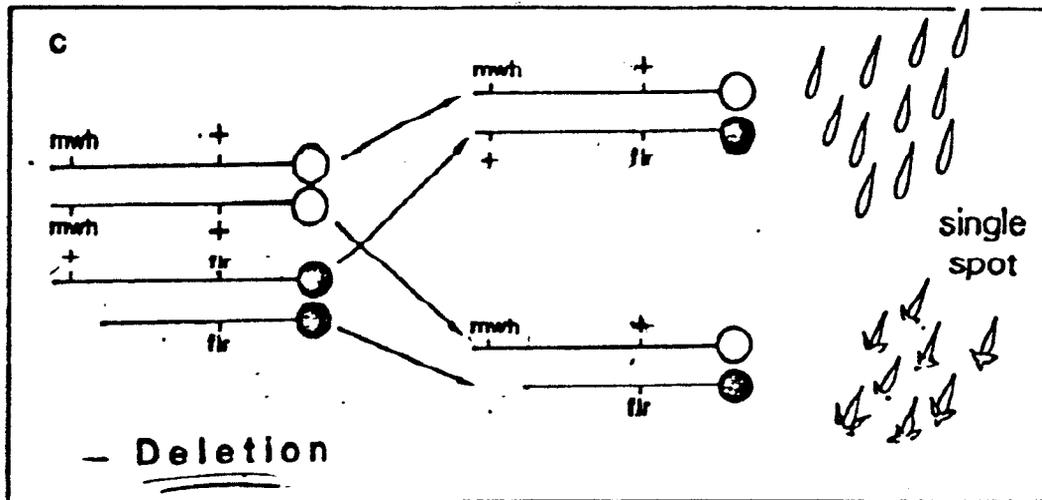
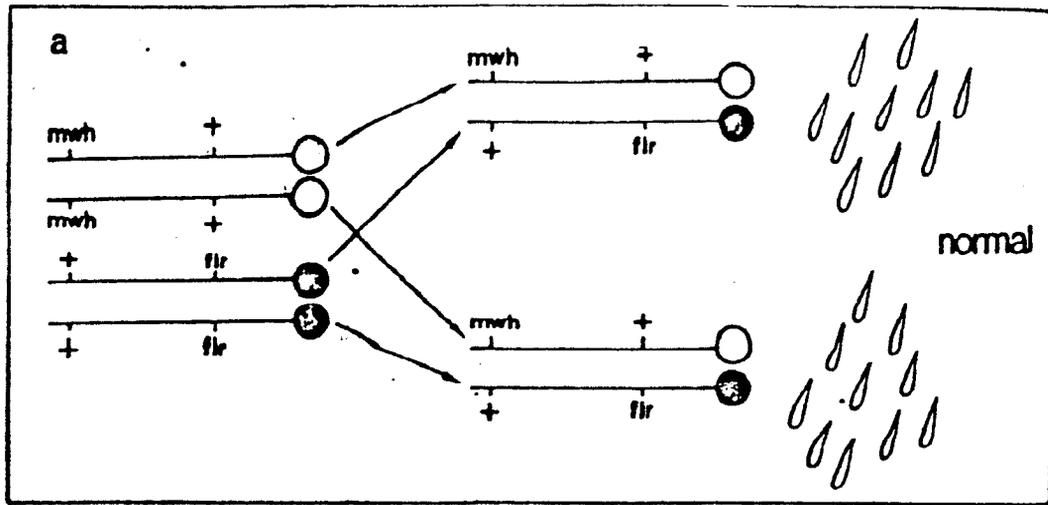


Figura 1. Esquemas genéticos responsáveis pela formação dos diferentes tipos de manchas, de acordo com Graf et al., 1984.

Graf *et al.* (1991 b) superaram estes problemas usando o cruzamento de fêmeas ORR/flr3 com machos mwh (padrão) ao invés de fêmeas ORR mwh x machos ORR flr3 usado originalmente. Os determinantes genéticos responsáveis por esta distribuição irregular no padrão de pêlos estão localizados no cromossomo 2, e são, desta forma, ligados aos gens responsáveis pela alta bioativação, mas são recessivos, considerando que a alta bioativação apresentada na linhagem ORR/flr3 é dominante. Os híbridos ORR/+; mwh+/+flr3 exibem alta bioativação, sem irregularidades no padrão de distribuição dos pêlos e fornece mais resultados reproduzíveis que os híbridos ORR/ORR; mwh+/flr3+.

O uso de linhagens que carrega flr3 como fêmea parental assegura a boa fertilidade.

### 1.3. OMEPRAZOL

É o primeiro de uma nova classe de drogas que inibem a secreção gástrica através da alteração da atividade da bomba  $H^+/K^+$  - ATPase, o passo final comum na secreção ácida de células parietais gástricas. Esta ação farmacológica, que inibe a etapa final da formação de ácido no estômago, proporciona uma inibição efetiva tanto da secreção ácida-basal quanto da estimulada, independentemente do estímulo. O início da ação é rápido e o controle reversível da secreção ácida é obtido com uma única administração diária (1).

A descoberta do Omeprazol tem conduzido a novas introspecções dentro do mecanismo da secreção gástrica:

- . conhecimento da gênese de certos tumores gastrointestinais;
- . desenvolvimento de novos tratamentos para doenças ácido-peptídicas.

É recomendado a pacientes com úlcera duodenal, úlcera gástrica, esofagite de refluxo e na Síndrome de Zollinger-Ellison.

#### Secreção ácido-gástrica, $H^+/K^+$ -ATPase, e ação do Omeprazol

A secreção do ácido hidróclorido pelas células parietais gástrica depende do funcionamento da bomba de prótons. Esta bomba é  $H^+/K^+$ -ATPase, uma enzima que usa a energia resultante do metabolismo do ATP para mover prótons através da membrana em troca de íons potássio.

---

(1) Informação retirada do folheto informativo do Losec (Merrel/Lepetit)

$H^+/K^+$ -ATPase está situada em vesículas no citoplasma da célula. Desde que as vesículas não contenham potássio e as membranas das vesículas sejam impermeáveis a íons potássio, a bomba é inativada. Com a ativação das células parietais, com estímulo apropriado, como histamina, a  $H^+/K^+$ -ATPase transloca para membrana plasmática dos canaliculos das células parietais. o aspecto extra celular da  $H^+/K^+$ -ATPase é, deste modo, exposto aos íons potássio, como há uma aumento associado na permeabilidade da membrana para o potássio, as células são capazes de secretar ácido a um pH aproximadamente igual a 1,0. Omeprazol tem demonstrado em várias espécies que inibe a secreção ácida através da inibição  $H^+/K^+$ -ATPase.

Omeprazol é lipofílico, base fraca com pH aproximadamente igual a 4,0. é absorvido no intestino e chega às células parietais do estômago através dos vasos sanguíneos. Num pH aproximadamente igual a 7,0 Omeprazol não é carregado e pode atravessar membranas celulares. Porém, nos canaliculos secretores de células parietais gástricas ativamente secretoras, onde a droga é exposta a um pH menor que 2,0, Omeprazol, torna-se protonado. Omeprazol, por si só é inativo, porém, sob condições ácidas é convertido para a forma ativa, a sulfenamida, que reage covalentemente com grupos sulfidril de resíduos da cisteína na superfície extracelular da subunidade  $H^+/K^+$ -ATPase e inibe a ativação da enzima. O retorno da secreção ácida depois da administração do omeprazol certamente requer a síntese de nova proteína  $H^+/K^+$ -ATPase.

### **Metabolismo**

Dois metabólitos do Omeprazol encontrados no plasma são, o derivado sulfonado e o hidroxioimeprazol. Nenhum inibe a secreção ácido gástrica e ambos são metabolizados antes de serem excretados. 80% dos metabólitos são excretados na urina e os

outros 20% excretados nas fezes depois da secreção biliar. Devido ao fato de o Omeprazol ser metabolizado pelo citocromo P-450 do sistema hepático, interações com outras drogas devem ocorrer (Maton, 1991).

