

Tarcísio José de Almeida Moura

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DO ÁCIDO NALIDÍXICO SOBRE OS ÍNDICES
DE TRANSFORMAÇÃO BLÁSTICA E MITÓTICA, E SOBRE OS CROMOSSOMOS HUMANOS

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Esta-
dual de Campinas para a obtenção
do título de Mestre.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Bernardo Beiguelman

Campinas, SP

1977

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer profundamente emocionado aos Professores, colegas e colaboradores dos Departamento de Genética Médica e de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas, especialmente aos seguintes que contribuíram para a realização do presente trabalho:

Prof. Dr. Bernardo Beiguelman
Dr. Walter Pinto Júnior
Dr. Antonio Sérgio Ramalho
Dra. Regina de Castro Bicudo Pisani
Dr. Francisco José Chagas Pisani
Prof. Dr. William José da Silva
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Dr. Aquiles Eugênio Piedra Buena
Sr. Antonio Conceição Costa
Sr. Henry Norberto Ciolfi
Sra. Geralda Luzia Alves
Sr. Aldo Donizete da Silva
Srta. Denise de Lima
Sr. Luiz Eurípedes da Silva
Srta. Regina Maria Pompeu

Um outro agradecimento igualmente sincero quero deixar consignado aos Mestres da UFRN, sem a ajuda dos quais não teria sido possível a minha estadia na Universidade Estadual de Campinas.

Magnífico Reitor Prof. Dr. Domingos Gomes de Lima
Prof. Dr. Leide Moraes
Prof. Paulo Henriques Bittencourt
Prof. Marco Antonio Cavalcanti da Rocha
Prof. Francisco Renato de Sá e Benevides Filho
Prof. Aldo Barbosa da Silva.

ÍNDICE

	Pág.
I - Introdução	1
II -- Casuística e Métodos	5
III - Resultados	16
IV - Discussão e conclusões	19
V - Sumário	23
VI - Summary	24
VII - Bibliografia	25

I - INTRODUÇÃO

O ácido nalidíxico ($C_{12}H_{12}N_2O_3$) sintetizado por LESHER *et al.* (1962) é um derivado do ácido 1-alkuil-1,8-naftiridina-4-oxo-3-carboxílico (LAPPIN, 1948), cuja fórmula estrutural está representada na figura 1.

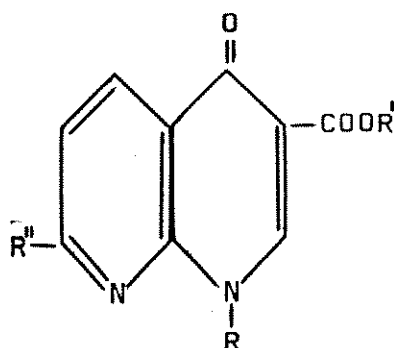


Fig. 1 - Núcleo dos derivados 1-alkuil-1,8-naftiridina-4-oxo-3-carboxílico.

A substituição do radical R por um grupamento etil, propil ou alil, do radical R' por um grupamento etil ou do R'' por radicais etil ou hidroximetil origina derivados do 1-alkuil-1,8-naftiridina-4-oxo-3-carboxílico com propriedades físicas diferentes, porém, com a mesma atividade biológica.

O ácido nalidíxico apresenta-se como um pó de cor branca, com peso molecular 232,23 e com boa solubilidade em clorofórmio e soluções de hidróxido de sódio ou de potássio, mas pouco solúvel em etanol, metanol e éter.

Os derivados do núcleo 1,8 naftiridina (Win 18.320)* foram inicialmente utilizados para ensaios clínicos em camundongos, cães, macacos e, posteriormente no homem, apresentando atividade máxima em infecções sistêmicas

* Código utilizado para identificação da droga antes da sua comercialização.

causadas por bactérias Gram-negativas. Por ser um agente quimioterápico com ação específica sobre esse grupo de bactérias, o ácido nalidíxico recebeu denominações comerciais tais como, NegGram, Negram e Nogram. No Brasil, entretanto, foi apresentado comercialmente sob o nome de Wintomylon.

O ácido nalidíxico possui um mecanismo de ação cujo efeito primário ainda não foi estabelecido. Estudos realizados em bactérias demonstraram sua atuação por inibição seletiva da síntese semi-conservativa do DNA, sem alteração da integridade bioquímica desse último (GOSS *et al.*, 1965 ; ROSENKRANS *et al.*, 1965 ; COOK *et al.*, 1966 ; DEITZ *et al.*, 1966 ; KIHLMAN, 1967 ; SIMON *et al.*, 1974) .

As pesquisas realizadas objetivando elucidar a interferência do ácido nalidíxico sobre enzimas bacterianas têm demonstrado que esse quimioterápico não interfere no metabolismo ou mecanismos de ação de DNA-polimerase (EBERLE *et al.*, 1971 ; PEDRINE *et al.*, 1972 ; HANE, 1974), da endonuclease I, das exonucleases I, II e III, da polinucleotidiloligase, da DNA-metiltransferase (PEDRINE *et al.*, 1972 ; HANE, 1974), da desoxirribonucleotidioquinase, da desoxirribonucleotidiotransferase (BOYLE *et al.*, 1969 ; HENE, 1974) e da beta-galactosidase (BOYLE, 1969).

As investigações de DEITZ *et al.* (1966), KAPLAN *et al.*, 1970, EBERLE *et al.* (1971), JAVOR, (1974) entre outros, demonstraram que o ácido nalidíxico não possui ação primária de inibição sobre o RNA e proteínas, e que sua incorporação à célula é independente da ação de permeases, havendo indícios de que a resistência bacteriana demonstrada a essa substância seja desenvolvida a nível cromossômico. HELLING *et al.* (1971) justificaram a deficiência de desidrogenase de isocotrato observada em *E. coli* resistentes ao ácido nalidíxico, como sendo efeito indireto de algum metabólito intermediário.

Apesar de alguns autores como GOSS *et al.* (1964), DEITZ *et al.* (1966), EBERLE *et al.* (1971) e SIMON *et al.* (1974) serem unânimes em afirmar que o ácido nalidíxico in

terfere somente com o DNA unifilamentoso, não tendo atuação sobre o mecanismo de reparo induzido pela luz ultravioleta, notam-se algumas controvérsias no que diz respeito a competição entre o iniciador (*primer*) e o ácido nalidíxico.

Estudos realizados, entre outros, por CUMMINGS (1969), IVLER (1975) tentam comprovar a hipótese de que o ácido nalidíxico atua como um análogo das bases púricas, pois suas cadeias apresentam grande similaridade.

No homem foi possível demonstrar que, duas horas após a ingestão, o ácido nalidíxico atinge um nível hemático de 20 a 50 µg/ml, sendo encontrado em suas formas ativas como ácido nalidíxico (75%) e hidroxinalidíxico (25%) ligadas a proteínas plasmáticas. Ao se ligar com a albumina, o ácido nalidíxico compete com o sítio de ligação dos compostos cumarínicos, potencializando a ação hipoprotrombinêmica dos anticoagulantes, de maneira idêntica ao observado com a fenilbutazona, ácido mefenâmico e ácido etacrínico (MARTIN *et al.*, 1969 ; SELLERS, 1970 ; BIANCHI, 1975).

