



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DO OMEPRAZOL EM ESTUDOS NÃO
CLÍNICOS**

ANTONIO LIMA BRAGA

TERESINA – PIAUÍ
FEVEREIRO/2018

ANTONIO LIMA BRAGA

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DO OMEPRAZOL EM ESTUDOS NÃO
CLÍNICOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Teresina – Piauí

Fevereiro/2018

ANTONIO LIMA BRAGA

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DO OMEPRAZOL EM ESTUDOS NÃO
CLÍNICOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em

____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante (Orientadora)

Departamento de Bioquímica e Farmacologia | *Campus* Ministro Petrônio Portella

Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa (Examinador Interno)

Departamento de Biologia | *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros

Prof. Dr. Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar (Examinador Externo)

Departamento de Farmácia | *Campus* Ministro Petrônio Portella

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José, de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes, da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

Dedico este trabalho a primeiramente a Deus, pois sem ele nada sou, aos meus pais que me deram o maior de todos os presentes, o amor; aos meus irmãos que estiveram sempre a me encorajar, a todos os meus amigos que fizeram parte de minha vida tornando-a mais feliz e completa.

AGRADECIMENTOS

Sempre em primeiro lugar Deus que está sempre a guardar meus passos e assegurar meus caminhos;

Aos meus pais, *Neuton Braga da Costa e Cleonice Pereira Lima Braga*, por todo o ensinamento, amor e carinho, fundamentais para a formação do homem que me tornei;

Aos meus irmãos e familiares, pelo carinho e apoio em minhas escolhas;

À Universidade Federal do Piauí, por meio do Magnífico Reitor Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes, do Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, através do Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira, e dos demais integrantes do corpo docente deste Programa de Pós-Graduação;

Aos 21 companheiros da 6º turma do PPGCF/UFPI referente ao biênio 2016/2017, pela multiplicação do conhecimento compartilhado e divisão do sofrimento deste caminho percorrido;

Aos queridos companheiros de pesquisa, profissão e amigos, do Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica, LAPGENIC, em especial aos queridos (as) *Ag-Anne Melo, Rai Pablo, Ana Maria, Reyca Rodrigues, Jadson Teixeira, Torequl Islam, Ricardo Melo, Rosália Tôres, José Victor, Leane Brunelle, Anthonielly Campinho, Júnior Gomes e Márcia Fernanda*;

Ao Dr. Marcos Resende de Souza Lima, por todo suporte, amizade, apoio e ensinamentos que facilitaram o meu crescimento;

À minha orientadora, Profa. Dra. *Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante*, que de modo inenarrável, me acolheu e me ensinou o sentido da palavra “Pesquisador” tem desde o ano 2015, lhe sou muito grato.

Aos meus “cyberfriends” que vieram do incrível mundo de LineageII para minha vida real, *Vinicius Machado (LightBlade), Pablo Henrique (Solsticio), Rodrigo Maia (Vison)*...

Muito Obrigado!

*“Aceitar as coisas que não posso mudar,
ter coragem para mudar as coisas que eu posso
e ter a sabedoria para entender a diferença”*

(Barry Allen – The Flash)

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido ascórbico
AR	Ácido retinóico
CAT	Catalase
CBMN	Micronúcleos com bloqueio de citocinese
CCK-2	Colecistocinina B
CG	Carcinoma gástrico
CPA	Ciclofosfamida
DOX	Doxorrubicina
EG	Linhagem duplo mutante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>SOD1ΔCAT1Δ</i>
EG103	Linhagem selvagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>SODWT</i>
EG110	Linhagem mutante e defectiva de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>SOD2Δ</i>
EG118	Linhagem mutante e defectiva de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>SOD1Δ</i>
EG133	Linhagem duplo mutante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>SOD1ΔSOD2Δ</i>
EG223	Linhagem mutante e defectiva de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>CAT1Δ</i>
ENC	Eritrócitos normocromáticos
EPC	Eritrócitos policromáticos
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GC	Gastrite crônica
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
IAP	Inibidores de apoptose
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBP's	Inibidores da bomba de prótons
IG	Instabilidade genética
IM	Índice mitótico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MN	Micronúcleo
O₂⁻	Ânion superóxido
OH⁻	Íon hidroxila
OH[•]	Radical hidroxila

OME	Omeprazol
OTDCDE	Organização para Testes de Diretrizes para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PR	Palmitato de retinol
RGE	Refluxo gastroesofágico
S-180	Sarcoma 180
SCGE	<i>Single cell gel electrophoresis assay</i>
DP	Desvio padrão
SOD	Superóxido dismutase
TGO	Transaminase glutâmico-oxilacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
VIT	Vitaminas

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1.** Divisão esquemática do corpo da dissertação. 20
- Figura 2.** Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes para 2016 por sexo, exceto pele não-melanoma (INCA). 25
- Figura 3.** Estrutura química do omeprazol (OME). 27
- Figura 4.** Estrutura química do palmitato de retinol (PR). 28
- Figura 5.** Estrutura química do ácido ascórbico (AA). 28
- Figura 6.** Posicionamento das linhagens utilizadas no ensaio com *S. cerevisiae* 30

CAPÍTULO I

- Figura 3.** Avaliação oxidante do omeprazol (10, 20 e 40 µg/mL) e os efeitos do ácido ascórbico em *S. cerevisiae*. 50
- Figura 4.** Avaliação oxidante do omeprazol (10, 20 e 40 µg/mL) e os efeitos do palmitato de retinol – PR (100 UI/mL) em *S. cerevisiae*. 53
- Figura 3.** Avaliação oxidante do omeprazol (10, 20 e 40 mg/mL) e os efeitos da interação do ácido ascórbico – AA (2,0 µM/mL) e palmitato de retinol – PR (100 UI/mL) frente ao H₂O₂, em *S. cerevisiae*. 54
- Figura 4.** Perfil fotomicrográfico das alterações citogenéticas induzidas por Omeprazol em linhagens de Sarcoma 180. 59

CAPÍTULO II

- Figura 5.** Efeitos de PR e ou AA sobre o dano genotóxico induzido pelo OME às células meristemáticas de *A. cepa* (teste de cometa). 75
- Figura 6.** Fotomicrografia dos efeitos mutagênicos de OME em células meristemáticas de *A. cepa*. 76
- Figura 3.** Mutagenicidade do OME e os efeitos moduladores do PR e ou AA em *A. cepa*. 77
- Figura 4.** Toxicidade do OME e os efeitos do PR e/ou AA em *A. cepa*. 78

Figura 5. Citotoxicidade do OME e os efeitos do PR e/ou AA nos meristemas de raiz de *A. cepa*. 79

Figura 6. Possíveis eventos citogenéticos do OME em sistema eucarioto com base no teste de *A. cepa*. 82

CAPÍTULO III

Figura 7. Genotoxicidade do OME em células de medula óssea e estômago de camundongos avaliadas pelo índice (A) e frequências (B) de dano. 100

Figura 8. Avaliação genotóxica (ID) do OME e seu co-tratamento com PR e AA e possíveis efeitos de reparação do dano do DNA em linfócitos do sangue periférico de camundongos. 102

Figura 3. Avaliação genotóxica (FD) do OME e seu co-tratamento com PR e AA e possíveis efeitos de reparação do dano ao DNA em linfócitos do sangue periférico de camundongos. 103

Figura 4. Fotomicrografias de cometas (dano ao DNA) induzidas pelo OME e os efeitos moduladores em associação com PR e AA. 104

Figura 5. Fotomicrografias de dano citogenéticos e os efeitos moduladores com o tratamento de OME e/ou PR + AA. 107

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 9. Descrição das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* a serem utilizadas no estudo. 30

CAPÍTULO I

Tabela 10. Descrição e posicionamento das linhagens de *S. cerevisiae* usadas no estudo. 47

Tabela 11. Danos oxidativos do omeprazol (OME) e os efeitos do ácido ascórbico (AA) e do palmitato de retinol (PR) em *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e mutadas em defesas enzimáticas para superóxido dismutase e catalase. 55

Tabela 3. Alterações citogenéticas em linhagem celular de Sarcoma 180 tratadas com omeprazol, ácido ascórbico e palmitato de retinol. 58

CAPÍTULO II

Tabela 12. Genotoxicidade do OME e efeitos moduladores de PR e/ou AA em células meristemáticas de *A. cepa*. 74

CAPÍTULO III

Tabela 13. Grupos experimentais (n = 5) utilizados neste estudo. 97

Tabela 2. Avaliação da mutagenicidade do OME e os efeitos do seu co-tratamento com PR e AA em células de medula óssea de camundongos por meio do teste de MN. 105

Tabela 3. Avaliação citotóxica do OME e seus efeitos sobre sua associação com PR + AA nas células de medula óssea de camundongos por meio do teste de MN. 106

Tabela 4. Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com OME. 108

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos de camundongos tratados com OME. 109

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Gerais	21
2.2 Específicos	21
3 REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1 Doenças Gastrointestinais	22
3.2 Genotoxicidade	23
3.3 Câncer	24
3.4 Estresse Oxidativo	25
3.5 Inibidores da Bomba de Prótons (IBP'S)	26
3.5.1 Omeprazol	26
3.6 Vitaminas Antioxidantes	27
3.6.1 Palmitato de Retinol	28
3.6.2 Ácido Ascórbico	28
4. MODELOS DE ESTUDOS PARA MONITORAMENTO DE FÁRMACOS	29
4.1 <i>Linhagens de Saccharomyces cerevisiae</i>	
4.2 <i>Teste Allium cepa e cometa de células vegetais</i>	31
4.3 <i>Teste de Micronúcleo (MN)</i>	31
4.4 <i>Ensaio de Cometa</i>	32
REFERÊNCIAS	

CAPÍTULO I

TOXICOGENÉTICA DO OMEPRAZOL E SUA ASSOCIAÇÃO COM ÁCIDO ASCÓRBICO E PALMITATO DE RETINOL EM LINHAGENS CELULARES

RESUMO	42
ABSTRACT	43
Introdução	44
Metodologia	46
Resultados e Discussão	49
Conclusão	60
Referências	

CAPÍTULO II

ESTUDO TOXICOGENÉTICO DO OMEPRAZOL E OS EFEITOS DO PALMITATO DE RETINOL E ÁCIDO ASCÓRBICO EM *Allium cepa*

RESUMO	69
ABSTRACT	70
Introdução	71
Materiais e Métodos	72
Resultados	74
Discussão	80
Conclusão	84
Referências	

CAPÍTULO III
**ALTERAÇÕES TOXICOGENÉTICAS INDUZIDAS POR OMEPRAZO]
E EFEITOS DE SUA ASSOCIAÇÃO COM ANTIOXIDANTES EM
CAMUNDONGOS**

RESUMO	93
ABSTRACT	94
Introdução	95
Materiais e Métodos	96
Resultados	98
Discussão	109
Conclusão	113
Referências	
Anexos	

Avaliação toxicogenética do omeprazol em estudos não clínicos. ANTONIO LIMA BRAGA. Orientadora: Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. 123p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF, Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2017.

RESUMO

O omeprazol (OME) é considerado o mais rápido inibidor da bomba de prótons usado em terapias gástricas. Entretanto, os seus efeitos adversos em relação ao material genético ainda são pouco conhecidos. O objetivo da pesquisa foi avaliar os efeitos toxicogenéticos do omeprazol em estudos não clínicos *in vivo* e *in vitro*; e os possíveis efeitos moduladores da associação do palmitato de retinol e ácido ascórbico frente aos danos induzidos ao material genético de *Saccharomyces cerevisiae*, de cultura primária de Sarcoma – 180, *Allium cepa* e em *Mus musculus* com aplicação de biomarcadores citogenéticos. Em *S. cerevisiae* e Sarcoma 180, as concentrações de omeprazol utilizadas foram de 10, 20 e 40 µg/mL. O palmitato de retinol e o ácido ascórbico foram usados nas concentrações de 100 UI/mL e 2,0 µM, respectivamente. Nos tratamentos em *Mus musculus*, as doses do omeprazol foram de 10, 20 e 40 mg/kg e de 100 UI/kg para o palmitato de retinol e 2,0 µM/Kg para o ácido ascórbico. O omeprazol induziu significantes danos oxidativos, em linhagens de *S. cerevisiae* e efeitos toxicogenéticos (micronúcleos, pontes citoplasmáticas, brotos nucleares, apoptose e necrose) e genotóxicos (danos nucleares) em Sarcoma 180, assim como induziram efeitos mutagênicos, citotóxicos, e genotóxicos em células de *Allium cepa*, de sangue periférico e de medula óssea de camundongos. Entretanto, o palmitato de retinol e ácido ascórbico apresentaram efeitos antioxidantes, antigenotóxicos e antimutagênicos frente aos danos induzidos pelo omeprazol nas células em estudo. Estes dados demonstram que o omeprazol induz instabilidades genéticas em células eucarióticas, incluído as tumorais. Entretanto, os danos citogenéticos relatados podem ser modulados em terapias com suplementação de vitaminas antioxidantes, como alternativas para a prevenção de riscos para desordens neoplásicas.

Palavras-chave: Omeprazol. Toxicidade. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Mutagenicidade.

Toxicogenic evaluation of omeprazole in no clinic studies. ANTONIO LIMA BRAGA.
Advisor: Dr. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. 123p. Dissertation. Graduate Program in Pharmaceutical sciences-PPGCF, Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2017.

ABSTRACT

Omeprazole (OME) is considered the fastest proton pump inhibitor used in gastric therapies. However, its adverse effects on genetic material are still poorly understood. The aim of the study was to evaluate the toxicogenic effects of omeprazole in non-clinical *in vivo* and *in vitro* studies; the possible modulating effects of the association of retinol palmitate and ascorbic acid on induced damage to the genetic material of *Saccharomyces cerevisiae*, Sarcoma - 180 cell line, *Allium cepa* and *Mus musculus* with application of cytogenetic biomarkers. In *S. cerevisiae* and Sarcoma 180, the concentrations of omeprazole used were 10, 20 and 40 µg / mL. Retinol palmitate and ascorbic acid were used at concentrations of 100 IU / mL and 2.0 µM, respectively. In *Mus musculus* treatments, doses of omeprazole were 10, 20 and 40 mg / kg and for retinol palmitate was used 100 IU / kg and 2.0 µM / kg for ascorbic acid. Omeprazole induced significant oxidative damage effect in *S. cerevisiae* and toxicogenic strains (micronuclei, cytoplasmic bridges, nuclear buds, apoptosis and necrosis) and genotoxic (nuclear damage) in Sarcoma 180, as well as induced mutagenic, cytotoxic and genotoxic effects in cells *Allium cepa*, peripheral blood and bone marrow of mice. However, retinol palmitate and ascorbic acid presented antioxidant, antigenotoxic and antimutagenic effects against omeprazole-induced damage in the cells under study. These data demonstrate that omeprazole induces genetic instability in eukaryotic cells, including tumor cells. However, the reported cytogenetic damage can be modulated in antioxidant vitamin supplementation therapies as alternatives for the prevention of risks for neoplastic disorders.

Palavras-chave: Omeprazole. Toxicity. Citotoxicity. Genotoxicity. Mutagenic.

1. INTRODUÇÃO

Os medicamentos inibidores da bomba de prótons (IBP's) são os principais fármacos prescritos para o tratamento de enfermidades como esofagite de refluxo e úlcera duodenal. Uma vez que apresentam poucos efeitos adversos quando sua administração é dada de forma correta, os IBP's passaram a ser usados para sintomas agudos e crônicos na prática clínica, ainda que seu uso à longo prazo seja bastante discutível (YANAGIHARA et al., 2015)

Os fármacos da classe IBP incluem o lansoprazol, esomeprazol, rabeprazol, pantoprazol e omeprazol. Atuam suprimindo a secreção ácida de modo mais eficaz que os fármacos antagonistas do receptor H₂, apresentando ampla utilização para o tratamento de esofagite de refluxo, lesões gastrointestinais causadas pelo uso de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais, dispepsias, hipergastrinemia, na terapia para tratamento da infecção por *Helicobacter pylori*, úlcera péptica, úlcera gástrica, úlceras duodenais, entre outras patologias do trato gastrointestinal (WANNMACHER, 2004).

O omeprazol (OME) é considerado o mais rápido IBP disponível, sendo utilizado no tratamento de distúrbios relacionados ao ácido gástrico por décadas, atuando como um IBP funcional por mais tempo do que qualquer outro IBP. O omeprazol é um inibidor da bomba de prótons (IBP), a qual se liga covalentemente inibindo a enzima H⁺K⁺ATPase necessária para acidificação tubulovesicular na célula parietal. Isto reduz a produção de ácido e aumenta o pH do lúmen estomacal, que se revelou um importante mecanismo para o tratamento de gastrite (KOHLER et al., 2010).

Além da sua ação antiácida, os efeitos metabólicos e moleculares da utilização de IBP's, principalmente quando utilizado à longo prazo, têm aumentado questionamentos de discussão substancial. Recentemente, IBP's têm sido relatados como possíveis agentes anti-proliferativos e moduladores de resistência, tanto em *in vitro* quanto *in vivo*. Entretanto, os efeitos inibitório ou promotorial de IBP's para a inflamação gástrica e carcinogênese permanece controverso (PENG et al., 2014).

A gastrite é classificada como uma inflamação da mucosa estomacal sendo uma condição clínica comumente associada com infecção local da mucosa gástrica pela bactéria *Helicobacter pylori*. Há estimativas de que a gastrite crônica estar presente em cerca 37%

dos adultos na forma assintomática. A incidência aumenta de acordo com a idade onde a maioria dos casos se associa pela infecção por *Helicobacter pylori*. O omeprazol, em combinação com antibióticos, torna-se um mecanismo eficaz no combate e erradicação da infecção por *H. pylori*. Entretanto, relatos recentes sugerem que o tratamento à base de omeprazol é um potencial causador de lesões agudas e crônicas nas células da glândula gástrica esse efeito foi atribuído a CCK-2 causadora de efeitos pró-inflamatórios em resposta à supressão da produção de ácido (KOHLENER et al., 2010).

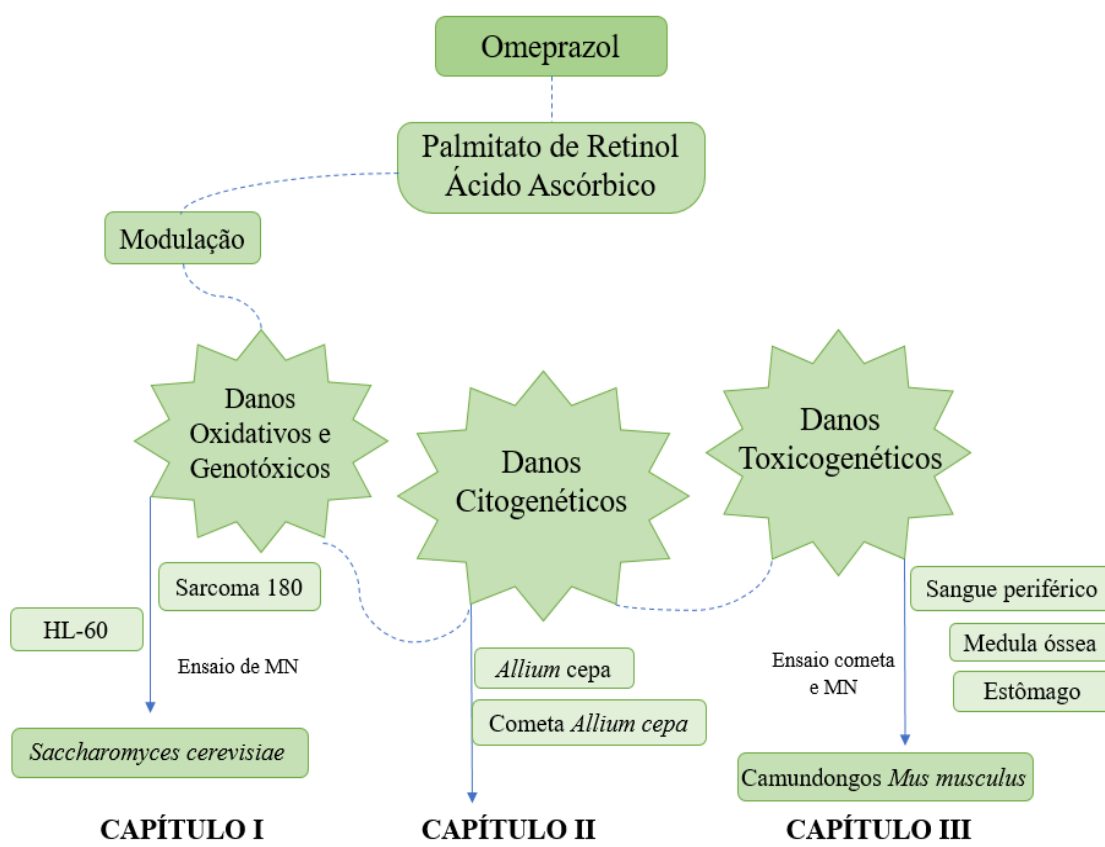
As espécies reativas de oxigênio são produzidas durante a redução do oxigênio e são caracterizadas por alta reatividade participando de muitos processos fisiológicos importantes, mas, se produzidos em altas concentrações, levam ao desenvolvimento do estresse oxidativo e perturbam o equilíbrio pro-oxidativo / antioxidante para a reação de oxidação levando a danos de lipídios, proteínas, carboidratos ou ácidos nucleicos (KLENIEWSKA; PAWLICZAK, 2017). O termo "estresse oxidativo" em toxicologia é utilizado para se referir a uma série de condições patológicas e reações que em conjunto, constituem uma partida de um estado redutivo homeostático basal a nível celular ou tecidual. Conseqüentemente, o acúmulo de espécies reativas (tipicamente, mas não exclusivamente, espécies de oxigênio ou nitrogênio) é tomada como evidência de estresse oxidativo (SAMET; WAGES, 2017).

Os principais agentes antioxidantes derivados das fontes naturais por ingestão dietética são as vitaminas A e C, com isso, tem crescido o interesse no papel antioxidante de produtos naturais como uma estratégia para prevenir o dano oxidativo como fator na fisiopatologia e histopatologia de vários transtornos de saúde. Entre os antioxidantes, as vitaminas são utilizadas como suplementos nutricionais e elementos essenciais em quase todos os sistemas biológicos (MAGDY et al., 2016).

Tendo em vista a necessidade de compreender os possíveis efeitos tóxicos/genotóxicos do omeprazol (OME) e a importância dos efeitos antioxidantes do palmitato de retinol (PR) e do ácido ascórbico (AA) frente aos riscos do omeprazol para o material genético. O presente trabalho objetivou avaliar os efeitos tóxicos e genotóxicos por meio de testes *ex vivo* e *in vivo*, através do estudo em células tumorais de Sarcoma 180, em *S. cerevisiae*, em células de estômago; medula óssea; e sangue periférico de *Mus musculus* durante os tratamentos com omeprazol (**Figura 1**). A presente dissertação compreende a: um estudo não-clínico da atividade oxidante do OME e os efeitos modulatórios do PR e AA em *S. cerevisiae*, cultura primária de sarcoma 180 (S-180)

(**Capítulo I**); assim como os efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos do omeprazol em sistema *Allium cepa* (**Capítulo II**); e por fim, uma avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do omeprazol e o potencial efeito modulatório de sua associação com PR e AA em *Mus musculus* (**Capítulos III**).

Figura 1. Divisão esquemática do corpo da dissertação.



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um estudo não clínico para avaliar os efeitos tóxicogenéticos do omeprazol e a importância da utilização do palmitato de retinol e do ácido ascórbico na modulação dos possíveis danos induzidos ao material genético com aplicação de marcadores citogenéticos indicativos de danos ao DNA, mutagenicidade, apoptose e necrose.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do omeprazol através do bioensaio *Allium cepa* e avaliar o índice e frequência de dano através de ensaio cometa em células meristemáticas de *Allium cepa*.

Verificar os riscos do omeprazol na indução de danos oxidativos, genotóxicos e mutagênicos em culturas primárias de sarcoma 180 (S-180) e em *Saccharomyces cerevisiae*, bem como a importância do PR e do AA para a modulação dos danos induzidos pelo OME;

Avaliar os efeitos aneugênicos/clastogênicos em células de medula óssea e sangue periférico de camundongos tratados com omeprazol e em associação com vitaminas antioxidantes vitamina A, e vitamina C, por meio do teste de Micronúcleos;

Investigar o potencial genotóxico em células de medula óssea e sangue periférico de camundongos tratados com omeprazol e em associação com PR e AA, bem como os efeitos de reparo de DNA em linfócitos de sangue periférico, por meio do ensaio cometa.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Doenças Gastrointestinais

O intestino humano é o habitat natural de uma população numerosa, diversa e dinâmica de microorganismos que compõe sua microbiota normal, constituída em sua maioria por bactérias que se adaptaram para viver nas superfícies da mucosa gastrointestinal, dito isto, um conhecimento detalhado da microbiota intestinal é de fundamental importância para a determinação do papel que possíveis alterações neste ambiente possa promover no desenvolvimento de certas doenças, onde muitas resultam, em sua maioria, da alteração na microbiota intestinal, estes incluem infecção por *Helicobacter pylori*, que podem levar a gastrite, úlceras e outras complicações a exemplo do câncer gástrico (ALLUÉ, 2015).

A gastrite é classificada como uma inflamação da mucosa estomacal sendo uma condição clínica comumente associada com infecção local da mucosa gástrica pela bactéria *Helicobacter pylori*. Há estimativas de que a gastrite crônica está presente em cerca 37% dos adultos na forma assintomática. A incidência aumenta de acordo com a idade onde a maioria dos casos se associa pela infecção por *Helicobacter pylori* (KOHLER et al., 2010). A úlcera péptica é caracterizada por lesões pépticas ácidas no trato digestivo que resulta em rupturas na mucosa atingindo a submucosa, geralmente são encontradas no estômago ou duodeno proximal, mas também podem ser encontradas no esôfago ou no divertículo de Meckel, a prevalência ao longo da vida da úlcera péptica na população em geral foi estimada em cerca de 5-10% e incidência de 0,1- 0,3% ao ano. No entanto, a prevalência e a incidência da úlcera péptica são agora provavelmente menores do que essas estimativas em todo o mundo, especialmente em países desenvolvidos (LANAS; CHAN, 2017).

As úlceras gástricas são causadas, principalmente, pela ação prejudicial do ácido e da pepsina sendo um dos problemas de saúde mais importantes em todo o mundo. Normalmente, há um equilíbrio multifatorial (agentes defensivos, barreira de muco-bicarbonato, células epiteliais de superfície, regeneração da mucosa, circulação sanguínea, equilíbrio ácido-base) no estômago que atuam minimizando os efeitos de agentes prejudiciais, em geral ocasionado por *Helicobacter pylori* (KALAYCI et al., 2017).

O câncer gástrico é a décima quinta maior causa de morte por câncer. O número de mortes estimado foi de 3,3 em cada 100.000 homens e mulheres por ano, entre os anos de 2009 e 2013, onde o risco de desenvolver um câncer gástrico é de aproximadamente 0,9% sendo mais frequente homens do que mulheres, fatores como a idade, dieta e doenças de estômago, incluindo a infecção por *Helicobacter pylori*, podem aumentar o risco de desenvolver um câncer gástrico (HU et al., 2017; MARCUS; SUBRAMANIAM, 2017).

De acordo com o estudo EUROCORE-5, 4 de 5 pacientes com câncer gástrico na Europa morrem nos primeiros 5 anos após o diagnóstico, as opções de tratamento para pacientes com progressão metastática estão aumentando, nos últimos 5 anos foram disponibilizados vários novos fármacos com base em resultados de estudos positivos, incluindo drogas-alvo como o trastuzumab anticorpo monoclonal contra o sítio extracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) (OBERMANNOVÁ; LORDICK, 2017).

Apesar dos avanços nos métodos de cirurgia e intervenções mediadas por quimioterápicos e radioterapia, a melhora clínica do câncer gástrico continua a ser insatisfatória, principalmente por progredir para metástase recorrentemente. Portanto, torna-se necessária as pesquisas sobre o mecanismo molecular a cerca da progressão do cancer gástrico, e desenvolver novas estratégias terapêuticas de intervenção (LI et al., 2017).

Aproximadamente 50% de toda a população mundial é infectada por *H. pylori*, com uma prevalência de 30-40% nos países desenvolvidos e superior a 80% nos países em desenvolvimento. Na população com faixa etária inferior a 20 anos, a prevalência é de aproximadamente 80% em indivíduos residentes em países em desenvolvimento, superior à dos países desenvolvidos. Estas variações na prevalência de infecções por *H. pylori*, estão diretamente relacionadas a fatores sociodemográficos, especialmente em se tratando de indivíduos de baixas condições socioeconômicas (ALLUÉ, 2015).

3.2 Genotoxicidade

As análises no âmbito da genotoxicidade é um componente fundamental para avaliação da segurança de todos os tipos de substâncias, que vão desde produtos farmacêuticos, produtos químicos industriais, pesticidas, aditivos alimentares, cosméticos e medicamentos de uso veterinário, substâncias relevantes no contexto das legislações

internacionais que visam a protecção da saúde humana e animal (CORVI; MADIA, 2017; IRIONDO-DEHOND et al., 2017; NIKOLOVA; MARINI; KAINA, 2017).

A genotoxicidade é definido como o potencial que um produto químico possui, capaz de danificar o DNA, o que pode resultar em mutações hereditárias através de divisões celulares. Se não for devidamente reparado, tais mutações podem levar a carcinogênese através da activação de oncogenes e/ou inactivação de supressores tumorais (CHAPPELL; RAGER, 2017). A principal característica de carcinógenos genotóxicos é a sua capacidade de interagir directamente com o DNA para formar aductos covalentes que resultam em mutações e aberrações genéticas (TRYNDYAK, 2017).

3.3 Câncer

O câncer é definido como o crescimento desordenado de células, podendo invadir e se espalhar para locais distantes no corpo. O câncer pode levar a consequências graves para a saúde, sendo uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. Câncer de pulmão, próstata, colo-rectal, estômago e câncer de fígado são os tipos de câncer que comumente acomete os homens, enquanto mama, colorretal, pulmão, colo uterino e câncer de estômago são os mais comuns entre as mulheres. Cerca de 30% das mortes causadas por câncer poderiam ser prevenidas se evitar os fatores de risco, em especial o uso do tabaco. Atualmente, as opções de tratamento incluem cirurgia, quimioterapia e radioterapia, adaptadas para o estágio do tumor, o tipo e os recursos disponíveis. (WHO, 2016).

De acordo com o documento *World cancer report 2014* emitido pela International Agency for Research on Cancer (Iarc), da Organização Mundial da Saúde (OMS), é incontestável que o câncer é uma problemática de saúde pública, particularmente entre os países em desenvolvimento, onde estima-se que, em algumas décadas, o impacto causado pelo câncer sob a população corresponderá a 80% dos mais de 20 milhões de novos casos estimados para 2025 (WHO, 2014).

Segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer), estima-se que entre 2016 e 2017 o número de novos casos de câncer no Brasil alcance a marca de 600 mil pessoas acometidas pela doença à exceção do câncer de pele não melanoma (que se aproximará de 180 mil novos casos), advirão cerca de 420 mil novos casos de câncer, onde a prevalência de câncer de estômago no gênero masculino será de 6,0% e no gênero feminino de 3,7%,

(Figura 2). Os fatores que podem dar origem ao processo de iniciação das neoplasias, apesar de diversos, são comumente representados por: fatores hereditários e genéticos, idade, hábitos alimentares e sexuais, estilo de vida, fatores ambientais e ocupacionais, medicamentos, infecções virais e bacterianas, tabagismo, alcoolismo e radiações ultravioleta e ionizantes (INCA, 2015).

Figura 2. Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes para 2016 por sexo, exceto pele não-melanoma (INCA). Números arredondados para múltiplos de 10.

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%	Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%	Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%	Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%	Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: INCA, 2015.

3.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo está associado à patogênese de diversas doenças, causando danos a nível celular por reação de radicais livres com proteínas celulares, lipídios e DNA. O estresse oxidativo ocorre quando a quantidade de substâncias responsáveis pelo dano oxidativo excede a capacidade de neutralização do sistema antioxidante (LASKOSKI et al., 2016). A produção de radicais livres pode levar a mudanças no material genético resultando na morte celular. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são conhecidas por desempenhar um papel importante em muitos processos celulares, como sinalização e regulação celular, ativação de cascatas de sinalização e apoptose e caminhos alternativos de morte celular (WOŪNIAK et al., 2017). Certos agentes farmacêuticos possuem o potencial de induzir um estado de stress oxidativo, entretanto este efeito indesejável geralmente pode ser atenuado por mecanismos antioxidantes (WARD; HOFFMAN; LOO, 2015).