#### **Doses empregadas na terapêutica em humanos:**

Omeprazol (20 mg) - inibe a secreção ácida em 6% dos pacientes, depois de 4 - 6 horas; e em 25% dos pacientes, depois de 24 horas. Com doses subsequentes a inibição aumenta chegando a um platô depois de 4 doses.

Esta inibição (%) varia de pessoa para pessoa.

#### **Estudos realizados com Omeprazol:**

Diversos experimentos com a droga vêm sendo realizados com diferentes organismos testes (Ekman et al., 1985).

Em ratos, após um mês de aplicação intravenosa, nenhuma descoberta clínica, hematológica, química-clínica ou patológica pode ser observada (Ekman et al., 1985).

Estudos realizados em cachorros por meio de administração oral demonstraram que nenhuma descoberta clínica ou químico-clínica pode ser relatada nas observações de 3 a 12 meses. As mudanças patológicas foram a nível de mucosa gástrica, restrita às áreas ácido-secretoras. Em 3 meses de estudo, a única mudança morfológica foi atrofia moderada das células parietais, que pode ser reversível. As mudanças gástricas foram, hipertrofia da membrana rugosa e hiperplasia da mucosa. Mudanças comparáveis com as observadas em pacientes com síndrome de Zollinger-Ellison (Rotterdam, 1981 em Ekman et al., 1985).

Através de estudos oncogênicos com camundongos observou-se uma queda significativa na sobrevivência em machos tratados com 400 µmol/Kg/dia (Ekman et al., 1985).

Estudos na reprodução: nenhum sinal de efeito embriotóxico, teratogênico e fetotóxico, relatado para o tratamento com o composto, pode ser detectado em ratos (Ekman et al., 1985).

Em coelhos foi verificado um aumento da perda fetal, após tratamentos com doses elevadas de Omeprazol, devido a toxicidade materna, manifestada como anorexia (Fryklund, personal communication em Ekman et al., 1985).

Resultados obtidos em estudos mutagênicos, em teste de Ames, cultura de células de mamíferos e micronúcleos em ratos, indicam que Omeprazol não demonstra nenhum potencial mutagênico (Ekman et al., 1985).

#### 1.4. Ciclofosfamida

A Ciclofosfamida (2-(bis(2-cloroetil)amino)tetra-hidro-2-h 1,3,2-oxazafosforino 2 óxido) é uma substância derivada do agente alquilante mustarda nitrogenada, primeira substância conhecida que induz rearranjos cromossômicos e mutações em células germinativas de animais experimentais, o que trouxe preocupações quanto à sua mutagenicidade, que foi confirmado por inúmeros trabalhos (Ramos Jr, 1974; Michaelis e Rieger, 1961; Spanó, 1981).

A mustarda nitrogenada não pode ser aplicada com sucesso na terapêutica contra o câncer humano, devido aos efeitos tóxicos colaterais e ação inespecífica sobre os tecidos não-afetados (Hendry e Cols, 1951). Desta forma, foi feita uma combinação deste composto com o ácido fosfórico, numa configuração molecular tal que o composto derivado fosse inativo in vitro, representando uma forma de transporte que fosse ativado dentro do corpo. Esta ativação dar-se-ia por meio de

enzimas específicas presentes, as quais liberariam a parte da molécula cistostática ativa (Mohn e Ellemberger, 1976).

A Ciclofosfamida é um composto com estas propriedades, que foi sintetizada juntamente com um número de derivados N-fosforilados.

A Ciclofosfamida necessita ser metabolizada por enzimas microsossomais do fígado, para produzir produtos alquilantes bifuncionais que apresentam efeitos citostáticos. Estes produtos são responsáveis também pelos efeitos clastogênicos que a droga apresenta sobre os cromossomos.

A teoria da metabolização da Ciclofosfamida, por oxidases de função mista do fígado, foi postulada pela primeira vez por Druckrey e Cols, 1963 (em Spanó, 1981).

A Ciclofosfamida é primeiro oxidada pela enzima microsossomal citocromo P-450, na presença de NADPH e oxigênio molecular, para 4-hidroxíciclofosfamida (2(bis(2-cloroetil)amino)4-hidroxi-tetrahydro-4H-1,3,2 oxazafosforino-2-óxido). Este produto inicial equilibra-se com seu tautômero acíclico, Aldofosfamida (2-formil etil N,N-bis(2-cloroetil)fosforodiamidato) (Sladek, 1973; em Spanó, 1981). A produção da Aldofosfamida, além de ser catalizada pela fração microsossomal do fígado, requer Trifosfopiridina nucleotídeo reduzido (TPNH) e oxigênio, sendo inibida por CO<sub>2</sub>. A aldofosfamida é muito tóxica, a julgar pela inibição da formação de clones de células epidermóides e carcinomas humanos e pela toxicidade que produz em células leucêmicas L<sub>1210</sub> (Hill e Cols, 1972; em Spanó, 1981). A aldofosfamida é convertida em carboxifosfamida (2 carboxietil N,N-bis(2-cloroetil)), por uma aldeído oxidase solúvel, e esta convertida em 4-cetociclofosfamida. Estes dois metabólitos, carboxifosfamida e 4-cetociclofosfamida, são relativamente não-tóxicos (Bakke e Cols, 1971; em Spanó, 1981) (Figura 2).

Devido ao seu efeito mutagênico comprovado, a Ciclofosfamida será empregada, neste experimento, como controle positivo.

Este trabalho tem como objetivos:

. verificar o potencial mutagênico e recombinogênico do OMEPRAZOL, em células da asa de *Drosophila melanogaster*, in vivo.

. fornecer uma contribuição para a classe médica no que diz respeito à escolha e emprego terapêutico de agentes químicos, uma vez que os agentes atualmente empregados são altamente tóxicos, o que acarreta prejuízos para o paciente.

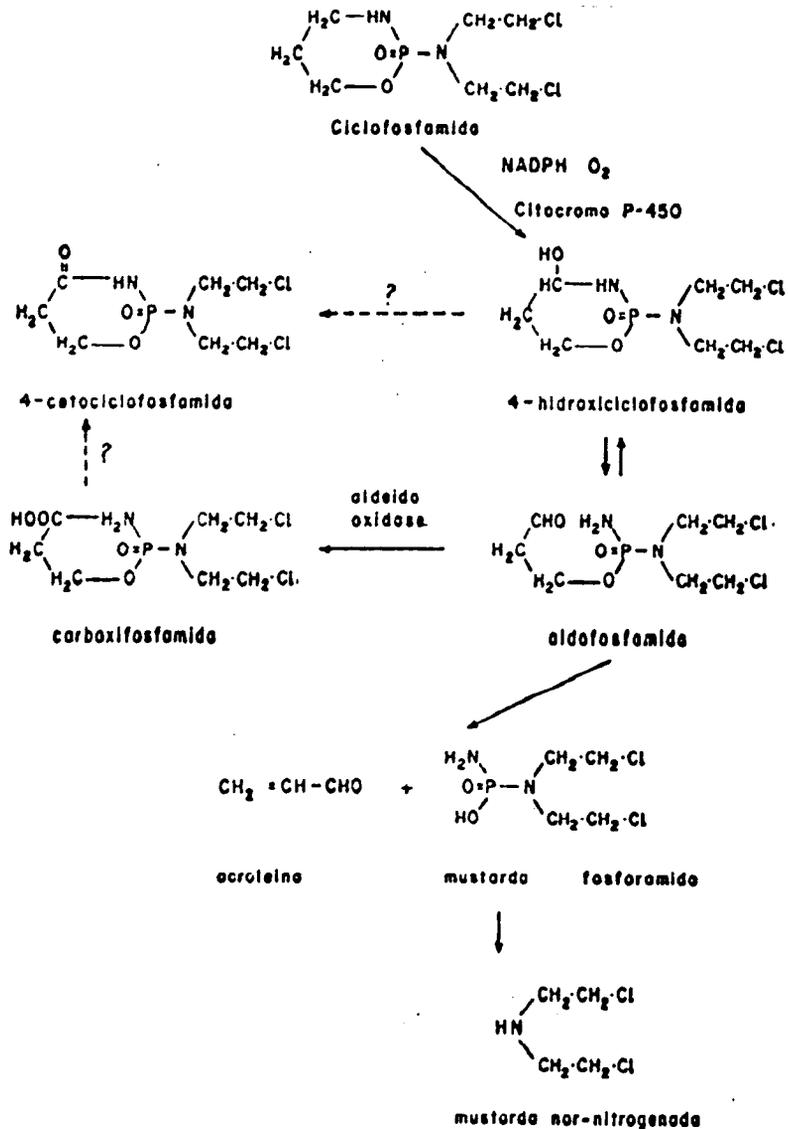


Figura 2. Sequência de reações químicas e enzimáticas que levam à via metabólica principal da ciclofosfamida (Mohr e Ellenberger, 1976)

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. OMEPRAZOL

É um agente quimioterápico conhecido com o nome comercial de "Losec" (Merrel Lepetit).