A metabolização do ácido nalidíxico ocorre no fígado por um processo de conjugação, originando monoglicuronatos sem ação bactericida. Após 6 horas de administração, é possível a detecção de 150 a 300 µg/ml de ácido nalidíxico e hidroxinalidíxico na urina. O probenecid influencia o metabolismo do ácido nalidíxico, diminuindo o "clearance" renal, com atuação semelhante à que tem sobre outros ácidos orgânicos fracos e penicilinas (BIANCHI, 1975 ; DASH *et al.*, 1976).

Por sua ação específica sobre bactérias Gram-negativas, o ácido nalidíxico tem sido largamente utilizado no tratamento de infecções das vias urinárias, embora também seja usado em outras situações como gastroenterites, meningites, infecções sistêmicas, etc. (FARNARIER, 1967 ; GILBERTSON, 1972 ; DEONNA, 1974 ; DUFFEL, 1975).

Tendo em vista as evidências mencionadas anteri-

ormente de que o ácido nalidíxico inibe a síntese semi-conservativa do DNA de bactérias tornava-se forçoso investigar se tal atividade não teria efeitos sobre o DNA humano, mormente porque o ácido nalidíxico vem sendo ministrado a gestantes e crianças, principalmente para tratamento de infecções urinárias.

Uma investigação preliminar nesse sentido foi, então planejada tendo por objetivo averiguar o efeito *in vitro* do ácido nalidíxico sobre :

- a) a taxa de multiplicação dos linfócitos do sangue periférico estimulados por fitohemaglutinina, avaliada por intermédio do percentual de transformação blástica e por intermédio do índice mitótico ;
- b) as taxas de aneuploidias, de poliploidias e de quebras ou falhas (*gaps*) cromossômicas e cromatídicas.

II - CASUÍSTICA E MÉTODOS

II.1 - Casuística estudada.

A casuística estudada consistiu de 15 indivíduos brasileiros, adultos e aparentemente sadios, que não tinham sofrido exposição a agentes químicos, drogas, radiações, nem manifestavam doenças infecciosas particularmente de origem viral, até algumas horas antes de serem selecionados. Dez deles eram caucasóides (7 homens e 3 mulheres) e cinco eram negróides do sexo masculino.

II.2 - A colheita de sangue e preparação de culturas.

Após a antissepsia da porção anterior da prega do cotovelo com álcool 70%, procedeu-se a colheita de 20 ml de sangue venoso de cada indivíduo, utilizando-se seringas e agulhas 25x6 descartáveis e heparinizadas (0,01 ml de Lique mine Roche por ml de sangue), com selo de identificação contendo o nome do doador. Para assegurar a não coagulação do sangue, girou-se a seringa lentamente por diversas vezes, a fim de se obter uma distribuição homogênea de heparina no volume de sangue colhido.

O material foi transportado para a câmara asséptica, onde cada amostra de sangue foi transferida para um tubo cônico estéril, etiquetado e fechado com uma capa dupla de folha de alumínio, a qual, após flambada em um bico de Busen, foi perfurada pela agulha da seringa. A folha de alumínio perfurada foi recoberta por uma outra previamente flambada, a fim de que o tubo permanecesse vedado.

A sedimentação das hemácias foi obtida pela centrifugação dos tubos contendo sangue heparinizado, a 300

r.p.m. durante 5 minutos.

Retornando à câmara asséptica, aspirou-se o plasma sobrenadante rico em leucócitos juntamente com o creme leucocitário eventualmente depositado sobre as hemácias, com o auxílio de uma pipeta Pasteur esterilizada e munida de uma chupeta. Antes dessa operação a pipeta foi flambada na chama de um bico de Bunsen, após ter sido passado sobre ela um chumaço de algodão embebido em álcool.

O conteúdo da pipeta foi transferido para um tubo de ensaio esterilizado recoberto por folha de alumínio previamente flambada. Durante essa operação o tubo de ensaio foi mantido o mais inclinadamente possível e nas proximidades e atrás da chama de um bico de Bunsen, o que também foi exigido nas etapas seguintes dentro da câmara asséptica.

Feita a ressuspensão no interior do tubo de ensaio, o plasma rico em leucócitos foi recolhido em pipeta estéril provida de chupeta e contendo rolha de algodão na porção proximal e distribuído equitativamente em duas séries de quatro frascos numerados de 1 a 4 e de 1-A a 4-A, os quais continham 6 ml de meio de cultura. Nos frascos 1 e 1-A não havia ácido nalidíxico, enquanto nos frascos 2 e 2-A, 3 e 3-A, 4 e 4-A as concentrações dessa substância foram respectivamente iguais a 20, 50 e 100 microgramas por mililitro. Enquanto a série de frascos numerada de 1 a 4 se prestou para o estudo de cromossomos metafásicos, a série numerada de 1-A a 4-A foi utilizada para a análise da diferenciação blástica.

Depois de flambados e enrolados, os frascos destinados à obtenção de placas metafásicas foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas, enquanto que as amostras destinadas a análise da diferenciação blástica foram incubadas por 72 horas a 37°C.

II.3 - Preparo do material.

Os tubos de ensaio, os tubos de centrífuga, as provetas, os frascos tipo vidro de xarope com capacidade de 100 ml e as rolhas de borracha neutras foram mantidos em detergente alcalino, sem emulsão oleosa, durante 4 horas, escovados cuidadosamente e lavados com água corrente abundante e água destilada antes de serem postos a secar a 40°C.

Os tubos de ensaio foram siliconizados com solução de silicone a 2% em toluol e voltaram para a estufa de secagem. Após vedação com uma capa de folha de alumínio, a sua esterilização foi feita dentro de caixas de alumínio, do tipo das usadas como merendeiras, em forno a 180°C, durante duas horas.

As folhas de alumínio utilizadas para a vedação de tubos de ensaio e provetas, foram previamente cortadas em quadrados medindo 5 cm de lado, e esterilizadas em forno a 180°C durante duas horas, dentro de placas de Petri. O mesmo tempo de esterilização foi dispensado aos frascos tipo vidro de xarope.

As rolhas de borracha foram distribuídas em placas de Petri envolvidas em papel Kraft e esterilizadas durante uma hora em autoclave a 1,5 atmosferas de pressão e a 125°C.

Os tubos de vidro utilizados para a preparação de pipetas Pasteur foram mantidos durante 4 horas em uma solução sulfo-nítrica (20 : 1 v/v), submetidos a lavagem em água corrente e bidestilada, e secos a 40°C. Depois de siliconizados e novamente secos, procedeu-se a vedação de suas extremidades com algodão hidrófilo e sua esterilização em caixas cilíndricas metálicas, em forno a 180°C durante duas horas. O estiramento desses tubos para a feitura de pipetas Pasteur foi realizada no momento de uso. As chupetas empregadas para o uso das pipetas Pasteur não fo-

ram esterilizadas.

O conjunto empregado na filtração e esterilização das soluções foi constituído pelos seguintes componentes :

- a) filtro Seitz munido de placa filtrante e esterilizante, com a sua parte superior ligada a um tubo de látex ;
- b) frasco de Kitasato, com a solução a ser filtrada, provido de rolha de borracha munida de um orifício, através do qual passa um tubo de vidro em L, que quase atinge o fundo do frasco e cuja extremidade superior é ligada ao tubo de látex em conexão com o filtro Seitz. A abertura lateral do frasco de Kitasato é ligada por intermédio de um outro tubo de látex a um compressor ;
- c) frasco de Mariotti, ligado por intermédio de um tubo de látex munido de um interruptor a uma campânula de vidro.