O estresse oxidativo não está relacionado apenas com à toxicidade das terapias oncológicas, mas também com a própria etiologia do câncer, isto é decorrente do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) entrando em conflito com o potencial neutralizador

antioxidante do organismo. No câncer, as ERO podem agir estimulando a proliferação celular intermediada por mutações danificando o DNA, ocasionando uma progressão tumoral. Entretanto, existe a possibilidade de prevenção da desordem entre as moléculas antioxidantes e pró-oxidantes através de nutrientes que em sua composição disponibilizam as vitaminas A (PR) e C (AA), que são capazes de neutralizar ERO. Deste modo, os nutrientes antioxidantes possuem ação benéfica tanto na prevenção do câncer quanto no seu tratamento, e sua ação é capaz de minimizar os efeitos colaterais relacionados à quimioterapia, (PORTANTIOLO et al., 2014). Entretanto, as defesas antioxidantes levam ao equilíbrio. As enzimas antioxidantes são componentes essenciais de defesa celular contra ERO, que estão continuamente gerados em células pelo metabolismo aeróbio e fontes exógenas, tais como pesticidas e outros tipos de poluição ambiental (DANAIEI; KARAMI, 2017).

3.5 Inibidores da Bomba de Prótons (IBP's)

Os medicamentos inibidores da bomba de prótons (IBP's) são os principais fármacos prescritos para o tratamento de enfermidades como esofagite de refluxo e úlcera duodenal, uma vez que apresentam poucos efeitos adversos quando sua administração é dada de forma correta, os IBP's passaram a ser usados para sintomas agudos e crônicos na prática clínica, ainda que seu uso à longo prazo seja bastante discutível (YANAGIHARA et al., 2015).

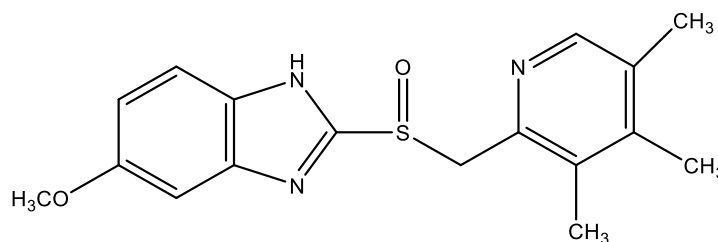
Os fármacos da classe IBP incluem o lansoprazol, esomeprazol, rabeprazol, pantoprazol e omeprazol. Atuam suprimindo a secreção ácida de modo mais eficaz que os fármacos antagonistas do receptor H₂, apresentando ampla utilização para o tratamento de esofagite de refluxo, lesões gastrointestinais causadas pelo uso de medicamentos antiinflamatórios não esteroidais, dispepsias, hipergastrinemia, na terapia para tratamento da infecção por *Helicobacter pylori*, úlcera péptica, úlcera gástrica, úlceras duodenais, entre outras patologias do trato gastrointestinal (WANNMACHER, 2004).

3.5.1 Omeprazol

O omeprazol OME, (**Figura 3**) é considerado o mais rápido IBP disponível, sendo utilizado no tratamento de distúrbios relacionados ao ácido gástrico por décadas, atuando como um PPI funcional por mais tempo do que qualquer outro IBP. O OME é um inibidor

da bomba de protons (IBP), a qual se liga covalentemente inibindo a enzima H⁺K⁺ATPase necessária para acidificação tubulovesicular na célula parietal. Isto reduz a produção de ácido e aumenta o pH do lúmen estomacal, que se revelou um importante mecanismo para o tratamento de gastrite (KOHLER et al., 2010). Além da sua ação antiácida, os efeitos metabólicos e moleculares da utilização de IBP's, principalmente quando utilizado à longo prazo, têm aumentado questionamentos de discussão substancial. Recentemente, IBP's têm sido relatados como possíveis agentes anti-proliferativos e moduladores de resistência, tanto em in vitro quanto in vivo. Entretanto, os efeitos inibitório ou promocional de IBP's para a inflamação gástrica e carcinogênese permanece controverso (PENG et al., 2014).

Figura 3. Estrutura química do omeprazol (OME).



3.6 As vitaminas Antioxidantes

A atividade antioxidante é a capacidade que um composto bioativo possui, fazendo com que a estrutura celular e suas funções funcionem de forma efetiva livrando-a de radicais livres, inibindo as reações de peroxidase lipídica, e impedindo outros danos oxidativos. Também exerce diversas outras funções biológicas, tais como anticâncer, anti-inflamatório e combate o envelhecimento precoce. Desta forma, é de grande importância a realização de estudos aprofundados sobre antioxidantes naturais, tais como aqueles provindos de frutas e hortaliças, que são de grande importância para a saúde humana. Frutos cítricos são ricos em fitoquímicos úteis, tais como as vitaminas A e C, elementos minerais, flavonóides, cumarinas, albuminóides, carotenóides, dentre outros compostos (ZOU et al., 2016).

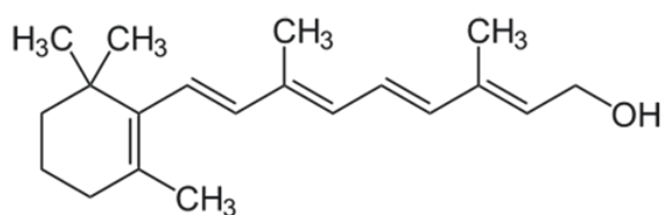
O desenvolvimento de novas formas analíticas capazes de determinar a atividade antioxidante ou até mesmo quantificar a presença de antioxidantes específicos em análises complexas como as de extratos vegetais, é justificada pela relevância farmacológica destes

aditivos, bem como pela importância da implantação de metodologias simples e baratas (PALANISAMY et al, 2011).

3.6.1 Palmitato de retinol

A vitamina A (**Figura 4**) é também conhecida como retinol, é uma das vitaminas solúveis em gordura que atua em uma série de processos fisiológicos incluindo a visão, o crescimento a hematopoiese, sistema imune e diferenciação celular. O PR é considerado como um importante micronutriente na dieta dos mamíferos e chega aos tecidos sob a forma de retinol. A vitamina A existe em três formas; retina, retinol e de ácido retinóico, entre os quais o ácido retinóico (AR) é o metabolito ativo da vitamina A, funciona como um bom agente antioxidante atuando contra o stress oxidativo no organismo animal, uma vez que neutraliza os radicais livres (BANALA; KARNATI, 2015).

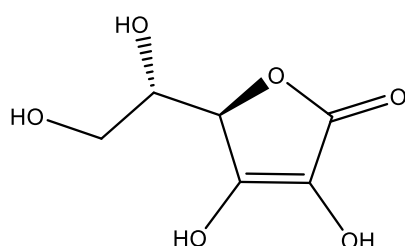
Figura 4. Estrutura química do palmitato de retinol.



3.6.2 Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico, vitamina C (**Figura 5**), é um importante suplemento para todos os animais, devido suas atividades no crescimento, formação de colágeno, metabolismo do ferro, respostas a estressores, cicatrização e resposta imune. A vitamina C também atua como um poderoso agente antioxidante capaz de proteger as lipoproteínas de baixa densidade contra a oxidação, reduz agentes oxidantes nocivos no estômago e promove a absorção de ferro atuando em diversas funções fisiológicas dos animais (ASAIKKUTTI; 2016).

Figura 5. Estrutura química do ácido ascórbico (AA).



4 MODELOS DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS PARA MONITORAMENTO CITOGENÉTICO DE FÁRMACOS

4.1 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* é um dos organismos eucarióticos mais simples e tem sido amplamente estudado, possui um ciclo de vida que dura cerca de 90 min e requer procedimentos de crescimento e manutenção pouco dispendiosa. Foi o primeiro eucariota a ter seu genoma sequenciado em 1996, que agora está disponível em plataformas on-line públicas, onde seus genes já estão atribuídos às vias bioquímicas correspondentes. Devido à grande quantidade de conhecimento genômico, os recursos e as ferramentas de manipulação associadas a este fungo unicelular, *S. cerevisiae* é considerado um excelente sistema na investigação dos mecanismos de resistência aos fármacos e toxicidade a nível celular, sendo bastante utilizada na procura dos mecanismos moleculares de algumas doenças que acometem os seres humanos e também na investigação de drogas antitumorais (VALERIO et al., 2014).

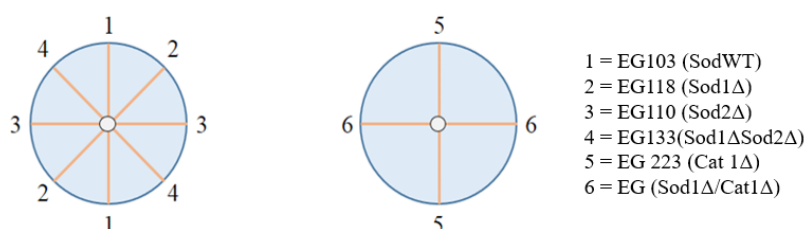
As células de *S. cerevisiae* são modelos celulares extremamente eficazes no estudo de vários produtos químicos, incluindo compostos antioxidantes e a utilização de linhagens celulares com defeitos nas defesas antioxidantes é extensamente empregada na pesquisa científica. As células de levedura são intensamente utilizadas por serem capazes de gerar espécies reativas de oxigénio (ROS) através dos mesmos mecanismos que as células de mamíferos, e expressar muitos dos mesmos fatores antioxidantes podendo, portanto, proporcionar um sistema adequado para a detecção rápida de vários compostos antioxidantes (OPREA et al., 2014).

Tabela 1: Descrição das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* a serem utilizadas no estudo.

Descrição	Genótipos	Origem		
EG103 (SodWT)	MAT α leu2 3, 112 his3 Δ 1, trp1 - 289 ura-3 52	Edith Angeles	Gralla	E, L
EG118 (Sod1 Δ)	EG103except sod1::URA3	Edith Angeles	Gralla	E, L
EG110 (Sod2 Δ)	EG103, exceto sod2:: TRP1	Edith Angeles	Gralla	E, L
EG133(Sod1 Δ Sod2 Δ)	EG103except sod1::URA3 sod2::TRP1	Edith Angeles	Gralla	E, L
EG 223 (Cat 1 Δ)	EG103except cat1::TRP1	Edith Angeles	Gralla	E, L
EG (Sod1 Δ /Cat1 Δ)	EG103except sod1::URA3cat1::TRP1	Edith Angeles	Gralla	E, L

As células em suspensão serão semeadas a partir do centro para a margem de uma placa de Petri em um ciclo contínuo, para ambos os lados da placa contendo no centro um disco de papel filtro estéril, no qual foi adicionado 100 μ L das concentrações de omeprazol isoladas e em associação com vitaminas antioxidantes e 5 μ L de H₂O₂ 10M (co-tratamento) será utilizado Como controle positivo para estresse oxidativo (**Figura 6**). Após 48hs de incubação em estufa a 30°C, será mensurado o halo de inibição do crescimento, sendo estes resultados tabelados e submetidos a tratamento estatístico.

Figura 6 - Posicionamento das linhagens utilizadas no ensaio com *S. cerevisiae*.



4.2 Teste *Allium cepa* e cometa de células vegetais

Os bioensaios utilizando plantas superiores têm sido propostos para avaliar, monitorar e detectar compostos tóxicos. Um mecanismo útil na pesquisa básica do potencial citotóxico e genotóxico de compostos químicos, substâncias complexas tais como extratos vegetais, rejeitos industriais e águas poluídas é o ensaio *Allium cepa*, elaborado por Levan em 1938 (GRANT, 1999). A *Allium cepa* L. é uma das espécies vegetais mais utilizadas em testes de toxicidade e genotoxicidade (FERNANDES, VENTURA, MARINMORALES, 2002; RIGONATO; JORDÃO, 2002).

Ao longo dos anos tem sido recomendado para análise toxicogenéticas o teste de *Allium cepa* L. (cebola comum) devido a sua sensibilidade a agentes tóxicos, baixo custo aquisitivo, bevidade, facilidade no preparo e manuseio, utilização de analitos sem tratamento prévio, determinando-se a citotoxicidade e genotoxicidade (LEME; MARIN-MORALIS, 2009). Por todo o mundo, laboratórios de pesquisa genética toxicológica, utilizam o bioensaio *A. cepa* com frequência por ser um mecanismo validado para a determinação de agentes tóxicos, existindo um grande acervo de dados sobre compostos químicos já testadas (FISKESJÖ, 1993 apud CUCHIARA; BORGES; BOBROWSKI, 2012).

Este bioensaio concede dois tipos de toxicidade: os parâmetros macroscópicos que demonstram formações de tumores, avaliações de crescimentos de raízes torcidas, entre outros, e parâmetros microscópicos, que revelam o índice mitótico, pela análise do índice de divisão celular, aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos, como indicadores de disfunções no DNA (MONARCA et al., 2000). O teste de *A. cepa* foi validado internacionalmente e tem sido utilizado como bioindicador de toxidade (EVSEEVA, GERAS´KIN, SHUKTOMOVA 2003), por ser um teste preliminar para avaliar o potencial genotóxico e citotóxico de substâncias cancerígenas atuando como um bioindicador potencial (BARBÉRIO, 2009). O protocolo de teste cometa em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* foi desenvolvido através de adaptações de Radić et al. (2010), Dhawan e Anderson (2009) e Silva et al. (2000).

4.3 Teste de Micronúcleo (MN)

O teste com Micronúcleo (MN) é considerado no meio científico como um importante biomarcador de genotoxicidade tanto *in vivo* como *in vitro*, usado principalmente na pesquisa epidemiologia molecular e citogenética avaliando danos causados pela exposição a agentes genotóxicos. O termo micronúcleo (MN), também

denominado corpúsculos de Howell-Jolly, foi introduzido no meio científico em 1951 que o descreve como sendo fragmentos acêntricos expulsos do núcleo principal durante as fases finais da anáfase. A formação de MNs pode si dar através de dois mecanismos: quebras cromossômicas (clastogênese) ou disfunções mitóticas (aneugênese). Assim, utilizarmos o anticorpo anti-cinetócoro é possível verificar se um determinado agente induz a formação de MN via clastogenese ou aneugene. A ausência de cinetócoro nos MNs indica ação clastogênica, considerando que sua presença indica ação aneugênica (ARALDI et al., 2015).

O teste MN, que é um ensaio citogenético capaz de detectar aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares. Ela tem sido usada como um método sensível em pesquisas de citotoxicidade demonstrado na forma de micronúcleos (MN) e binucleação (BN) (CIĞERCI et al., 2016). O teste é bastante utilizado para prever a mutagenicidade de produtos químicos, incluindo produtos farmacêuticos, *in vivo* ou *in vitro* (M.K et al., 2015). Baseia-se na quantificação dos cromossomas inteiros ou fragmentados que não são incorporados ao núcleo durante a mitose, devido a efeitos aneugênicos ou clastogênicos (ZAPATA et al., 2016).

Este método pode ser integrado a estudos toxicológicos gerais de dose repetida, uma vez que nenhum tratamento prévio é necessário para a análise em MN, o que ajuda a reduzir o número de animais experimentais sob o princípio da substituição, redução e refinamento de estudos com animais (TAKAYANAGI et al., 2015). Nos últimos anos, o ensaio de micronúcleo foi aceite como um biomarcador predominante em pesquisas de genotoxicidade. O micronúcleo é formado em células que são expostas a um agente genotóxico como uma consequência da indução de quebras na cadeia de DNA que resultam em aberração cromossômica. Além do micronúcleo, outras aberrações podem ser geradas, tais como brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas devem ser considerados quando se avalia o potencial genotóxico de uma determinada substância (TAUBÖCK et al., 2017).

4.4 Teste Cometa

A análise dos danos ao DNA é realizada em muitos campos da medicina, tais como toxicologia, farmacogenômica, oncologia, epidemiologia humana e biomonitoramento. Os danos ao DNA ocorrem devido à contínua exposição celular aos agentes exógenos e endógenos. As quebras formadas no DNA possuem potencial bloqueador da transcrição e

da replicação do DNA, e se eles não são reparados ou se são reparados de forma incorreta, pode levar a doença, tais como, Alzheimer, doença de Parkinson, câncer, envelhecimento precoce, diabetes mellitus, doença mental e doenças cardíacas. A análise dos danos que acometem o DNA, fornece valiosas informações a respeito dos primeiros efeitos biológicos dos produtos químicos. Portanto, a análise dos danos do DNA tem grande importância em pesquisas clínicas e há uma clara demanda para um método preciso, rápido e sensível na detecção de danos ao DNA (SREELATHA et al., 2015).

O teste do cometa, também conhecido como “single cell gel electrophoresis assay” (SCGE), é uma técnica sensível que usada para detecção de danos no DNA. Inicialmente, o processo envolveu apenas reações que ocorrem em condições neutras, permitindo apenas a detecção quebras de fita dupla no DNA. O aperfeiçoamento do ensaio para condições alcalinas resultou na detecção de danos de fita simples do DNA, no qual após inúmeras modificações levaram a um aumento significativo nas aplicações do ensaio (AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIECKA, 2015). O teste se revelou muito vantajoso fazendo com que esta técnica seja uma ferramenta valiosa, especialmente na pesquisa toxicológica e é amplamente aceito como uma técnica simples, rápida e de baixo custo. Vários tipos celulares podem ser utilizados no teste sem a necessidade de um conhecimento prévio estrutural do cariótipo e genoma. Apesar deste teste detecta apenas danos no DNA na forma de quebras de cadeia, suas modificações através de vários modelos experimentais, torna-o poderoso na averiguação de hipóteses (AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIECKA, 2015; LANIER et al., 2015).

No teste cometa, durante a eletroforese carregada negativamente, fragmentos do DNA migram para fora do núcleo, avançando para o ânodo adquirindo a forma de um cometa, assim foi dado o nome de cometa ao teste. Tal como um cometa possui regiões como cabeça e calda. Dependendo do nível de dano sofrido pelo DNA, o cometa passará a ter formato e tamanho diversificado. Desta forma o dano sofrido pelo DNA pode ser quantificado através da medição da porcentagem de DNA presente na cauda, e o comprimento da cauda resultante do arraste em eletroforese (SREELATHA et al., 2015).

REFERÊNCIAS

ALLUÉ, I. Polanco. Microbiota and gastrointestinal diseases. **Anales de Pediatría (english Edition)**, [s.l.], v. 83, n. 6, p.443-447, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anpede.2015.11.003>.

ARALDI, R. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: **A review. Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.

ASAIKKUTTI, A.; BHAVAN, P. S.; VIMALA, K.; KARTHIK, M. Effect of different levels dietary vitamin C on growth performance, muscle composition, antioxidant and enzyme activity of freshwater prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 229-236, 2016.

AUGUSTYNIAK, M.; GLADYSZ, M.; DZIEWIEĆKA, M. The Comet assay in insects—Status, prospects and benefits for science. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 767, p. 67-76, 2015.

BANALA, R. R.; KARNAATI, P. R. An oxidative stress marker in sodium fluoride (NaF) induced oxidative damage in developing rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 47, p. 298-303, 2015.

BARBÉRIO, A. Efeitos citotóxicos e genotóxicos no meristema radicular de *Allium cepa* exposta à água do rio Paraíba do Sul - estado de São Paulo – regiões de Tremembé e Aparecida. 2009. 98f. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - **Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 2009.

CHAPPELL, Grace A.; RAGER, Julia E. Epigenetics in chemical-induced genotoxic carcinogenesis. **Current Opinion In Toxicology**, [s.l.], v. 6, p.10-17, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cotox.2017.06.007>.

CIGĀRČI, Ī. et al. Genotoxicity assessment of cobalt chloride in *Eisenia hortensis* earthworms coelomocytes by comet assay and micronucleus test. **Chemosphere**, v. 144, p. 754-757, 2016.

CORVI, Raffaella; MADIA, Federica. In vitro genotoxicity testing—Can the performance be enhanced? **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 106, p.600-608, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.024>.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. S.; BOBROWSKI, V. L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Revista Tecnol. & Ciên. Agropec.** João Pessoa, v.6, n.1, p.33-38, mar. 2012.

DANAEI, Gholam Hassan; KARAMI, Mohammad. Protective effect of thymoquinone against diazinon-induced hematotoxicity, genotoxicity and immunotoxicity in rats. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 55, p.217-222, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.09.002>

DHAWAN, A.; ANDERSON, D. Issues in toxicology: the comet assay in toxicology. Cambridge: **The Royal Society of Chemistry**, 2009. v. 5.

EVSEEVA, T.I.; GERAS'KIN, S.A.; SHUKTOMOVA, I.I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium-test*. **Journal of Environmental Radioactivity**, Oxford, v. 68, p. 235-248, 2003

FERNANDES, T.C.C.; VENTURA, B.C.; MARINMORALES, M.A. **O uso do teste de micronúcleo na detecção de genotoxicidade do herbicida Trifluralina, utilizando células meristemáticas de *Allium cepa***. Resumos do 48º Congresso Nacional de Genética CD Rom. 2002.

GRANT, W.F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

HU, Yongbo et al. LncRNA-SNHG1 contributes to gastric cancer cell proliferation by regulating DNMT1. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 491, n. 4, p.926-931, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.137>.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2014**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>.

IRIONDO-DEHOND, Amaia et al. Validation of coffee silverskin extract as a food ingredient by the analysis of cytotoxicity and genotoxicity. **Food Research International**, [s.l.], v. 100, p.791-797, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.012>.

KALAYCI, Mehmet et al. Comparison of the therapeutic effects of sildenafil citrate, heparin and neuropeptides in a rat model of acetic acid-induced gastric ulcer. **Life Sciences**, [s.l.], v. 186, p.102-110, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.013>.

KLENIEWSKA, Paulina; PAWLICZAK, Rafał. The participation of oxidative stress in the pathogenesis of bronchial asthma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 94, p.100-108, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.066>.

KOHLER, Jonathan E. et al. Antioxidant pre-treatment prevents omeprazole-induced toxicity in an in vitro model of infectious gastritis. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 49, n. 5, p.786-791, 1 set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.034>.

LANAS, Angel; CHAN, Francis K L. Peptic ulcer disease. **The Lancet**, [s.l.], v. 390, n. 10094, p.613-624, ago. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)32404-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(16)32404-7).

LANIER, C. et al. The comet assay in higher terrestrial plant model: **Review and evolutionary trends. Environmental Pollution**, v. 207, p. 6-20, 2015.

LASKOSKI, Luciane Maria et al. Oxidative stress in hoof laminar tissue of horses with lethal gastrointestinal diseases. **Veterinary Immunology And Immunopathology**, [s.l.], v. 171, p.66-72, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.008>.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LI, Yanliang et al. LncRNA ZEB1-AS1 predicts unfavorable prognosis in gastric cancer. **Surgical Oncology**, [s.l.], p.0-1, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.suronc.2017.09.008>.

M.K., Praveen Kumar et al. The effect of gamma radiation on the Common carp (*Cyprinus carpio*): In vivo genotoxicity assessment with the micronucleus and comet assays. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 792, p.19-25, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.08.005>.

MAGDY, B. Wilson et al. Ameliorative effect of antioxidants (vitamins C and E) against abamectin toxicity in liver, kidney and testis of male albino rats. **The Journal Of Basic & Applied Zoology**, [s.l.], v. 77, p.69-82, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobaz.2016.10.002>.

MARCUS, Charles; SUBRAMANIAM, Rathan M. PET/Computed Tomography and Precision Medicine. **Pet Clinics**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.437-447, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpet.2017.05.004>.

MONARCA, S.; FERETTI, D.; COLLIVIGNARELLI, C.; GUZZELA, L.; ZERBINI, I.; BERTANZA, G.E.; PEDRAZZANI, R. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Research**, Londres, v. 34, n.17, p. 4261-4269, 2000.

NIKOLOVA, Teodora; MARINI, Federico; KAINA, Bernd. Genotoxicity testing: Comparison of the γ H2AX focus assay with the alkaline and neutral comet assays. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 822, p.10-18, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.07.004>.

OBERMANNOVÁ, Radka; LORDICK, Florian. Management of Metastatic Gastric Cancer. **Hematology/oncology Clinics Of North America**, [s.l.], v. 31, n. 3, p.469-483, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2017.01.006>.

OPREA, E.; RUTA, L. L.; NICOLAU, I.; POAP, C. V.; NEAGOE, A. D.; Vaccinium corymbosum L. (blueberry) extracts exhibit protective action against cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Food Chemistry**, v. 152, p. 516-521, 2014.

PALANISAMY, P. et al. Evaluation of anti-oxidant and anti-diabetic activities of *Cinnamomum tamala* linn leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Research Journal Of Pharmacy**, v. 2, n. 12, p. 157-162, 2011.

PENG, Y. et al. Interaction of omeprazole and Helicobacter pylori-induced nuclear factor- κ B activation and mediators in gastric epithelial cells. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 77, n. 11, p. 567-572, 2014.

PORTANTIOLO, T. et al. Consumo de Vitaminas Antioxidantes por Mulheres com Câncer de Mama submetidas ao Tratamento Quimioterápico na Cidade de Pelotas-RS. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n. 4, p. 323-329, 2014.

RADIĆ, Sandra et al. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the Allium cepa test. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 408, n. 5, p.1228-1233, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.055>.

RIGONATO, J.; JORDÃO, B.Q. **Uso do teste de Allium na avaliação de amostras ambientais**. Resumos do 48º Congresso Nacional de Genética – CD Rom. 2002.

SAMET, James M.; WAGES, Phillip A. Oxidative Stress from Environmental Exposures. **Current Opinion In Toxicology**, [s.l.], p.1-22, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.008>.

SILVA, Juliana da et al. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetics And Molecular Biology**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.241-245, mar. 2000. <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-47572000000100042>.

SREELATHA, G. et al. Quantification of DNA damage by the analysis of silver stained comet assay images. **IRBM**, v. 36, n. 5, p. 306-314, 2015.

TAKAYANAGI, T. et al. Repeated dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays using N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in young adult rats. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 780-781, p. 100-106, 2015.

TAUBÖCK, Tobias T. et al. Genotoxic potential of dental bulk-fill resin composites. **Dental Materials**, [s.l.], v. 33, n. 7, p.788-795, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2017.04.011>.

TRYNDYAK, Volodymyr P. Role of epigenetics in tumor induction by non-genotoxic carcinogens. **Current Opinion In Toxicology**, [s.l.], v. 6, p.42-49, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cotox.2017.08.004>.

VALERIO, E.; VILARES, A.; CAMPOS, A.; PEREIRA, P.; VASCONCELOS, V. Effects of microcystin-LR on Saccharomyces cerevisiae growth, oxidative stress and apoptosis. **Toxicon**, v. 90, p. 191-198, 2014.

WANNMACHER, L. Inibidores da bomba de prótons: indicações racionais. **Brasília**, v.2, n.1, dez. 2004.

WARD, William M.; HOFFMAN, Jared D.; LOO, George. Genotoxic effect of ethacrynic acid and impact of antioxidants. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 286, n. 1, p.17-26, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2015.03.016>.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

WHO. **World Health Organization**. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2016.

WOŪNIAK, Anna et al. In vitro genotoxicity and cytotoxicity of polydopamine-coated magnetic nanostructures. **Toxicology In Vitro**, [s.l.], v. 44, p.256-265, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.022>.

YANAGIHARA, G. et al. Efeitos da administração em longo prazo do omeprazol sobre a densidade mineral óssea e as propriedades mecânicas do osso. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 50, n. 2, p. 232-238, 2015.

ZAPATA, L. et al. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 108-116, 2016.

ZOU, Z. et al. Antioxidant activity of Citrus fruits. **Food Chemistry**, v. 196, p. 885-896, 2016.

Capítulo I

Toxicogenética do omeprazol e sua associação com ácido ascórbico e palmitato de retinol em sarcoma – 180 e *Saccharomyces cerevisiae*

Artigo submetido à Revista: Toxicon

Qualis: B1 para Farmácia

Antonio Lima Braga, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Rai Pablo Sousa de Aguiar, Lara Arrais Chaves Cronemberger, Milena Braga Soares da Silva, Rosália Maria Torres de Lima, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, João Marcelo ³, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Toxicogenética do omeprazol e sua associação com ácido ascórbico e palmitato de retinol em sarcoma – 180 e *Saccharomyces cerevisiae*

Antonio Lima Braga, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Rai Pablo Sousa de Aguiar, Lara Arrais Chaves Cronemberger, Milena Braga Soares da Silva, Rosália Maria Torres de Lima, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, João Marcelo ³, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

¹Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica, LAPGENIC - Universidade Federal do Piauí, UFPI, Ininga, CEP: 64.049-550, Teresina/PI – Brasil. E-mail: tonny.L.b@hotmail.com

²Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brasil

³Departamento de Farmácia, Southern University Bangladesh, Mehedibag, Chittagong 4000, Bangladesh.

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Piauí, Picos, (Piauí), 64.607-670, Brasil.

RESUMO

O omeprazol, inibidor da bomba de prótons, oxida grupos tióis e induz danos ao DNA. O estudo objetivou avaliar os efeitos oxidativos do omeprazol e suas interações com o ácido ascórbico e com o palmitato de retinol em *Saccharomyces cerevisiae*, proficientes e mutadas em defesas antioxidantes, bem como os níveis de danos citogenéticos para os biomarcadores: micronúcleos, brotos, pontes, cariorrexe e cariólises, em células neoplásicas de Sarcoma 180, pelo teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese. O omeprazol foi testado nas concentrações de 10, 20 e 40 µg/mL, tendo como controles positivos, o H₂O₂ (10 mM) e ciclofosfamida (20 µg/mL); e negativo (solução salina 0,9%). O omeprazol, nas concentrações testadas, induziu efeitos oxidativos na maioria das linhagens de *S. cerevisiae*, mas o co-tratamento com o ácido ascórbico (2,0 µM/mL) e com o palmitato de retinol (100 UI/mL), modulou significativamente os danos oxidativos citoplasmáticos e mitocondriais, exceto para a linhagem mutada em superóxido dismutase mitocondrial e duplo mutantes. Entretanto, a interação com o ácido ascórbico e o palmitato, particularmente para a maior concentração, não foi efetiva na modulação dos danos oxidativos induzidos pelo omeprazol para todas as linhagens testadas. O omeprazol não induziu em células tumorais de Sarcoma 180 a formação de micronúcleos e pontes, mas induziu brotos. Porém, foram observados indicativos de apoptoses pelo aumento significativo de cariorrexe e cariólise, por diversos mecanismos, incluindo possivelmente os relacionados ao estresse oxidativo, que foram modulados pelo ácido ascórbico e pelo palmitato de retinol isolados. Por outro lado, a interação dos antioxidantes sugeriu possíveis efeitos pró-apoptóticos. O estudo aponta perspectivas de pesquisas relacionadas com a interação de antioxidantes em terapias com omeprazol, com foco para seus efeitos antagônicos.

Palavras-chave: Omeprazol. Antioxidantes. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Omeprazole, a proton pump inhibitor, oxidizes thiol groups and induces DNA damage. The objective of this study was to evaluate the oxidative effects of omeprazole and its interactions with ascorbic acid and retinol palmitate in *Saccharomyces cerevisiae*, proficient and mutated in enzymatic defenses, as well as cytogenetic damage levels for the biomarkers: micronuclei, shoots, cariorolysis and karyolysis in neoplastic cells of Sarcoma 180 by the micronucleus test with block of cytokinesis. Omeprazole was tested at concentrations of 10, 20 and 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$, with H_2O_2 (10 mM) and cyclophosphamide (20 $\mu\text{g} / \text{mL}$) as positive controls; and saline as negative control (0.9%). Omeprazole, at concentrations tested, induced oxidative effects in most *S. cerevisiae* strains, but co-treatment with ascorbic acid (2.0 $\mu\text{M} / \text{mL}$) and retinol palmitate (100 IU / mL) significantly modulated cytoplasmic and mitochondrial oxidative damage, except for the mutated line in mitochondrial and double mutant superoxide dismutase. However, the interaction with ascorbic acid and palmitate was not effective, especially for the highest concentration, in the modulation of oxidative damage induced by omeprazole for all tested strains. Omeprazole did not induce sarcoma 180 tumor cells to form micronuclei and bridges, but induced buds. Nevertheless, indications of apoptosis were observed for the significant increase of karyorrhexis and karyolysis by several mechanisms, possibly including those related to oxidative stress, which were modulated by ascorbic acid and retinol palmitate alone. Indeed, the interaction of antioxidants suggested possible pro- apoptotic. The study points out research perspectives related to the interaction of antioxidants in omeprazole therapies, with caution for the antagonistic effects.