Indicado no tratamento de úlcera duodenal, úlcera gástrica, esofagite de refluxo e Síndrome de Zollinger-Ellison.

Apresenta-se na forma de cápsula, cada qual contendo 20 mg de droga.

A droga, em geral, é bem tolerada. No decorrer do tratamento foram relatados casos de cefaléia, obstipação, fraqueza, vertigem e "rash" cutâneo. Efeitos transitórios e de natureza leve (2).

A posologia indicada em casos de úlcera duodenal é de 20 mg/dia, via oral, que proporciona alívio rápido dos sintomas. Em 75% dos pacientes obtém-se cicatrização após 2 semanas de tratamento. Caso não haja cicatrização neste tempo, recomenda-se prolongamento de mais 2 semanas (95% ficam cicatrizados) (2).

Nas pacientes com úlcera gástrica ou esofagite de refluxo a dose diária também é de 20 mg/via oral. No prazo de 4 semanas, se não houver cicatrização prolonga-se por mais 4 semanas (2).

Nos doentes refratários a outros medicamentos, recomenda-se a dose diária de 40 mg. E, por fim, na síndrome de Zollinger-Ellison recomenda-se 60 mg diariamente<sup>(2)</sup>.

Não existe experiência com o uso de Losec em crianças<sup>(2)</sup>.

O Omeprazol é insolúvel em água. Usou-se como solvente uma solução de 1% tween: 3% etanol.

## **2.2 *Drosophila melanogaster* como sistema-teste**

### **Obtenção das larvas trans-heterozigotas para mwh e flr**

Larvas trans-heterozigotas mwh +/+flr foram obtidas do cruzamento entre as linhagens mwh e flr. As larvas trans-heterozigotas constituem metade da progênie larval, e a outra metade consiste de mwh/TM3 heterozigota. O cruzamento com TM3 é necessário para balancear o gene flr na segunda linhagem parental, porque flr em homozigose é letal. Contudo, células da asa que possuem o fenótipo flr em mosaico, são viáveis. Os dois tipos de larvas foram obtidos, porém não são distinguíveis. Após a metamorfose podem ser distinguidas pela coloração, onde mwh+/+flr possui coloração selvagem e mwh/TM3 possui coloração do corpo amarela.

A Figura 3 apresenta um esquema de "SMART".

### **Coleção das fêmeas**

Selecionou-se culturas, de preferência, com 9-10 dias de idade, com pupas marrons, prontas para eclodir. Removeu-se todas as moscas adultas, sendo que nenhuma fêmea ou macho tenha ficado no frasco. As moscas foram coletadas nas próximas 6 horas. No final deste período as moscas foram anestesiadas, com auxílio de uma lupa, separadas as fêmeas de machos,

cuidadosamente, com um pincel macio, de acordo com os seguintes critérios:

1) Pente sexual

Os machos possuem um tufo de pêlos no segmento proximal do tarso. Já as fêmeas não possuem. É a característica mais segura para diferenciar os sexos.

2) Abdômen

. Machos: Nos machos a parte posterior do abdômen apresenta-se preta, porque os últimos segmentos são extremamente pigmentados e formam uma região escura única. A terminação abdominal é arredondada.

. Fêmeas: Nas fêmeas a coloração escura é apenas na extremidade posterior de cada segmento e vista tanto dorsalmente quanto lateralmente.

O abdômen possui a parte terminal afilada (ovopositor).

As virgens foram colocadas em um meio fresco, até a maturidade sexual e a oogênese estimulada pelo meio rico em proteína. A idade ótima de uso das fêmeas é de 3-5 dias.

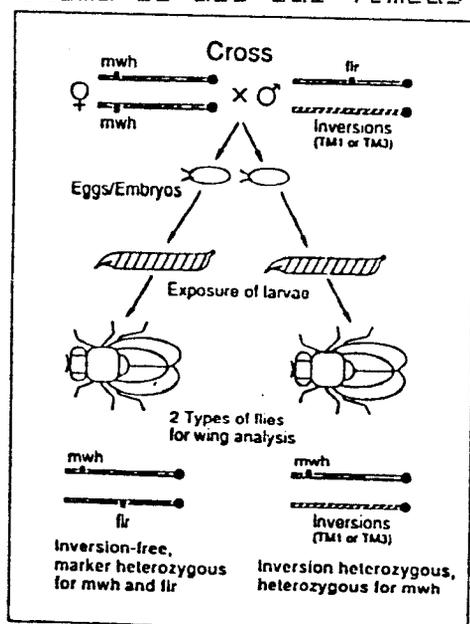


Figura 3. Esquema do "somatic mutation and recombination test", de acordo com Frei e Würigler (1992).

(2) Dados retirados do folheto de apresentação da droga pela Merrel Lepetit.

### **Coleção dos machos**

Os machos foram coletados em qualquer hora; geralmente isolados de 1 a 2 dias e bem alimentados.

### **Meio de cultura**

O meio de cultura usado para manutenção dos estoques de moscas consiste de:

- 820 ml de água.
- 11 g de ágar
- 156 g de banana
- 25 g de fermento
- 11 ml de nipagin

#### **Modo de preparar:**

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

Colocou-se a banana no resto da água e bateu-se em liquidificador.

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

Adicionou-se a água com banana e o fermento até ferver novamente. Desligou-se o fogo e acrescentou-se o nipagin.

O meio de cultura preparado foi, então, dividido em alíquotas de 50 ml, em frascos de 1/4 de litro, fechados com tampões de gaze.

Os frascos foram mantidos a 25°C e a 60% de umidade.

### **Coleção de larvas**

Foi usado uma base de ágar sólida feita de 5% ágar-ágar em água fervente, coberta completamente com uma camada de aproximadamente 5 mm de uma pasta densa de fermento fresco com um pouco de açúcar. Após a secagem do fermento colocou-se as moscas para ovoposição.

## Tratamento

### Cruzamento e linhagens mutantes

#### 1. Standard cross (ST)

Fêmeas virgens flr3/TM3, Ser x machos mwh.

#### 2. Improved high bioactivation cross (ORR)

Fêmeas virgens ORR: Flr3/TM3, Ser x machos mwh.

A coleta de ovos foi feita num período de 8 horas. As larvas com  $72 \pm 4$  horas de idade foram lavadas com água corrente, para a retirada do fermento, e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina.

As larvas foram colocadas em tubos de vidro (aproximadamente 50 a 100 larvas foram usadas por tubo, evitando sempre a superpopulação) contendo 1,5 g de meio de cultura instantâneo (Fórmula 4-24-Instant Drosophila Medium Carolina Biological Supply Company) + 5 ml de água; solvente e diferentes concentrações do agente a ser testado de acordo com o protocolo:

Frasco (nº)	Tratamento
1	água destilada (controle)
2	solução 1% tween + 3% etanol (controle-solvente)
3	1,0 mM ciclofosfamida (controle positivo)
4	0,5 mg Omeprazol
5	1,0 mg Omeprazol
6	2,5 mg Omeprazol
7	5,0 mg Omeprazol

### Preparação das asas

As asas foram embebidas em solução de Faure (goma arábica 30 g, 20 ml glicerol, 50 g hidrato de cloro, 50 ml de água). As asas foram primeiramente separadas do corpo e depois distendidas em lâminas limpas e secas.