Com exceção do filtro Seitz, que foi lavado com sabão, palha de aço fina, bastante água corrente e água destilada, todos os outros componentes do sistema filtrante foram lavados do mesmo modo que os frascos tipo vidros de xarope. Cada conjunto, depois de seco e envolvido em papel Kraft foi levado à esterilização em autoclave a 1,5 atmosferas de pressão e a 125°C, durante uma hora. Antes da autoclavagem teve-se o cuidado de vedar todas as aberturas dos componentes do sistema filtrante com folha de alumínio, bem como de umedecer a placa de asbesto do filtro Seitz, com água bidestilada (PINTO JR., 1972).

As soluções de colquicina e ácido nalidíxico foram autoclavadas a 125°C sob pressão de uma atmosfera por 15 minutos.

II.4 - Meio de cultura empregado.

O meio de cultura foi aquele rotineiramente utilizado na Unidade de Citogenética Humana do Departamento de Genética Médica da UNICAMP, o qual apresenta a seguinte composição :

Soro fisiológico de Hanks	700 ml
Soro de cordão umbilical humano	300 ml
Hidrolizado de lactalbumina	5 g
Fitohemaglutinina	16,65 ml*
Estreptomicina	100 mg
Penicilina G potássica cristalina	100.000 UI

A solução fisiológica de Hanks tem a composição abaixo e foi preparada com água tridestilada e desionizada:

NaCl	8.000 mg
KCl	400 mg
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	120 mg
KH_2PO_4	60 mg
CaCl_2	140 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 mg
NaHCO_3	350 mg
Dextrose	1.000 mg
Fenol vermelho	2 ml
H_2O tridestilada q.s.p.	1.000 ml

O fenol vermelho foi preparado por dissolução de

* A quantidade de fitohemaglutinina pode ser maior, dependendo, de sua atividade mitogênica, previamente testada.

1 g desse composto em 28 ml de NaOH 1N, tendo sido os cristais triturados em almofariz, e o hidróxido de sódio acrescentado em pequenas quantidades (0,5 a 1 ml). Depois dessa dissolução adicionou-se água destilada em quantidade suficiente para obter 200 ml.

O soro de cordão umbilical humano utilizado consistiu de uma mistura de soros de diversas procedências colhidos em salas de parto da Maternidade de Campinas. Após a ressecção do cordão umbilical e antes do delivramento, o sangue era colhido em tubos de ensaio medindo 32 x 170 mm, posteriormente vedados com folhas de alumínio, e transportados para o laboratório depois de ficarem em repouso à temperatura ambiente. A retirada do soro sobrenadante foi feita antes e depois do descolamento do coágulo com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Os soros dos diferentes tubos foram misturados e inativados em banho-maria a 56°C durante 30 minutos sendo, posteriormente, estocados a -15°C.

A fitohemaglutinina foi preparada a partir de oitenta gramas de feijão preto (*Phaseolus vulgaris**) lavado vãrias vezes em água corrente, na qual permaneceu submerso a 5°C. Após 12 horas os grãos de feijão foram transferidos para um liquidificador e triturados depois de adicionar 60 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%. A pasta obtida por esse processo permaneceu 12 horas em agitação contínua à temperatura ambiente, após ter-lhe sido adicionado 140 ml de solução de cloreto de sódio.

O material foi centrifugado a 6.000 r.p.m. por uma hora a 5°C, desprezando-se o sedimento. O sobrenadante foi submetido a centrifugações sucessivas, até que se apresentasse límpido. Ao sobrenadante foi adicionado aproximadamente 12 volumes de solução de cloreto de sódio 0,9%. Depois de filtrado em filtro Seitz, o material foi distribuído em frascos estéreis com capacidade de 5 ml e estocado em congelador.

O pH do meio de cultura foi corrigido com ácido clorídrico 0,1 N, para um valor muito próximo de 7. Após a

*RIGAS et al., 1955.

passagem através de um filtro Seitz munido de placa filtrante e esterilizante, o meio foi distribuído em volumes de 200 ml em provetas com capacidade para 250 ml, as quais foram vedadas com tampa de vidro esmerilhada. Antes e depois dessa operação, tanto o bocal das provetas quanto as suas tampas foram flambadas e, para maior proteção, essas últimas foram cobertas com folhas de alumínio igualmente flambadas.

II.5 - As soluções de ácido nalidíxico.

O ácido nalidíxico* foi preparado a partir de uma solução estoque de 20 mg/ml. Isso foi conseguido por intermédio da dissolução de 100 mg de ácido nalidíxico, inicialmente, em 0,5 ml de hidróxido de potássio 1N, procedendo-se a correção do pH para 7,1 com a adição de ácido clorídrico 0,1 N e hidróxido de potássio 0,1 N, quando necessário. Com a adição de água tridestilada completou-se o volume para 5 ml.

Em três provetas com capacidade de 100 ml pipetou-se 0,1 ml dessa solução estoque na primeira, 0,25 ml na segunda e 0,5 ml na terceira, adicionando-se, em seguida meio de cultura para completar o volume final de 100 ml. Com isso foram obtidos meios de cultura com concentrações de ácido nalidíxico iguais a 20µg/ml, 50µg/ml e 100µg/ml.

II.6 - O estudo dos cromossomos metafásicos.

Transcorridas 48 horas de incubação, acrescentou

* O ácido nalidíxico foi gentilmente doado ao autor pelo Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

-se a cada frasco das séries numeradas de 1 a 4, 0,1 ml de uma solução de colquicina (Colchicine Houdé) em solução de 0,0106 mg/ml, ou seja, $4.10^{-5}M$ de colquicina por frasco. Após essa operação a incubação continuou por duas horas.

O material dos frascos foi transferido para tubos cônicos e centrifugados a 800 r.p.m., por 5 minutos. Com exceção de aproximadamente 1 ml do sobrenadante sobre o se dimento dos tubos cônicos, o restante foi desprezado.

A hipotonia foi provocada acrescentando-se, lentamente, a cada um dos tubos cônicos 5 ml de uma solução constituída de 4 partes de água e uma parte de meio de cul tura a $37^{\circ}C$ e mantendo os mesmos durante 25 minutos em es tufa bacteriológica a $37^{\circ}C$. Em seguida, os tubos foram cen trifugados durante 5 minutos a 800 r.p.m., procedendo-se, logo depois, a retirada de todo o sobrenadante.

A cada um dos tubos acrescentou-se 4 ml de fixador preparado no momento de uso e constituído por uma solução de 3 partes de metanol para uma de ácido acético gla cial. Nesse fixador, ressuspendeu-se, lentamente, o sedimen to com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

Os tubos com o sedimento em fixador, foram manti dos em geladeira durante um tempo mínimo de uma hora, fa zendo-se nova ressuspensão do sedimento e centrifugação a 800 r.p.m. durante 5 minutos, desprezando-se o sobrenadan te.

Ressuspendeu-se novamente o sedimento em 0,5 ml de fixador recém-preparado e procedeu-se a distribuição desse material em 4 a 5 lâminas geladas e úmidas (3 a 4 go tas por lâmina), as quais foram passadas sobre a chama de uma lâmpada a álcool, a fim de que se processasse a fixa ção.