Keywords: Omeprazole. Antioxidants. Oxidative stress.

1 introdução

No tratamento de distúrbios gastrointestinais são usados inúmeros medicamentos de forma intermitente ou prolongada, a exemplo de Inibidores da Bomba de Prótons (IBP's) prescritos, em sua maioria, sem qualquer conhecimento de seus efeitos tóxicos ou interações medicamentosas. As drogas utilizadas podem causar danos genotóxicos e/ou efeitos carcinogênicos; e, por isso, devem ser consideradas na avaliação do benefício diante do risco (DOWNES; FOSTER et al, 2015).

O omeprazol (OME), protótipo inibidor da bomba de prótons, tem seu mecanismo de ação relacionado à oxidação de grupos tióis. A partir do ambiente ácido provido pela célula parietal, o omeprazol é convertido em sulfenamida tiofílica. Com a ativação seletiva e covalente com a H^+/K^+ ATPase, em particular da cisteína 813 extracelular, realiza a inibição potente da secreção de ácido gástrico e desencadeia uma alteração da flora estomacal. Em nível bioquímico, essa hipocloridria ou acloridria desencadeia a formação de N-nitrosaminas, que podem induzir danos ao DNA e provocar a síntese de alterações nucleares, como micronúcleos, picnose e cariorrexe (NOVOTNA et al, 2014).

Estudos para avaliar a associação de substâncias antioxidantes, como vitamina A e C, com o omeprazol sugerem que um antioxidante não-tiol pode antagonizar os efeitos tóxicos de omeprazol, tanto isoladamente, como em um modelo a nível celular de estresse oxidativo induzido por gastrite. Dessa forma, segundo Kohler e colaboradores (2010), certas concentrações de ácido ascórbico (AA) teriam efeito protetor sobre a ação tóxica do uso prolongado de omeprazol e na modulação de efeitos terapêuticos desejados.

Eventos de genotoxicidade já são estabelecidos como passos cruciais na iniciação do câncer (KANG et al, 2013), que ainda hoje é um desafio para a saúde humana e uma das principais causas de morte no mundo. Para avaliar o risco de câncer, ensaios toxicogenéticos, que incluem o teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese, reconhecido como teste robusto e sensível na detecção de eventos clastogênicos/aneugênicos em células expostas a agentes genotóxicos, os quais podem ser considerados como biomarcadores para mutagenicidade (ARALDI et al, 2015).

Os biomarcadores toxicogenéticos, na avaliação de danos ao DNA induzidos pelos fármacos, são determinantes quantificáveis de eventos biológicos que permitem a predição de anormalidades nucleares indicativas de neoplasias, a exemplo do teste de micronúcleos (MN), capaz de evidenciar danos cromossômicos causados por agentes mutagênicos em modelos “*in vivo*”, “*ex vivo*” e “*in vitro*”. Algumas variações da técnica, como o teste de

micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN), evidenciam alterações citogenéticas (micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos celulares), e morte celular por apoptose e necrose. Estes eventos celulares são úteis na avaliação de riscos de instabilidade genética (FENECH, 2007).

Instabilidades genômicas podem ser induzidas por uma variedade de agentes prejudiciais, que formam complexos com o DNA, ocasionando quebras de cadeia dupla. Fármacos que induzem a formação de radicais livres e consequente estresse oxidativo são exemplos clássicos destes efeitos deletérios ao material genético. As Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) são poderosos agentes que danificam o DNA, causando rupturas, alterações em bases de guanina e timina e translocações entre cromátides irmãs. Os danos ocasionados pelas ERO's podem ser potencializados ou minimizados a partir dos mecanismos de defesas antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos. Enzimas tais como a superóxido dismutase (SOD), que está presente no citosol e na mitocôndria, catalisa a dismutação do ânion superóxido (O_2^-) em H_2O_2 . Esta enzima está presente na célula em sua isoforma com diferentes grupos prostéticos: isoforma SOD-cobre-zinco citosólica e a SOD-manganês mitocondrial (BARBOSA et al, 2010).

Um dos modelos fundamentais para a avaliação e caracterização da morte celular, a *Saccharomyces cerevisiae*, um sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo, tornou-se a levedura mais utilizada em testes biológicos (CASTRO et al, 2011). A maquinaria apoptótica nuclear é bastante conservada neste organismo e o metabolismo é similar ao dos eucariotos superiores, com mecanismos apropriados de ativação metabólica (citocromo P450) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias. A avaliação da capacidade antioxidante pode ser realizada pela medida da sobrevivência de células tratadas com o antioxidante e agentes estressores (TEIXEIRA; GUARIENT, 2010).

Sarcoma 180 é uma neoplasia pouco diferenciada advinda de um tumor originado em camudongos, em que uma das linhagens de células é utilizada para investigações relacionadas com atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* (FERREIRA et al, 2015; LIMA et al, 2014; XIE et al, 2014; ITO et al, 1997). Os sarcomas são um grupo de tumores heterogêneos que se distinguem por aberrações moleculares tais como mutações, deleção intergenes, ampliações de genes e translocações, o que os torna fundamentais para o entendimento da biologia molecular do câncer (QUESADA; AMATON, 2012).

As alterações na mucosa estomacal induzidas pelo omeprazol amplificam o estresse oxidativo induzido por gastrite, podendo lesionar as células da mucosa gástrica (KOHLENER et al, 2010). Assim, o estudo teve por objetivo avaliar os possíveis efeitos oxidativos do

omeprazol e sua associação com o ácido ascórbico e o palmitato de retinol em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e deficientes em defesas antioxidantes; e alterações toxicogênicas em modelo de Sarcoma 180, com aplicação do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.

2 Metodologia

Tipo de Pesquisa

Trata-se de um estudo experimental de caráter analítico descritivo, no qual foram utilizadas seis linhagens de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e deficientes em defesas antioxidantes, e em modelos de sarcoma 180 com aplicação dos testes do disco central com leveduras e do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.

Local da Pesquisa

O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, situado no Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, CEP: 64049-550, Teresina/PI – Brasil.

Agentes Químicos

O omeprazol foi obtido da Medley Indústria Farmacêutica Ltda e solubilizado em dimetilsulfóxido 5% até as concentrações finais de 10, 20 e 40 µg/mL. O peróxido de hidrogênio foi obtido da ISOFAR Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda e diluído em água destilada até a concentração final de 10 mM. O ácido ascórbico foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e solubilizado em tampão fosfato (pH. 6.8) até a concentração final de 2,0 µM/mL. Procedeu-se a solubilização do Palmitato de Retinol, manipulado em farmácia de manipulação, até a concentração de 100 UI/mL, em solução fisiológica 0,9% acrescido de Dimetilsulfoxido (DMSO) a 10%.

Teste em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Foram utilizadas linhagens de *S. cerevisiae* (**Tabela 1**) proficiente e deficientes em defesas antioxidantes (EG118, EG110, EG133 e EG103). A linhagem EG118 é defectiva no sistema enzimático que envolve a enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD - produto do gene SOD1), enquanto a EG110 apresenta mutação na SOD mitocondrial (MnSOD - produto do gene SOD2); EG133 é o duplo mutante, defectivo para Sod1 Δ e Sod2 Δ ; e EG103 corresponde à linhagem selvagem (SODWT), portanto proficiente nestas enzimas. As linhagens foram cultivadas em meio YEL a 28 °C em agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária, de acordo com Moraes e colaboradores (2016). Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem de uma placa de Petri com meio de cultura YEPD, em um ciclo contínuo e em duplicata, para ambos os lados da placa contendo, no centro, um disco de papel de filtro estéril, no qual foi adicionado omeprazol (10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$), de forma isolada e em co-tratamento com as vitaminas A (100 UI/mL) e C (2,0 $\mu\text{M/mL}$). As placas foram cultivadas em estufa a 30°C \pm 1°C por 48 h. Ao final do período de incubação, os halos de inibição de crescimento leveduriformes foram mensurados em milímetros (mm) e os dados inseridos em programa estatístico (**Tabela 1**).

Tabela 1. Descrição e posicionamento das linhagens de *S. cerevisiae* usadas no estudo.

EG103 (SODWT)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	Edith Gralla, L Angeles
EG118 (Sod1 Δ)	sod1::URA3 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG110 (Sod2 Δ)	sod2::TRP1 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG133 (Sod1 Δ Sod2 Δ)	sod1::URA3 sod2::TRP1 double mutant all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG223 (Cat1 Δ)	EG103, except cat1:: TRP1	Edith Gralla, L Angeles
EG (Sod1 Δ Cat1 Δ)	EG103, except sod1:: URA3 and cat1:: TRP1	Edith Gralla, L Angeles

Modelo de Sarcoma 180

Os experimentos de manutenção do tumor Sarcoma 180 em camundongos *Mus musculus* foram iniciados sob a aprovação prévia pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI, com documento comprobatório de número 081/14. As células tumorais do Sarcoma 180 foram mantidas em camundongos por meio de passagens intraperitoneais semanais. O líquido ascítico, com células de Sarcoma 180 germinadas por 7 a 9 dias, foi aspirado da cavidade intraperitoneal em condições assépticas e centrifugado (500 g, 5 min, 4° C) para obtenção do *pellet* celular. A concentração celular para a cultura em RPMI foi ajustada a 0.5×10^6 células/mL (FERREIRA, 2011). Em frascos de cultura contendo 1 mL de meio RPMI suplementados com soro fetal bovino (20%), aminoácidos, antibióticos (Sigma, St. Louis, MO) e fitohemaglutinina A (Gibco, Grand Island, NY) foram adicionados 20 μ L de suspensão celular de Sarcoma 180 (0.5×10^6 /mL).

Viabilidade celular por meio do teste de exclusão por azul de Tripán

A viabilidade celular foi analisada com a aplicação do teste de exclusão por azul de Tripán de acordo com Renzi e colaboradores (1993). As células sem tratamento foram usadas para a aplicação da técnica após 72 horas, onde 90 μ L da suspensão de células (1:20) foram retirados das culturas e acrescidos de 10 μ L do azul de Tripán. As células não viáveis foram contadas por sua coloração azulada, sendo consideradas como células mortas. Em oposição, as células viáveis não apresentam esta coloração devido às suas capacidades de expulsarem o azul de Tripán. As diferenciações celulares foram observadas em microscopia óptica com o aumento de 400X, com o auxílio da câmara de Neubauer.

Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese

Para este estudo, os critérios para a identificação de alterações citogenéticas do ensaio foram descritos por Fenech (2007). Suspensão de células de Sarcoma 180 ($0,5 \times 10^6$ /mL) foi adicionada em placas com poços contendo meio RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino, glutamina 2 mM, 100 UI/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY), incluindo fitohemaglutinina A (Gibco, Grand Island, NY). Em seguida, aos poços foi adicionado omeprazol (20 e 40 μ g/mL), de forma isolada e em co-tratamento com as vitaminas A (100 UI/mL) e C (2,0 μ M/mL). As células foram incubadas durante 44 h a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, com atmosfera de 5% de CO_2 . Após a

incubação, 6 $\mu\text{g/mL}$ de citocalasina B (Sigma, St. Louis, MO) foram adicionados às culturas. As placas foram mantidas em estufa por mais 28 h. No final destas duas fases de incubação, as culturas foram centrifugadas a 800 rpm durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e os sedimentos celulares foram suavemente agitados com 5 mL de solução fixadora (metanol: ácido acético, 5:1) e 2 gotas de formaldeído. Depois de processos de centrifugação e fixação (metanol: ácido acético, 3:1), o sobrenadante foi descartado e 2 a 4 gotas de suspensão de células foram gotejadas em lâminas e coradas com Giemsa 5%. As lâminas previamente codificadas foram examinadas em um teste cego por meio de microscópio óptico (1000X) e um total de 1000 células/lâminas em duplicatas foram analisadas quanto aos eventos citogenéticos de micronúcleos, brotos nucleares, pontes nucleoplásmicas, apoptose e necrose.

Análise estatística

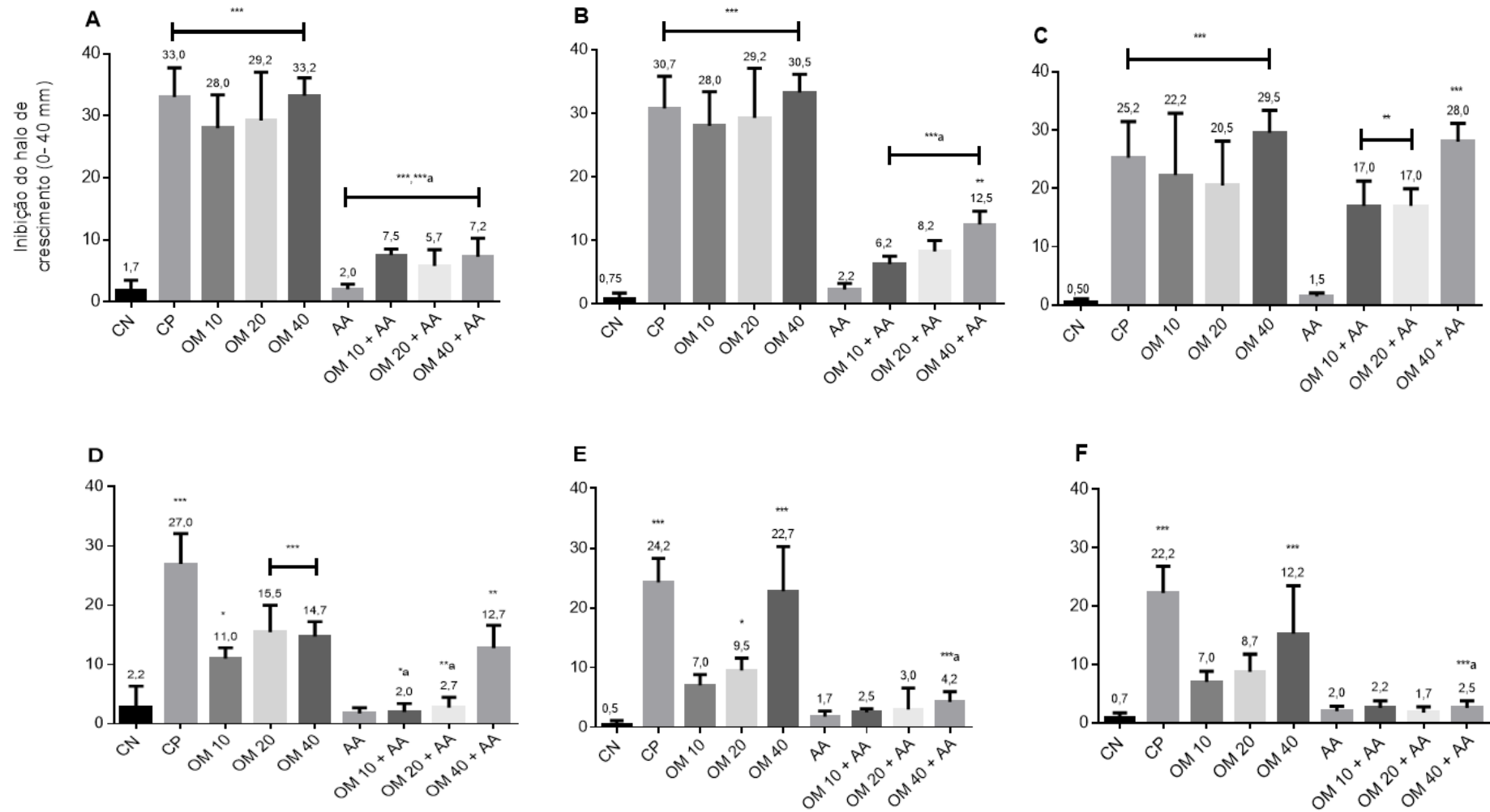
Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão da média e comparados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni, como post hoc teste, usando GraphPad Prism (versão 6.0) considerando valores significantes de $p < 0,05$.

3 Resultados e Discussão

Avaliação oxidativa do OME e os efeitos do AA e do PR

A oxidação promove a produção de energia necessária para as atividades das células, mas desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e radicais livres, dentre eles, ânions superóxidos (O_2^-), radicais hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que desencadeiam danos a macromoléculas como, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos podendo desencadear mutações ao DNA, oxidação de proteínas e peroxidação de lipídios e dano celular (BARBOSA et al, 2010). O OME induziu danos oxidativos para a maioria das linhagens proficientes (SODWT) e mutadas para a enzima superóxido dismutase citoplasmática (Sod1 Δ), mitocondrial (Sod2 Δ) e duplo mutante Sod1 Δ Sod2 Δ . Entretanto, o co-tratamento com o antioxidante ácido ascórbico (AA) modulou, significativamente, a oxidação induzida pelo OME nas concentrações testadas, exceto para a Sod2 Δ (**Figura 1**).

Figura 1. Avaliação oxidante do omeprazol (10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$) e os efeitos do ácido ascórbico em *S. cerevisiae*: SODWT (A); Sod1 Δ (B); Sod2 Δ (C); Sod1 Δ Sod2 Δ (D), Cat1 Δ (E); Sod1 Δ Cat1 Δ (F). CN (salina 0,9%), AA (ácido ascórbico 2,0 $\mu\text{M/mL}$) e CP – H₂O₂ (10 mM/mL). ANOVA, *Bonferroni* como *post hoc* teste. **: *** Significante para CN e ***a para concentração correspondente ao OME.



Esses resultados com a Sod2 Δ podem, possivelmente, indicar a inativação de substâncias antioxidantes, em virtude da alteração do pH induzida pelo OME, conforme estudo de Mowat e colaboradores (2001). O AA não permitiu a oxidação pelo OME nas linhagens Cat1 Δ (A); Sod1 Δ Cat1 Δ (**Figura 1**). O ácido ascórbico pode interagir com radicais livres, sequestrando-os e prevenindo a oxidação e o dano ao DNA, além de ser capaz de modular o sistema enzimático que gera radicais livres e promover o aumento da atividade da SOD, como doador de elétrons e agente redutor em várias reações biológicas no corpo prevenindo a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (ESTEVINHO et al, 2016; GONZÁLEZ-FUENTES et al, 2015).

O AA é um antioxidante que pode atuar na inibição e sequestro de radicais livres e a complexação com metais (KUMAR; MAURYA et al, 2016; ZHAO et al, 2015), como também na redução da peroxidação lipídica e aumento dos níveis de enzimas antioxidantes (MILITÃO; FERREIRA; FREITAS et al, 2010). No entanto, a inibição dessas enzimas, menor produção ou menor atividade podem promover um desequilíbrio nos níveis de radicais livres e ERO's e provocar danos ao DNA, desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica e até mesmo morte celular. Dessa forma, as enzimas antioxidantes desempenham uma importante função na proteção e homeostase celular (HE et al, 2015; JIANG et al, 2015; JIANG et al, 2015; MARCHI et al, 2015; WU et al, 2014).

A exemplo desses resultados, em modelos experimentais *in vivo*, foi observado que em tratamento com o OME, a maior parte do AA se encontra na forma oxidada inativa, ácido desidroascórbico; porém, a razão para isso ainda não está totalmente esclarecida (MOWAT et al, 1999). A medida que o pH aumenta, o ácido ascórbico se torna mais susceptível à oxidação para a forma ativa, passando a ter sua ação antioxidante, ou seja, protetora contra os danos oxidativos do OME. Outros estudos *in vitro* destacam que o AA é instável em ambientes de acidorria ou neutros e é irreversivelmente degradado a metabólitos inativos (MOWAT et al, 2001).

Em estudos experimentais em coelhos, o uso do omeprazol induziu aumento da renovação das células parietais, além da acumulação de células inflamatórias crônicas (KARAM et al, 1994). Estes efeitos foram atribuídos a atividades pró-inflamatórias mediadas por colecistocinina B (CCK-2) de hipergastrinemia, compensatória, em resposta à diminuição da produção de ácido, gerando danos. Estudos clínicos sugerem que a exposição ao omeprazol amplifica a lesão celular causada por NH₂Cl, porém a toxicidade poderia ser revertida usando uma terapia antioxidante (ALVAREZ et al, 2007; KOHLER et al, 2010). Entre os suplementos antioxidantes mais utilizados estão o palmitato de retinol e ácido

ascórbico, respectivamente. De acordo com Fadel e colaboradores (2011), a suplementação com esses antioxidantes garante o equilíbrio de espécies reativas de oxigênio, com modulação do estresse oxidativo, como observado em nossos estudos (MORAES et al, 2016).

O co-tratamento com palmitato de retinol (PR) modulou significativamente os danos induzidos pelo OME, não oxidando na linhagem proficiente (SODWT) nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$, na *Sod1 Δ Sod2 Δ* e na *Sod1 Δ Cat1 Δ* em 10 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 2**).

Como observado na **Fig 2**, o OME, na concentração de 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$, induziu estresse oxidativo em linhagens mutadas para catalase. Os medicamentos contribuem para a elevação dos níveis de estresse oxidativo (HERBET et al, 2016; ALMENARA et al, 2015; PORTO et al, 2015). O PR demonstra seus importantes efeitos na inibição de danos oxidativos, assim como na prevenção e tratamento do câncer. O PR representa um composto antioxidante de natureza hidrofóbica. Este micronutriente é um aldeído originado a partir de conformações químicas do retinol, um álcool eficaz no combate a ERO's (MORAES et al, 2016).

O PR tem ação preventiva para certos tipos de cânceres, devido sua eficiência na diferenciação celular e regulação de apoptose. Isso porque são capazes de atrasar ou inibir a oxidação, diminuindo a concentração de radicais livres no organismo podendo, assim, atuar na prevenção do câncer, mas também reduzir os efeitos dos antineoplásicos (WANG, 2014). Como descrito, o AA e o PR apresentaram efeitos modulatórios de danos oxidativos induzidos pelo OME em linhagens proficientes e mutadas em defesas antioxidantes. O estudo também avaliou a interação entre esses antioxidantes nos efeitos oxidantes do OME. Os dados apresentados na **Fig 3** apontam que a interação ente AA e PR resultou em efeitos não esperados, especialmente para a concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, onde foi observado que a oxidação do OME não foi modulada. Entretanto, modulou os danos oxidativos induzidos nas linhagens SODWT e *Sod1 Δ Sod2 Δ* , e o importante aspecto de inibir os danos do OME nas linhagens *Cat1 Δ* e *Sod1 Δ Cat1 Δ* (**Figura 3**). Em síntese, o AA inibiu a oxidação do OME e modulou, significativamente, os danos oxidativos do OME com percentuais acima de 70%, para a maioria das linhagens testadas; e, principalmente, nas menores concentrações, exceto para a linhagem *Sod2 Δ* . De forma similar, o PR permitiu a não oxidação do OME, especialmente para as linhagens *Cat1 Δ* e *Sod1 Δ Cat1 Δ* . A interação entre os antioxidantes apresentou em sua maioria menores percentuais de modulação e não significantes, como

também não modulação para OME na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, e não modulou para todas concentrações em *Sod1 Δ Sod2 Δ* (Tabela 2).

Figura 2. Avaliação oxidante do omeprazol (10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$) e os efeitos do palmitato de retinol – PR (100 UI/mL) em *S. cerevisiae*: SODWT (A); *Sod1 Δ* (B); *Sod2 Δ* (C); *Sod1 Δ Sod2 Δ* (D); *Cat1 Δ* (E); *Sod1 Δ Cat1 Δ* (F). CN (salina 0,9%), PR (100 UI/mL) e CP - H_2O_2 (10 mM/mL). ANOVA, *Bonferroni's* como *post hoc* teste. **: ***Significante para CN e ***a para a respectiva concentração de OME.

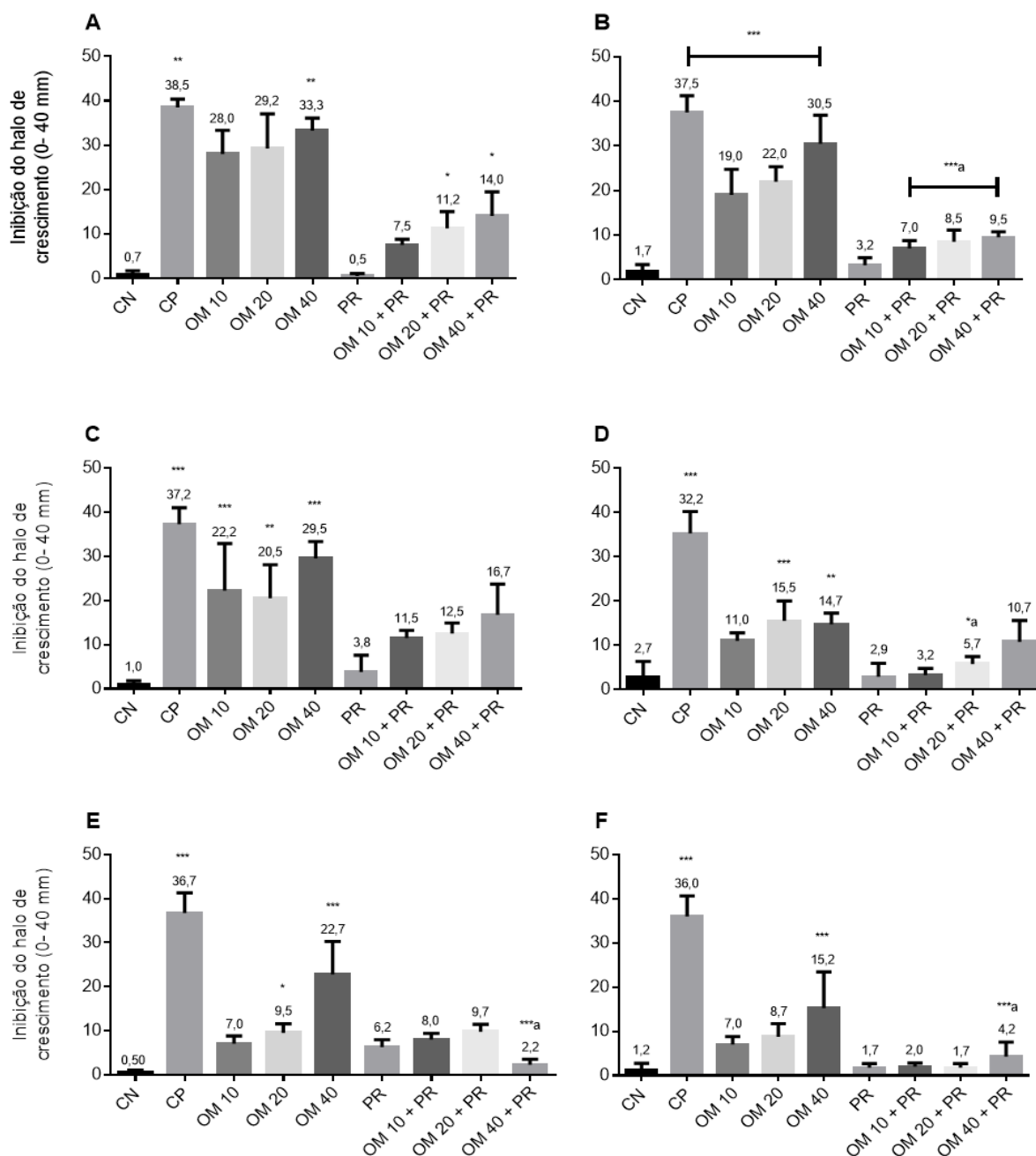


Figura 3. Avaliação oxidante do omeprazol (10, 20 e 40 mg/mL) e os efeitos da interação do ácido ascórbico – AA (2,0 μ M/mL) e palmitato de retinol – PR (100 UI/mL) frente ao H₂O₂, em *S. cerevisiae*: SODWT (A); Sod1 Δ (B); Sod2 Δ (C); Sod1 Δ Sod2 Δ (D), Cat1 Δ (E); Sod1 Δ Cat1 Δ (F) CN (salina 0,9%), AA (2,0 μ M/mL), PR (100 UI/mL) e CP- H₂O₂ (10 mMol). ANOVA, *Bonferroni's* como *post hoc* teste. **: ***Significante para CN e ***a para a respectiva dose.

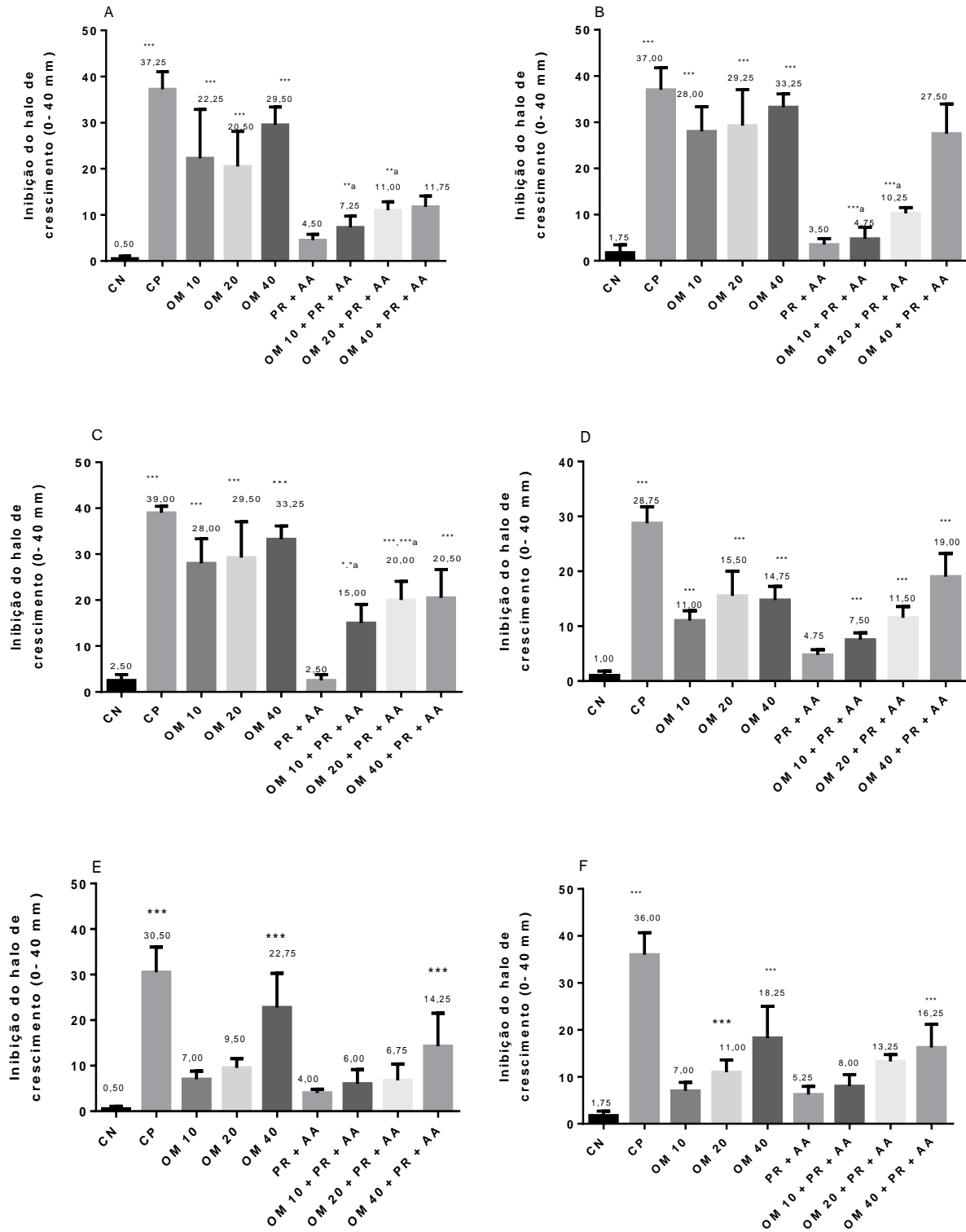


Tabela 2. Danos oxidativos do omeprazol (OME) e os efeitos do ácido ascórbico (AA) e do palmitato de retinol (PR) em *Saccharomyces cerevisiae*, proficiente e mutadas, em defesas enzimáticas para superóxido dismutase e catalase.