Estas foram mantidas em placa aquecida à 40°C, por pelo menos 24 horas, para que as asas grudassem firmemente à lâmina. Depois foram colocadas poucas gotas de solução de Faure

em uma laminula e esta colocada sobre a lâmina. Após este procedimento colocou-se pequenos cubos de metal, pesando aproximadamente 250 g, sobre a lâmina e este conjunto foi mantido sobre placa aquecida a 40°C para secar.

### Análise microscópica das asas

As asas foram analisadas em microscópio óptico em aumento de 40x.

Durante a análise microscópica das asas, a posição da mancha foi anotada de acordo com o setor da asa. O tamanho da mancha reconhecido, isto é, o número de células afetadas, bem como os tipos simples mwh, ou flr ou mancha gêmea (mwh/flr).

O tamanho de cada mancha foi determinado através da contagem do número de células que expressam o fenótipo mutante.

No trabalho de rotina somente foram classificadas como verdadeiras manchas mwh, aquelas em que as células da asa mostram três ou mais pêlos, ao invés de um só, como nos tipos selvagens. De qualquer modo, frequentemente uma única célula foi encontrada com dois pêlos de tamanho mais ou menos iguais. Estas falsas manchas não são incluídas na contagem.

As vezes, as manchas foram divididas em 2 ou mais grupos de células de diferentes tamanhos ao longo da asa. Estas manchas isoladas podem estar separadas por uma ou mais fileiras de células normais. Quando separadas por apenas duas fileiras de células normais, foi considerada como uma só mancha.

O mutante mwh produz células com dois ou mais pêlos, sendo a maioria de tamanho reduzido.

O mutante flr produz pêlos deformados (mal formados). É bastante variada a forma que flr apresenta-se mas são sempre facilmente distinguíveis do tipo selvagem.

Foram analisadas 20 asas de cada tratamento, num total de 140 asas para o cruzamento padrão e 140 asas para o cruzamento de alta capacidade de bioativação.

### Análise Estatística

Teste do  $\chi^2$  para proporção (Frei e Würigler, 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 tratamentos, 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:

$N_c = pG = n_0$  de moscas do grupo controle.

$N_t = qG = n_0$  de moscas do grupo tratado.

$(p + q) G = n_0$  total de moscas.

$p = n_0$  de moscas do grupo controle/ $n_0$  total de moscas.

$q = n_0$  de moscas do grupo tratado/ $n_0$  total de moscas.

$X = n_0$  de manchas observadas.

$X_c = n_0$  de manchas observadas no controle.

$X_t = n_0$  de manchas observadas no tratado.

$T = n_0$  total de manchas observadas (controle + tratado).

$EX = n_0$  de manchas esperadas.

$pT = n_0$  de manchas esperado no controle.

$qT = n_0$  de manchas esperado no tratado.

$(p + q)T = n_0$  total de manchas esperadas (controle +  
tratado).

$(p + q) T = T$ , então,

$(p + q) = 1$

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^K \frac{[X_j - E(X_j)]^2}{E(X_j)}$$

### 3. RESULTADOS

Foram utilizados, neste experimento, fêmeas virgens das linhagens standard (flr3/TM3, Ser) e de alta capacidade de ativação metabólica (ORR : flr3/TM3, Ser); que foram cruzadas com machos da linhagem mwh.

Do cruzamento entre as linhagens mwh e flr3/TM3, Ser, metade da progênie larval é trans-heterozigota (mwh+/+flr3), na qual pode-se detectar mutações, deleções, recombinações gênicas e não-disjunções cromossômicas; e a outra metade consiste de mwh/TM3, Ser, heterozigota, na qual é possível detectar apenas mutações e deleções.

Larvas de ambas as linhagens foram tratadas com as diferentes concentrações de Omeprazol: 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg dissolvidas no solvente (1% tween + 3% etanol). Foram realizados como controles, um grupo sem tratamento (água) e um tratado apenas com solvente. Como controle positivo foi utilizado a Ciclofosfamida (1 mM). Foram analisados apenas os descendentes trans-heterozigotos mwh+/+flr.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos e o diagnóstico estatístico da linhagem standard.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos e o diagnóstico estatístico da linhagem de alta capacidade de bioativação.

Para ambas as linhagens, a análise estatística foi realizada comparando-se as proporções de mutações observadas nos tratados com o Omeprazol em relação às observadas nos grupos tratados com solvente, e comparando-se as proporções observadas nos tratados com Ciclofosfamida em relação aos grupos tratados com água.

A Tabela 3 apresenta os valores do teste do  $\chi^2$  para proporções, de acordo com Frei e Würigler, (1988), calculados para as diferentes concentrações de Omeprazol e Ciclofosfamida da linhagem standard.

A Tabela 4 apresenta os valores do teste do  $\chi^2$  para proporções, calculadas para as diferentes concentrações do Omeprazol e Ciclofosfamida da linhagem de alta capacidade de bioativação.

A Figura 4 apresenta a distribuição do tamanho de manchas simples e gêmeas observadas na linhagem standard, tratada com 1 mM de Ciclofosfamida.

A Figura 5 apresenta a distribuição do tamanho de manchas simples e gêmeas observadas na linhagem de alta capacidade de bioativação, tratada com 1 mM de Ciclofosfamida.

A Figura 6 apresenta a distribuição do tamanho de manchas simples e gêmeas observadas na linhagem de alta capacidade de bioativação, tratada com 1,0 mg de Omeprazol.

A Figura 7 apresenta a distribuição do tamanho de manchas simples observadas na linhagem de alta capacidade de ativação metabólica, tratada com 2,5 mg e Omeprazol.

A Figura 8 apresenta a distribuição do tamanho de manchas simples observadas na linhagem de alta capacidade de ativação metabólica, tratada com 5,0 mg e Omeprazol.

Tabela 1. Frequência de manchas observadas nos descendentes marcadores trans heterozigotos (mwh/flr3) de *Drosophila melanogaster* da linhagem flr3/TM3, Ser tratadas no período de larva (48 hs de tratamento) com diferentes concentrações de Omeprazol e com Ciclofosfamida.

Tratamento	Marcador heterozigoto			
	nº asas	nº manchas	freq	*
Controles				
água	20	5	0,25	
Solvente				
(1% Tween + 3% etanol)	20	4	0,20	-
Ciclofosfamida				
(1,0 mM)	20	28	1,40	+
Omeprazol				
0,5 mg/5ml solvente	20	2	0,10	-
1,0 mg/5ml solvente	20	4	0,20	-
2,5 mg/5ml solvente	20	0	0,00	-
5,0 mg/5ml solvente	20	6	0,30	-

\* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei, Würzler (1988)

- = negativo; + = positivo

Tabela 2. Frequência de manchas observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (mwh/flr3) de *Drosophila melanogaster* da linhagem ORR, flr3/TM3, Ser tratadas no período de larva (48 hs de tratamento) com diferentes concentrações de Omeprazol e com Ciclofosfamida.

Tratamento	Marcador heterozigoto			
	nº asas	nº manchas	freq	*
Controles				
água	20	7	0,35	
Solvente				
(1% Tween + 3% etanol	20	1	0,05	-
Ciclofosfamida				
(1,0 mM)	20	19	0,95	+
Omeprazol				
0,5 mg/5ml solvente	20	3	0,15	-
1,0 mg/5ml solvente	20	7	0,35	+
2,5 mg/5ml solvente	20	6	0,30	+
5,0 mg/5ml solvente	20	11	0,55	+

\* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei, Würzler (1988).