A coloração foi feita com a solução azur-eosina-azul de metileno de Giemsa a 6% durante 10 minutos, após os quais procedeu-se uma rápida lavagem das lâminas em água corrente e secagem ao ar.

O índice mitótico foi avaliado sob objetiva de menor aumento (125x), pela contagem do número de metáfases e do número de núcleos não metafásicos em 100 células examinadas.

As metáfases foram selecionadas com objetiva de menor aumento (125x), de acordo com o grau de condensação e espalhamento dos cromossomos, e analisadas sob objetiva de imersão (1250x) com o auxílio de uma *câmara clara*. De cada cultura foram selecionadas 10 metáfases diplóides com eventuais hipo ou hiperdiploidia, 10 metáfases para a investigação de poliploidias e 10 metáfases para a investigação de aberrações estruturais representadas por quebras ou falhas (*gaps*). Em resumo, foram analisadas 1.800 metáfases.

As anomalias estruturais dos cromossomos foram consideradas alterações cromatídicas quando somente uma das cromátides dos cromossomos metafásicos encontrava-se afetada e alterações cromossômicas quando ambas as cromátides de tais cromossomos apresentavam aberração. Denominou-se *quebra cromatídica* ou *cromossômica* o tipo de lesão em que o espaço correspondente à perda de continuidade da cromátide era maior do que a largura de uma cromátide e/ou o fragmento distal não mantinha o mesmo alinhamento da porção proximal. Quando o espaço correspondente à perda de continuidade era menor do que a largura de uma cromátide e o fragmento distal mantinha o alinhamento com a cromátide, a lesão foi chamada de *falha cromatídica* ou *cromossômica* (*gap*), (BLOOM, 1972).

II.7 - O estudo da transformação blástica.

Ao término do período de 72 horas de incubação a 37°C e após leve agitação, o conteúdo de cada frasco das séries numeradas de 1-A a 4-A foi transferido para um tubo cônico de numeração correspondente e centrifugado a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos. O sobrenadante de cada tu-

bo foi aspirado em quantidade suficiente para obter uma boa suspensão de células necessária à preparação de esfregaços em lâminas novas desengorduradas, previamente identificadas. Depois da secagem dos esfregaços ao ar, procedeu-se a coloração segundo a técnica de ROSENFELD (1947), que utiliza um corante preparado com antecedência, constituído por Giemsa em pó (0,97g), MayGrünwald (0,53g) e metanol q.s.p. 1.000 ml.

O corante de ROSENFELD foi empregado em quantidade suficiente (aproximadamente 2 ml), de maneira a formar uma película sobre a extensão da lâmina. Após um minuto, adicionou-se igual volume de água sobre o filme de corante. Decorridos 10 minutos, procedeu-se a lavagem em água corrente e secagem ao ar.

O percentual de transformação blástica foi avaliado após contagem de 100 células, sob objetiva de imersão, anotando-se o número de linfoblastos e o número de linfócitos. As células foram classificadas como linfoblastos, quando apresentavam forma arredondada com citoplasma basófilo sem granulações, núcleo grande e arredondado com um a dois nucléolos bem evidentes e cromatina pouco condensada. As células com tamanho inferior ao linfoblasto, com granulações presentes em um citoplasma escasso, zona clara perinuclear, núcleo arredondado, oval ou reniforme com cromatina abundante e intensamente corado foram identificadas como linfócitos.

Embora possa parecer óbvio, consideramos não ser supérfluo assinalar que a investigação do percentual de transformação blástica dos linfócitos estimulados por fitohemaglutinina foi feita com a finalidade de averiguar se o ácido nalidíxico não teria um efeito depressor sobre essa transformação, que é um pré-requisito para a multiplicação *in vitro* dos linfócitos do sangue periférico.

II.8 - Análise estatística.

As comparações destinadas à averiguação das diferenças entre os percentuais de transformação blástica e entre os índices mitóticos das culturas-controle e das tratadas com ácido nalidíxico foram feitas por intermédio de testes t para dados emparelhados (cf. BEIGUELMAN, 1977).

O valor de t nesse teste é calculado a partir da razão entre a média das diferenças intrapar ($\bar{d} = \frac{\sum d}{n}$, onde $\sum d$ é o somatório das diferenças intrapar e n é o número de pares de dados) e o erro da média $\bar{d}$, calculado por meio de :

$$s(\bar{d}) = \sqrt{\frac{\sum d^2 - (\sum d)^2/n}{n(n-1)}}$$

Em outras palavras,

$$t = \frac{\bar{d}}{s(\bar{d})} \text{ com número de graus de liberdade igual a } n - 1 .$$

As comparações de proporções foram feitas pelo teste do qui-quadrado.

III - RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os percentuais de transformações blásticas observadas tanto nas culturas-controle quanto naquelas tratadas com ácido nalidíxico nas concentrações de 20µg/ml, 50µg/ml e 100µg/ml.

A análise dos dados emparelhados permite comparar o efeito das diferentes concentrações de ácido nalidíxico sobre as percentagens de linfócitos transformados, testando-se a hipótese nula de que as diferenças intrapar são iguais a zero contra a hipótese alternativa de que isso não é verdadeiro.

Os valores de t expressos na tabela 1, mostram que as diferenças dos percentuais de transformações blásticas entre os controles e as diferentes concentrações de ácido nalidíxico não são significativas.

Tabela 1

Na tabela 2 encontram-se representadas as proporções de metáfases observadas em culturas de linfócitos com concentrações de ácido nalidíxico iguais a zero (controle), 20µg/ml, 50µg/ml e 100µg/ml.

A comparação entre os índices mitóticos das culturas-controle e das tratadas com ácido nalidíxico também foi feita por intermédio do teste t para dados emparelhados, com 14 graus de liberdade, testando-se a hipótese nula de que as diferenças intrapar são iguais a zero contra a hipótese alternativa de que são diferentes da nulidade.

Os valores de t expressos na tabela 2 permitem, pois, aceitar a hipótese nula, ou seja, falam a favor de que não há diferenças significativas entre as culturas-controle e as tratadas com ácido nalidíxico, quanto ao índice mitótico.

Tabela 1 - Percentual de transformação blástica nas culturas-
-controle e nas tratadas com ácido nalidíxico nas
concentrações de 20µg/ml, 50µg/ml e 100µg/ml. Os va-
lores de d_1 , d_2 e d_3 correspondem às diferenças in-
trapar entre as taxas observadas nas culturas-contro-
le e naquelas com 20µg/ml, 50µg/ml e 100µg/ml de áci-
do nalidíxico.