Tratamentos e linhagens	SODWT	Sod1Δ	Sod2Δ	Sod1ΔSod2Δ	Cat1Δ	Sod1ΔCat1Δ
Ácido ascórbico - AA						
10 µg/mL	Oxidação com modulação de 73,21%	Oxidação com modulação de 77,67%	Oxidação sem modulação	Oxidação com modulação de 81,81%	Não oxidou	Não oxidou
20 µg/mL	Oxidação com modulação de 76,92%	Oxidação com modulação de 71,79%	Oxidação sem modulação	Oxidação com modulação de 82,21%	Oxidação com modulação de 68,42%	Não oxidou
40 µg/mL	Oxidação com modulação de 78,19%	Oxidação com modulação de 59,01%, mas com oxidação	Oxidação sem modulação	Oxidação sem modulação	Oxidação com modulação de 68,42%	Oxidação com modulação de 78,59%
Palmitato de retinol - PR						
10 µg/mL	Não oxidou	Oxidação com modulação de 63,15%	Oxidação sem modulação	Não oxidou	Não oxidou	Não oxidou
20 µg/mL	Não oxidou	Oxidação com modulação de 61,36%	Oxidação sem modulação	Oxidação com modulação de 62,90%	Oxidação sem modulação	Não oxidou
40 µg/mL	Oxidação sem modulação	Oxidação com modulação de 68,85%	Oxidação sem modulação	Oxidação sem modulação	Oxidação com modulação de 59,01%, mas com oxidação	Oxidação com modulação de 62,90%
AA + PR						
10 µg/mL	Oxidação com modulação de 62,41%	Oxidação com modulação de 83,03%	Oxidação com modulação de 46,44%	Oxidação sem modulação	Não oxidou	Não oxidou
20 µg/mL	Oxidação com modulação de 42,34%	Oxidação com modulação de 64,95%	Oxidação com modulação de 39,84 %	Oxidação sem modulação	Não oxidou	Oxidação sem modulação
40 µg/mL	Oxidação sem modulação	Oxidação sem modulação	Oxidação sem modulação	Oxidação sem modulação	Oxidação sem modulação	Oxidação sem modulação

Legenda: Os dados estão apresentados como percentual de modulação (%M), calculando pela equação: $% M = [X - (Y + Vit)] / X * 100$, onde %M representa o percentual de modulação da vitamina testada (Vit). X: representa o valor do dano oxidativo induzido pelo omeprazol. Y+Vit: representa o valor do dano oxidativo induzido pelo omeprazol associado com ácido ascórbico (AA) e palmitato de retinol (PR).

Avaliação de danos toxicogénicos induzidos pelo OME em modelos tumorais de Sarcoma 180

Antes da realização do teste foi avaliado a viabilidade celular com Azul de Tripan como descrito em materiais e métodos. O OME não induziu alterações na viabilidade celular de sarcoma 180 (dados não mostrados).

Como observado no estudo com *Saccharomyces cerevisiae*, que são modelos de células eucarióticas para estudos oxidativos, o OME oxida o DNA citoplasmático mitocondrial por mecanismos associados a ERO's podendo ocasionar apoptose. Assim, em nosso estudo verificamos também a avaliação toxicogénica do OME em modelos tumorais de Sarcoma 180. Na menor concentração de OME não foi observado oxidação expressiva. Por isso, o OME foi utilizado nas suas maiores doses, nas quais foram verificados mais risco de indução de apoptose em células tumorais.

A partir da análise da mutagenicidade, pela frequência de micronúcleos em células tumorais de Sarcoma 180, foi observado que o tratamento com OME de forma isolada e em co-tratamento com o AA e PR, não induziu aumento da formação de micronúcleos. Similarmente, os tratamentos supramencionados também não induziram aumento da frequência de pontes nucleoplásmicas. Por outro lado, o OME na concentração de 40 µg/mL, induziu ($p < 0,05$) aumento da frequência de brotos nucleares em células de Sarcoma 180, comparado ao grupo sem tratamento (controle negativo) (**Tabela 3**).

O potencial mutagénico de compostos químicos é um parâmetro de extrema importância na avaliação dos aspectos toxicológicos. A avaliação da mutagenicidade é requerida para produtos farmacêuticos antes do início dos testes clínicos. Durante o desenvolvimento de medicamentos para humanos, o potencial mutagénico dos compostos não é só considerado para o princípio ativo, mas também para substâncias relacionadas como metabólitos e impurezas (PEKALA et al, 2013; VALENCIA et al, 2013).

Evidências descritas aqui e por outros autores ressaltam as alterações citogénicas induzidas por OME em linhagens celulares, a exemplo da presença de brotos nucleares, que segundo Fenech e colaboradores (2011), estariam associados à amplificação gênica e instabilidade genética, pois seriam biomarcadores de eventos genotóxicos e instabilidade cromossômica (KOHLENER et al, 2010). A formação dessas anomalias nucleares é também vista em processos carcinogénicos, podendo aumentar o risco de doenças degenerativas.

Kohler e colaboradores (2010) destacam que o tratamento com omeprazol pode causar lesões celulares de caráter agudo e crônico, aumento da proliferação celular e

inflamação. No entanto, certas concentrações de vitamina C teriam efeito protetor sobre a ação tóxica do uso prolongado do fármaco. Pesquisas anteriores, levando em conta estes efeitos, já demonstraram que a adição de vitamina C para o tratamento de erradicação do *H. pylori* nos casos de gastrite, pode aumentar a taxa de efetividade do tratamento com inibidores de bombas de prótons, indicando o uso concomitante de antioxidantes que possam minimizar os efeitos oxidativos do OME, como observado em nossos estudos (ZOJAJI et al., 2009).

Considerando anormalidades citogenéticas, indicativas de morte celular (cariorrexe e cariólise), o OME (40 µg/mL) induziu ($P < 0,05$) aumento da frequência de células em fragmentação nuclear (cariorrexe), comparado ao grupo sem tratamento. Efeitos similares de modulação foram evidenciados para o co-tratamento de OME (40 µg/mL) e AA, bem como com a associação do AA e PR (**Tabela 3**).

Dados farmacocinéticos anteriores indicam que, por via intravenosa, o AA pode agir como pró-droga e produzir elevado nível no plasma de peróxido de hidrogênio e consequente dano celular (DU et al, 2012). Considerando que o AA tenha participação direta na formação de espécies reativas de oxigênio, os danos citogenéticos observados pelo co-tratamento com antioxidantes sugerem maior participação do AA na morte celular.

Além desse aspecto, o omeprazol (40 µg/mL) induziu, significativamente, o aumento da frequência de células em dissolução nuclear (cariólise), comparada ao grupo não tratado. Similarmente, o co-tratamento de OME (40 µg/mL) e AA, bem como a combinação de AA e PR induziram de forma pronunciada o aumento da frequência de células em cariólise (**Tabela 3**).

Tabela 3. Alterações citogenéticas em linhagem celular de Sarcoma 180 tratadas com omeprazol, ácido ascórbico e palmitato de retinol.

Grupos	Micronúcleos	Brotos	Pontes	Cariorrejes	Cariólises
CN	1,5 ± 0,7	2,0 ± 1,4	0,5 ± 0,8	14,5 ± 10,6	12,5 ± 3,5
CPA	19,5 ± 4,9**	11,5 ± 2,1**	8,5 ± 2,1**	312,0 ± 25,4***	107,0 ± 10,6***
OME 20	3,5 ± 2,1	4,0 ± 1,4	2,5 ± 0,7	228,0 ± 21,2***a	65,5 ± 12,7**a
OME 20 + AA	1,5 ± 0,7	2,5 ± 0,7	1,5 ± 0,8	42,5 ± 6,3**a	15,0 ± 7,0*a
OME 20 + PR	1,5 ± 0,8	0,7 ± 0,4	1,5 ± 0,7	132,5 ± 27,5***	15,0 ± 12,7*a
OME 20 + AA + PR	0,5 ± 0,7	4,0 ± 1,4	1,5 ± 0,7	20,5 ± 3,5**a	15,5 ± 4,9*a
OME 40	4,0 ± 2,8	9,8 ± 2,1*	2,5 ± 0,7	207,0 ± 9,8***	15,0 ± 7,0
OME 40 + AA	3,5 ± 1,2	8,2 ± 1,4	0,5 ± 0,7	65,0 ± 12,7**	18,0 ± 4,2
OME 40 + PR	0,5 ± 0,7	6,5 ± 3,5	1,5 ± 0,7	16,6 ± 6,3*	15,0 ± 2,7
OME 40 + AA + PR	0,7 ± 0,2	4,5 ± 0,7	1,5 ± 0,7	238,0 ± 44,5***	103,0 ± 9,6***a

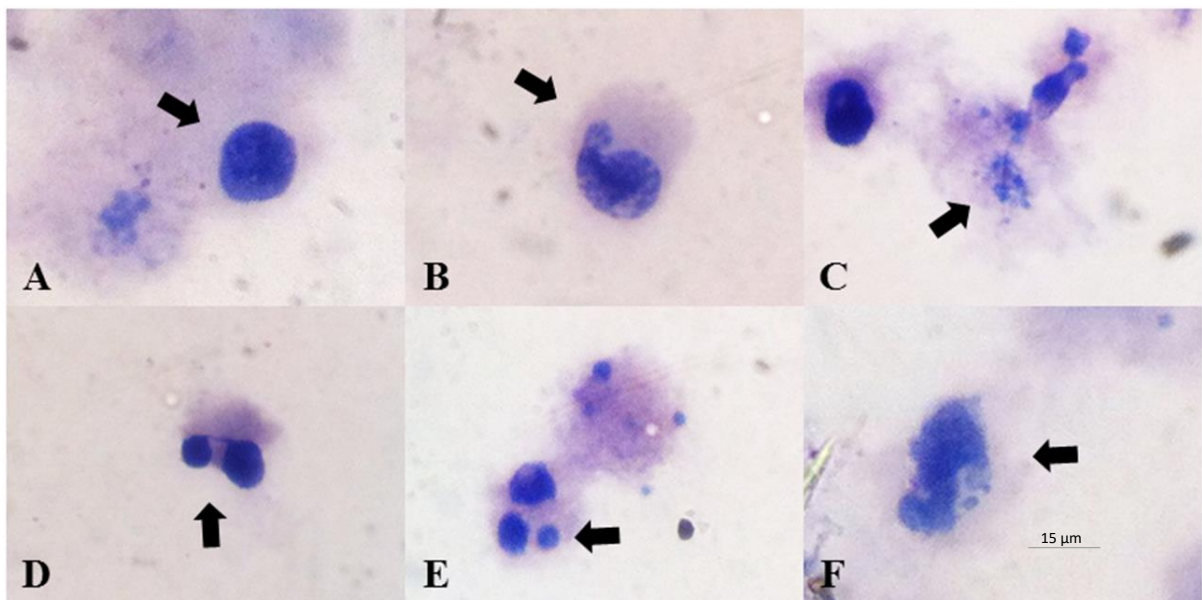
Legenda: CPA: ciclofosfamida 20 µg/mL; CN: salina 0,9%. OME E20: omeprazol 20 µg/mL, OME 40: omeprazol 40 µg/mL. AA: ácido ascórbico 2,0 µM/mL. PR: palmitato de retinol 100 UI/mL. ANOVA, Bonferroni como *post hoc* teste. Significância de *p<0,05; ** p<0,001; ***p<0,0001, comparado ao CN e ^a, comparação entre as doses e modulação de danos.

Em contrapartida, o PR em todas as associações com o OME, exceto quando combinada ao AA, não induziu danos, ratificando a atuação do retinol na inibição da formação de tumores em sistemas experimentais. Em seres humanos, esse efeito é possível devido a inibição do crescimento celular na fase G1 (CARRATÙ et al, 2012). O PR, relativamente estável, é a principal forma de armazenamento de retinol em seres humanos e animais que podem ser enzimaticamente hidrolisados de volta para o retinol *in vivo*. A evidência clínica para um quimiopreventivo baseado em retinóis tem originado substâncias importantes para o tratamento de lesões pré-malignas, tais como leucoplasia oral, displasia cervical e xeroderma pigmentoso. Da mesma forma, ensaios clínicos revelaram que retinoides são ativos na redução de alguns cânceres primários, tais como tumores do trato digestivo, pulmão e carcinomas hepatocelulares (LEE et al,2010).

Em síntese, o OME em Sarcoma 180 não induziu micronúcleos e pontes, entretanto significantes anormalidades nucleares do tipo cariorrexe e cariólise, indicativas de apoptose, foram induzidas pelo OME, mas foram moduladas pelo AA e pelo PR. Entretanto, a associação entre OME, AA e PR apresentou aumentos de anormalidades nucleares indicativas de apoptoses, sugerindo possíveis efeitos pró-apoptóticos.

As fotomicrografias de danos citogenéticos estão apresentadas na **Figura 4**.

Figura 4. Perfil fotomicrográfico das alterações citogenéticas induzidas por Omeprazol em linhagens de Sarcoma 180. A: célula normal. B: broto nuclear. C: apoptose. D: ponte nucleoplásmicas. E: célula binucleada com micronúcleo. F: necrose. Giemsa 10%. Aumento de 100X.



Os mecanismos de formação de brotos podem ser relacionados com eliminação e amplificação ou reparo de DNA. A formação de micronúcleos pode ser devido a quebras, indicando clastogenia; e por perda de cromossomos para agentes aneugênicos (FENECH et al, 2011; FERREIRA et al, 2009). Os micronúcleos (MNs) são formados no processo de divisão celular, no período de anáfase, quando fragmentos do cromossomo ou até mesmo o cromossomo inteiro não é incluído no núcleo principal. O aparecimento do micronúcleo é resultante da quebra do cromossomo ou mal funcionamento do fuso mitótico, podendo promover o aparecimento de um ou mais MNs por célula. Por conseguinte, constitui-se um biomarcador de instabilidade genética sendo geralmente observado em muitas condições

patológicas. O estudo dos danos ao DNA a nível de cromossomo constitui a parte necessária na toxicologia genética (GUTIÉRREZ; VILLAR, 2015; SHARMA; BHONDE, 2015).

As células binucleadas podem ser indicativas de falhas de citocineses no final de divisão celular e células com cromatina condensada são indicativas de apoptoses (cariorrexe e cariólise), como também de picnoses (SABHARWAL et al., 2015). Vários caminhos de sinalização regulam a apoptose, dentre eles os que envolve as famílias da proteína Bcl-2, e de inibidores de apoptose (IAP). As apoptoses podem ser indicativos para câncer e outras doenças neurodegenerativas (HASSAN et al, 2015). Assim, os nossos dados apontam que as terapias com o OME contribuem para a aumentar a instabilidade genética e possivelmente pode contribuir para o desenvolvimento de neoplasias.

Conclusões

O OME induziu danos oxidativos para a maioria das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, proficientes e mutadas em defesas enzimáticas para superóxido dismutase e catalase, dependendo das linhagens e das concentrações usadas. O AA e o PR modularam os danos para a maioria das linhagens, exceto nas maiores concentrações testadas de OME, nas linhagens Sod2 Δ e Sod1 Δ Sod2 Δ . A associação do AA com o PR apresentou efeitos controversos não modulando os danos oxidativos na concentração de 40 μ g/mL em todas as linhagens e para a maioria das concentrações testadas na linhagem Sod1 Δ Sod2 Δ . Os danos oxidativos podem induzir anormalidades nucleares. No estudo com células de S-180, não foi observado aumento nas frequências de micronúcleos e pontes, mas sim aumentos de brotos, cariorrexe e de cariólise que, em sua maioria, foram modulados por AA e PR de forma isolada. Entretanto, a interação entre os antioxidantes e OME aumenta significativamente, os danos nucleares indicativos de apoptose. Os dados do estudo apontam riscos para a terapêutica com OME devido sua potencialidade para a indução de estresse oxidativo e instabilidade genética, por outro lado, os antioxidantes podem minimizar esses danos toxicogenéticos. Assim, estudos são necessários, especialmente para investigar os efeitos controversos das interações entre antioxidantes e terapia medicamentosa.

Referências

- ALMENARA, C.C.P. et al. Toxicology in Vitro In vitro fructose exposure overactivates NADPH oxidase and causes oxidative stress in the isolated rat aorta. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 8, p. 2030–2037, 2015.
- ALVAREZ A; IBIZA, M.S.; ANDRADE, M.M., BLAS-GARCÍA A.; CALATAYUD S. Gastric antisecretory drugs induce leukocyte-endothelial cell interactions through gastrin release and activation of CCK-2 receptors. **Jornal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 323, p. 406–413, 2007.
- ARALDI, R.P.; MELO, T.C.; MENDES, T.B.; JÚNIOR, P.L.S.; NOZIMA, B.H.; ITO, E.T.; et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.72, p.74-82, 2015.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA S.O.; MINIM V.P.R.; BRESSAN J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista Nutrição Campinas**, v.23, p. 629-643, 2010.
- CARRATÙ M.R.; MARASCO C.; MANGIALARDI G.; VACCA A. Retinoids: novel immunomodulators and tumour-suppressive agents? **British Journal of Pharmacology**, v. 167, p. 483–492, 2012.
- CASTRO P.A. et al. Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell**.10(3):398-411,2011.
- DOWNES, N.; FOSTER, J. Regulatory Forum Opinion Piece: Carcinogen Risk Assessment: The Move from Screens to Science. **Toxicologic Pathology**, v. 43, p.1064-1073, 2015.
- DU, J.; CULLEN, J. J.; BUETTNER, G. R. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1826, n. 2, p. 443-457, 2012.
- ESTEVINHO, B.N. et al. Soluble vitamins (vitamin B12 and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a spray drying process. **Powder Technology**, v. 289, p. 71–78, 2016.

FADEL, O.; EL KIRAT, K.; MORANDAT, S. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1808, p. 2973-2980, 2011.

FENECH M.; KIRSCH-VOLDERS M.; NATARAJAN A.T.; SURRELLES J.; CROTT J.W.; PARRY J. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125–132, 2011.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v.2, p.1084-1104, 2007.

FERREIRA, P.M.; COSTA, P.M.; COSTA, A.M.; LIMA, D.J.; DRUMOND, R.R.; SILVA, J.D.; MOREIRA, D.R.; OLIVEIRA FILHO, G.B.; FERREIRA, J.M.; QUEIROZ, M.G.; LEITE, A.C.; PESSOA, C. Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 3, p. 1-18, 2015.

FERREIRA, P.M.P. et al. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.83, p.1045-1058, 2011.

GONZÁLEZ-FUENTES, J. et al. Developmental study of vitamin C distribution in children's brainstems by immunohistochemistry. **Annals of Anatomy**, v. 201, p. 65–78, 2015.

GUTIÉRREZ, J.M.; VILLAR, S.; PLAVAN, A.A. Micronucleus test in fishes as indicators of environmental quality in subestuaries of the Río de la Plata (Uruguay). **Marine pollution bulletin**, v.91; p.518-523, 2015.

HASSAN, M.; et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated pathways to both apoptosis and autophagy: Significance for melanoma treatment. **World Journal of Experimental Medicine**, v.5, n.4, p.206-217, 2015.

HE, J. et al. Changes in the fatty acid composition and regulation of antioxidant enzymes and physiology of juvenile genetically improved farmed tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), subjected to short-term low temperature stress. **Journal of Thermal Biology**, v. 53, p. 90–97, 2015.

HERBET, M.; IZDEBSKA, M.; PIA, I. Estimation of oxidative stress parameters in rats after simultaneous administration of rosuvastatin with antidepressants. **Pharmacological Reports**, v. 68, p. 172–176, 2016.

ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. **Anticancer Research**, v. 17, n. 9, p. 277-284, 1997.

JIANG, J. et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Effects of copper on induction of thiol-compounds and antioxidant enzymes by the fruiting body of *Oudemansiella radicata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 111, p. 60–65, 2015.

KANG, S.H.; KWON, J.Y.; LEE, J.K.; SEO, Y.R. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. **Journal of Cancer Prevention**, v. 18, p.277-288, 2013.

KARAM, S.M.; FORTE, J.G. Inhibiting gastric H (+) –K (+) -ATPase activity by omeprazole promotes degeneration and production of parietal cells. **American Journal of Physiology**, v.266, p.745–758, 1994.

KAUR, S.; KAUR, A. Comparative Biochemistry and Physiology , Part C Variability in antioxidant / detoxification enzymes of *Labeo rohita* exposed to an azo dye , acid black (AB). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 167, p. 108–116, 2015.

KOHLER, J.E.; BLASS, A.L.; LIU, J.; TAI, K.; SOYBEL, D.I. Antioxidant pre-treatment prevents omeprazole-induced toxicity in an in vitro model of infectious gastritis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.49, p.786–791, 2010.

KUMAR N.; MAURYA P.K.; KANT R.; RIZVI S.I. (-)-Epicatechin in vitro ameliorates erythrocyte protein carbonyl content in hypertensive patients: comparison with l-ascorbic acid. **Archives of Physiology and Biochemistry**. Jul 29;122(3):155-60, 2016.

LEE, J.H.; KISHIKAWA, M.; KUMAZOE, M.; YAMADA, K.; TACHIBANA, H. Vitamin A Enhances Antitumor Effect of a Green Tea Polyphenol on Melanoma by Upregulating the Polyphenol Sensing Molecule 67-kDa Laminin Receptor. **PLoS One**, v.5, p.11051, 2010.

LIMA, A.P. et al. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium (II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 0. 105-125, 2014.

MARCHI, F.E. et al Flax meal supplementation on the activity of antioxidant enzymes and the expression of oxidative stress- and lipogenic-related genes in dairy cows infused with sunflower oil in the abomasum. **Animal Feed Science and Technology**, v. 199, p. 41–50, 2015.

MILITÃO G.C.G.; FERREIRA P.M.P.; FREITAS R.M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. **Neurochemistry. International.**, 56, pp. 16–20, 2010.

MORAES, G.P.; ALENCAR, M.V.O.B.; ISLAM, T.; ARAÚJO, L.S.; SOBRAL, A.L.P.; MACHADO, K.C. et al. Cytogenotoxic and oxidative status evaluation of *Morinda citrifolia*. **International Archives of Medicine**, v.9, p. 1-13, 2016.

MOWAT, C.; CARSWELL, A.; WIRZ, A.; MCCOLL, K.E. Omeprazole and Dietary Nitrate Independently Affect Levels of Vitamin C and Nitrite in Gastric Juice. **Gastroenterology**, v. 116, p.1507, 1999.

MOWAT, C.; MCCOLL, K.E. Alterations in intragastric nitrite and vitamin C levels during acid inhibitory therapy. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 15, p.523-537, 2001.

NOVOTNA, A.; SROVNALOVA, A.; SVECAROVA, M.; KORHONOVA, M.; BARTONKOVA, I.; DVORAK, Z. Differential Effects of Omeprazole and Lansoprazole Enantiomers on Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Hepatocytes and Cell Lines. **PLoS One**, v.9, p.98711, 2014.

OLIVEIRA, G.L.S.; OLIVEIRA, F.R.A.M.; ALENCAR, M.V.O.B.; JUNIOR, A.L.G.; ARAUJO, A.S.; CAVALCANTE, A.A.C.; et al. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African journal of pharmacy and pharmacology**, v.8, p.136-147, 2014.

PEKALA, E. et al. Evaluation of mutagenic and antimutagenic properties of new derivatives of pyrrolidine-2,5-dione with anti-epileptic activity, by use of the *Vibrio harveyi* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 758, n. 1-2, p. 18–22, 2013.

PORTO, M.L. et al. Toxicology *in Vitro* Increased oxidative stress and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of fructose-fed rats. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 8, p. 1977–1981, 2015.

QUESADA, J.; AMATO, R. The molecular biology of soft-tissue sarcomas and current trends in therapy. **Sarcoma**, v. 12, p. 849-856, 2012.

SABHARWAL, R. et al. Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**, v.36, n.4, p.212-218, 2015.

SHARMA, S.; VENKATESAN, V.; BHONDE, R. Human mesenchymal stem cells as a novel platform for simultaneous evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals. **Mutagenesis**, v. 30, n.3, p. 391-399, 2015.

TEIXEIRA, I.N.A.O.; GUARIENTO, M.E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 15, n. 6, p. 2845-2857, 2010.

VALENCIA, A. et al A novel QSAR model of Salmonella mutagenicity and its application in the safety assessment of drug impurities. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 273, n. 3, p. 427–434, 2013.

WANG, K. Molecular mechanisms of liver injury: Apoptosis or necrosis. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 66, n. 8, p. 4–9, 2014.

WU, B. et al. Postharvest Biology and Technology Impact of postharvest nitric oxide treatment on antioxidant enzymes and related genes in banana fruit in response to chilling tolerance. **Postharvest Biology and Technology**, v. 92, p. 157–163, 2014.

XIE, Q.J.; CAO, X.L.; BAI, L.; WU, Z.R.; MA, Y.P.; LI, H.Y. Anti-tumor effects and apoptosis induction by Realgar bioleaching solution in Sarcoma-180 cells in vitro and transplanted tumors in mice in vivo. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 6, p. 2883-2898, 2014.

ZHAO, S. et al. NeuroToxicology Full length article Puerarin attenuates learning and memory impairments and inhibits oxidative stress in STZ-induced SAD mice. **Neurotoxicology**, v. 51, p. 166–171, 2015.

ZOJAJI, H.; TALAIE, R.; MIRSATTARI, D.; HAGHAZALI, M.; MOLAEI, M.; MOHSENIAN, N.; et al The efficacy of helicobacter pylori eradication regimen with and without vitamin C supplementation. **Digestive and Liver Disease**. v.41, p.644-647, 2009.

Capítulo II

Estudo toxicogenético do omeprazol e os efeitos do palmitato de retinol e ácido ascórbico em *Allium cepa*

Artigo submetido à Revista: Chemosphere

Qualis: A2 para Farmácia

Estudo toxicogenético do omeprazol e os efeitos do palmitato de retinol e ácido ascórbico em *Allium cepa*

Antonio Lima Braga^{1,2}, Ag-Anne Pereira Melo de Meneses^{1,2}, José Victor de Oliveira Santos^{1,2}, Antonielly Campinho dos Reis^{1,2}, Rosália Maria Tôrres de Lima^{1,2}, Ana Maria Oliveira da Mata^{1,2}, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz^{1,2}, Leane Brunelle dos Santos Alves², Muhammad Torequl Islam^{2,3*}, João Marcelo de Castro e Sousa^{2,4}, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^{1,2}

¹Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica, LAPGENIC - Universidade Federal do Piauí, UFPI, Ininga, CEP: 64.049-550, Teresina/PI – Brasil. E-mail: tonny.L.b@hotmail.com

²Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brasil

³Departamento de Farmácia, Southern University Bangladesh, Mehedibag, Chittagong 4000, Bangladesh.

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Piauí, Picos, (Piauí), 64.607-670, Brasil.

RESUMO

Omeprazol (OME), é um inibidor da bomba de prótons utilizado no tratamento de doenças gástricas e intestinais. No entanto, estudos sobre seus efeitos no material genético ainda são restritos. O presente estudo teve como objetivo avaliar seus possíveis efeitos toxicogênicos em meristemas de *Allium cepa* com aplicação de biomarcadores citogenéticos para danos no DNA, efeitos mutagênicos, tóxicos e citotóxicos. Além disso, o palmitato de retinol (PR) e o ácido ascórbico (AA) também foram utilizados em co-tratamento com OME para avaliar possíveis efeitos moduladores dos danos citogenéticos induzidos pelo omeprazol. OME foi testado em 10, 20 e 40 µg / mL, enquanto que o PR e AA em 100 UI / mL e 2 µM / mL, respectivamente. O sulfato de cobre (0,6 µg / mL) e a água desclorada foram utilizados como controle positivo e controle negativo, respectivamente. Os resultados sugerem que o OME induz genotoxicidade e mutagenicidade em *A. cepa*. em todas as concentrações testadas. No entanto, o OME mostrou toxicidade e citotoxicidade nas duas maiores concentrações. Deve-se enfatizar que as vitaminas antioxidantes PR e / ou AA, quando co-tratadas ($p < 0,05$) inibiram e / ou modulam todos os danos toxicogênicos induzidos pelo OME, demonstrando seus efeitos antígenotóxicos, antimutagênicos, antitóxicos e anticitotóxicos em *A. cepa*. Os antioxidantes podem ser ferramentas úteis para combater os efeitos tóxicos induzidos pelo OME.

Palavras-chave: *Allium cepa*. Toxicidade. Citotoxicidade. Omeprazol. Ácido ascórbico. Palmitato de retinol.

ABSTRACT

Omeprazole (OME), a proton pump inhibitor is used in gastric and intestinal disease, however, studies on its effects on the genetic material are still restricted. The present study aimed to evaluate its possible toxicogenic effects in *Allium cepa* meristems with the application of cytogenetic biomarkers for DNA damage, mutagenic, toxic and cytotoxic effects. Additionally, retinol palmitate (RP) and ascorbic acid (AA) were also co-treated with OME to evaluate possible modulatory effects of OME-induced cytogenetic damages. OME was tested at 10, 20 and 40 µg/mL, while RP and AA by 100 IU/mL and 2 µM/mL, respectively. Copper sulfate (0.6 µg/mL) and dechlorinated water were used as positive control and negative control, respectively. The results suggest that OME induced genotoxicity and mutagenicity in *A. cepa* at all concentrations tested. However, OME showed toxicity and cytotoxicity at the two highest concentrations. It should be emphasized that the antioxidant vitamins RP and/or AA, when co-treated significantly ($p < 0.05$) inhibited and/or modulated all toxicogenic damages induced by OME, demonstrating their antigenotoxic, antimutagenic, antitoxic and anticitotoxic effects in *A. cepa*. Antioxidants may be useful tools to overcome OME-induced toxic effects.

Keywords: *Allium cepa*. Toxicity. Citotoxicity. Omeprazole. Ascorbic aci. Retinol palmitate.

1 Introdução

Omeprazol (OME) é utilizado para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, como dispepsia, úlcera péptica, refluxo gastroesofágico ou infecção por *Helicobacter pylori* (KOSMA *et al.*, 2016; SEOANE *et al.*, 2017). É um inibidor da bomba de prótons (IBP) (YANAGIHARA *et al.*, 2015), que pode atuar bloqueando irreversivelmente a fase terminal da secreção de ácido gástrico no intestino, inibindo a bomba de prótons $H^+ / K^+ ATPase$ nas células parietais, diminuindo a quantidade de ácido no estômago (STERBINI *et al.*, 2016; SEOANE *et al.*, 2017).

Vários estudos apontam que, prolongar o uso de OME pode causar algumas anormalidades na mucosa gástrica, como a hiperplasia das células parietais, dilatação do canalículo de fundo, corpo e antro do estômago e projeção de protrusões citoplasmáticas no lúmen do canalículo (KURMAN, 2013). Também é importante enfatizar que em doses de 20 a 40 mg / dia, de OME pode inibir até 90% da secreção de ácido durante 24 horas na maioria dos pacientes, fazendo com que muitos desses pacientes tenham quase achloridria, o que, a longo prazo, pode causar câncer gástrico (MELBOURNE, 2013; LIMA, 2014).

O OME também pode inibir a bomba de ácido gástrico em células parietais quando está completamente metabolizada no fígado, liberando sulfona, sulfito e hidróxi-OME, compostos que podem gerar dano oxidativo e induzir danos ao material genético (BRAMBILLA *et al.*, 2010; DOWNES e FOSTER, 2015). Assim, estudos toxicogênicos que indicam danos primários que podem progredir para os estágios da carcinogênese são necessários para a identificação de agentes químicos potencialmente mutagênicos e para avaliar os riscos de instabilidades genéticas (ZEIGER *et al.*, 2015), incluindo drogas (LEE *et al.*, 2014). No entanto, os efeitos tóxicos do uso prolongado de OME podem ser minimizados com o uso de antioxidantes (KOHLENER *et al.*, 2010), em alimentos e / ou suplementos vitamínicos. Os retinoides, como o palmitato de retinol (PR), são considerados como compostos antioxidantes capazes de neutralizar os radicais livres e o estresse oxidativo (BANALA e KARNATI, 2015; SHAO *et al.*, 2016). Por outro lado, o ácido ascórbico (AA), tem multifunções em nosso corpo, entre elas, como um antioxidante para proteger a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, reduzir os agentes oxidantes no estômago e promover a absorção de ferro (ASAIKKUTTI *et al.*, 2016).