- = negativo; + = positivo

**Tabela 3.** Diagnóstico estatístico e valores de  $\chi^2$  obtidos nos tratamentos com a linhagem "standard".

Tratamento	$\chi^2$ para proporções		Diagnóstico Estatístico
Ciclofosfamida	$\chi^2 = 16,03$	rejeita $H_0$	+
Omeprazol			
0,5	$\chi^2 = 0,66$	aceita $H_0$	-
1,0	$\chi^2 = 0,00$	aceita $H_0$	-
2,5	$\chi^2 = 0,00$	aceita $H_0$	-
5,0	$\chi^2 = 0,40$	aceita $H_0$	-

$H_0$  = não há diferença entre o controle e o grupo tratado

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

**Tabela 4.** Diagnóstico estatístico e valores de  $\chi^2$  obtidos nos tratamentos com a linhagem de alta capacidade de ativação metabólica.

Tratamento	$\chi^2$ para proporções		Diagnóstico Estatístico
Ciclofosfamida	$\chi^2 = 5,52$	rejeita $H_0$	+
Omeprazol			
0,5	$\chi^2 = 1,00$	aceita $H_0$	-
1,0	$\chi^2 = 4,50$	rejeita $H_0$	+
2,5	$\chi^2 = 3,42$	rejeita $H_0$	+
5,0	$\chi^2 = 8,30$	rejeita $H_0$	+

$H_0$  = não há diferença entre o controle e o grupo tratado

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

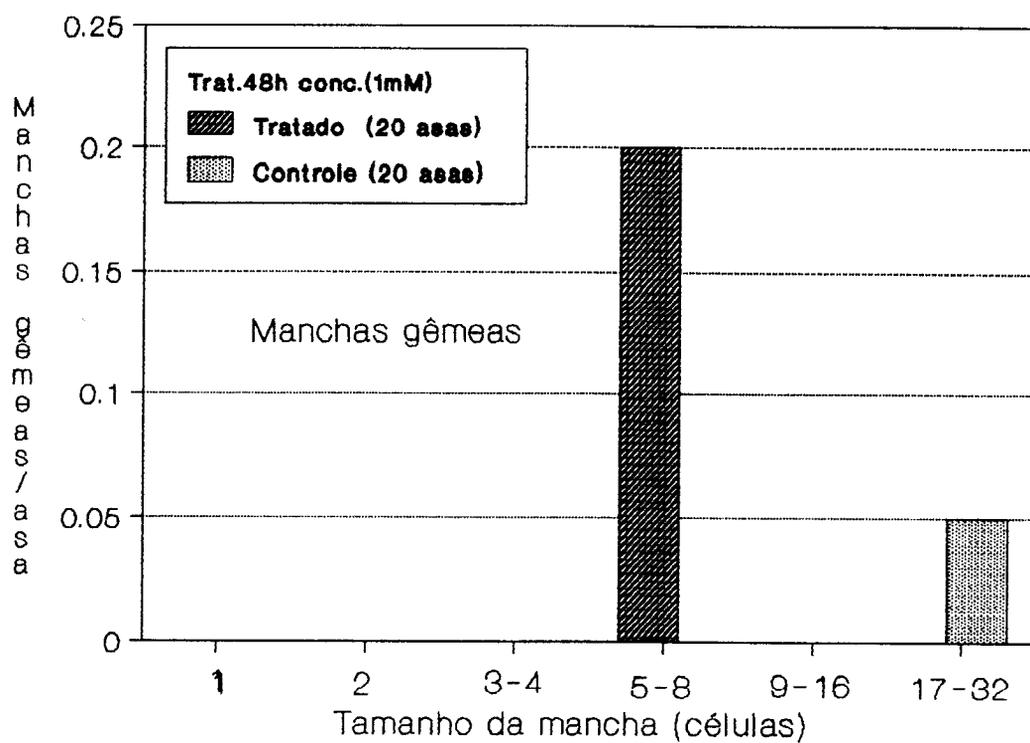
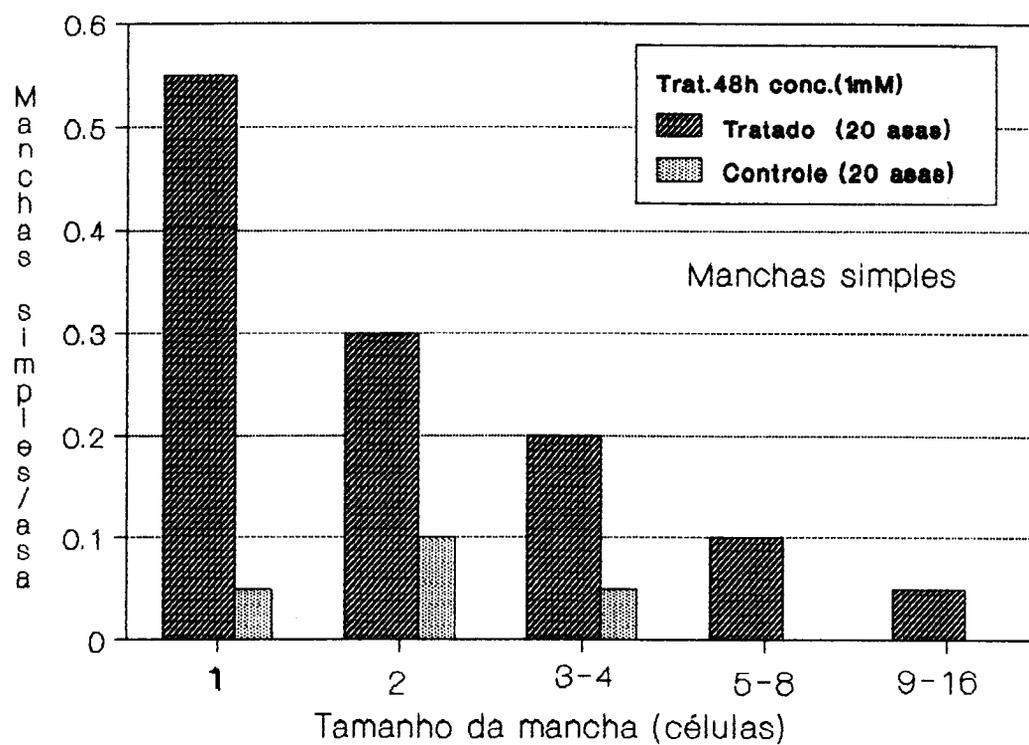


Figura 4. Distribuição de tamanho de manchas simples e gêmeas obtidas no tratamento de moscas da linhagem standard com ciclofosfamida (1 mM).