Nº	CONTROLE	20µg/ml	d_1	50µg/ml	d_2	100µg/ml	d_3
1	76	75	1	74	2	78	-2
2	76	77	-1	77	-1	77	-1
3	76	76	0	76	0	78	-2
4	78	77	1	76	2	77	1
5	78	79	-1	75	3	76	2
6	81	78	3	84	-3	78	3
7	80	76	4	79	1	80	0
8	78	70	8	84	-6	82	-4
9	82	79	3	76	6	76	6
10	76	75	1	76	0	78	-2
11	78	77	1	77	1	82	-4
12	78	78	0	76	2	80	-2
13	75	81	-6	76	-1	77	-2
14	78	75	3	79	-1	79	-1
15	77	78	-1	78	-1	78	-1
MÉDIA	77,800	76,733	1,067	77,533	0,267	78,400	-0,600
ERRO DA MÉDIA	0,509	0,651	0,796	0,761	0,714	0,486	0,689
$t_{(14)}$	1,340		0,374		-0,871		
	0,20 < P < 0,30		0,60 < P < 0,70		0,30 < P < 0,40		

$$t_c = 2,145 ; \alpha = 0,05 , 14 \text{ G.L.}$$

Tabela 2

A tabela 3 apresenta os números e os percentuais de células hipodiplóides (com 44 e com 45 cromossomos), diplóides (com 46 cromossomos) e hiperdiplóides (com 47 cromossomos) encontrados nas culturas-controle e naquelas tratadas com ácido nalidíxico. Para comparar as proporções de células dessas três classes nas culturas-controle e tratadas, os subtotais de metáfases com 44 e com 45 cromossomos foram reunidos em uma só categoria, de sorte que a tabela para o teste do qui-quadrado passou a ser constituída por quatro colunas e três fileiras (12 caselas). O valor do qui-quadrado com 6 graus de liberdade ($\chi^2_{(6)} = 6,719$; $0,30 < P < 0,50$) expresso na tabela 3, mostra que se pode aceitar a hipótese de que as proporções de metáfases com aberrações cromossômicas numéricas e com número normal de cromossomos não dependem de as culturas serem controles ou tratadas com ácido nalidíxico. Em outras palavras, as proporções dessas classes de metáfases nas culturas tratadas não diferiu significativamente daquelas observadas nas culturas-controle.

Tabela 3

A tabela 4 apresenta os valores relativos à contagem de células endorreduplicadas, constituídas todas por células tetraplóides, com suas respectivas frequências tanto nas culturas-controle quanto naquelas com 20µg/ml, 50µg/ml e 100µg/ml de ácido nalidíxico.

O valor do qui-quadrado obtido ao comparar as proporções de células tetraplóides ($\chi^2_{(6)} = 9,979$; $0,20 < P < 0,30$) permite aceitar a hipótese nula de que tais proporções são independentes de as culturas terem ou não ácido nalidíxico nas concentrações de 20µg/ml, 50µg/ml e 100µg/ml.

Tabela 4

Tabela 2 - Índice mitótico nas culturas-controle e nas tratadas com ácido nalidíxico nas concentrações de 20µg/ml 50µg/ml e 100µg/ml. Os valores d_1 , d_2 e d_3 correspondem às diferenças intrapar entre as taxas observadas nas culturas-controle e naquelas com 20µg/ml, 50µg/ml e 100µg/ml de ácido nalidíxico.

Nº	CONTROLE	20µg/ml	d_1	50µg/ml	d_2	100µg/ml	d_3
1	20	5	15	12	8	26	-6
2	4	4	0	10	-6	11	-7
3	10	18	-8	10	0	13	-3
4	12	8	4	12	0	7	5
5	11	21	-10	11	0	12	-1
6	10	12	-2	9	1	11	-1
7	10	7	3	22	-12	19	-9
8	12	20	-8	17	-5	12	0
9	22	26	-4	11	11	16	6
10	13	7	6	10	3	14	-1
11	5	11	-6	4	1	11	-6
12	9	12	-3	13	-4	4	5
13	13	15	-2	12	1	15	-2
14	14	18	-4	21	-7	13	1
15	9	14	-5	13	-4	13	-4
MÉDIA	11,600	13,200	-1,600	12,467	-0,867	13,133	-1,533
ERRO DA MÉDIA	1,218	1,668	1,670	1,179	1,499	1,291	1,194
$t_{(14)}$		-0,958		-0,578		-1,284	
		0,30 < P < 0,40		0,50 < P < 0,60		0,20 < P < 0,30	

$$t_c = 2,145 ; \alpha = 0,05 ; 14 \text{ G.L.}$$

Tabela 3 - Taxa de aneuploidias nas culturas-controle e nas tratadas com ácido nalidíxico nas concentrações de 20µg/ml, 50µg/ml e 100µg/ml.

Nº DE CROMOSSOMOS	CONTROLE		20µg/ml		50µg/ml		100µg/ml	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
44	1	0,67	-	-	-	-	-	-
45	4	2,66	12	8,0	7	4,67	8	5,34
46	144	96,00	138	92,00	140	93,33	140	93,33
47	1	0,67	-	-	3	2,00	2	1,33
TOTAL	150	100,00	150	100,00	150	100,00	150	100,00

$$\chi^2_{(6)} = 6,719 ; 0,30 < P < 0,50$$

Tabela 4 - Taxa de poliploidias (endorreduplicação) nas culturas-controle e nas tratadas com ácido nalidíxico nas concentrações de 20µg/ml, 50µg/ml e 100µg/ml.

CÉLULAS	CONTROLE		20µg/ml		50µg/ml		100µg/ml	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
TETRAPLÓIDES	11	7,33	17	11,33	21	14,00	20	13,33
DIPLÓIDES	139	92,67	133	88,67	129	86,00	130	86,67

$$\chi^2_{(3)} = 3,979 \text{ , } 0,20 < P < 0,30$$

A frequência de aberrações estruturais detectada nos cromossomos obtidos por cultura de linfócitos sem ácido nalidíxico (controle) e com ácido nas concentrações de 20µg/ml, 50µg/ml e 100µg/ml são mostradas na tabela 5.

O tipo de apresentação feito na tabela 5, incluindo metáfases com aberrações estruturais únicas e múltiplas em uma só classe, deve-se ao fato de não se ter observado falhas e quebras em uma mesma célula.

Para a análise dos dados expressos na tabela 5, estabeleceu-se a hipótese nula de que as proporções de células portadoras de alterações estruturais não diferem significativamente daquelas com ausência de tais alterações, tanto nas culturas-controle quanto naquelas tratadas com ácido nalidíxico. O valor do qui-quadrado obtido ($\chi^2_{(3)} = 1,122$; $0,70 < P < 0,80$) permite aceitar a hipótese nula de que a presença do ácido nalidíxico no meio de cultura nas concentrações de 20µg/ml, 50µg/ml e 100µg/ml não influencia a taxa de falhas e de quebras cromossômicas ou cromatídicas.

Tabela 5

De acordo com o grupo de cromossomos afetados, 1,5% das alterações foram detectadas no grupo A, 2% no grupo B e 2% no grupo C.

Tabela 5 - Número e percentual de metáfases com aberrações cromossômicas estruturais observadas nas culturas-controle e nas tratadas com ácido nalidíxico nas concentrações de 20 µg/ml, 50 µg/ml e 100 µg/ml.

Alteração estrutural	Controle		20 µg/ml		50 µg/ml		100 µg/ml		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Falha cromatídica	3	2,00	2	1,33	3	2,00	6	4,00	14	2,33
Quebra cromatídica	4	2,67	4	2,67	6	4,00	4	2,67	18	3,00
Falha cromossômica	1	0,66							1	0,17
Subtotal	8	5,33	6	4,00	9	6,00	10	6,67	33	5,50
Nenhuma	143	94,67	144	96,00	141	94,00	140	93,33	567	94,50
TOTAL	150	100,00	150	100,00	150	100,00	150	100,00	600	100,00

$$\chi^2_{(3)} = 1,122 ; 0,70 < P < 0,80$$

IV - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os estudos epidemiológicos feitos em populações humanas expostas a agentes mutagênicos físicos, químicos e biológicos, bem como as análises de casos individuais de contato com tais agentes ou os dados a respeito de infecções virais que induzem anomalias cromossômicas levaram os pesquisadores a associar essas mutações induzidas com a oncogênese. Isso porque os agentes carcinogênicos e/ou mutagênicos produzem alterações do DNA das células germinativas e somáticas do homem, podendo provocar aberrações cromossômicas de importância biológica e de grande interesse clínico (HARNDEN, 1972).