Vários testes podem ser usados para a avaliação de efeitos genotóxicos e mutagênicos, entre eles o teste *Allium cepa* é um importante sistema teste para avaliação de efeitos citotóxicos de várias substâncias que podem afetar o material genético, incluindo agentes

bioquímicos, ambientais e farmacêuticos (O'ZKARA et al., 2015), e os resultados estão correlacionados com as respostas obtidas em testes com sistemas envolvendo mamíferos (MOURA et al., 2016). O ensaio cometa é usado para detectar danos ao DNA, e pode ser aplicado em meristemas de raízes de *A. cepa* para avaliação de efeitos genotóxicos de diversas substâncias (TU'RKOG'LU 2012; LIMAN, 2013). Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos toxicogênicos do OME em meristemas de raízes de *A. cepa*, com a análise de biomarcadores citogenéticos de danos ao DNA pela aplicação do ensaio cometa (versão alcalina), avaliando, também possíveis efeitos de PR e / ou AA sobre os possíveis danos citogenéticos induzidos por OME neste sistema teste.

2 Materiais e Métodos

Obtenção de A. cepa

As cebolas de tamanho médio (*A. cepa*) foram compradas em mercado local no Piauí, Brasil. O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina / PI - Brasil.

Reagentes e produtos químicos

O OME foi comprado de uma farmácia convencional, uma produção da Medley Indústria Farmacêutica Ltda e solubilizada em água destilada até as concentrações finais de 10, 20 e 40 µg / mL. O sulfato de cobre foi obtido a partir do Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e diluído em água destilada para atingir a concentração final de 0,6 µg / mL. O ácido ascórbico (AA) e o palmitato de retinol (PR) também foram obtidos no Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e solubilizados em tampão fosfato (pH 6,8) e em solução salina a 0,9% mais 10% de DMSO nas concentrações finais de 0,2 µM / mL e 100 UI / mL, respectivamente.

Ensaio de cometa em A. cepa

Este teste foi feito de acordo com o método descrito por Liman et al. (2013). Resumidamente, as cebolas (cinco em cada grupo) foram tratadas como descrito no teste *A. cepa*. Após o tratamento com solução de carnoy, as regiões meristemáticas das raízes foram cortadas em pequenos pedaços e tratadas com Tris-HCl 0,4 M (pH 7,5) *overnight* para obter o extracto nuclear. Em seguida, usando 1% de agarose com baixo ponto de fusão (LMPA: 35 °

C), o extrato nuclear foi espalhado nas lâminas previamente preparadas (2,25% de agarose de ponto de fusão normal (NMPA: 50 °C) em solução salina e tampão fosfato (PBS, pH: 7,4). As lâminas foram então secas a 37 ° C durante 1,5 h e a electroforese em gel foi realizada a 25 V, 300 mA durante 15 min. As lâminas foram secas como descrito acima e depois fixadas em solução carnoy durante 10 min. Após três banhos em água destilada, as lâminas foram coradas e seguiram para avaliação fotomicroscópica com ampliação de 400X. O perfil genotóxico foi determinado com base no nível de dano do DNA, que foi classificado de zero (0) a quatro (4) de acordo com os níveis de migração de fragmentos de DNA danificados em 200 células. Deve notar-se que, exceto a observação microscópica, toda a operação foi realizada no escuro. Após a avaliação, foi calculado o Índice de Dano, segundo a fórmula: $ID = \sum (n^{\circ} \text{ de células com dano "y"} \times \text{classe "y" de dano})$, que variou de 0 (ex.: 100 células com dano 0 X 0) a 400 (ex.: 100 células com dano 4 X 4). Também foi calculada a frequência de dano através da fórmula: $FD = 100\% - \text{danos de classe 0}$.

Teste A. cepa

O teste de *A. cepa* foi realizado de acordo com Islam et al. (2017). Após a compra, as cebolas foram lavadas com água corrente da torneira, removendo as raízes antigas e secas, a membrana externa e o parênquima central da coroa em brotamento (fazendo uma pequena incisão circular) para facilitar a absorção das soluções e a uniformidade de brotação e crescimento das raízes. Após este processo, as cebolas foram expostas a cada concentração de OME e/ou PR e/ou AA, e controle e mantidas durante 48 horas no escuro à temperatura ambiente. Após o período de exposição, as raízes foram removidas e fixadas em solução Carnoy (metanol e ácido acético) durante 24 horas; as raízes que não foram avaliadas imediatamente foram armazenadas em etanol a 70% para análise posterior no ensaio de cometas alcalinas (anteriormente discutido). Para a preparação das lâminas, as raízes foram lavadas com água destilada (3 banhos de 5 minutos cada) para remover a solução e hidrolisados com HCl 1 N a 60 ° C durante 11 min. Em seguida, as raízes foram removidas e lavadas com água destilada, que foi seguido por secagem à temperatura ambiente e transferência para frascos de cor âmbar contendo o reagente de Schiff durante aproximadamente 2 h e lavado em água corrente até remoção completa do corante. As raízes foram colocadas em uma lâmina onde a região meristemática foi separada, colocando uma gota de carmim acético 2% no topo e cobrindo com lamínulas. A fotomicrografia foi feita com um microscópio óptico em uma ampliação de 1000X.

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), seguidos pelos testes de Tukey, Dunnet e Bonferroni usando GraphPad Prism (versão 6.0), considerando $p < 0,05$ com um nível de confiança de 95%.

3 Resultados

OME induziu danos ao DNA de células meristemáticas de *A. cepa* em todas as concentrações testadas pelo aumento do índice (ID) e frequência de danos (FD) em comparação com o grupo CN. No entanto, o co-tratamento de OME com PR e / ou AA, inibiram os efeitos genotóxicos do OME 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$, juntamente com a modulação de 20 e 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ dos efeitos de dano induzidos pela OME no sistema *Allium cepa* (**Tabela 1**).

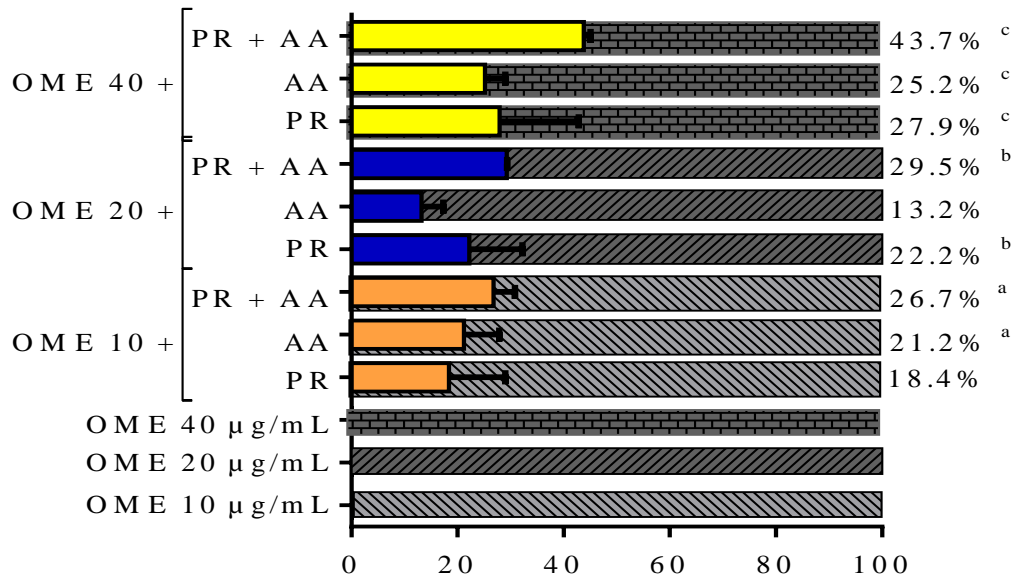
Tabela 1. Genotoxicidade do OME e efeitos moduladores do PR e / ou AA em células meristemáticas de *A. cepa* (teste de cometas)

Grupos de tratamento	ID	FD
CN	48.0 \pm 1.4	18.5 \pm 0,7
CP	198.0 \pm 3.7	91.0 \pm 1.8
OME 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100.0 \pm 6.7 ^{ab}	45.5 \pm 0.7 ^a
OME 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	111.0 \pm 2.0 ^{ab}	50.5 \pm 3.5 ^{ab}
OME 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	149.5 \pm 6.3 ^{ab}	65.0 \pm 1.4 ^{ab}
OME 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + PR	81.4 \pm 1.4 ^b	42.0 \pm 1.4 ^{ab}
OME 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + PR	86.0 \pm 2.6 ^{abc}	50.0 \pm 1.4 ^{ab}
OME 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + PR	106.5 \pm 5.6 ^{abd}	59.5 \pm 2.1 ^{ab}
OME 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + AA	83.0 \pm 4.2 ^{bc}	42.5 \pm 0.7 ^{ab}
OME 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + AA	96.5 \pm 10.6 ^{ab}	50.5 \pm 2.1 ^{ab}
OME 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + AA	103.5 \pm 6.3 ^{ad}	54.5 \pm 3.5 ^{ab}
OME 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + PR + AA	73.0 \pm 4.2 ^{bc}	38.5 \pm 0.7 ^{ab}
OME 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + PR + AA	78.5 \pm 4.9 ^{bc}	40.2 \pm 1.4 ^{abc}
OME 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + PR + AA	84.0 \pm 7.0 ^{bd}	52.0 \pm 1.4 ^{abd}

Os valores médios são \pm DP (n = 5), ANOVA one-way e Bonferroni pós-teste, valores significativos $p < 0,05$ quando comparados com ^aCN, ^bOME 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ^cOME 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ^dOME 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PR - palmitato de retinol (100 UI / kg), AA - ácido ascórbico (2,0 μM / mL), controle positivo para CP (sulfato de cobre a 0,0006 mg / mL), CN - controle negativo (água desclorada) índice de dano (ID) frequência de dano (FD).

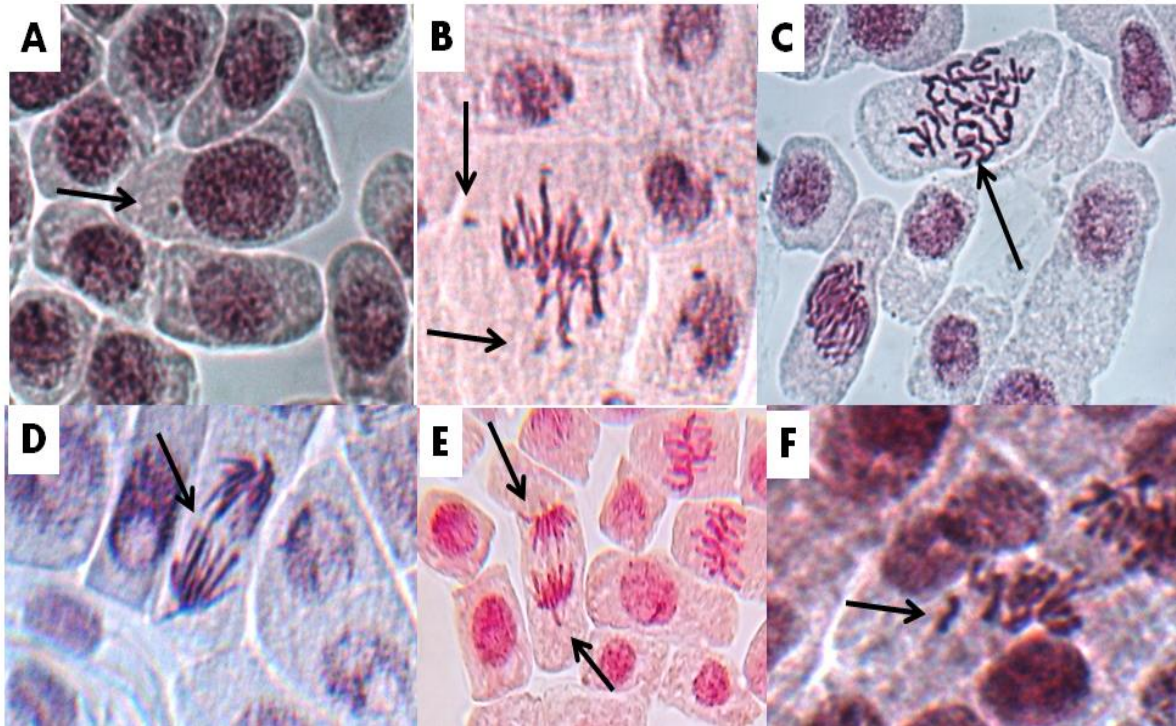
A modulação do dano genotóxico induzido pelo OME mediada pelo PR foi de 18,4 a 27,9%, enquanto a de AA foi de 21,2 a 29,5%. No entanto, a associação dessas duas vitaminas (PR + AA) aumentou a modulação de 26,7 para 43,7% (**Figura 1**).

Figura 1. Efeitos de PR e / ou AA sobre o dano genotóxico induzido pelo OME às células meristemáticas de *A. cepa* (ensaio de cometas) Os valores são modulação percentual (n = 5), ANOVA one-way, pós-teste Tukey, valores significativos: p <0,05 quando comparado aos ^aOME10 µg / mL, ^bOME 20 µg / mL e ^cOME 40 µg / mL].



O dano genotóxico não pode ser reparado porque várias mudanças estruturais nos cromossomos nos meristemas de *A. cepa* foram observadas nas anáfases, como micronúcleos (MN), pontes, cromossomos soltos e atrasos cromossômicos, que são os biomarcadores da mutagenicidade. O perfil de fotomicrografia das células meristemáticas visualizadas na **Figura 2** sugere a formação de MN (A), quebras (B) ou perda de cromossomos (C e F) observados na concentração de OME 40 µg / mL, enquanto que D e E indicam pontes e atrasos cromossômicos.

Figura 2. Fotomicrografia dos efeitos mutagênicos de OME em células meristemáticas de *A. cepa*. [Coloração com carmin acético, ampliação de 400X sob o microscópio óptico. A: MN em profase; B: fragmentos cromossômicos na metafase; C: metafase; D: ponte cromossômica na anafase; E: atrasos cromossômicos; F: perda cromossômica na anafase] danos encontrados na concentração de 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$.



O OME em todas as concentrações (10, 20 e 40 mg / mL) aumentou o número de alterações estruturais nos cromossomos durante o processo de divisão celular nos meristemas de *A. cepa*, especialmente atrasos anafásicos (**Figura 3A**). No entanto, as atividades antimutagênicas de PR e / ou AA foram observadas com a inibição de tais eventos variando de 64 a 74,5% causados por OME (**Figura 3B**).

OME induziu toxicidade nas duas maiores concentrações testadas (20 e 40 mg / mL) em *A. cepa* pela inibição do crescimento radicular (um biomarcador de toxicidade macroscópica). No entanto, no co-tratamento com PR e / ou AA, estes danos tóxicos foram totalmente modulados, especialmente em 20 mg / mL de OME. O PR inibiu cerca de 47 a 50% de toxicidade, enquanto AA em 15 a 44%. No entanto, a associação de PR + AA modulou os efeitos tóxicos induzidos por OME em 43 a 65% (**Figura 4**).

A citotoxicidade em *A. cepa* é avaliada por meio do parâmetro de contagem de células microscópicas nas fases de divisão celular. OME induziu citotoxicidade apenas na mais alta concentração testada (40 mg / mL) (**Figura 5A**). No entanto, o efeito citotóxico do OME foi modulado pelo PR e / ou AA na faixa de 16 a 28,8% (**Figura 5B**).

Figura 3. Mutagenicidade do OME e os efeitos moduladores do PR e / ou AA em *A. cepa* [Os valores médios são \pm DP e porcentagem, (n = 5), ANOVA one-way e Bonferroni pós-teste, valores significativos de $p < 0,05$ quando comparado ao ^aCN, ^bCP, ^cOME 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$, ^dOME 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$, ^eOME 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$, PR-retinol palmitato (100 UI / kg), AA - ácido ascórbico (2,0 $\mu\text{M} / \text{mL}$), CP - controle positivo (sulfato de cobre a 0.0006 mg / mL), CN controle negativo (água desclorada)] em **A** resultados de alterações cromossômicas; em **B** percentual de modulação.

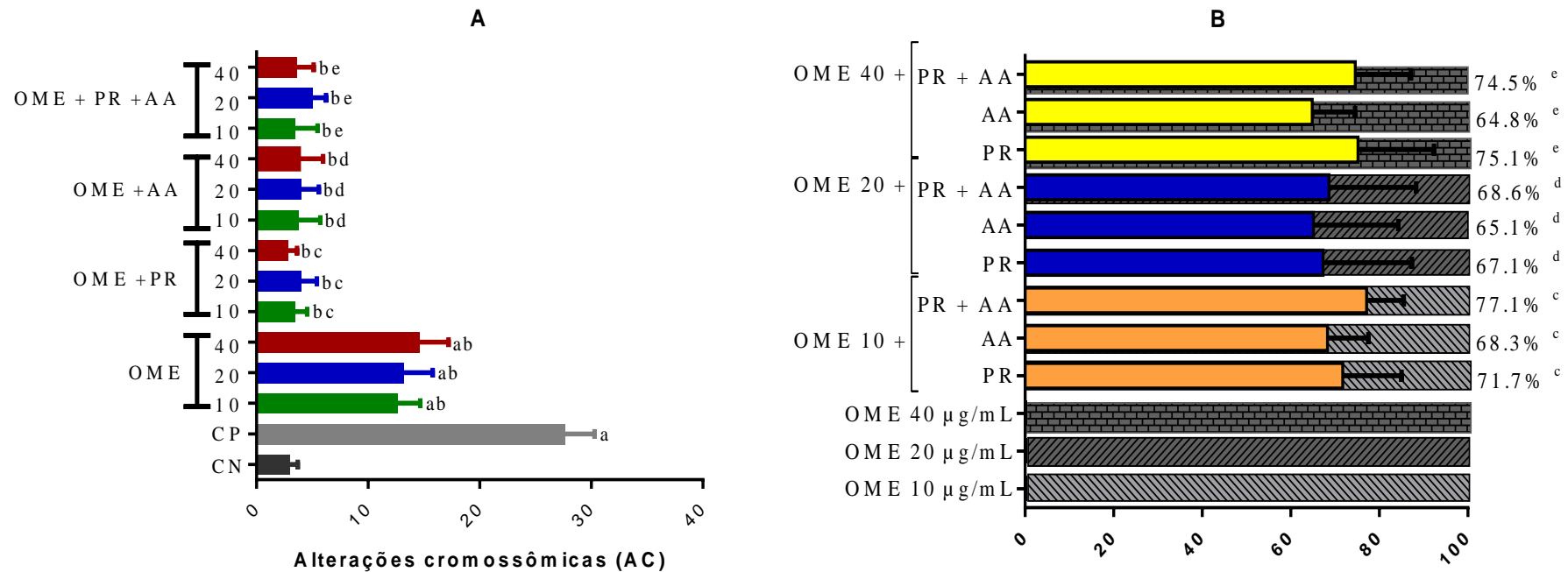


Figura 4. Toxicidade do OME e os efeitos do PR e / ou AA em *A. cepa* [Os valores são médios \pm DP e porcentagem, (n = 5), ANOVA one-way e Bonferroni pós-teste, valores significativos de $p < 0,05$ quando comparado ao ^aCN, ^bCP, ^cOME 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$, ^dOME 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e ^eOME 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$, PR-retinol palmitato (100 UI / kg), AA - ácido ascórbico (2,0 $\mu\text{M} / \text{mL}$), CP - controle positivo (sulfato de cobre a 0.0006 mg / mL), CN controle negativo (água desclorada)] em **A** resultados de crescimento de raíz; em **B** percentual de modulação.

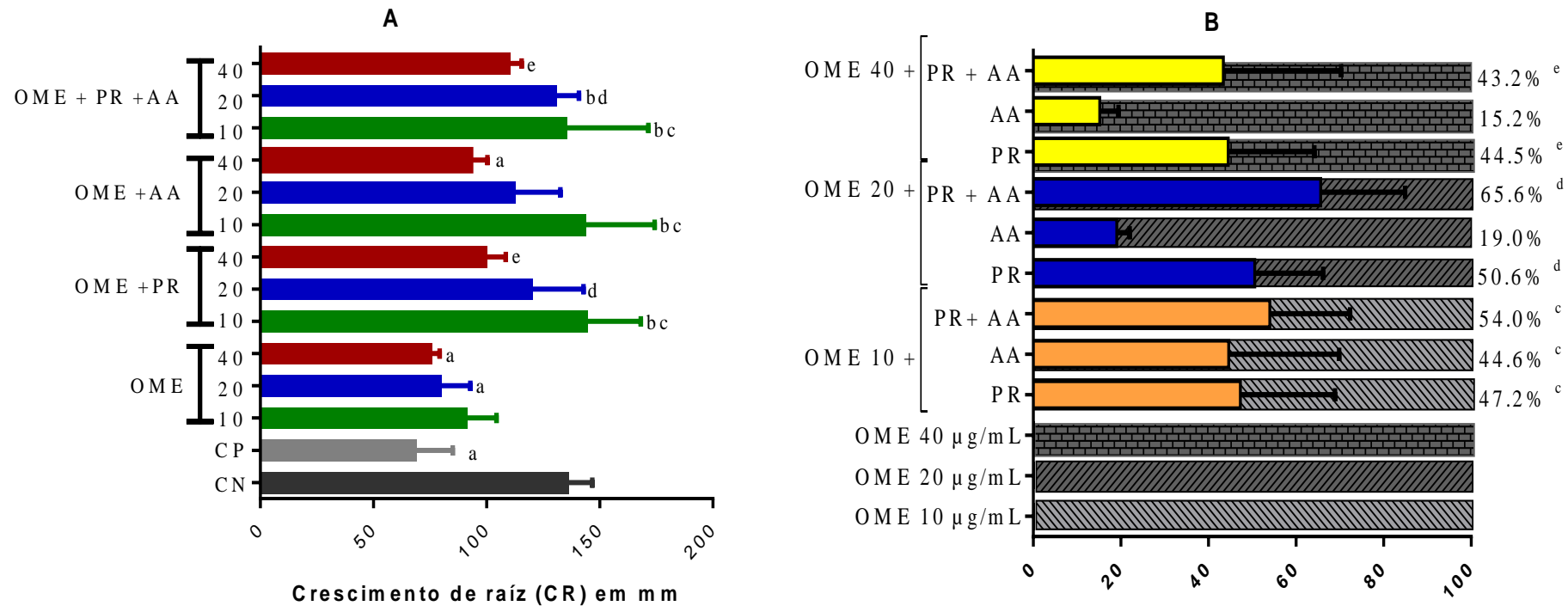
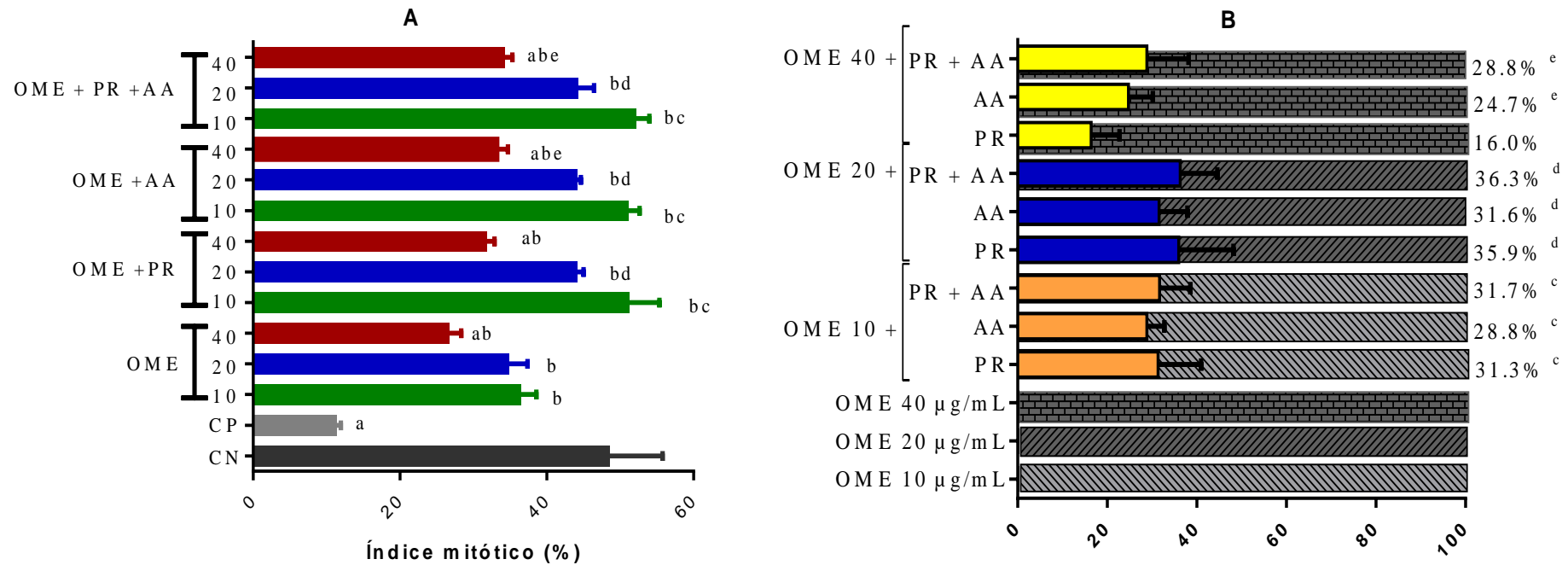


Figura 5. Citotoxicidade do OME e os efeitos do PR e / ou AA nos meristemas de raiz de *A. cepa* [Os valores médios são \pm DP e porcentagem, (n = 5), ANOVA one-way e Bonferroni pós-teste, valores significativos de $p < 0,05$ quando comparado ao ^aCN, ^bCP, ^cOME 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$, ^dOME 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e ^eOME 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$, PR-retinol palmitato (100 UI / kg), AA - ácido ascórbico (2,0 $\mu\text{M} / \text{mL}$) CP - controle positivo (sulfato de cobre a 0.0006 mg / mL), CN - controle negativo (água desclorada)] em **A** resultados de índice mitótico; em **B** percentual de modulação.



4 Discussão

Estudos de danos ao DNA a nível cromossômico são necessários em estudos toxicogenéticos (Sharma e Bhonde, 2015). No presente estudo, a OME induziu a genotoxicidade aumentando o ID e FD de forma dependente da concentração em células meristemáticas de *A. cepa*, e mutagenicidade através de alterações cromossômicas. Além disso, o OME também induziu toxicidade inibindo o crescimento radicular nas duas maiores concentrações, bem como citotoxicidade na maior concentração. OME pode alterar a flora bacteriana do trato gastrointestinal levando a má absorção, infecções entéricas e causar lesões agudas ou crônicas nas células gástricas, pelo efeito compensatório, em resposta à diminuição do ácido com trombocitopenia, nefrite intersticial aguda, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, reações anafiláticas, ginecomastia e impotência (THOMSON et al., 2010).

Além desses efeitos adversos, o OME pode causar a destruição da glândula gástrica e a hipergastrinemia persistente, que pode ser denominada como "gastrite atrófica" devido à monoterapia com OME no contexto da infecção por *H. pylori*, tem sido associada a um risco aumentado de displasia da mucosa e câncer gástrico (KOHLENER et al., 2010; ARAI e GALLERANI, 2011).

OME também pode induzir soluços ou achloridria levando à formação de N-nitossaminas, que alteram os materiais genéticos devido a anormalidades nucleares, como MN, picnoses e cariátrore (NOVOTNA et al., 2014). É evidente que o OME, bem como o lansoprazol, o pantoprazol, a fenolftaleína, o rabeprazol e a sulfasalazina podem causar danos cromossômicos (BRAMBILLA et al., 2010), como observado no presente estudo sobre a formação de MN, pontes, cromossomos soltos e atrasos. O dano genotóxico é indicativo de efeitos mutagênicos e é caracterizado por agentes que causam instabilidade genética, incluindo alterações cromossômicas, portanto, efeitos tóxicos (ADEYEMO e FARINMADE, 2013).

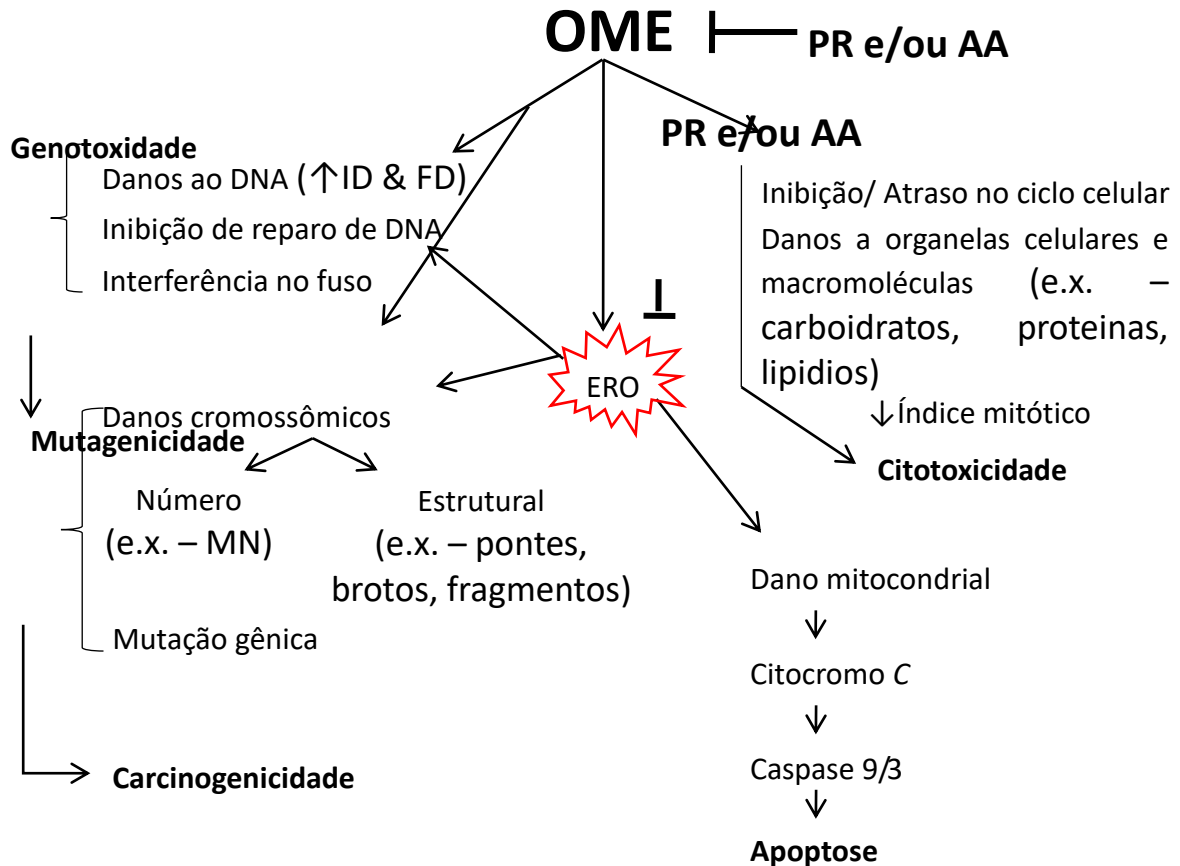
A partir deste estudo, evidenciou-se que o OME induz instabilidade genética (IG), pois causou danos ao DNA e as anormalidades nucleares dos cromossomos em *A. cepa*. IG é um dos marcadores de câncer (PALMEIRA et al., 2011) e seu monitoramento é importante em terapêutica, especialmente por alterações nos cromossomos (FERGUSON et al., 2015) que podem causar mutações e iniciar o processo de carcinogênese (BURRELL e SWANTON, 2014), e a progressão do tumor (ASATRYAN e KOMAROVA, 2016), com vias múltiplas,

danos nos telômeros, amplificação cromossômica, modificações epigenéticas, dano ao DNA (FERGUSON et al., 2015) e alterações nas proteínas, como DNA polimerase e cofatores e quebras de fitas (DESHMUKH et al., 2016).

Outra consequência das IGs são os riscos de citotoxicidade (por apoptose), com a consequente inibição do índice mitótico (IM). Substâncias que são citotóxicas podem inibir o crescimento de organismos vegetais em algumas plantas (YILDIZ et al., 2009). Por exemplo, *A. cepa* (HERRERO et al., 2012), como observado nos estudos de OME na maior concentração em *A. cepa*, indicando que a OME a esta concentração pode ter uma ação mitodispressiva, conforme definido por Sharma e Vig (2012) que caracteriza as substâncias que interferem no ciclo celular normal com a diminuição do número de células. O IM pode identificar de forma confiável a presença de efeitos citotóxicos de uma substância. Uma redução de 50% no IM quando comparado ao CN é um valor limitante: <50% de redução induz um efeito sub-letal e <22% causa um efeito letal (MESI e KOPLIKU, 2013). Possíveis eventos citogenéticos do OME em sistema eucariótico com base no teste de *A. cepa*.