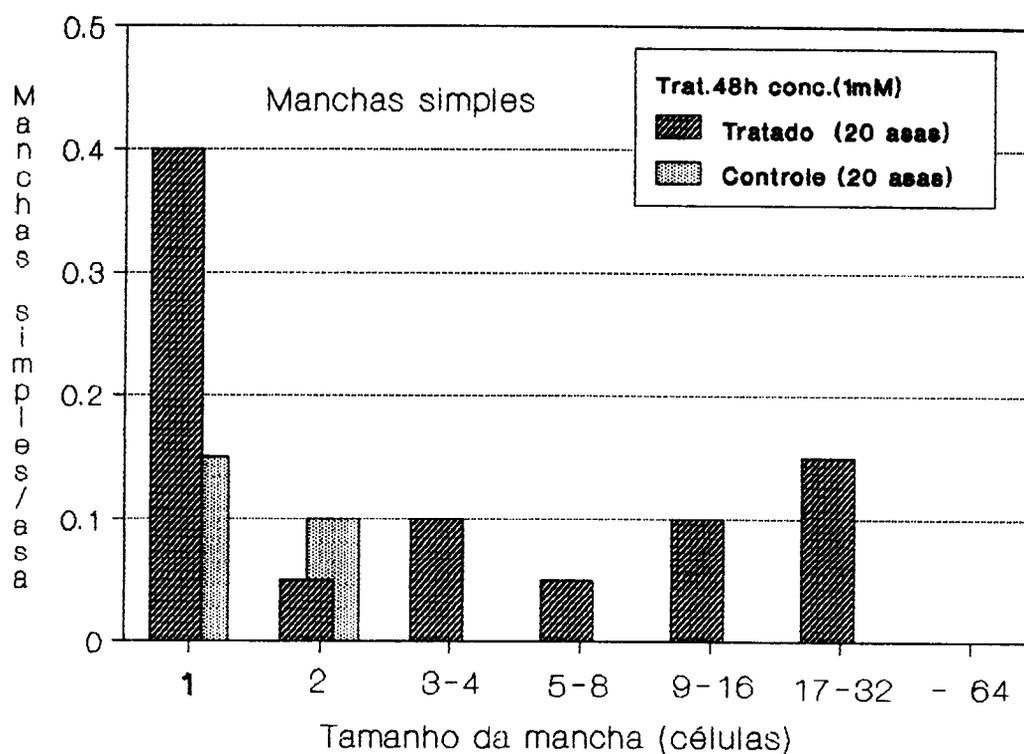
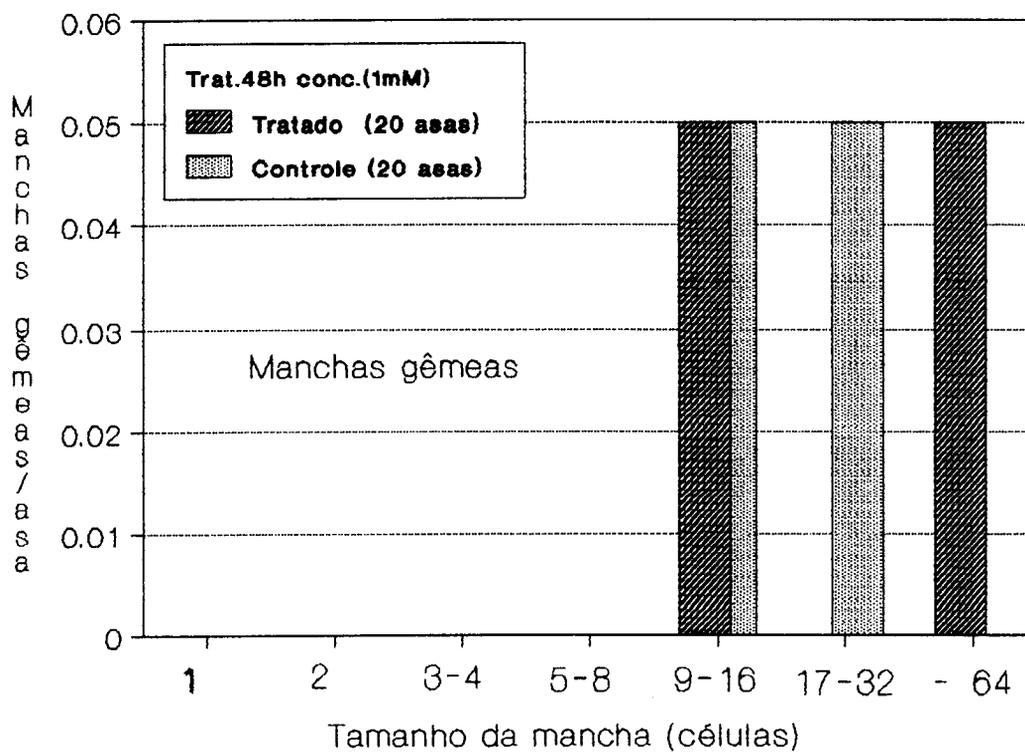


Figura 5. Distribuição de tamanho de manchas simples e gêmeas obtidas no tratamento de moscas da linhagem de alta capacidade de bioativação, com ciclofosfamida (1 mM).

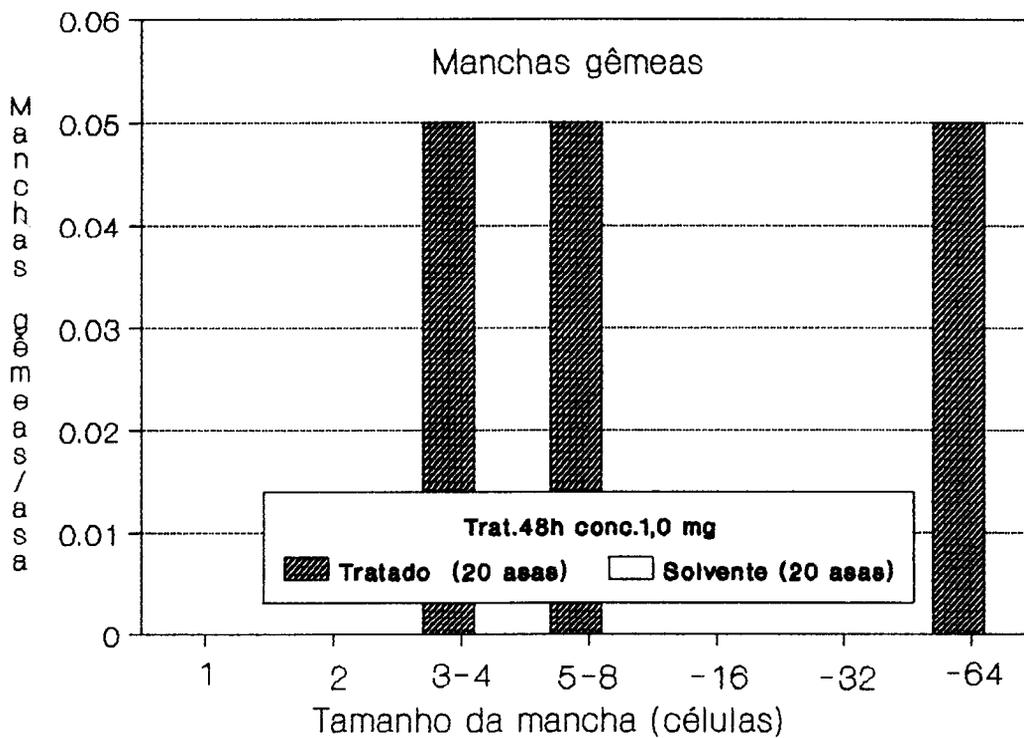
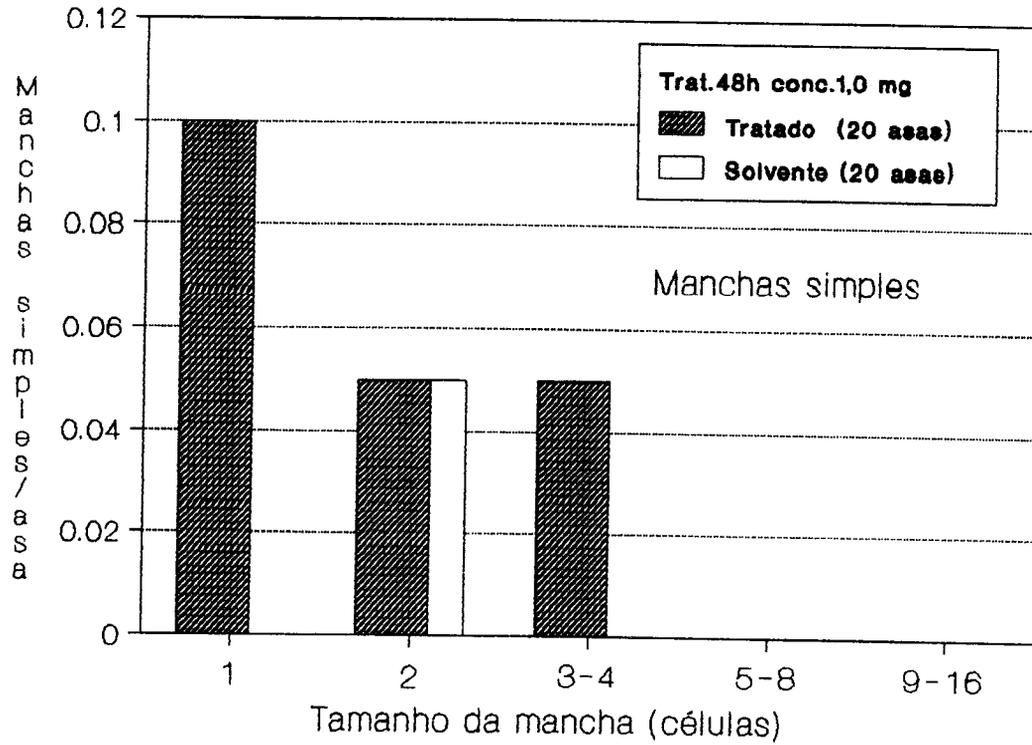


Figura 6. Distribuição de tamanho de manchas simples e gêmeas obtidas no tratamento de moscas da linhagem de alta capacidade de bioativação, com Omeprazol (1,0mg).