A teoria da carcinogênese ou teoria da mutação das células somáticas foi proposta por BOVARI em 1914 (cf. MATNEY, 1976) e, desde então, os investigadores passaram a estudar meios para provocar mutações e estimar a capacidade mutagênica de certos compostos sobre microrganismos, extrapolando os resultados obtidos para a espécie humana. Evidentemente, tais extrapolações carecem de validade, pois a estrutura cromossômica e a fisiologia dos eucariotos não é comparável à procariotos.

O avanço das técnicas de cultura de tecidos animais nos últimos anos propiciou o desenvolvimento de técnicas que permitem a proliferação, *in vitro*, de células somáticas de mamíferos, inclusive do ser humano, que vêm sendo utilizadas com sucesso em várias áreas biomédicas para o estudo de efeitos clastogênicos*.

A metodologia usualmente empregada para a investigação do efeito de drogas mutagênicas sobre os cromossomos humanos, *in vivo* ou *in vitro*, requer um exame clínico

* SHAW (1970) empregou o termo clastogênico para designar qualquer agente que cause quebras cromossômicas e suas subseqüentes aberrações.

de rotina e uma anamnese detalhada de cada indivíduo analisado, para detectar possíveis alterações cromossômicas hereditárias ou induzidas por fatores do ambiente, tais como, a exposição a agentes químicos, a drogas, a radiações e a doenças infecciosas, particularmente as causadas por vírus e micoplasma (BIANCHI *et al.*, 1975).

As técnicas empregadas para investigar a ação de substâncias mutagênicas na espécie humana, tais como a detecção de substâncias mutagênicas em líquidos orgânicos, a transformação celular *in vitro*, o teste do dominante letal, a hibridização celular, a detecção de enzimas de reparo e a utilização de precursores marcados do DNA, são impraticáveis na grande maioria ou quase totalidade dos laboratórios brasileiros, devido a complexidade do material utilizado e dos métodos empregados (HELLING *et al.*, 1971; BRINKLEY *et al.*, 1976 ; CERUTTI, 1976 ; LEGATOR *et al.*, 1976; HSU *et al.*, 1976).

Além das dificuldades técnicas encontradas, esses métodos de investigação preconizados pelo Clinical Cancer Center da Universidade do Texas (KILLIAN *et al.*, 1976) exigem a manipulação de uma amostra muito grande que possibilite uma amostra-controle representativa, ou seja, passível de comparação com as amostras tratadas. Para isso, o material utilizado deve ser de fácil obtenção, pois, pode haver necessidade de repetição do experimento ou colheita de novas amostras.

Entretanto, no caso específico dos estudos sobre a ação de substâncias com possível efeito sobre a multiplicação celular e sobre os cromossomos humanos, BEIGUELMAN e PISANI (1974, 1975) se valeram de um método que não somente contorna as dificuldades acima mencionadas mas, por empregar dados emparelhados, é mais eficiente, podendo, pois, o pesquisador valer-se de amostras de tamanho muito pequeno. Além disso, esse método não exige qualquer investigação anamnésica prévia e contorna o problema das variações individuais.

Nos experimentos realizados para a apresentação deste trabalho, encontramos um exemplo que fala muito a favor dessa metodologia. De fato, é fácil constatar na tabela 4 que a taxa de endorreduplicação observada nas culturas foi excessivamente alta (7,33% a 14%) quando comparada às taxas comumente observadas, as quais variam entre 1% e 2% (LEVINE, 1971). Se as culturas-controle e as tratadas, de cada indivíduo, não tivessem sido preparadas simultaneamente, é evidente que essa variação de endorreduplicação poderia provocar conclusões erradas. Do mesmo modo, as pequenas variações incontrolláveis dos diferentes lotes de meio de cultura utilizados no decurso de uma investigação podem afetar os resultados das pesquisas planejadas segundo os métodos usuais, mas não têm qualquer influência no caso da metodologia preconizada por BEIGUELMAN e PISANI (1974, 1975).

A técnica de cultura de linfócitos do sangue periférico utiliza material de fácil obtenção e disponibilidade em experimentos repetidos, fornece resultados em tempo relativamente curto e possui um custo financeiro relativamente inexpressível em relação ao das outras técnicas. Além disso, permite a ação contínua do eventual agente mutagênico sobre as diferentes fases do ciclo mitótico, pois, a população de células apresenta um crescimento exponencial não sincrônico (MOOREHEAD *et al.*, 1960; POTIER *et al.*, 1969; MOORE *et al.*, 1970; PISANI *et al.*, 1972; BEIGUELMAN *et al.*, 1976).

Em suma, a simplicidade da técnica utilizada e a segurança do método empregado, fornece informações preliminares sobre o efeito dos eventuais agentes mutagênicos sobre os cromossomos humanos e permite que esse procedimento seja aplicado como triagem na investigação do potencial mutagênico.

É bem verdade que se poderia aventar a hipótese de que a cultura de linfócitos, por constituir um sistema fechado, não permite a formação de certos metabólitos ati-

vos, com ação mutagênica *in vivo*. Essa crítica, entretanto, não pode caber aos dados aqui apresentados, pois, o que se adicionou às culturas foi o ácido hidroxinalidíxico, que é juntamente com o ácido nalidíxico, a forma biologicamente ativa no organismo humano. Por outro lado, deve-se lembrar que o ácido nalidíxico, sob a forma de hidroxinalidíxico, foi adicionado não apenas na concentração correspondente ao nível hemático médio duas horas após sua ingestão, isto é, 20 a 50 µg/ml (SELLERS, 1970 ; BIANCHI, 1975), mas, também na concentração de 100 µg/ml, e que a metabolização do ácido nalidíxico ocorre no fígado por um processo de conjugação, originando o monoglicuronato, sem ação bactericida (BIANCHI, 1975).

Em vista disso, e considerando que mesmo em um sistema fechado que não permite a metabolização do ácido nalidíxico, as concentrações correspondentes à média dos níveis hemáticos duas horas após a ingestão desse medicamento e a um valor muito maior que o médio não conseguiram afetar :

- 1) o percentual de transformação blástica dos linfócitos induzidos por fitohemaglutinina (tabela 1) ;
- 2) o índice mitótico (tabela 2) ;
- 3) a taxa de aneuploidias (tabela 3) ;
- 4) a taxa de poliploidias (tabela 4) ;
- 5) a taxa de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas,

pode-se concluir que o ácido nalidíxico não tem efeito sobre a multiplicação celular, não induz aneuploidias, nem tem efeito clastogênico.