Omeprazol (OME) inibindo ou atrasando o ciclo celular, danificando organelas celulares e macromoléculas celulares como carboidratos, proteínas, lipídios podem induzir citotoxicidade. Além disso, ao induzir espécies reativas de oxigênio (ERO's), isso pode danificar as mitocôndrias, levando a liberar o citocromo C e ativa a caspase 9/3, resultando em morte celular apoptótica. OME e o stress oxidativo induzido pelo OME podem causar danos nos materiais genéticos (por exemplo - DNA e RNA), inibir a capacidade de reparo e causar interferência do fuso, resultando em efeitos genotóxicos. Além disso, a mutagenicidade pode ocorrer por danos cromossômicos induzidos por OME e mutação genética nas células hospedeiras. Finalmente, a genotoxicidade pode se transformar em mutagenicidade, eventualmente para a carcinogenicidade. O palmitato de Retinol (PR) e / ou o ácido ascórbico (AA) podem inibir ou interferir nos processos citogenéticos globais causados pelo OME, especialmente como antioxidantes que podem atuar contra ERO's. No entanto, ambos os antioxidantes também podem modular os danos citogenéticos causados pelo OME. ID - índice de dano, FD - frequência de dano, MN – micronúcleos está demonstrado na **Figura 6**.

Figura 6. Possíveis eventos citogenéticos do OME em sistema eucariótico com base no teste de *A. cepa*.



Estudos relataram que o OME aumenta as taxas de apoptose no tratamento de células em conjunto com paclitaxel em células quimiorresistentes (HeyA8-MDR, SKOV3-TR) e em carcinoma de células claras (ES-2, RMG-1) (LEE et al., 2015). Nas células de câncer gástrico humano (HGC-27), o OME inibiu seletivamente a proliferação celular (ZHAZG et al., 2013). No carcinoma do cólon em um modelo xenográfico e nas células do cólon, com aumento da secreção de gastrina, o OME pode aumentar a expressão do gene de resposta imediata do X-1 (IEX-1), um gene sensível ao estresse (MÜERKÖSTER et al., 2008). As propriedades apoptóticas do OME também foram sugeridas pela redução de Bcl-2 (AL-WAJEEH et al., 2017), Bcl-xL e survivina, outra proteína antiapoptótica e p21 que desempenha um papel essencial na parada do ciclo celular após o dano do DNA (MÜERKÖSTER et al., 2008; PATLOLLA et al., 2012).

A partir da discussão acima, vários mecanismos podem ser sugeridos para os efeitos genotóxicos, mutagênicos, tóxicos e mitogênicos do OME, no entanto, estudos mostram que o OME pode amplificar o estresse oxidativo inerente à gastrite, causando lesões na mucosa gástrica (KOHLENER et al., 2010). Estas lesões gástricas também são características da gastrite

atrófica crônica, úlceras precancerosas devido ao aumento do estresse oxidativo nas patologias gástricas associadas a *H. pylori* (WADHWA et al., 2014). Mas há relatos de que as drogas podem contribuir para a elevação dos níveis de estresse oxidativo (HERBET et al., 2016) e que a suplementação com esses antioxidantes garante o equilíbrio das espécies reativas de oxigênio (ERO), com a modulação do estresse oxidativo (MURPHY-MARSHMAN et al., 2017).

Assim, o OME pode causar danos ao DNA, possivelmente por falta de reparação, enquanto a mutagenicidade alterando a estrutura cromossômica observadas e a citotoxicidade pela interferência da divisão celular. No entanto, essas alterações toxicogênicas foram inibidas e / ou moduladas pela ação de vitaminas (PR e / ou AA), demonstrando que essas vitaminas têm efeitos antígenotóxicos, antimutagênicos, anticitotóxicos e antitóxicos. Para minimizar essas mudanças, podem induzir mecanismos de equilíbrio entre os efeitos antioxidantes e pró-oxidantes e são capazes de neutralizar os ERO's (PORTANTIOLO et al., 2014).

O PR possui a capacidade de neutralização de ERO's, pois reduz os efeitos oxidativos e nitrosativos (MORAES et al., 2016), diminui a peroxidação lipídica, estimula enzimas antioxidantes (CHA et al., 2016) e atua no ciclo celular (SHAO et al., 2016), disfunção mitocondrial e apoptose celular (OLIVEIRA, 2015). Estudos em ensaios clínicos mostraram que retinóides são ativos na redução de alguns tipos de câncer primário, como tumores do trato digestivo, carcinomas pulmonares e hepatocelulares (LEE et al., 2010). Assim, apesar de muitas controvérsias, os precursores de vitamina A, como retinol, PR e carotenóides podem ser aplicados em terapias contra o câncer (FELISBINO et al., 2014; RAHAL et al., 2014), devido ao seu efeito antiproliferativo, antioxidante, pró-apoptótico e efeitos de indução de diferenciação (PERSAUD et al., 2016).

Como o PR, AA pode interagir com radicais livres, sequestrá-los e prevenir a oxidação e danos ao DNA, bem como ser capaz de modular o sistema enzimático que gera radicais livres e aumenta a atividade de SOD como doador de elétrons e agente redutor em vários fatores biológicos reações no corpo que impedem a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (GONZÁLEZ-FUENTES et al., 2015; Estevinho et al., 2016). Há relatos sobre o uso de AA para o tratamento da erradicação de *H. pylori* em caso de gastrite, pode aumentar a taxa de efetividade do tratamento com IBP's e modular os efeitos oxidativos de OME (ZOJAJI et al., 2009).

No entanto, os efeitos observados do PR e / ou AA foram mais proeminentes com a modulação de até 70% de mutagenicidade induzida por OME em *A. cepa*. Há relatos de que a associação de vitaminas tem importância na proteção e inibição de efeitos oxidativos (SUN et

al., 2017) e prevenção de riscos para vários tipos de câncer, como adenomas (XU et al., 2013), colon (HEINE-BRÖRING et al., 2015), ovário (KOUSIK et al., 2015), próstata (TOMASETTI et al., 2012) e especialmente para câncer gástrico (KONG et al., 2014).

5 Conclusão

OME em *A. cepa* induziu efeitos genotóxicos (danos ao DNA) e mutagênicos (micronúcleos, fragmentos, atrasos e perdas cromossômicas) em todas as concentrações testadas, tóxico nas duas maiores concentrações e citotóxicos na maior concentração. O co-tratamento com PR e / ou AA inibe e / ou modula os danos citogenéticos causados pelo OME, indicando que estas vitaminas podem ter atividades antigenotóxicas, antimutagênicas, antitóxicas e anti-citotóxicas. Estes resultados sugerem perspectivas para estudos citogenéticos pré-clínicos e clínicos com OME associada a vitaminas. Estudar os efeitos mutagênicos dos compostos químicos é extremamente importante na avaliação da segurança, especialmente para os produtos farmacêuticos antes do início dos ensaios clínicos.

Conflitos de interesse

Nenhum declarado

Agradecimentos

Somos gratos à Universidade Federal do Piauí (UFPI) e à NTF, no Brasil, por hospedar e financiar este projeto.

Referências

- ADEYEMO, O A ; FARINMADE, A E. Genotoxic and cytotoxic effects of food flavor enhancer, monosodium glutamate (MSG) using *Allium cepa* assay. **African Journal of Biotechnology**, ., v. 12, p.1459-1466, jan. 2013.
- AL-WAJEEH, Nahla Saeed et al. The antiulcer effect of *Cibotium barometz* leaves in rats with experimentally induced acute gastric ulcer. **Drug Design, Development And Therapy**, [s.l.], v. 11, p.995-1009, mar. 2017. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s107018>.
- ARAI, A.E.; GALLERANI, S.M.C., Uso Crônico de Fármacos Inibidores da Bomba de Prótons: Eficácia Clínica e Efeitos Adversos. Monografia (Especialização em Farmacologia) – **Centro Universitário Filadélfia – Londrina**, 2011.
- ASAIKKUTTI, Annamalai et al. Effect of different levels dietary vitamin C on growth performance, muscle composition, antioxidant and enzyme activity of freshwater prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. **Aquaculture Reports**, [s.l.], v. 3, p.229-236, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.04.002>.
- ASATRYAN, Ani D.; KOMAROVA, Natalia L.. Evolution of genetic instability in heterogeneous tumors. **Journal Of Theoretical Biology**, [s.l.], v. 396, p.1-12, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.11.028>.
- BANALA, Rajkiran Reddy; KARNATI, Pratap Reddy. Vitamin A deficiency: An oxidative stress marker in sodium fluoride (NaF) induced oxidative damage in developing rat brain. **International Journal Of Developmental Neuroscience**, [s.l.], v. 47, p.298-303, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.08.010>.
- BRAMBILLA, Giovanni; MATTIOLI, Francesca; MARTELLI, Antonietta. Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants. **Toxicology**, [s.l.], v. 261, n. 3, p.77-88, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2009.04.056>.
- BURRELL, Rebecca A.; SWANTON, Charles. Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. **Molecular Oncology**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.1095-1111, 10 jul. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2014.06.005>.
- CHA, Jung-hwa; YU, Qi-ming; SEO, Jung-sook. Vitamin A supplementation modifies the antioxidant system in rats. **Nutrition Research And Practice**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.26-30, 2016. The Korean Nutrition Society and The Korean Society of Community Nutrition (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.4162/nrp.2016.10.1.26>.
- DESHMUKH, Amit Laxmikant et al. Dynamics of replication proteins during lagging strand synthesis: A crossroads for genomic instability and cancer. **Dna Repair**, [s.l.], v. 42, p.72-81, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.04.010>.
- DOWNES, Noel; FOSTER, John. Regulatory Forum Opinion Piece: Carcinogen Risk Assessment. **Toxicologic Pathology**, [s.l.], v. 43, n. 8, p.1064-1073, 21 ago. 2015. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0192623315598578>.

LIMA, Aliny Pereira et al. Cytotoxicity and Apoptotic Mechanism of Ruthenium(II) Amino Acid Complexes in Sarcoma-180 Tumor Cells. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 10, p.105-125, 17 out. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0105865>.

FERGUSON, Lynnette R. et al. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. **Seminars In Cancer Biology**, [s.l.], v. 35, p.5-24, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.005>.

HEINE-BRÖRING, Renate C. et al. Dietary supplement use and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analyses of prospective cohort studies. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 136, n. 10, p.2388-2401, 11 nov. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29277>.

HERBET, Mariola et al. Estimation of oxidative stress parameters in rats after simultaneous administration of rosuvastatin with antidepressants. **Pharmacological Reports**, [s.l.], v. 68, n. 1, p.172-176, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2015.08.004>.

HERRERO, O. et al. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 743, n. 1-2, p.20-24, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.028>.

ISLAM, Muhammad Torequl et al. Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion. **Chemosphere**, [s.l.], v. 177, p.93-101, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.145>.

KOHLER, Jonathan E. et al. Antioxidant pre-treatment prevents omeprazole-induced toxicity in an in vitro model of infectious gastritis. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 49, n. 5, p.786-791, 1 set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.034>.

KONG, Pengfei et al. Vitamin Intake Reduce the Risk of Gastric Cancer: Meta-Analysis and Systematic Review of Randomized and Observational Studies. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.1160-1170, 30 dez. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116060>.

KOSMA, Christina I.; LAMBROPOULOU, Dimitra A.; ALBANIS, Triantafyllos A.. Analysis, occurrence, fate and risks of proton pump inhibitors, their metabolites and transformation products in aquatic environment: A review. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 569-570, p.732-750, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.160>.

KOUSHIK, Anita et al. Intake of vitamins A, C, and E and folate and the risk of ovarian cancer in a pooled analysis of 10 cohort studies. **Cancer Causes & Control**, [s.l.], v. 26, n. 9, p.1315-1327, 14 jul. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10552-015-0626-0>.

KUMAR, Kirthi R. et al. Helicobacter gastritis induces changes in the oxyntic mucosa indistinguishable from the effects of proton pump inhibitors. **Human Pathology**, [s.l.], v. 44, n. 12, p.2706-2710, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2013.07.015>.

LEE, Ga-yi; LEE, Jong Jyun; LEE, Seung-min. Antioxidant and Anticoagulant Status Were Improved by Personalized Dietary Intervention Based on Biochemical and Clinical Parameters in Cancer Patients. **Nutrition And Cancer**, [s.l.], v. 67, n. 7, p.1083-1092, 2 set. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2015.1073754>.

LEE, Ju Hye et al. Vitamin A Enhances Antitumor Effect of a Green Tea Polyphenol on Melanoma by Upregulating the Polyphenol Sensing Molecule 67-kDa Laminin Receptor. **Plos One**, [s.l.], v. 5, n. 6, p.11051-11060, 10 jun. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.001105>.

LEE, P.; VOUSDEN, K.H.; CHEUNG, E.C. TIGAR,.. Burning bright. **Cancer & Metabolism**, 2, 1-9, 2014.

LIMA, APV; FILHO, MAN., Efeitos em longo prazo de inibidores da bomba de prótons. **J. Surgery Clin.I Res.** 5, 45-49, 2014.

LIMAN, Recep. Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by Allium and Comet assay. **Chemosphere**, [s.l.], v. 93, n. 2, p.269-273, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.076>.

MELBOURNE, Austrália Publicado em Global Family Doctor 2011. Inibidores da bomba de prótons-efeitos adversos incomuns. Disponível em: <http://www.sbmfc.org.br/default.asp?siteAcao=mostraPagi na&paginaId=748>. Acesso em: 10 set. 2013.

MESI, Anila; KOPLIKU, Ditika. Cytotoxic and Genotoxic Potency Screening of Two Pesticides on Allium cepa L. **Procedia Technology**, [s.l.], v. 8, p.19-26, 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.protcy.2013.11.005>.

Moura AG, Santana GM, Ferreira PMP, Sousa JMC, Peron AP., 2016. Cytotoxicity of cheese and Cheddar cheese food fl avorings on Allium cepa L root meristems. **Braz J Biol**, 76, 439-443.

MÜERKÖSTER, S Sebens et al. The apoptosis-inducing effect of gastrin on colorectal cancer cells relates to an increased IEX-1 expression mediating NF-κB inhibition. **Oncogene**, [s.l.], v. 27, n. 8, p.1122-1134, 20 ago. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210728>.

MURPHY-MARSHMAN, Hannah et al. Antioxidants and NOX1/NOX4 inhibition blocks TGFβ1-induced CCN2 and α-SMA expression in dermal and gingival fibroblasts. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 10, p.0186740-0186740, 19 out. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0186740>.

NOVOTNA, Aneta et al. Differential Effects of Omeprazole and Lansoprazole Enantiomers on Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Hepatocytes and Cell Lines. **Plos One**, [s.l.], v. 9,

n. 6, p.98711-98711, 2 jun. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098711>.

ÖZKARA, Arzu et al. Potential cytotoxic effect of Anilofos by using *Allium cepa* assay. **Cytotechnology**, [s.l.], v. 67, n. 5, p.783-791, 17 maio 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10616-014-9716-1>.

OLIVEIRA, Marcos Roberto de. Vitamin A and Retinoids as Mitochondrial Toxicants. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2015, p.1-13, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/140267>.

PALMEIRA, Carlos et al. CIS is a surrogate marker of genetic instability and field carcinogenesis in the urothelial mucosa. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.205-211, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2009.07.022>.

STERBINI, Francesco Paroni et al. Effects of Proton Pump Inhibitors on the Gastric Mucosa-Associated Microbiota in Dyspeptic Patients. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 82, n. 22, p.6633-6644, 2 set. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01437-1>.

PATLOLLA, J M. Anti-carcinogenic properties of omeprazole against human colon cancer cells and azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci formation in rats. **International Journal Of Oncology**, [s.l.], p.170-175, 28 set. 2011. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijco.2011.1214>.

PERSAUD, Shawna D. et al. All trans-retinoic acid analogs promote cancer cell apoptosis through non-genomic Crabp1 mediating ERK1/2 phosphorylation. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-10, 3 mar. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep22396>.

PORTANTIOLO TN, VALE IAV, BERGMAN RB, ALIB RT. Consumo de vitaminas antioxidantes por mulheres com câncer de mama submetidas ao tratamento quimioterápico na cidade de Pelotas-RS. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 2014; 60 (4): 323-9.

RAHAL, Anu et al. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2014, p.1-19, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/761264>.

SEOANE, Marta; ESPERANZA, Marta; CID, Ángeles. Cytotoxic effects of the proton pump inhibitor omeprazole on the non-target marine microalga *Tetraselmis suecica*. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 191, p.62-72, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.001>.

SHAO, Liye et al. Effects of dietary vitamin A on growth, hematology, digestion and lipometabolism of on-growing gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). **Aquaculture**, [s.l.], v. 460, p.83-89, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.054>.

SHARMA, S., VIG, A.P., Genotoxicity of Atrazine, Avenoxan, Diuron and Quizal of op-P-ethyl Herbicides using the Allium cepa Root Chromosomal Aberration Assay. *Terrestrial Aquatic Environ. Terrestrial and aquatic Environmental Toxicology*, v. 6, 90-95, 2012.

SUN, Wuping. Effects of B Vitamins Overload on Plasma Insulin Level and Hydrogen Peroxide Generation in Rats. *The Chinese Journal Of Physiology*, [s.l.], v. 60, n. 4, p.207-214, 31 ago. 2017. Chinese Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.4077/cjp.2017.baf469>.

THOMSON, Alan Br. Safety of the long-term use of proton pump inhibitors. *World Journal Of Gastroenterology*, [s.l.], v. 16, n. 19, p.2323-2330, 2010. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v16.i19.2323>.

TOMASETTI, Marco et al. Alpha-Tocopheryl Succinate Inhibits Autophagic Survival of Prostate Cancer Cells Induced by Vitamin K3 and Ascorbate to Trigger Cell Death. *Plos One*, [s.l.], v. 7, n. 12, p.52263-52263, 18 dez. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052263>.

TÜRKOĞLU, Şifa. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in Allium cepa root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. *Pesticide Biochemistry And Physiology*, [s.l.], v. 103, n. 3, p.224-230, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.06.001>.

WADHWA, Roopma et al. Gastric cancer—molecular and clinical dimensions. *Nature Reviews Clinical Oncology*, [s.l.], v. 10, n. 11, p.643-655, 24 set. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.170>.

XU, Xiaodong et al. Dietary intake of vitamins A, C, and E and the risk of colorectal adenoma. *European Journal Of Cancer Prevention*, [s.l.], v. 22, n. 6, p.529-539, nov. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/cej.0b013e328364f1eb>.

YANAGIHARA, Gabriela Rezende et al. Efeitos da administração em longo prazo do omeprazol sobre a densidade mineral óssea e as propriedades mecânicas do osso. *Revista Brasileira de Ortopedia*, [s.l.], v. 50, n. 2, p.232-238, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2014.05.012>.

YILDIZ, Mustafa et al. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in Allium cepa root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*, [s.l.], v. 75, n. 7, p.934-938, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.023>.

ZEIGER, Errol et al. Opportunities to integrate new approaches in genetic toxicology: An ILSI-HESI workshop report. *Environmental And Molecular Mutagenesis*, [s.l.], v. 56, n. 3, p.277-285, 6 dez. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/em.21923>.

ZHANG, Qiaoyin et al. The H⁺/K⁺-ATPase inhibitory activities of Trametenolic acid B from *Trametes lactinea* (Berk.) Pat, and its effects on gastric cancer cells. *Fitoterapia*, [s.l.], v. 89, p.210-217, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2013.05.021>.

ZOJAJI, H. et al. The efficacy of Helicobacter pylori eradication regimen with and without vitamin C supplementation. **Digestive And Liver Disease**, [s.l.], v. 41, n. 9, p.644-647, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2008.09.008>.

Capítulo III

Alterações toxicogenéticas induzidas por omeprazol e efeitos de sua associação com antioxidantes em camundongos

*Artigo submetido à Revista: NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF
PHARMACOLOGY*

Qualis: B1 para Farmácia

Alterações toxicogenéticas induzidas por omeprazol e efeitos de sua associação com antioxidantes em camundongos

Antonio Lima Braga^{1,2}, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz^{1,2}, Rosália Maria Tôrres de Lima^{1,2}, Ana Maria Oliveira da Mata^{1,2}, Antonielly Campinho dos Reis^{1,2}, Muhammad Torequl Islam^{2,3*}, José Victor de Oliveira Santos^{1,2}, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar^{1,2}, Ag-Anne Pereira Melo de Meneses^{1,2}, Antonio Luiz Gomes Júnior^{1,2}, Ricardo Melo de Carvalho^{1,2}, Hercília Maria Lins Rolim², João Marcelo de Castro e Sousa^{2,4}, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^{1,2}

¹Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica, LAPGENIC - Universidade Federal do Piauí, UFPI, Ininga, CEP: 64.049-550, Teresina/PI – Brasil. E-mail: tonny.L.b@hotmail.com

²Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brasil

³Departamento de Farmácia, Southern University Bangladesh, Mehedibag, Chittagong 4000, Bangladesh.

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Piauí, Picos, (Piauí), 64.607-670, Brasil.

RESUMO

Doenças gástricas e intestinais são problemas de saúde comuns no mundo. Os medicamentos utilizados estão associados aos efeitos do ácido gástrico, incluindo inibidores da bomba de prótons, por exemplo, o omeprazol (OME) também possui alguns efeitos adversos e pode induzir instabilidade genética. Este estudo avaliou os efeitos toxicogenéticos do OME em camundongos (*Mus musculus*). Para isso, 40 camundongos machos foram subdivididos em 8 grupos experimentais (n = 5) e tratados com OME em doses de 10, 20 e 40 mg / kg e / ou co-tratados com palmitato de retinol (100 UI) e ácido ascórbico (2,0 mM / kg). A ciclofosfamida (50 mg / kg) foi utilizada como um grupo de controle positivo, e camundongos não tratados como controle negativo. Após 14 dias de tratamento, as células do estômago e da medula óssea, assim como os linfócitos do sangue periférico, foram coletadas e submetidas ao teste do cometa (versão alcalina) e ao teste do micronúcleo. Além disso, determinaram-se parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais. OME induziu genotoxicidade em camundongos, em todas as doses testadas, aumentando o índice e a frequência de dano do DNA das células avaliadas, que após 14 dias não foram reparadas. O OME também mostrou mutagenicidade (formação de micronúcleos, pontes e brotos) e citotoxicidade (aumento de células binucleadas, apoptose e diminuição da proporção de eritrócitos) em animais. No entanto, em associação com os antioxidantes, estes efeitos foram modulados e / ou inibidos juntamente com capacidade de reparo do DNA avaliados no ensaio cometa. Os achados sugerem a possibilidade de aplicação clínica desses biomarcadores no monitoramento da terapia com OME, de preferência associada aos antioxidantes para prevenção de instabilidade genética e câncer.

Palavras-chave: Inibidor da bomba de prótons; Toxicogenética, Palmitato de retinol, Ácido ascórbico.

ABSTRACT

Gastric and intestinal diseases are common health problems in the world. The drugs used are associated with the effects of gastric acid, including proton pump inhibitors, for an example, omeprazole (OME) also has some adverse effects, and can induce genetic instability. This study evaluated toxicogenic effects of OME in mice (*Mus musculus*). For this, 40 male mice were subdivided into 8 experimental groups (n = 5) and treated with OME at doses of 10, 20 and 40 mg/kg and/or co-treated with the antioxidants retinol palmitate (1000 IU) and ascorbic acid (50 mM/kg). Cyclophosphamide (50 mg/kg) was served as a positive control group, while un-treated as negative control. After 14 days of treatment the cells of the stomach and bone marrow as well as peripheral blood lymphocytes were collected and submitted to the comet assay (alkaline version) and micronucleus test. Additionally, hematological and biochemical parameters of the animals were also determined. OME in mice induced genotoxicity, at all doses tested, by increasing the index and frequency of DNA damage of the evaluated cells, which after 14 days were not repaired. OME also showed mutagenicity (formation of micronuclei, bridges and shoots) and cytotoxicity (increase of binucleate cells, apoptosis and decrease in erythrocyte ratio) in animals. However, in association with the antioxidants, these effects were modulated and/or inhibited along with a DNA repair capacity. The findings suggest the possibility of clinical application of these biomarkers in monitoring the therapy with OME, preferably associated with the antioxidants for the prevention of genetic instability and cancer.

Keywords: Proton pump inhibitor; Toxicogenetics, Retinol palmitate, Ascorbic acid.

1 Introdução

A gastrite crônica (GC) é uma inflamação da mucosa do estômago preditiva de mudanças patológicas mais graves, como úlcera péptica e câncer gástrico (WHITEET al., 2015). A extensão e distribuição de uma gastrite pode determinar a formação de úlcera péptica, uma complicação da infecção por *Helicobacter pylori*, com exposição a ácido e pepsina pela mucosa gástrica (GRAHAM, 2014). O *H. pylori* está associado ao carcinoma gástrico (CG) induzindo um aumento nas espécies reativas e estimulando a produção de oncoproteínas, como o antígeno associado a citotoxina (CagA) (WADHWA et al., 2014). Omeprazol (OME) é um dos medicamentos mais utilizados para a inibição da secreção de ácido gástrico no tratamento da doença do refluxo gastroesofágico (RGE), úlcera péptica e erradicação de *H. pylori* (YANAGIHARA et al., 2015).

Um dos principais mecanismos de ação do OME é a ativação seletiva e covalente com $H^+ / K^+ ATPase$, particularmente a cisteína extracelular 813, levando a uma potente inibição da secreção de ácido gástrico e desencadeando mudanças na flora do estômago (Savarino et al., 2017). No entanto, o OME também pode alterar a flora bacteriana do trato gastrointestinal levando a má absorção, infecções entéricas e indução de lesões agudas ou crônicas nas células da glândula gástrica pelo efeito compensatório em resposta à diminuição do ácido. Inspeção da infecção por *H. pylori*, tem sido associada a um risco aumentado de displasia de mucosa e câncer gástrico (YANAGIHARA et al., 2015).

Assim, a alta prevalência de doenças gastroesofágicas e a relevância dos efeitos colaterais induzidos por drogas, como o OME, incluindo especialmente os riscos de instabilidade genética (IG), apoiam o desenvolvimento de estratégias terapêuticas efetivas que garantem que IG leva ao acúmulo de mutações, um passo inicial no processo de carcinogênese (INCA, 2016) e progressão tumoral (ASATRYAN e KOMAROVA, 2016), com vias múltiplas, danos teloméricos, amplificação cromossômica, modificações epigenéticas e danos ao DNA (FERGUSON et al., 2015).

Também deve ser enfatizado que as drogas contribuem para a elevação dos níveis de estresse oxidativo (HERBET et al, 2016), que é considerado um dos mecanismos importantes para o dano ao DNA pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's) devido ao desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e os níveis de estresse oxidativo (GUNASEKARANA et al., 2015). O ácido ascórbico (AA) e o alfa-tocoferol são antioxidantes que podem modular as ações apoptóticas, citotóxicas e genotóxicas nas células

do sangue (GARCÍA-RODRÍGUEZ et al., 2016). Há relatos sobre a importância da suplementação de vitaminas antioxidantes em terapias medicamentosas (RAHAL et al., 2014) para a regulação da peroxidação lipídica (CHA et al., 2016). Como exemplo, o palmitato de retinol (PR) tem a capacidade de modular o estresse oxidativo e reduzir o dano citogenético contra o tratamento de antineoplásicos, como doxorrubicina (DOX), ciclofosfamida (CPA) e esquema AC (CARVALHO et al., 2017).

A genotoxicidade é um dos estágios iniciais do câncer, por isso os biomarcadores detectáveis (danos ao DNA e alterações nucleares), incluindo a citogenética, são recomendados pela Organização para Testes de Diretrizes para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OTDCDE). Entre eles, destacamos os seguintes testes: cometa, aberrações cromossômicas, reversão bacteriana, troca de cromátides e micronúcleos (MN) (KANG et al., 2013). Esses biomarcadores, especialmente MN e alterações cromossômicas (FERGUSON et al., 2015) são associado à predisposição do tumor (HODSKINSON et al., 2014), e foram aplicados na biomonitorização de IG (HAYASHI, 2016), em estudos não clínicos e clínicos. O objetivo do estudo foi avaliar possíveis alterações toxicogenéticas do OME, indicativas de genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade, bem como os efeitos moduladores da associação de PR e AA com dano citogenético do OME na medula óssea, linfócitos do sangue periférico e células estomacais de ratos, com a aplicação dos testes de cometa e MN.

2 Materiais e Métodos

Preparo das dosagens

O OME (10, 20 e 40 mg / kg), AA (2,0 mM / kg) e CPA (50 mg / kg) foram diluídos com solução fisiológica 0,9% (estéril), enquanto PR (100 UI / kg) em 0,9% solução fisiológica acrescida de 10% de DMSO (CARVALHO et al., 2017).

Modelo experimental

Quarenta *Mus musculus* (2 meses de idade, 25-30g peso corporal) obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Agrícolas - CCA da Universidade Federal do Piauí (UFPI), foram mantidos sob condições controladas (temperatura equivalente a 22 ± 1 °C; 12 horas de ciclo de luz / escuridão), com livre acesso a comida (Purina®) e água. Os animais foram divididos em 8 grupos cinco em cada um. A **Tabela 1** mostra o desenho experimental e distribuição de animais. Um tratamento total de 14 dias foi administrado por via oral. O

protocolo do estudo foi previamente autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (UFPI), sob o número de aprovação 230/16.

Tabela 1. Grupos experimentais (n = 5) utilizados neste estudo.

Grupos de Tratamento
Controle negativo (CN) - sem tratamento
Controle positivo (CP) - CPA (50 mg/kg)
G1 - OME (10 mg/kg)
G2 - OME (20 mg/kg)
G3 - OME (40 mg/kg)
G4 - OME + AA + PR (10 mg/kg + 2,0 mM/kg + 100 UI/kg)
G5 - OME + AA + PR (20 mg/kg + 2,0 mM/kg + 100 UI/kg)
G6 - OME + AA + PR (40 mg/kg + 2,0 mM/kg + 100 UI/kg)
CPA – ciclofosfamida; OME – omeprazol; PR – palmitato de retinol; AA- ácido ascórbico

Teste de cometa em camundongos tratados com OME

O teste de cometa foi realizado para avaliar os efeitos genotóxicos, de acordo com Hartmann et al. (2003) e Uno et al. (2015) em células de medula óssea, estômago e leucócitos de sangue periférico de camundongos. As células do estômago foram extraídas de raspagem leve usando um bisturi cirúrgico estéril dos animais e transferidas para tubos falcons contendo solução fisiológica (0,9%), depois centrifugados para remoção de detritos alimentares por 3x (três vezes) sob 2000 rpm durante 5 min. Após cada centrifugação, o sobrenadante foi descartado e substituído por solução fisiológica, ressuspensando as células para o ensaio de cometas. Os linfócitos do sangue periférico foram obtidos por meio de uma punção caudal em três momentos de tratamento (0 horas, 7 e 14 dias). A agarose com baixo ponto de fusão e sangue (10: 1) foram homogeneizadas e dispersas em lâminas pré-revestidas com 0,75% de agarose de ponto de fusão normal. Após a ruptura das membranas celulares na solução de lise, a eletroforese foi realizada em meio alcalino (pH > 13), seguida de neutralização no tampão Tris, fixação e coloração das lâminas com nitrato de prata (0,02%). A análise foi feita por microscopia óptica sob a ampliação de 400X, permitindo a avaliação (0, 1, 2, 3 e 4) onde 0 (zero) representa a ausência de dano e 4 (quatro) para o maior grau de dano em 100 células por animal. O teste foi realizado em duplicata (células totais analisadas por animal n = 200). Após a avaliação, foi calculado o Índice de Dano, segundo a fórmula: $ID = \sum (n^{\circ} \text{ de células com dano "y"} \times \text{classe "y" de dano})$, que variou de 0 (ex.: 100 células com dano 0 X 0) a 400 (ex.: 100 células com dano 4 X 4). Também foi calculada a frequência de dano através da fórmula: $FD = 100\% - \text{danos de classe 0}$.