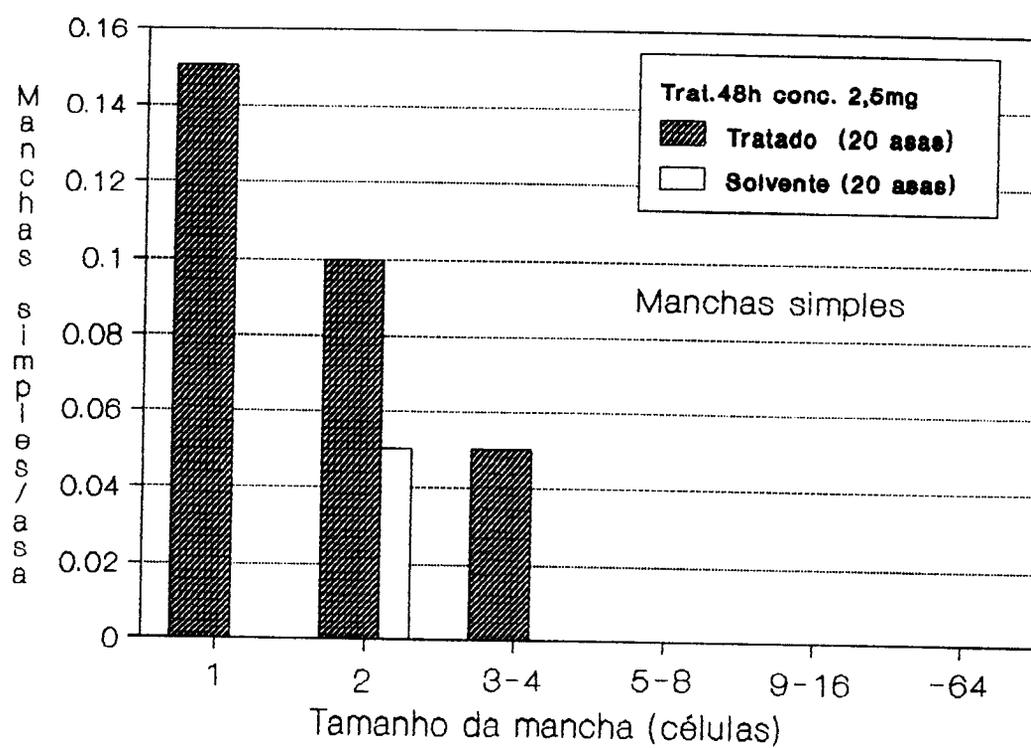


Figura 7. Distribuição de tamanho de manchas simples e gêmeas obtidas no tratamento de moscas da linhagem de alta capacidade de bioativação, com Omeprazol (2,5 mg).

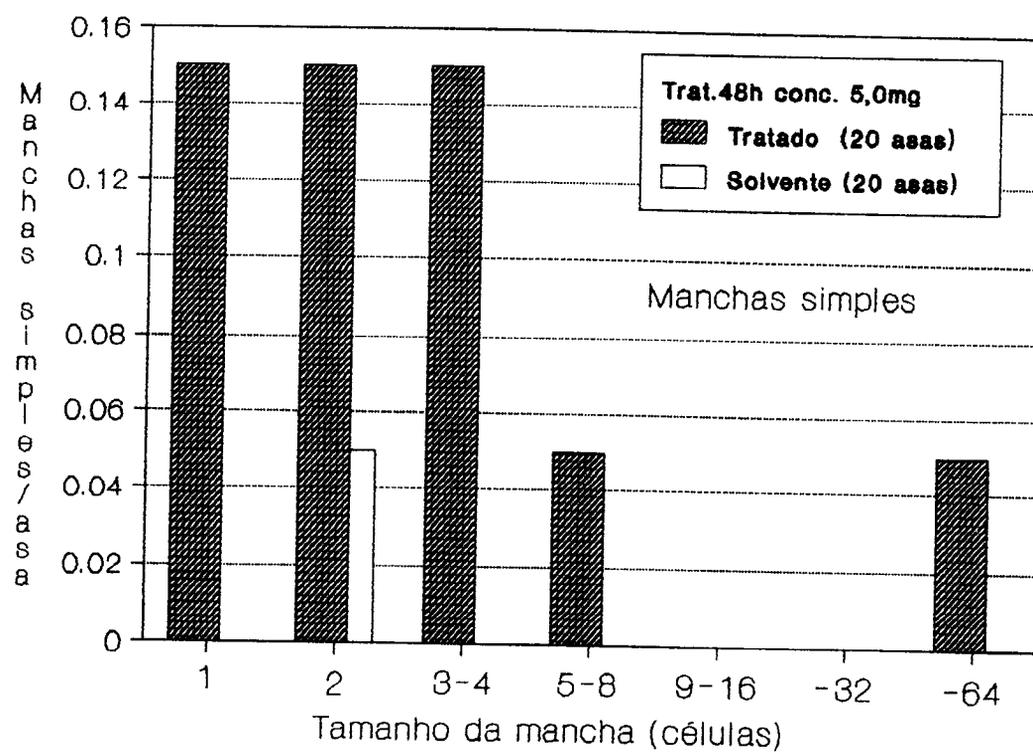


Figura 8. Distribuição de tamanho de manchas simples e gêmeas obtidas no tratamento de moscas da linhagem de alta capacidade de bicativacão, com Omeprazol (5.0 mg).

#### 4. DISCUSSAO

Quando um composto está sendo cogitado para ser lançado no mercado para uso público, faz-se necessário a avaliação de seus efeitos genotóxicos (efeitos carcinogênicos, teratogênicos, mutagênicos, etc).

Nenhum sinal de efeito embriotóxico, teratogênico e fetotóxico foi detectado em ratos tratados com Omeprazol (Ekman et al., 1985).

No entanto, em coelhos foi verificado um aumento da perda fetal após tratamentos com doses elevadas de Omeprazol, devido a toxicidade materna, manifestada como anorexia (Fryklund, personal communication, em Ekman et al., 1985).

Através de estudos oncogênicos com camundongos observou-se uma queda significativa na sobrevivência em machos tratados com 400 µmol/kg/dia.

Resultados obtidos em estudos mutagênicos, em teste de Ames, cultura de células de mamíferos e micronúcleos em ratos, indicam que Omeprazol não demonstra nenhum potencial mutagênico (Ekman et al., 1985).

Devido ao fato de os dados relativos aos efeitos genotóxicos do Omeprazol encontrados na literatura serem muito escassos, decidimos verificar seus possíveis efeitos genotóxicos utilizando como sistema teste a *Drosophila melanogaster*.

Foi empregado o "Somatic Mutation and Recombination Test" (SMART) desenvolvido por Graf et al., 1984.

Com o objetivo de verificar a necessidade ou não de metabolização da droga para a indução de efeitos genotóxicos, foram utilizadas duas linhagens: 1 - "standard" Flr3/TM3 Ser, com baixa capacidade de ativação metabólica; 2 - ORR: Flr3/TM3 Ser, com alta capacidade de ativação metabólica.

Larvas de  $72 \pm 4$  hs (3º estágio) foram transferidas para frascos contendo meio de cultura instantâneo (Fórmula 4-24-Instant Drosophila Medium Carolina Biological Supply Company) acrescido de diferentes concentrações de Omeprazol (0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg) onde permaneceram por um período de 48 hs. Após tal período, as larvas deixam o meio de cultura e se instalam nas paredes dos frascos para a pupação. Portanto, considera-se o tempo de tratamento aquele em que permanecem no meio de cultura mais droga (48 hs).