V - SUMÁRIO

Apesar de o mecanismo de ação do ácido nalidíxico ($C_{12}H_{12}N_2O_3$) ainda não estar completamente estabelecido, ele vem sendo largamente empregado no combate a infecções, por causa de sua grande especificidade sobre bactérias Gram-positivas. Esse quimioterápico tem sido mais utilizado no tratamento de infecções urinárias, embora também seja usado em outras situações como, gastroenterites, meningites, infecções sistêmicas, etc. Os experimentos recentes com o ácido nalidíxico desenvolvidos em bactérias, têm demonstrado que esse quimioterápico bloqueia a duplicação semiconservativa do DNA, sem afetar diretamente a síntese de RNA e proteínas. Em vista disso, e tendo em mente que o ácido nalidíxico vem sendo utilizado em gestantes e crianças, o autor considerou pertinente investigar o efeito dessa substância sobre os cromossomos humanos. Para tanto, foi analisado o efeito *in vitro* do ácido nalidíxico sobre o percentual de diferenciação blástica dos linfócitos estimulados pela fitohemaglutinina, o índice mitótico, bem como sobre as taxas de aneuploidias, de poliploidias e de quebras e falhas (*gaps*) cromossômicas e cromatídicas.

Nesse experimento foram utilizadas duas séries de quatro culturas para cada indivíduo analisado, com concentrações de ácido nalidíxico de zero, 20, 50 e 100 microgramas por mililitro. Uma dessas séries, incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 72 horas foi utilizada para a investigação do índice de transformação blástica e a outra, submetida a incubação a 37°C por 48 horas, destinou-se à pesquisa do índice mitótico e das taxas de aneuploidias, de poliploidias e de aberrações estruturais.

O tratamento estatístico dos dados feito pela análise dos dados emparelhados ou teste do qui-quadrado, permitiu a conclusão final de que o ácido nalidíxico não possui efeito sobre a multiplicação celular, não induz aneuploidias nem tem efeito clastogênico.

VI - SUMMARY

Nalidixic acid is largely used for treatment of infections due to its great specificity for Gram-negative bacteria, in spite of the poor knowledge of its mechanism of action.

This drug has been used mostly for treatment of urinary infections, but also for treatment of other diseases like gastroenterities, meningitides and systemic infections. Recent experiments with nalidixic acid on bacteria have demonstrated that this chemotherapeutic inhibits the semiconservative duplication of DNA, without affecting directly the synthesis of RNA and proteins. As nalidixic acid has been prescribed to pregnant women and children, the author considered highly pertinent the investigation of a possible effect of this substance on human chromosomes. Thus, it was analysed the *in vitro* effect of the nalidixic acid on the blastic differentiation of lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin, the mitotic index, as well as its effect on the rate of aneuploidies, polyploidies and chromosomal and chromatid breaks and gaps.

For this study it was used two series of four cultures for each of the 15 persons sampled. Each series contained a control with no nalidixic acid and three cultures with 20µg/ml, 50µg/ml and 100µg/ml of nalidixic acid. One series was incubated at 37°C for 72 hours and used for the investigation of the blastic transformation rate. The other series was incubated at 37°C for 48 hours and used to study the mitotic index as well as to the investigation of rate of aneuploidies, polyploidies and structural aberrations.

Statistical analysis was performed by pairing the data or through chi-square tests. It was concluded that nalidixic acid has no effect on celular multiplication and finally that this drug does not lead to both aneuploidies and any clastogenic effect.

VII - BIBLIOGRAFIA

- BEIGUELMAN, B. ; PISANI, R.C.B. Effect of DDS on phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation. *Int. J. Leprosy* 42(4): 412-415, 1974.
- BEIGUELMAN, B. ; PISANI, R.C.B. ; EL GUINDY, M.M. *In vitro* effect of dapsone on human chromossomes. *Int. J. Leprosy* 43(1) : 41-44, 1974.
- BEIGUELMAN, B. ; PINTO Jr. , W. ; PISANI, R.C.B. ; KRIEGER, H. ; VOZZA, A.A. ; EL GUINDY, M.M. Lymphocytes transformation and lepromatous leprosy. *Ciência e Cultura* 27(2): 217-220, 1975.
- BEIGUELMAN, B. ; PISANI, R.C.B. Chromosomal aberations in leukocytes metaphases of leprosy patients under dapsone therapy . *Hansen. Int.* 1(1): 53-60, 1976.
- BEIGUELMAN, B. *Genética Médica vol. 2: Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações*. São Paulo, EDART, 1977.
- BELTON, E. M. Haemolitic anaemia due to nalidixic acid. *Lancet* 2: 691-692, 1965.
- BIANCHI, A. ; OSELKA, G. W. ; LEVI, G. C. ; LOPES, H. V. ; PASTERNAK, J. ; PERFEITO, J. B. ; MENDONÇA, J. S. ; ALY, J. ; BALDY, J. L. S. ; NETO, V. A. *Quimioterápicos na prática médica*. São Paulo, Gremed, 1975.
- BLOOM, A. D. Induced chromosomal aberrations in man. Em *Advances in Human Genetics*, H. HARRIS and K. KIRSCHHORN (EDs) Ney York, Plenum Press, 1972.
- BOYLE, J. V. ; COOK, T. M. ; GOSS, W. A. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 97(1) : 230-236, 1969.
- BRINKLEY, B. R. ; FULLER, G. M. Tubulin and actin Immunofluorescence: A new assay for cell transformation *in vitro*. Em *First annual course in the principles and practices of genetic toxicology*. Univ. Texas Medical Branch, Galveston (Texas), 1976.

- CERUTTI, P. A. Repairable damage in DNA: Overview. Em *First annual course in the principles and practices of genetic toxicology*. Univ. Texas Medical Branch, Galveston (Texas), 1976.
- COOK, T. M. ; DEITZ, W. H. ; GOSS, W. A. Mechanism of action of nalidixic acid on *E. coli*. IV Effects on the stability of cellular constituents. *J. Bacteriol.* 91(2): 774-779, 1966.
- COOK, T.M. ; GOSS, W. A. ; DEITZ, W. A. Mechanism of action of nalidixic acid. V. Possible mutagenic effect. *J. Bacteriol.* 91(1): 780-783, 1966a.
- CUMMINGS, D. J. ; KUSY, A. R. Thymineless death in *E. coli*; inactivation and recovery. *J. Bacteriol.* 99: 558-566, 1976.
- DASH, H. ; MILLS, J. Severe metabolic acidosis associated with nalidixic acid overdose. *Ann. Intern. Med.* 84(5): 570-571, 1976.
- DEITZ, W. H. ; COOK, T. M. ; GOSS, W.A. Mechanism of action on *Escherichia coli*. III. Conditions required for lethality. *J. Bacteriol.* 91 (2): 768-773, 1966.
- DEONNA, T. Acute intracranial hypertension after nalidixic acid administration. *Arch. Dis. Child.* 49(9): 743, 1974.
- DUFFEL, S. J. Unexpected reaction to nalidixic acid. *Vet. Rec.* 96(8): 188, 1975.
- EBERLE, H. ; MASKER, W. Effect of nalidixic acid on semiconservative replication and repair synthesis after ultraviolet irradiation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 105(3): 908-912, 1971.
- FARNARIER, G. Nalidixic acid oral suspension in urinary infections in children. *Pediatric* 22: 740-741, 1967.
- GILBERTSON, C. Haemolytic anaemia with nalidixic acid. *Br. Med.* 4: 493, 1972.
- GOSS, W. A. ; DEITZ, W.H. ; COOK, T. M. Mechanism of action of nalidixic acid. *J. Bacteriol.* 88 (4): 1112-1118, 1964.
- GOSS, W. A. ; DEITZ, W. H. ; COOK, T. M. Mechanism of action of nalidixic acid on *E. coli*. II. Inhibition of Desoxyribonucleic acid synthesis. *J. Bacteriol.* 89(4). 1068-1074, 1965.