Teste de Micronúcleos (MN) em medula óssea e sangue periférico de camundongos

As células de medula óssea foram extraídas dos dois ossos femorais dos animais (camundongos) lavando o canal ósseo utilizando soro bovino fetal (20%). Foram aplicados 25µL da suspensão celular sobre lâminas. Para a fixação, a coloração destas células foi feita expondo as lâminas em 10% de coloração de Giemsa. A análise foi realizada utilizando microscopia de luz sob o uso de óleo imersão e ampliação de 1000X, considerando os danos nucleares presentes em 1000 células / lâmina. O teste foi realizado em duplicata. O cálculo para a citotoxicidade dos tratamentos foi realizado quantificando o número de eritrócitos normocromáticos (ENC) e policromáticos (EPC) na medula óssea dos camundongos, avaliando 400 eritrócitos por tratamento (Furtado et al., 2008). O teste foi realizado em duplicata aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{Proporção eritrocítica} = \frac{EPC}{ENC + EPC}$$

Análises hematológicas e bioquímicas

Para este fim, o sangue do coração de cada animal foi coletado logo após a eutanásia do animal e foi centrifugado a 4000 x g durante 5 min (a 4 ° C). A análise hematológica foi realizada em um aparelho de hematologia automática (Advia 120 / Hematology Siemens). Para análise bioquímica, o plasma foi submetido a uma análise bioquímica automática utilizando Labmax 240, com kits comerciais Labtest ® para avaliar uma série de parâmetros bioquímicos.

Análise estatística

Os resultados foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) com a aplicação das comparações múltiplas do Tukey por meio do GraphPad Prism (versão 6.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California, EUA) considerando o nível de confiança de 95% e valor de p<0,05 como significante.

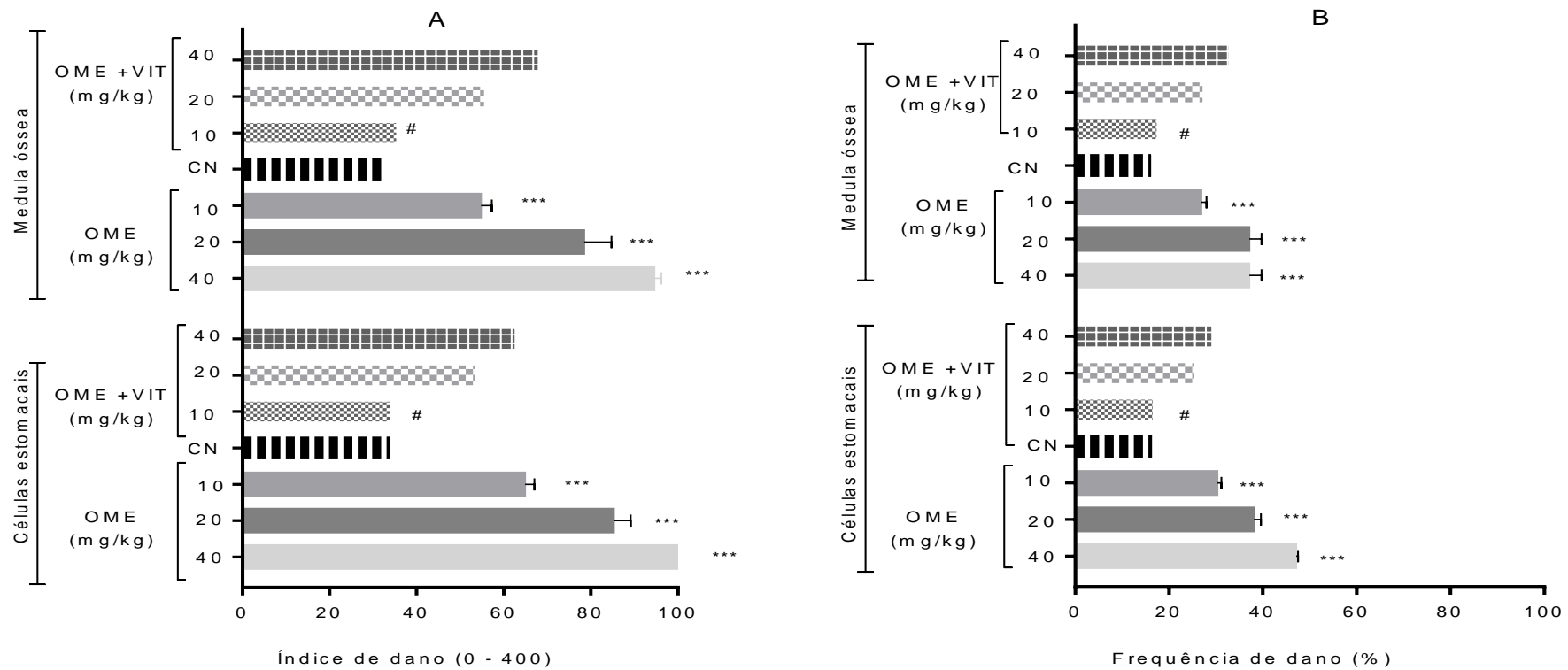
3 Resultados

Efeitos genotóxicos do OME e co-tratamento com PR e AA em medula óssea de camundongos

O OME mostrou efeitos genotóxicos em dose-resposta em eritrócitos de camundongos, medula óssea e nas células do estômago em relação ao grupo CN. O co-

tratamento de OME com PR e AA modularam danos ao DNA com inibição de genotoxicidade na dose de 10 mg / kg (**Figura 1**), indicando efeitos antígenotóxicos do OME combinado com antioxidante.

Figura 1. Genotoxicidade do OME em células de medula óssea e estômago de camundongos avaliadas pelo índice (A) e frequências (B) de dano ao DNA. [OME - omeprazol; OME + VIT - omeprazol co-tratado com palmitato de retinol e ácido ascórbico; CN (controle negativo: animais sem tratamento com OME); ANOVA two-way, teste de comparação múltipla de Tukey (# em relação à OME sem VIT / * $p < 0,001$)].



Efeitos genotóxicos do OME e a capacidade de reparação de danos no DNA em co-tratamento com PR e AA em linfócitos de sangue periférico de camundongos

Em todas as doses o OME induziu danos ao DNA dos linfócitos do sangue periférico de camundongos após o 7º e 14º dias de tratamento por aumento significativo do ID em relação ao CN. Mas esses danos foram significativamente modulados com o co-tratamento com PR e AA (VIT). Observou-se uma capacidade de reparo significativa em 10 mg / kg de OME co-tratada por um grupo VIT do que as outras duas dosagens de OME + VIT quando comparado ao grupo CN (**Figura 2**).

O OME também induziu o aumento da frequência de danos aos linfócitos do sangue periférico dos animais em todas as doses testadas, sem reparo do dano ao DNA. No entanto, o co-tratamento com PR e AA minimizou esses danos, bem como efeitos de reparo de DNA após 14 dias de co-tratamento com PR e AA (**Figura 3**).

As fotomicrografias de linfócitos de sangue periférico em camundongos sugerem que o OME induz danos de tipo 1, 2, 3 e 4 em todas as doses de teste de uma maneira dependente da dose. No entanto, as vitaminas (PR + AA) modularam os danos genotóxicos causados por OME em camundongos (**Figura 4**).

Figura 2. Avaliação genotóxica (ID) do OME e seu co-tratamento com PR (100 UI/Kg) e AA (2,0 µM/Kg) e possíveis efeitos de reparação do dano ao DNA em linfócitos do sangue periférico de camundongos. [CN - controle negativo solução salina a 0,9%; VIT (PR + AA); ANOVA two-way, comparações múltiplas de Tukey. *** p <0,0001 quando comparado ao CN, # em relação à OME sem VIT].

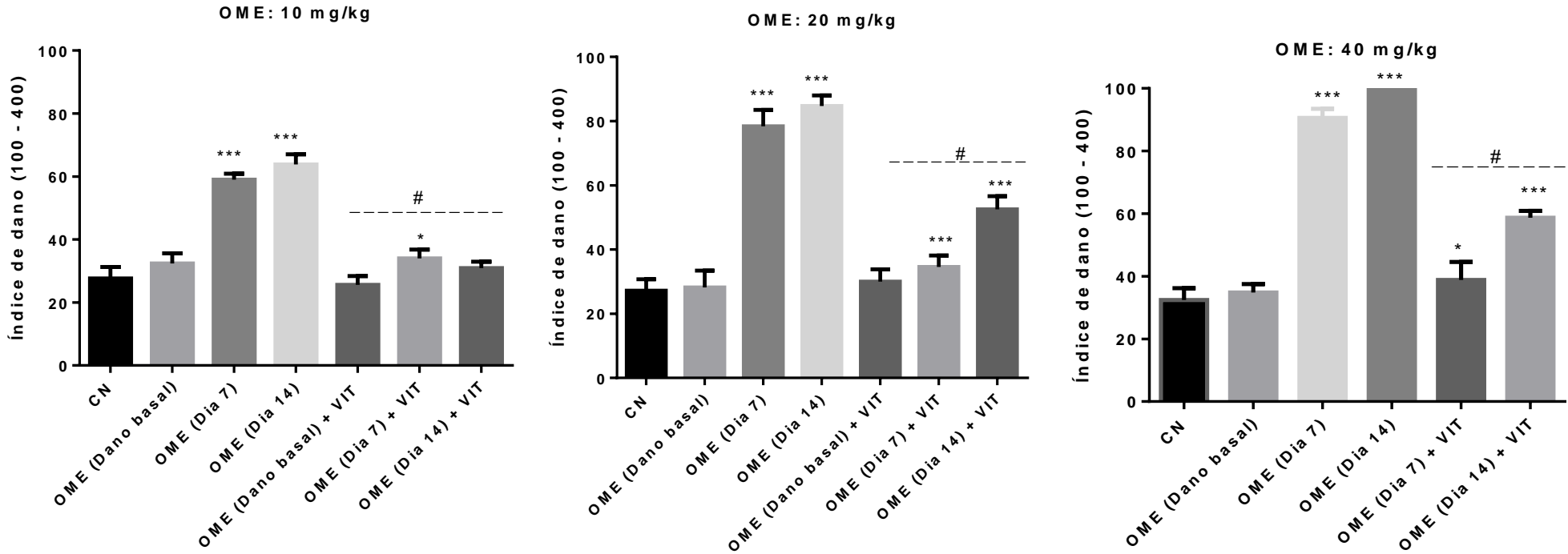


Figura 3. Avaliação genotóxica (FD) do OME e seu co-tratamento com PR (100 UI/Kg) e AA (2,0 μ M/Kg) e possíveis efeitos de reparação do dano do DNA em linfócitos do sangue periférico de camundongos. [CN - controle negativo; VIT (PR + AA); Two Way ANOVA, comparações múltiplas de Tukey. *** $p < 0,0001$ quando comparado ao CN, em relação à OME sem VIT].

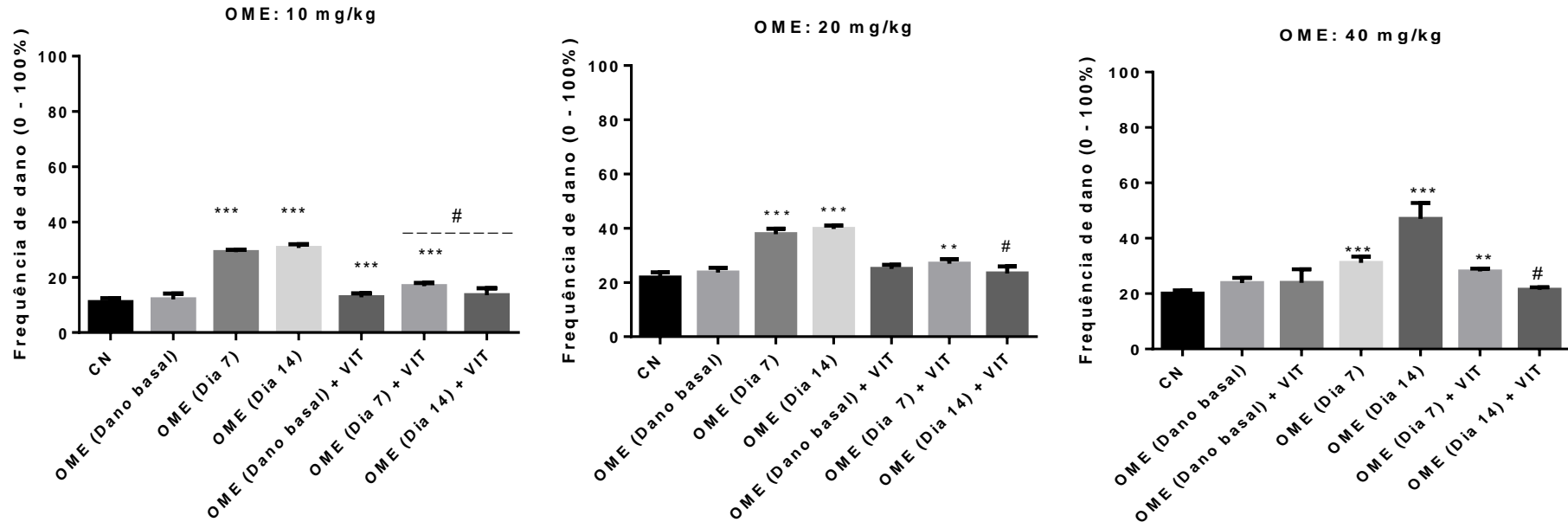
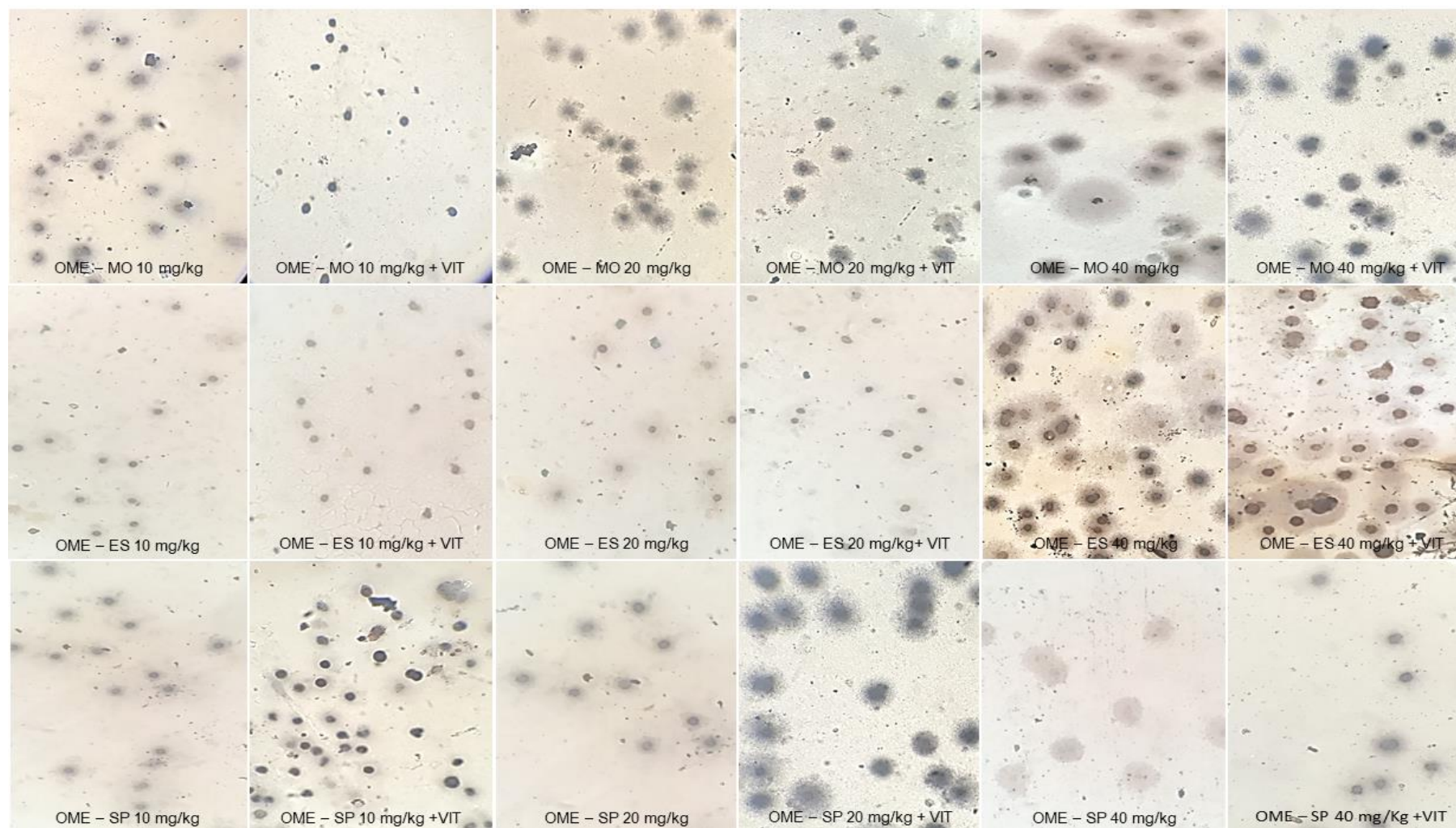


Figura 4. Fotomicrografias de cometas (dano ao DNA) induzidos pelo OME e os efeitos moduladores da associação com PR (100 UI/Kg) e AA (2,0 μ M/Kg). Aumento de 400x.



Efeitos mutagênicos do OME em medula óssea de camundongos e modulação desses danos citogenéticos por PR e AA

OME induziu mutagenicidade em todas as doses através da formação de MN, brotos e pontes. A indução de pontes foi semelhante à observada no grupo CPA. No entanto, com o co-tratamento com PR e AA, estas alterações citogenéticas foram significativamente reduzidas, demonstrando efeitos antimutagênicos dos antioxidantes (**Tabela 2**).

Tabela 2. Avaliação da mutagenicidade do OME e os efeitos do seu co-tratamento PR e AA em células de medula óssea de camundongos por teste de MN.

Grupos de tratamento	Marcadores de mutagenicidade		
	MN	Brotos	Pontes
CN	1,5 ± 0,85	2,6 ± 2,1	3,8 ± 1,8
CP	21,2 ± 2,8 ^a	70,0 ± 4,0 ^a	38,7 ± 2,4 ^a
OME 10 mg/kg	6,3 ± 1,8 ^{ab}	16,8 ± 14,8 ^{ab}	36,8 ± 15,2 ^a
OME 20 mg/kg	10,2 ± 3,7 ^{ab}	21,2 ± 8,7 ^{ab}	32,9 ± 13,7 ^a
OME 40 mg/kg	19,1 ± 7,0 ^a	24,0 ± 9,7 ^{ab}	26,4 ± 12,3 ^a
OME 10 mg/kg + PR e AA	5,7 ± 2,0 ^b	16,8 ± 3,9 ^{ab}	20,5 ± 5,1 ^{ab}
OME 20 mg/kg + PR e AA	7,8 ± 1,9 ^{ab}	9,5 ± 4,7 ^b	7,0 ± 3,2 ^b
OME 40 mg/kg + PR e AA	6,1 ± 3,0 ^b	8,6 ± 3,0 ^b	6,7 ± 3,3 ^b

Foram avaliadas 2.000 células por grupo; PR (100 UI / kg); One-way ANOVA e Bonferroni pós-teste (n = 5); os valores médios ± DP, p <0,05 em comparação com ^aCN e ^bCPA

Efeitos citotóxicos do OME em medula óssea de camundongos e efeitos moduladores por PR e AA

OME induziu citotoxicidade nos animais, diminuindo significativamente a proporção de eritrócitos, bem como aumentou o número de células binucleadas e a fragmentação nuclear (cariólise) em comparação com o grupo CN. Não foram observadas diferenças significativas entre as doses em relação aos parâmetros citogenéticos, com exceção de cariorrexe no OME 20 e 40 mg / kg quando comparadas ao OME 10 mg / kg (**Tabela 3**).

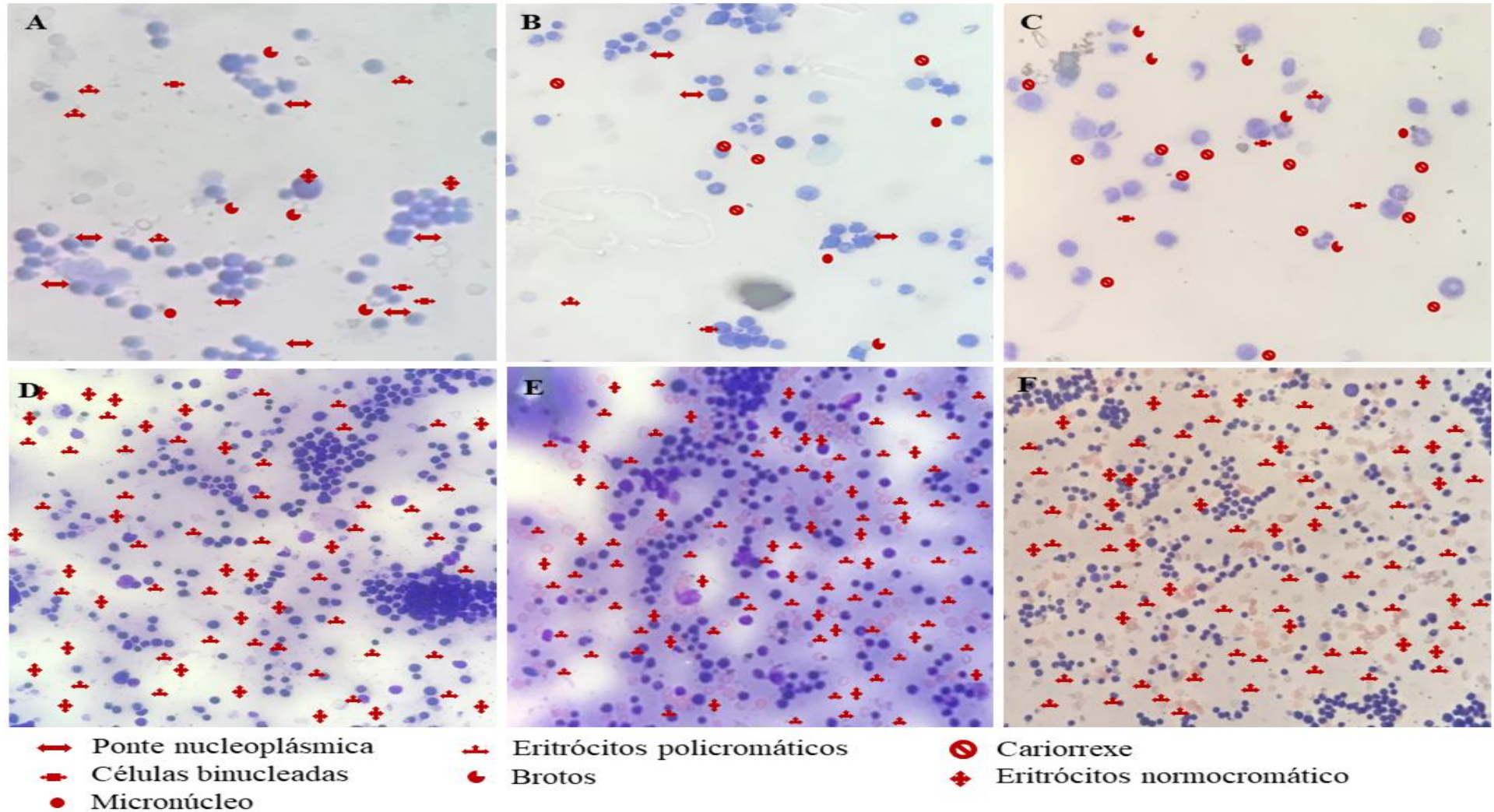
Tabela 3. Avaliação citotóxica do OME e os efeitos de sua associação com as vitaminas PR + AA nas células de medula óssea de camundongos em teste de MN.

Grupos de tratamento	Citotoxicidade		
	Relação eritrocitária	Células binucleadas	Cariorrexe
CN	0,87 ± 0,0	2,4 ± 1,4	29,0 ± 6,9
CP	0,45 ± 0,0 ^a	61,9 ± 10,0 ^a	314,8 ± 22,5 ^a
OME 10 mg/kg	0,55 ± 0,1 ^{ab}	103,4 ± 52,0 ^{ab}	43,5 ± 19,8 ^b
OME 20 mg/kg	0,56 ± 0,1 ^{ab}	216,6 ± 39,0 ^{ab}	171,9 ± 43,6 ^{abc}
OME 40 mg/kg	0,62 ± 0,0 ^{ab}	203,0 ± 24,4 ^{ab}	256,0 ± 88,7 ^{ac}
OME 10 mg/kg + PR e AA	0,65 ± 0,1 ^{abc}	79,4 ± 15,6 ^a	10,3 ± 4,4 ^b
OME 20 mg/kg + PR e AA	0,63 ± 0,0 ^{abd}	72,4 ± 32,2 ^{ad}	7,9 ± 3,2 ^{bd}
OME 40 mg/kg + PR e AA	0,59 ± 0,1 ^{ab}	89,9 ± 22,0 ^a	8,5 ± 4,4 ^b

Foram avaliadas 2.000 células por grupo; PR (100 UI / kg); AA (2,0 mM / kg). ENC / (EPC + ENC) - relação entre o número de eritrócitos policromáticos divididos pelo número de eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) em 400 células analisadas; ANOVA one-way e pós-teste Bonferroni; os valores são médios ± DP (n = 5), p <0,05 em comparação com ^aCN, ^bCP e ^cOME (10 mg / kg) e ^dOME (20 mg / kg).

Conforme observado no perfil fotomicrográfico (**Figura 5**), o OME induziu danos citogenéticos em células da medula óssea de camundongos, aumentando a formação de MN; brotos e pontes cromossômicas em todas as doses testadas. O OME a 40 mg / kg apresentou maiores efeitos citotóxicos aumentando a quantidade de cariorrexe. No entanto, o OME a 20 mg / kg também mostrou um maior número de células binucleadas. Essas alterações citogenéticas não foram observadas com a mesma intensidade nos grupos OME co-tratados com VIT. Além disso, houve aparentemente um aumento de ENC, favorecendo o aumento da proporção de eritrócitos, reduzindo assim cariorrexe e uma indicação de menor citotoxicidade pelosco-tratamentos.

Figura 5. Fotomicrografias de dano citogenéticos e os efeitos moduladores com o tratamento de OME e / ou PR (100 UI/Kg) e AA (2,0 μ M/Kg) em (A) OME 10mg/Kg, em (B) OME 20mg/Kg, em (C) OME 40mh/Kg, em (D) OME 10mg/Kg + PR + AA, em (E) OME 20mg/Kg + PR + AA, em (F) OME 40mh/Kg + PR + AA aumento de 400x.



Alterações hematológicas e bioquímicas de camundongos tratados com OME e associação com as vitaminas PR e AA

OME a 40 mg / kg aumentou o número de leucócitos e monócitos, enquanto diminuiu os neutrófilos e os linfócitos. OME a 20 mg / kg aumentou o hematócrito e diminuiu em monócitos e plaquetas. Por outro lado, 10 mg / kg de OME aumentou leucócitos, linfócitos e plaquetas nos animais. OME em associação com vitaminas reestabeleceu o teor de hemoglobina, bem como leucócitos e monócitos que não sejam neutrófilos. OME 20 mg / kg também reestabeleceu o hematócrito em animais (**Tabela 4**).

Tabela 4. Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com OME e associação com as vitaminas PR e AA

Parâmetros	CN	OME 10 mg/kg	OME 20 mg/kg	OME 40 mg/kg
Hemoglobina (g/dL)	11,3 ± 0,2	12,0 ± 1,4	11,6 ± 0,2	16,1 ± 0,6
Hematócrito (%)	38,2 ± 0,7	37,0 ± 5,6	28,9 ± 2,1	35,9 ± 5,5
Leucocitos (p/mm ³)	1,235 ± 430	2,000,0 ± 989,9*	1,793.5 ± 306*	2,739,5 ± 128*
Neutrófilos (10 ⁹ /L)	26 ± 3,2	26,0 ± 0,0	25,00 ± 7,0	10,00 ± 6,1*
Linfócitos (10 ⁹ /L)	70,2 ± 2,2	77,00 ± 2,8	73,50 ± 20,5	50,5 ± 0,0*
Eosinófilos (10 ⁹ /L)	0,45 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Monócitos (10 ⁹ /L)	2,0 ± 0,6	2,0 ± 0,0	4,50 ± 3,5	8,5 ± 0,5*
Plaquetas (10 ⁹ /L)	523,5 ± 16,5	814,5 ± 91,2	767,5 ± 116,6	778,0 ± 121,6
Parâmetros	CN	OME (10 mg/kg) + VIT	OME (20 mg/kg) + VIT	OME (40 mg/kg) + VIT
Hemoglobina (g/dL)	11,3 ± 0,2	13,00 ± 4,2	13,1 ± 0,6	13,6 ± 1,6
Hematócrito (%)	38,2 ± 0,7	36,5 ± 4,9	38,3 ± 3,5	35,5 ± 4,8
Leucocitos (p/mm ³)	1,235 ± 430	830,9 ± 1,7	2,157,0 ± 485+	2,395 ± 550*
Neutrófilos (10 ⁹ /L)	26 ± 3,2	25,00 ± 7,0	25,00 ± 7,0	15,00 ± 6,1
Linfócitos (10 ⁹ /L)	70,2 ± 2,2	63,50 ± 3,5	81,00 ± 5,6	92,0 ± 2,8
Eosinófilos (10 ⁹ /L)	0,45 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Monócitos (10 ⁹ /L)	2,0 ± 0,6	2,0 ± 0,0	6,50 ± 2,1	2,5 ± 2,1
Plaquetas (10 ⁹ /L)	523,5 ± 16,5	934,0 ± 21,7	822,5 ± 6,0	781,5 ± 22,7

Os valores médios ± DP (n = 5); MCV: volume corpuscular médio; MCH: hemoglobina corpuscular média; MCHC: concentração média de hemoglobina corpuscular; p > 0,05 em comparação com o CN (ANOVA, Two-way seguido do teste pós Tukey)

OME em todas as doses aumentou significativamente valores de uréia nos animais. OME a 40 mg / kg aumentou na transaminase glutâmico-oxilacética (TGO) enquanto diminuía os níveis de transaminase glutâmico-pirúvica (TGP). OME a 10 e 20 mg / kg também aumentou no nível sérico de TGP em animais. O OME a 10 mg / kg também aumentou os níveis de TGO. Alguns em associação com VIT aumentaram os níveis de ureia e creatinina, enquanto diminuíram em TGP nos animais. No entanto, a OME a 10 mg / kg restabeleceu os níveis TGO em animais experimentais (**Tabela 5**).

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos de camundongos tratados com OME e CN.

Parametros	CN	OME 10 mg/kg	OME 20 mg/kg	OME 40 mg/kg
Urea (mg/dL)	26.40 ± 0.40	35.00 ± 7.00*	35.00 ± 4.20*	34.90 ± 7.00*
Creatinina (mg/dL)	0.41 ± 0.30	0.45 ± 0.08	0.50 ± 0.07	0.55 ± 0.05
TGO	122.00 ± 0.80	125.00 ± 7.00	122.05 ± 1.76	130.00 ± 5.60
TGP	36.80 ± 4.40	48.30 ± 12.5	48.30 ± 12.5	31.3 ± 5.76
Parametros	CN	OME (10 mg/kg) + VIT	OME (20 mg/kg) + VIT	OME (40 mg/kg) + VIT
Urea (mg/dL)	26.4 ± 0.40	56.50 ± 2.0*	47.00 ± 2.0*	60.00 ± 7.7*
Creatinina (mg/dL)	0.41 ± 0.30	0.65 ± 0.07	0.50 ± 0.07	0.55 ± 0.03
TGO	122.00 ± 0.80	120.00 ± 1.11	122.50 ± 1.40	131.00 ± 1.40
TGP	117.50 ± 3.53	82.50 ± 12.5	66.00 ± 15.50	66.00 ± 9.80

Os valores médios ± DP (n = 5). TGO (Transaminasa Oxaloacética Glutâmica); TGP (Glutamic Pyruvate Transaminase) * p <0,05 em comparação com o grupo CN, (ANOVA, Two-way seguido por Tukey)

4 Discussão

Omeprazol (OME) tem efeitos contra o dano ulcerativo na mucosa gástrica de ratos (BLANDIZZIET al., 1994) e camundongos (ZHANG et al., 2016), com a capacidade de bloquear a bomba de prótons nas células parietais do estômago (METZ et alfa, 2002) e ativar a proteína HSP70 (BLANDIZZI et al., 1994). O estudo do dano aos cromossomos e DNA é necessário e importante (SHARMA et al., 2015), especialmente para produtos farmacêuticos de uso contínuo (MALAQUINET al, 2015). A avaliação da genotoxicidade é importante para identificar e caracterizar o papel dos agentes mutagênicos e cancerígenos na saúde humana. A medição do dano primário, mutações nos genes e danos aos cromossomos é necessária para avaliar os riscos de instabilidade genética e efeitos cancerígenos de qualquer substância (ZEIGERET al., 2015). Em sua versão alcalina, o teste de cometa pode detectar quebras em moléculas de DNA, lesões em locais sensíveis a alcalinos, juntamente com locais de reparação de excisão incompletos em células de mamíferos, e podem ser aplicadas em protocolos de monitoramento terapêuticos para medir o potencial genotóxico de drogas sozinho ou em combinação (CASH et al., 2014).