Além dos grupos de tratamento, foram incluídos no experimento os grupos controles negativo e positivo. O controle positivo é necessário para confirmar a eficiência do sistema teste utilizado (Eddler, 1992).

O controle positivo usado foi 1mM de Ciclofosfamida, que, confirmando o esperado, apresentou resultados positivos. Verificou-se que mesmo a linhagem com baixa capacidade de ativação, é capaz o suficiente de metabolizar a Ciclofosfamida e apresentar resultado positivo. A menor frequência de manchas observadas na linhagem ORR é devido a toxicidade da droga, o que está de acordo com Spanó, 1981; Rieger, 1961; Ramos Jr., 1974.

A frequência de manchas observadas nas diferentes concentrações de Omeprazol, na linhagem ORR, foi maior que na linhagem standard, o que indica a necessidade do Omeprazol ser metabolizado a metabólitos ativos para que possa produzir seus efeitos genotóxicos.

De acordo com Maton (1991), o Omeprazol é extensivamente metabolizado pelas enzimas hepáticas citocromo P-450.

A linhagem ORR: flr3/TM3, Ser é rica em enzimas P-450, o que lhe confere a alta capacidade de ativação metabólica, o que explica a maior indução de manchas na linhagem ORR, quando comparada com a observada na linhagem standard.

Também foi possível verificar que com o aumento da concentração, aumentou o número e o tamanho das manchas, apesar de não ser proporcional ao aumento da concentração.

Enquanto larvas, não é possível distinguir-se larvas trans-heterozigotas (mwh+/+flr3) de larvas heterozigotas (mwh/TM3, Ser). Desta forma todas as larvas foram tratadas. Após a metamorfose são distinguíveis pela borda da asa serrilhada em mwh/TM3 Ser e lisa em mwh+/+flr3. Devido ao fato de os descendentes mwh/TM3, Ser apresentarem inversão cromossômica que impede a recombinação gênica, tais descendentes não são analisados no teste de detecção de mutação e recombinação somática (SMART), a menos que se queira determinar qual foi a frequência de mutação induzida pela droga teste, separada da frequência relacionada à recombinação.

Muitos trabalhos (Spanó, 1993; Graf et al. 1992; etc) têm demonstrado que a maioria dos agentes químicos induzem manchas simples e gêmeas em asas de *Drosophila melanogaster* devido a processos de recombinação gênica e que a minoria dessas manchas é devida a processo mutacional.

Assim sendo, procedeu-se apenas a análise das asas de moscas trans-heterozigotas, uma vez que a frequência de manchas obtidas, embora estatisticamente significativa na linhagem ORR, é muito baixa quando comparada com a frequência observada no controle.

## 5. CONCLUSÕES

Com apoio nos resultados de  $\chi^2$  para proporções podemos concluir que o Omeprazol, nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg, não é genotóxico para *Drosophila melanogaster* de linhagem com baixa capacidade de ativação metabólica (linhagem Flr3/TM3, Ser), mas é genotóxico para *Drosophila melanogaster* de linhagem de alta capacidade de ativação metabólica (linhagem ORR : flr3/TM3, Ser).

Podemos ainda concluir que o Omeprazol necessita ser metabolizado a metabólitos ativos para que possa exercer seus efeitos genotóxicos. A linhagem de alta capacidade de ativação metabólica é mais eficiente para detecção de efeitos genotóxicos do Omeprazol pelo fato de ser rica em enzimas citocromo P-450, necessárias para o metabolismo deste composto.

O sistema teste utilizado é eficiente na detecção dos efeitos genotóxicos induzidos, o que pode ser observado nos tratados com Ciclofosfamida, assim como nos tratados com Omeprazol na linhagem de alta capacidade de ativação metabólica.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AUERBACH, C. (1974). History of research on chemical mutagenesis. Chemical mutagens-principles and methods for their detection. Edited by A. Hollander. Plenum Press. New York. 3:1-19.
- AUERBACH, C.; ROBSON, J.M. (1946). Chemical production of mutations. *Nature*, 157:302.
- BARTHELMESS, A. (1970). Mutagenic substances in the human environment. Chemical mutagens in mammals and man. Edited by F. Vogel and G. Röhrborn. pp. 69-147.
- EDLLER, L. (1992). Statistical methods for short - term test in genetic toxicology: The first fifteen years. *Mutation Res.*, 277: 11-13.
- EKMAN, L.; HANSSON, E.; HAVU, N.; CARLSSON, E.; LUNDBERG, C. (1985) Toxicological studies on Omeprazol. *Scand J. of Gast.* 20 Suppl. 108: 53-69.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Res.* 203:297-308.
- FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F.E. (1989) New tester strains with improved bioactivation capacity for *Drosophila* wing - spot test. *Mutation Res.* 216: 179-187.

- FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F.E. (1991). The high bioactivation cross for the SMART assay with the wing. *Drosophila Inf. Serv.* 70, 246-247.
- GARCIA BELLIDO, A.; DAPENA, J. (1974). Induction, detection, and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. *Mol Gen. Genet* 128:127-130.
- GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H; JUON, H; HALL, C. B.; KALE, P. G. (1984). Somatic mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagenesis*. 0: 153-188.
- GRAF, U., van SCHAICK, N.; WÜRGLER, F. E. (1991 a). *Drosophila* Genetics: A practical course. Springer-Verlang, pp. 1-239.
- GRAF, U., van SCHAICK, N.; PACELLA, R. (1991 -b). -Improved "High Bioactivation" cross for the smart wing assay. *Drosophila Inf Serv (Dis)* 70. Technical Note.
- GRAF, U.; Heo, O. - S.; RAMIREZ, O. O. (1992) The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutation Res.* 266:197-203.
- HENDRY, J. A.; ROSE, F. L.; WALPOLE, A. L. (1951): Cytotóxica agents. I. Methylolamide with tumour inhibitory activity and related inactive compounds. *Brit. J. Pharmacol.* 6:201-234.
- LINSDSLEY, D. L.; GRELL, E. H. (1968). Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet* 115: 302-313.
- MATON, P. N. (1991). Review Article: OMEPRAZOLE. *The N. Engl. J. Med.* 324 Nº 14: 965-973.
- MICHAELIS, A.; RIEGER, R. (1961). Die induktion von chromosomen aberration durch mitomen und Endoxan bei *Vicia faba* und der transportform -wirkform mechanismus. *Biol Zentr.* 80: 301-307.
- MOHN, G. R.; ELLENBERGER, J. (1976): Genetic effects of cyclophosphamide, ifosfamide and trofosfamide. *Mutation Res.* 32: 331-360.

- MOLLET, R.; WÖRGLER, F. E. (1974). Detection of somatic recombination and mutation in *Drosophila*: A method for testing genetic activity of chemical compounds. **Mutation Res.** 25: 421-424.
- MÜLLER, H. J. (1927) Artificial Transmutation of the Gene, **Science.** 66: 84-87.
- RABELO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. (1991). Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação. **Editora Sociedade Brasileira de genética.** pp. 1-241.
- RAMOS JR., J. (1974). Principais fases da evolução histórica da quimioterapia anti-neoplásica. In: **Oncologia Clínica.** Servier S/A. São Paulo - Brasil. pp. 105-188.
- SPANO, M. A. (1981). Efeitos Clastogênicos de drogas anti-neoplásicas (ciclofosfamida, 5 -fluorouracil, methotrexate) e raios X, *in vivo* e *in vitro*. **Tese de Doutorado Fac. Medicina de Rib. Preto - USP.** pp. 1-163.
- SPANO, M. A.; GRAF U.; WÖRGLER, F. E (1993) Quantitative Determination of Recombinagenic Activity in Two Different Crosses of The Wing Spot Test in *Drosophila melanogaster*. Dados não publicados.
- STRICKBERGER, M. W. (1962). Experiments in Genetics with *Drosophila*. Edited by John Wiley & Sons, Inc., U.S.A. 60 edition. pp 1-144.