- GREEN, S. The dominant lethal test. Em *First annual course in the principles and practices of genetic toxicology*. Univ. Texas Medical Branch, Galveston (Texas), 1976.
- GRIGG, G. W. Stability of DNA in dark-repair mutants of *E. coli* B treated with nalidixic acid. *J. Gen. Microb.* 61: 21-25, 1970.
- HAMILTON, P. B. ; ROSI, D. ; PERUZZOTTI, G. P. ; NIELSON, E. D. Microbial metabolism of naphthyrididines. *Appl. Microbiol.* 17:237-241, 1969.
- HANE, M. W. Some effects of nalidixic acid on conjugation in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 105(1): 46, 56, 1971.
- HARNDEN; D. G. Specificity of acquires chromosome damage in man . Em GROUCHY, J. ; ERBING, F. J. G. ; HENDERSON, I. W. (EDs) *Human Genetic*, Excerpta medica, Amsterdam, Exc. Med., 1972.
- HAYFLICK, L. ; MOORHEAD, P. S. The serial subcultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25:285-621, 1961.
- HELLING, R. B. ; KUKORA, J. S. Nalidixic acid - resistant mutants of *E. coli* deficient in isocitrate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 105: 1224, 1971.
- HSU, T.C. ; ARRIGHI, F. E. Cytogenetics assay methods. Em *First annual course in the principles and practices of genetic toxicology*. Univ. of Texas Medical Branch, Galveston (Texas), 1976.
- IVLER, D. Antimicrobial drugs: Mechanism and factors influencing their action. Em KAGAN, B. M. (EDs) *Antimicrobial Therapy*, 2nd ed, Philadelphia, W. B. Saunders, 1974.
- JAVOR, G. T. Inhibition of ribonucleic acid synthesis by nalidixic acid in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 120(1):282-286, 1974.
- KAPLAN, D.M. ; CRIDDLE, R. S. Effects of antibiotic substances on the respiration of yeast grown in 1% glucose. *Biochim Biophys. Acta* 222: 611-620, 1970.
- KIHLMAN, B. A. *Action of chemicals on dividing cells*. Ney Jersey , Prentice-Hall, 1967.
- KILIAN, J. D. ; PICCIANO, D. Cytogenetic surveillance of industrial populations. Em *First annual course in the principles and*

- practices of genetic toxicology*. Univ. Texas Medical Branch, Galveston (Texas), 1976.
- KOROLKOVAS, A. *Fundamentos de Farmacologia Molecular. Base para planejamento de fármacos*. São Paulo, EDART, 1974.
- LAPPIN, G. R. Cyclization of 2-aminopyridine derivatives. I. Substituted ethyl 2-pyridylaminomethylenemalonates. *J. Am. Chem. Soc.* 70 (33): 3348-3350, 1948.
- LEGATOR, M. S. Host medical essay. Em *First annual course in the principles and practices of genetic toxicology* Univ. Texas Medical Branch, Galveston (Texas), 1976.
- LEGATOR, M.S. ; PULLIN, T. G. ; CONNOR, T. H. The isolation and detection of mutagenic substances in body fluid and tissues of animals subjects. Em *First annual course in the principles and practices of genetic toxicology*. Univ. Texas Medical Branch, Galveston (Texas), 1976a.
- LESHER, G. Y. ; FROELICH, E. J. ; GRUETT, M. D. ; BAILEY, J. H. ; BRUNDAGE, R. P. 1,8-naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm. Chem.* 5: 1063-1065 , 1962.
- LEVINE, H. *Clinical Genetics*, Boston , Brown and Company, 1971.
- MARTIN, M. C. ; BABIN, J. P. ; DEMARQUEZ, J. L. Acidose métabolique sévère au cours d'un traitement par l'acide nalidixique chez un nouveau-né. *Bordeaux Med.* 2: 1477-1478, 1969.
- MATNEY, T. Bacterial test systems employed in the detection of chemical mutagens. Em *First annual course in the principles and practices of genetic toxicology*. Univ. Texas Medical Branch, Galveston (Texas), 1976.
- MOORE, G. E. ; MINOWADA, J. Human lymphocyte cell lines for genetic and clinical studies. Em GROUCHY, J; EBLING, F. J. G. ; HENDERSON, I. W. (Eds) *Human Genetics. Excerpta medica*. Amsterdam, Exc. Med. , 1972.
- MOOREHEAD, P. S. ; NOWELL, P. C. ; MELLMAN, W. J. ; BATTIPS, D. M. ; HUNGERFORS, D. A. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. cell Res.* 20: 613, 1960.

- NELSON, D. S. ; NELSON, M. ; THURSTON, J. M. ; WATERS, M. F. R. ; PEARSON, J. M. H. Phytohaemagglutinin-induced lymphocytes transformation in leprosy. *Clinic Exp. Immunol.* 9:33-34 , 1971.
- PEDRINI, A. ; GEROLD, D. ; SICCARDIA, A. ; FALASCHI, A. Studies on the action of nalidixic acid. *Eur. J. Bioch.* 25(2): 359 - 365, 1972.
- PINTO Jr. , W. A *síndrome do "Cri du chat"*. Tese de doutoramento, UNICAMP, 1972.
- PISANI, R. C. B. ; BEIGUELMAN, B. ; OPRIMOLLA, D. V. A. *In vitro* behavior of blood derived macrophages against killed M. Leprae. *Int. J. Leprosy* 41(1) : 14-24, 1972.
- POTIER, J. C. ; MERKLEN, F. P. Sur la transformation lymphoblastique des lymphocytes de lépreuse provoquée par broyat de *lêpromie muirim*. *Bull. Soc. Path. Exotique* 62: 987-992, 1969 .
- RIGAS, D. ; OSCOOD, E. E. Purification and properties of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 212 : 607, 1955.
- ROSENFELD, G. . Corante Pan crômico para hematologia e citologia clínica, Nova contribuição dos componentes May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan.* 20: 329-334, 1941.
- ROSENKRANS, H. S. ; LAMBEK, C. *In vivo* effect of nalidixic acid (Neg-Gram) on the DNA of human diploid cells in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120:549-552, 1965.
- SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutation Research* 31; 9-15 , 1975.
- SELLERS, E. M. ; KOCH-WESER, J. Displacement of warfarin from human albumin by diazoxide and ethacrynic, mefenamic and nalidixic acid. *Clin. Pharmacol. Ther.* 11(4): 524-529, 1970 .
- SHAW, M. W. Human chromosome damage by chemical agents. *Ann. Rev. Med.* 21: 409 - 432, 1970.

SIMON, T. J. ; MASKER, W. E. ; HANAWALT, P. C. Seletive of semi - conservative DNA synthese by nalidixic acid in permeabilized bacteria. *Bioch. Bioph. Acta* 239(2): 271-274, 1974.

WASSON, J. S. ; MALLING, H. V. Suggested format for articles to be submitted to "genetic toxicology testing"*Mutation Research* 40, 3-8, 1976.