No presente estudo com camundongos e teste cometa, na avaliação dos riscos genotóxicos do OME, é evidente que o aumento da genotoxicidade é dependente da dose e do tempo de exposição, aumentando ID e FD em células da medula óssea, células do estômago e

linfócitos do sangue periférico em camundongos. Nenhuma capacidade de reparo do DNA foi observada após 7 e 14 dias de tratamento. Há relatos de que os Inibidores da bomba de prótons (IBP's), como o lansoprazol, o pantoprazol, a fenolftaleína, o rabeprazol, a sulfasalazina e o OME podem causar genotoxicidade e induzir danos cromossômicos (DOWNES e FOSTER, 2015). O dano genotóxico induzido por OME em células da medula óssea, células do estômago e linfócitos do sangue periférico foi significativamente modulado pelos antioxidantes (PR e AA) co-tratados com o OME ao interferir no ID e FD juntamente com a influência da capacidade de reparo do DNA em animais. Assim, os antioxidantes podem ter efeitos antígenotóxicos contra os efeitos prejudiciais genotóxicos induzidos pelo OME. O OME pode amplificar as lesões celulares gástricas causadas por HCl, que também pode ser minimizado com terapias antioxidantes (KOHLENER et al, 2010), pois as vitaminas A (retinóides, carotenóides) e C (ácido ascórbico) podem neutralizar ERO's (PORTANTIOLO et al., 2014) e manter a homeostase do corpo (CHANG et al., 2015), bem como prevenir o dano oxidativo (CELIK et al., 2013).

Na toxicogenética, a genotoxicidade pode ter correlações positivas com a carcinogenicidade, de modo que o teste de cometa e o teste de MN de forma associada são importantes para a detecção da instabilidade genética (KANG et al., 2013). Como observado no presente estudo, o dano genômico induzido por OME não foi reparado, portanto, um dano genotóxico não compensado pode desencadear instabilidade genética e alterações cromossômicas (ZHANG et al., 2014), o que leva a quebras cromossômicas que podem resultar na formação de MN (RIM e KIM, 2015). O MN em eritrócitos de camundongos são marcadores de instabilidade genética, eles são formados por cromossomos inteiros ou fragmentos de cromossomos (cromossomos acêntricos) que são separados do núcleo (BALMUS et al., 2015), não mais incorporados ao núcleo de duas vertentes, devido rupturas no DNA ou por disfunção do fuso mitótico (FENECH et al., 2011). O teste MN pode detectar genotoxicidade e efeitos aneugênicos e / ou clastogênicos (NETO et al., 2016). Como mutagenicidade induzida por OME em células de medula óssea de camundongos, pode ter efeitos aneugênicos e / ou clastogênicos, pois provocou um aumento da formação de MN juntamente com outras anormalidades nucleares, como pontes e brotos. As pontes nucleoplasmáticas são formadas por defeitos nos rearranjos cromossômicos ou na fusão de extremidades cromossômicas, telômeros que permitem a formação de filamentos de cromatina ligando dois núcleos distintos (FENECH et al., 2011). Os brotos podem estar relacionados à eliminação e ampliação ou reparo do DNA e MN devido aos intervalos, indicando

clastogenicidade; e perda de cromossomos pelos agentes aneugênicos (LUZHNA et al., 2013).

No entanto, como foi observado genotoxicidade, o co-tratamento com PR e AA modularam esses danos citogenéticos e, portanto, apresentou efeitos antimutagênicos reduzindo a formação de MN, brotos e pontes. Estudos em roedores foram relatados que o PR tem a capacidade de modular o estresse oxidativo e reduzir o dano citogenético contra o tratamento de antineoplásicos como DOX, CPA (CARVALHO et al., 2017). Estudos também apontam que a OME pode amplificar o estresse oxidativo resultante de gastrite e lesão da mucosa gástrica, em vez de acelerar a cura (KOHLENER et al., 2010), inibindo a bomba de ácido gástrico na célula parietal levando ao seu metabolismo no fígado, liberando sulfona, sulfito e hidróxi-OME, compostos que podem gerar mais danos oxidativos ao material genético, o que justifica o risco benéfico (DOWNES e FOSTER, 2015) seria propor o uso de antioxidantes em terapias de OME.

O presente estudo, demonstra que a administração de OME pode induzir a formação de células binucleadas e cariorrexe (fragmentação da cromatina), bem como de citotoxicidade pela redução da proporção de eritrócitos, também foi avaliado pelo teste MN. O OME em todas as doses aumentou a formação de células binucleadas, cariorrexe e diminuiu a proporção de eritrócitos, portanto, possui atividades citotóxicas e apoptóticas em células da medula óssea de camundongos. As células binucleadas podem ser indicadas por falhas de citocinese no final da divisão celular e as células com cromatina condensada são indicativas de apoptose (cariorrexe e coriólise), bem como a picnose (SABHARWAL et al., 2015). A apoptose é a forma mais pronunciada de morte celular. Caracterizado pela condensação de cromatina, diminuição citoplasmática e nuclear e extravasamento de corpos apoptóticos sendo facilmente extinguidos por fagócitos ou células adjacentes. A nível molecular, a apoptose é realizada por um tipo específico de cisteína protease (caspases), que por sua vez atua pela clivagem de substratos celulares (PEREZ-GARIJO e STELLER, 2015).

O OME também ocasionou aumento da taxa de apoptose no tratamento de células em conjunto com paclitaxel em células quimiorresistentes (HeyA8-MDR, SKOV3-TR) e células claras de carcinoma (ES-2, RMG-1) (LEE et al., 2015). Mas os dados ainda são controversos porque os estudos também apontam que a OME reduz a apoptose em células gástricas (BISWAS et al., 2003) em ratos (LI et al., 1996) via redução da expressão da caspase 3 (Liu et al., 2015). Em nosso estudo, durante o co-tratamento de OME com PR e AA, os danos apoptóticos e citotóxicos foram modulados, sugerindo que esses antioxidantes podem exercer atividades anti-citotóxicas e antiapoptóticas. O PR é um potente antioxidante (OLIVEIRA ET

al., 2014) e pode diminuir a citotoxicidade em células de câncer de mama MCF-7 com baixa concentração (DI BELLA e DI BELLA, 2015). Também pode reduzir células cultivadas com apoptosina (SUBRAMANI et al., 2014). O PR, como antioxidantes têm papel citoprotetor em estudos *in vitro* e *in vivo* (PANCHUK et al., 2014). Os produtos químicos derivados da estrutura do retinol foram descritos por modular vários processos biológicos relacionados à funcionalidade do ciclo celular, proliferação celular e apoptose na resposta fisiológica comum ao dano genotóxico de alta intensidade (MARCATO et al., 2015). Estudos dizem que o OME tem efeitos apoptóticos em células cancerosas gástricas humanas (HGC-27) (HOUEY et al., 2015) e em células colônicas aumentando a secreção de gastrina aumentando a expressão de IEX-1 (PATLOLLA et al., 2012), no carcinoma (MÜERKÖSTERET al., 2008), possivelmente via redução da expressão de Bcl-2 (SHARIFIET al., 2017) e Bcl-xL (PATLOLLA et al., 2012). OME pode causar anormalidades da mucosa gástrica, como hiperplasia da célula parietal, dilatação do canaliculi no fundo, corpo e antro do estômago e projeção de protruções citoplasmáticas no lóbulo do canaliculo (KURMAN, 2013), além de desencadear a formação de N-nitrosaminas que induzem danos ao DNA, levando a anormalidades nucleares, como MN, picnose e cariólise (SUDHA et al., 2011).

Durante a aplicação dos testes de genotoxicidade e mutagenicidade, o monitoramento da toxicidade foi realizado por parâmetros hematológicos e bioquímicos, para avaliação da homeostase e desenvolvimento de processos patológicos (OKONKWO et al., 2016). OME induziu alterações no número de leucócitos e ureia nas doses e monócitos aos 40 mg / kg. Os dados indicam sinais de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou mesmo aumento do catabolismo protéico (ADEBAYO et al., 2003). Os linfócitos, as células mais importantes da resposta imune devido a ter receptores de membrana para reconhecer determinadas moléculas antigênicas (RUÍZ et al., 2003) e correspondem à maior porcentagem de leucócitos. Baixos níveis de linfócitos nos animais podem ser devidos ao estresse induzido pelo OME em animais. No entanto, uma diminuição nos neutrófilos indica menor atividade fagocítica, possivelmente devido ao dano citotóxico desse tipo de células pelo OME. Os medicamentos citotóxicos podem influenciar a maturação e diferenciação celular, desencadeando ou não em resposta fisiológica à morte celular. Eles também causam leucopenia, neutropenia e trombocitopenia, o que compromete a homeostase do corpo principalmente devido ao envolvimento de transtornos imuno-hematológicos funcionais (FERRARI et al., 2010; Cecilio et al., 2015).

A alteração nos parâmetros bioquímicos também está relacionada com efeitos genotóxicos (Vicentini et al., 2017). Neste estudo, encontramos níveis aumentados de ureia

sérica e creatinina nos animais, que confirmam alterações histológicas renais e o aumento do nível de TGO (ou ALT) (exceto 40 mg / kg OME) indicam a função renal comprometida. No entanto, um aumento do nível de TGP indica distúrbios funcionais do fígado, rim e coração dos animais (MAYNE, 1994). As alterações necrobióticas dos túbulos renais podem virar as mudanças estruturais significativas do rim levando a aumentar o nível sanguíneo de TGP (SMITH et al., 1988). Além disso, os níveis aumentados de TGO (ou AST) também suportam o dano renal induzido pela OME diretamente relacionado a esse incremento e ao dano renal (STRYER, 1988).

Creatinina, é um dos indicadores mais confiáveis da eficiência da função renal (BABU et al., 2011), pois está fortemente relacionado ao dano renal (KORE et al., 2011). O aumento significativo registrado na creatinina no sangue pode estar associado a dano estrutural renal distinto pelo OME. Além disso, o OME também aumentou significativamente a uréia no sangue, o que pode ser devido à superprodução de ERO's no tecido renal e à indução de nefrotoxicidade (ESLAMI et al., 2011). Os metabólitos reativos do oxigênio, como os aniões superóxido e os radicais hidroxílicos, devem ser um dos principais contribuintes de uma nefrotoxicidade mediada por drogas (ALI et al., 2005) através da peroxidação lipídica (KUMER et al., 2000). Os radicais livres liberados das mitocôndrias das células tubulares renais podem ser o fator responsável pela nefrotoxicidade induzida pela OME em animais (ABDEL-RAHEEM et al., 2010). Alterações histológicas graves e extensas podem levar ao dano oxidativo induzido pelo OME às macromoléculas e organelas celulares. No entanto, o OME, especialmente em 10 e 20 mg / kg, apresentou a restauração da maioria dos dados hematológicos e bioquímicos alterados nos animais quando co-tratados com as vitaminas.

5 Conclusão

OME (omeprazol) a 10, 20 e 40 mg /Kg produz genotoxicidade em células do estômago, medula óssea e linfócitos do sangue periférico, aumentando o ID e FD em camundongos. Não foram observados efeitos de reparação do dano do DNA após 7 e 14 dias de tratamento. A ausência de reparo pode ser correlacionada aos seus efeitos mutagênicos, aumentando a formação de MN, brotos e pontes, levando à indução de citotoxicidade e apoptose. Também induziu toxicidade moderada pelo aumento dos leucócitos e monócitos e insuficiências renais (aumento da ureia). No entanto, as vitaminas (PR e AA) associadas à OME foram capazes de modular todos os marcadores citogenéticos e tóxicos, incluindo a capacidade de reparação de danos no DNA. Além disso, o OME também causou alterações

nos parâmetros hemtológicos e bioquímicos, especialmente no nível de ureia. Os dados indicam que os testes citogenéticos são importantes para análise toxicológica de drogas em ensaios não clínicos, bem como para o monitoramento de terapias com OME em pacientes com doenças gástricas, como estratégia para prevenir riscos de instabilidade genética e câncer.

Referências

TI, Abdel-raheem; GA, El-shebiny; UMA, Taye. Green tea ameliorates renal oxidative damage induced by gentamicin in rats. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, ., p.21-28, jan. 2010.

ADEBAYO, Joseph O. et al. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 88, n. 1, p.69-72, set. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741\(03\)00193-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741(03)00193-4).

ALI, B.h. et al. Curcumin has a palliative action on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Fundamental And Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.473-477, ago. 2005. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-8206.2005.00343.x>.

ASATRYAN, Ani D.; KOMAROVA, Natalia L.. Evolution of genetic instability in heterogeneous tumors. **Journal Of Theoretical Biology**, [s.l.], v. 396, p.1-12, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.11.028>.

BABU, Sv et al. *Anogeissus latifolia* prevents gentamicin induced nephrotoxicity in rats. **International Journal of Pharmacy and Farmaceutical Sciences**, ., p.1091-1095, jan. 2011.

BALMUS, Gabriel et al. A high-throughput in vivo micronucleus assay for genome instability screening in mice. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.205-215, 31 dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.010>.

BISWAS, Kaushik et al. A Novel Antioxidant and Antiapoptotic Role of Omeprazole to Block Gastric Ulcer through Scavenging of Hydroxyl Radical. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 278, n. 13, p.10993-11001, 15 jan. 2003. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m210328200>.

BLANDIZZI, C. et al. Protective action of omeprazole against gastric mucosal injury induced by hemorrhagic shock in rats. **Digestive Diseases And Sciences**, [s.l.], v. 39, n. 10, p.2109-2117, out. 1994. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02090358>.

CASH, Stephanie Whisnant et al. Recent Physical Activity in Relation to DNA Damage and Repair Using the Comet Assay. **Journal Of Physical Activity And Health**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.770-776, maio 2014. Human Kinetics. <http://dx.doi.org/10.1123/jpah.2012-0278>.

CELIK, Veysel Kenan et al. Vitamin E and antioxidant activity; its role in slow coronary flow. **Cardiovascular Journal Of Africa**, [s.l.], v. 24, n. 9, p.360-363, 4 dez. 2013. Clinics Cardive Publishing. <http://dx.doi.org/10.5830/cvja-2013-076>.

CHA, Jung-hwa; YU, Qi-ming; SEO, Jung-sook. Vitamin A supplementation modifies the antioxidant system in rats. **Nutrition Research And Practice**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.26-32, 2016. The Korean Nutrition Society and The Korean Society of Community Nutrition (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.4162/nrp.2016.10.1.26>.

CHANG, Hui-ping; SHEEN, Lee-yan; LEI, Yen-ping. The protective role of carotenoids and polyphenols in patients with head and neck cancer. **Journal Of The Chinese Medical Association**, [s.l.], v. 78, n. 2, p.89-95, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcma.2014.08.010>.

CARVALHO, Ricardo Melo de et al. Cytogenotoxicological defense of retinyl palmitate in the front damage of antineoplastics. **Experimental And Toxicologic Pathology**, [s.l.], v. 69, n. 5, p.293-297, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2017.01.013>.

BELLA, di L; BELLA, di G. Solution of retinoids in vitamin E in the Di Bella Method biological multitherapy. **Neuro Endocrinol Lett**, ., p.661-676, jan. 2015.

DOWNES, Noel; FOSTER, John. Regulatory Forum Opinion Piece: Carcinogen Risk Assessment. **Toxicologic Pathology**, [s.l.], v. 43, n. 8, p.1064-1073, 21 ago. 2015. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0192623315598578>.

ESLAMI, S.h. et al. Renoprotective effect of Eryngium caucasicum in Gentamicin-induced nephrotoxic mice. **Archives Of Biological Sciences**, [s.l.], v. 63, n. 1, p.157-160, 2011. National Library of Serbia. <http://dx.doi.org/10.2298/abs1101157e>.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.125-132, 16 dez. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geq052>.

FERGUSON, Lynnette R. et al. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. **Seminars In Cancer Biology**, [s.l.], v. 35, p.5-24, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.005>.

FURTADO, Michelle Andrade et al. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 657, n. 2, p.150-154, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.003>.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, María del Carmen; HERNÁNDEZ-CORTÉS, Lourdes Montserrat; ALTAMIRANO-LOZANO, Mario Agustín. In Vivo Effects of Vanadium Pentoxide and Antioxidants (Ascorbic Acid and Alpha-Tocopherol) on Apoptotic, Cytotoxic, and Genotoxic Damage in Peripheral Blood of Mice. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2016, p.1-11, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6797851>.

GRAHAM, David y. History of Helicobacter pylori, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 20, n. 18, p.5191-5204, 2014. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5191>.

GUNASEKARANA, Vidya. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, [s.l.], p.01-05, 2015. JCDR Research and Publications. <http://dx.doi.org/10.7860/jcdr/2015/12062.5622>.

HARTMANN, A et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, ., p.45-51, jan. 2003.

HAYASHI, Makoto. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. **Genes And Environment**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.1-7, 1 out. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s41021-016-0044-x>.

HERBET, Mariola et al. Estimation of oxidative stress parameters in rats after simultaneous administration of rosuvastatin with antidepressants. **Pharmacological Reports**, [s.l.], v. 68, n. 1, p.172-176, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2015.08.004>.

HODSKINSON, Michael r.g. et al. Mouse SLX4 Is a Tumor Suppressor that Stimulates the Activity of the Nuclease XPF-ERCC1 in DNA Crosslink Repair. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 54, n. 3, p.472-484, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.014>.

HOU, Yue et al. Shikonin induces apoptosis in the human gastric cancer cells HGC-27 through mitochondria-mediated pathway. **Pharmacognosy Magazine**, [s.l.], v. 11, n. 42, p.250-256, 2015. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1296.153074>.

INCA (2017) Câncer: O que é Câncer? Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322.

KANG, Seung Hun et al. Recent Advances in In Vivo Genotoxicity Testing: Prediction of Carcinogenic Potential Using Comet and Micronucleus Assay in Animal Models. **Journal Of Cancer Prevention**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.277-288, 30 dez. 2013. Korean Society of Cancer Prevention. <http://dx.doi.org/10.15430/jcp.2013.18.4.277>.

KOHLER, Jonathan E. et al. Antioxidant pre-treatment prevents omeprazole-induced toxicity in an in vitro model of infectious gastritis. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 49, n. 5, p.786-791, 1 set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.034>.

KORE, Kaksahab J et al. Protective role of hydroalcoholic extract of Ficus carica in gentamicin induced nephrotoxicity in rats. **International Journal of Pharmacy and Life Sciences**, ., p.978-982, jan. 2011.

KUMAR, Kirthi R. et al. Helicobacter gastritis induces changes in the oxyntic mucosa indistinguishable from the effects of proton pump inhibitors. **Human Pathology**, [s.l.], v. 44, n. 12, p.2706-2710, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2013.07.015>.

KUMAR, K.vijay et al. Carvedilol: A beta blocker with antioxidant property protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Life Sciences**, [s.l.], v. 66, n. 26, p.2603-2611, maio 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205\(00\)00594-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205(00)00594-4).

LEE, y et al. Proton pump inhibitors enhance the effects of cytotoxic agents in chemoresistant epithelial ovarian carcinoma. **Oncotarget**, [s.l.], p.35040-35050, 26 out. 2015. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.5319>.

LI, H; HELANDER, H F. Hypergastrinemia increases proliferation of gastroduodenal epithelium during gastric ulcer healing in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, ., p.40-48, jan. 1996.

LIU, Jiahui; WANG, Zhichong. Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2015, p.1-12, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/294303>.

LUZHNA, Lidiya; KATHIRIA, Palak; KOVALCHUK, Olga. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers In Genetics**, [s.l.], v. 4, p.131-141, 2013. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2013.00131>.

MALAQUIN, Nicolas et al. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. **Frontiers In Genetics**, [s.l.], v. 6, p.94-99, 12 mar. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2015.00094>.

MARCATO, Paola et al. Aldehyde dehydrogenase 1A3 influences breast cancer progression via differential retinoic acid signaling. **Molecular Oncology**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.17-31, 24 jul. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2014.07.010>.

MAYNE PD. *Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment*, sixth ed. Oxford University Press, Inc., New York, USA, p. 478, 1994. ISBN-13:978-0340576472.

METZ, David C. et al. Proton Pump Activation in Stimulated Parietal Cells Is Regulated by Gastric Acid Secretory Capacity: A Human Study. **The Journal Of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 42, n. 5, p.512-519, maio 2002. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1177/00912700222011562>.

MÜERKÖSTER, S Sebens et al. The apoptosis-inducing effect of gastrin on colorectal cancer cells relates to an increased IEX-1 expression mediating NF- κ B inhibition. **Oncogene**, [s.l.], v. 27, n. 8, p.1122-1134, 20 ago. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210728>.

NETO, M P L et al. Toxicogenetic evaluation of an imidazolidine derivative PT-31. *Curr Pharmaceut Biotechnol*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 1, p.1043-1048, jan. 2016.

NOVOTNA, Aneta et al. Differential Effects of Omeprazole and Lansoprazole Enantiomers on Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Hepatocytes and Cell Lines. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.987-991, 2 jun. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098711>.

OKONKWO, Chukwudi Onyeka John et al. The effects of acute gasoline vapour inhalation on some haematological indices of albino Wistar rats. **Journal Of Acute Disease**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.123-125, mar. 2016. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine Press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joad.2015.11.005>.

OLIVEIRA, Marcela B. et al. Topical Application of Retinyl Palmitate-Loaded Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for the Treatment of Skin Aging. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2014, p.1-7, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/632570>.

PANCHUK, Rostyslav et al. Specific antioxidant compounds differentially modulate cytotoxic activity of doxorubicin and cisplatin: in vitro and in vivo study. **Croatian Medical**

Journal, [s.l.], v. 55, n. 3, p.206-217, jun. 2014. Croatian Medical Journal. <http://dx.doi.org/10.3325/cmj.2014.55.206>.

PATLOLLA, J M et al. Anti-carcinogenic properties of omeprazole against human colon cancer cells and azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci formation in rats. **International Journal Of Oncology**, [s.l.], p.170-175, 28 set. 2011. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2011.1214>.

PÉREZ-GARIJO, Ainhoa; STELLER, Hermann. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. **Development**, [s.l.], v. 142, n. 19, p.3253-3262, 1 out. 2015. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.127878>.

PORTANTIOLO TN, VALE IAV, BERGMAN RB, ALIB RT. Consumo de vitaminas antioxidantes por mulheres com câncer de mama submetidas ao tratamento quimioterápico na cidade de Pelotas-RS. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 2014; 60 (4): 323-9.

RAHAL, Anu et al. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2014, p.1-19, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/761264>.

RIM, Kyung-taek; KIM, Soo-jin. A Review on Mutagenicity Testing for Hazard Classification of Chemicals at Work: Focusing on in vivo Micronucleus Test for Allyl Chloride. **Safety And Health At Work**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.184-191, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.shaw.2015.05.005>.

RUÍZ I, FERNÁNDEZ AB, BLAS I. El sistema inmune de los teleósteos (III): Respuesta inmune específica. *AquaTIC*. 18:33-38, 2003.

SABHARWAL, Robin et al. Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. **Indian Journal Of Medical And Paediatric Oncology**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.212-218, 2015. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0971-5851.171541>.

SAVARINO, Vincenzo et al. The appropriate use of proton pump inhibitors (PPIs): Need for a reappraisal. **European Journal Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 37, p.19-24, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2016.10.007>.

SHARIFI, Rasoul et al. Dietary PUFA Increase Apoptosis in Stomach of Patients with Dyspeptic Symptoms and Infected with H. pylori. **Lipids**, [s.l.], v. 52, n. 6, p.549-558, 10 maio 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-017-4257-y>.

SHARMA, S. et al. Human mesenchymal stem cells as a novel platform for simultaneous evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals. **Mutagenesis**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.391-399, 30 dez. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geu086>.

SMITH RL, et al. Principles of Biochemistry: Mammalian Biochemistry, seventh ed. McGraw-Hill, New York, USA. Stryer L Biochemistry, third ed. Stanford University, Stanford, p. 939, 1988.

SUBRAMANI, Tamilselvan et al. Vitamin C suppresses cell death in MCF-7 human breast cancer cells induced by tamoxifen. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.305-313, 25 nov. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12188>.

SUDHA S, et al. Elevated Frequencies of Micronuclei and other Nuclear Abnormalities of Chrome Plating Workers Occupationally Exposed to Hexavalent Chromium. *Iran J Cancer Prev* 4:119-124, 2011.

UNO, Yoshifumi et al. JaCVAM-organized international validation study of the in vivo rodent alkaline comet assay for detection of genotoxic carcinogens: II. Summary of definitive validation study results. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 786-788, p.45-76, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.04.010>.

VICENTINI, M et al. Benzo(a)pyrene Exposure Causes Genotoxic and Biochemical Changes in the Midge Larvae of *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino (Diptera: Chironomidae). **Neotropical Entomology**, [s.l.], v. 46, n. 6, p.658-665, 22 mar. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13744-017-0505-3>.

WADHWA, Roopma et al. Gastric cancer—molecular and clinical dimensions. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s.l.], v. 10, n. 11, p.643-655, 24 set. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.170>.

WHITE, Jonathan; ROBINSON, Karen; WINTER, Jody. Differential inflammatory response to *Helicobacter pylori* infection: etiology and clinical outcomes. **Journal Of Inflammation Research**, [s.l.], p.137-147, ago. 2015. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/jir.s64888>.

YANAGIHARA, Gabriela Rezende et al. Effects of long-term administration of omeprazole on bone mineral density and the mechanical properties of the bone. **Revista Brasileira de Ortopedia (english Edition)**, [s.l.], v. 50, n. 2, p.232-238, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rboe.2015.03.002>.

ZEIGER, Errol et al. Opportunities to integrate new approaches in genetic toxicology: An ILSI-HESI workshop report. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, [s.l.], v. 56, n. 3, p.277-285, 6 dez. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/em.21923>.

ZHANG, Fang et al. The caspase-1 inhibitor AC-YVAD-CMK attenuates acute gastric injury in mice: involvement of silencing NLRP3 inflammasome activities. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.241-246, 7 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep24166>.

ZHANG, Lei et al. E2F1 impairs all-trans retinoic acid-induced osteogenic differentiation of osteosarcoma via promoting ubiquitination-mediated degradation of RAR α . **Cell Cycle**, [s.l.], v. 13, n. 8, p.1277-1287, 17 fev. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.28190>.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - UFPI



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, S/N, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550
 Telefone: (86) 3215-5134, e-mail: comet@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação Toxicogenética do omeprazol" registrada nº 230/16, sob a responsabilidade da Profa. Dra. ANA AMÉLIA DE CARVALHO MELO CAVALCANTE– Núcleo de Tecnologia Farmacêutica/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 16/09/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Outubro/ 2016 à Janeiro/ 2018
Espécie/Linhagem/raça	1. Camundongo heterogênico/ Swiss 2. Rato heterogênico/ wistar
Nº de Animais	1. 70 2. 05
Peso/ Idade	1. 25-30 g/ 2 meses 2. 180-220 g/ 3 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias –CCA/UFPI

Teresina, 16 de Setembro de 2016.


Prof.ª Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 - Coordenadora

ANEXO B – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO A *TOXICON*

Dear Dr. MT Islam,

The Research Article titled "Estimation of omeprazole-induced oxidative stress and toxicogenetic effects," by Márcia Paz, **Antonio Braga**, Shams Tabrez, Chelapram Firoz, Mohammad A. Kamal, Ag-Anne Menezes, Ricardo Carvalho, Rai Pablo Sousa de Aguiar, Lara Cronemberger, Milena Silva, Rosália Lima, Marcus Vinicius Oliveira Barros de Alencar, Jozelda Duarte, Mohammed Torequi Islam, João Sousa and Ana Amélia de C has been received and assigned the number 4684325.

The special issue for which the paper is being processed is
"From Oxidative Stress to Ageing via Lifestyle, Nutraceuticals, Polypharmacy and Neuro-Psychological Factors"

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript.

Thank you for submitting your work to *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Best regards,

<https://ssl.gstatic.com/ui/v1/icons/mail/images/cleardot.gif>

--

Ahmed Khaled
Editorial Office
Hindawi
<http://www.hindawi.com>

ANEXO C – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO A *CHEMOSPHERE*

Elsevier Editorial System(tm) for
Chemosphere
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Toxicogenetic study of omeprazole and the modulatory effects of retinol palmitate and ascorbic acid on *Allium cepa*

Article Type: Research paper

Section/Category: Toxicology and Risk Assessment

Keywords: Antioxidants; omeprazole; vitamins; *Allium cepa*; cytogenotoxicity.

Corresponding Author: Dr. Muhammad Torequl Islam, PhD (on going)

Corresponding Author's Institution: Federal University of Piauí

First Author: Antonio L Braga

Order of Authors: Antonio L Braga; Ag-Anne P M. de Meneses; José Victor O Santos; Antonielly C dos Reis; Rosália M T de Lima; Ana M O da Mata; Márcia F C J Paz; Leane B S Alves; Muhammad Torequl Islam, PhD (on going); João M C e Sousa; Ana Amélia C Melo-Cavalcante

Abstract: Omeprazole (OME), a proton pump inhibitor is used in gastric and intestinal disease, however, studies on its effects on the genetic material are still restricted. The present study aimed to evaluate its possible toxicogenic effects in *Allium cepa* meristems with the application of cytogenetic biomarkers for DNA damage, mutagenic, toxic and cytotoxic effects. Additionally, retinol palmitate (RP) and ascorbic acid (AA) were also co-treated with OME to evaluate possible modulatory effects of OME-induced cytogenetic damages. OME was tested at 10, 20 and 40 µg/mL, while RP and AA by 100 IU/mL and 2 µM/mL, respectively. Copper sulfate (0.6 µg/mL) and dechlorinated water were used as positive control and negative control, respectively. The results suggest that OME induced genotoxicity and mutagenicity in *A. cepa* at all concentrations tested. However, OME showed toxicity and cytotoxicity at the two highest concentrations. It should be emphasized that the antioxidant vitamins RP and/or AA, when co-treated significantly ($p < 0.05$) inhibited and/or modulated all toxicogenic damages induced by OME, demonstrating their antigenotoxic, antimutagenic, antitoxic and anticytotoxic effects in *A. cepa*. Antioxidants may be useful tools to overcome OME-induced toxic effects.

ANEXO D – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO A NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology
Omeprazole-Induced toxicogenic changes and In association effects of antioxidants in mice
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Omeprazole-induced toxicogenic changes and in association effects of antioxidants in mice
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	Md. Torequi Islam, PhD (Ongoing) Universidade Federal do Piauí Teresina, Piauí BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Piauí
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Antonio Lima Braga, MS
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Antonio Lima Braga, MS Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Ph.D. ongoing Rosália Maria Tórreres de Lima, Ph.D. ongoing Ana Maria Oliveira da Mata, Ph.D. ongoing Antonielly Campinho dos Reis, MS Md. Torequi Islam, PhD (Ongoing) José Victor de Oliveira Santos, MS Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Ph.D. ongoing Ag-Anne Pereira Melo de Meneses, MS Antonio Luiz Gomes Júnior, Ph.D. ongoing Ricardo Melo de Carvalho, Ph.D. ongoing Herculíia Maria Lins Rolim, Ph.D. João Marcelo de Castro e Sousa, Ph.D. Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Gastric and intestinal diseases are common health problems in the world. The drugs used are associated with the effects of gastric acid, including proton pump inhibitors, for an example, omeprazole (OME) also has some adverse effects, and can induce genetic instability. This study evaluated toxicogenic effects of OME in mice (<i>Mus musculus</i>). For this, 40 male mice were subdivided into 8 experimental groups (n = 5) and treated with OME at doses of 10, 20 and 40 mg/kg and/or co-treated with the antioxidants retinol palmitate (1000 IU) and ascorbic acid (50 mM/kg). Cydophosphamide (50 mg/kg) was served as a positive control group, while un-treated as negative control. After 14 days of treatment the cells of the stomach and bone marrow as well as peripheral blood lymphocytes were collected and submitted to the comet assay (alkaline version) and micronucleus test. Additionally, hematological and biochemical parameters of the animals were also determined. OME in mice induced

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation