

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ – UFPA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR – PPGNBC
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LORENA MONTEIRO GOMES

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DO
FÁRMACO DAPIRONA SÓDICA (METAMIZOL SODIUM) EM LINHAGEM DE RIM
DE MACACO VERDE AFRICANO (VERO)

BELÉM

2016

LORENA MONTEIRO GOMES

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DO
FÁRMACO DAPIRONA SÓDICA (METAMIZOL SODIUM) EM LINHAGEM DE RIM
DE MACACO VERDE AFRICANO (VERO)

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção de
título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular, área de concentração
Biologia Celular da Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia.

BELÉM
2016

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Gomes, Lorena Monteiro

Avaliação *in vitro* dos efeitos genotóxicos e citotóxicos do fármaco dipirona sódica (metamizol sodium) em linhagem de rim de macaco verde africano (Vero) / Lorena Monteiro Gomes ; Orientador, Marcelo de Oliveira Bahia. - 2016.

44 f. : il.

Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2016.

1. Agentes antiinflamatórios não esteróides. 2. Toxicologia genética . 3. Citotoxicidade, mediada por células. I. Bahia, Marcelo de Oliveira, orientador. II. Título.

CDD – 22 ed. 615.7040724

LORENA MONTEIRO GOMES

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DO
FÁRMACO DAPIRONA SÓDICA (METAMIZOL SODIUM) EM LINHAGEM DE RIM
DE MACACO VERDE AFRICANO (VERO)

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção de título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular da Universidade Federal do Pará.

Aprovada em: 27 / 10 / 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia (Orientador) - Instituto de Ciências Biológicas (ICB) / UFPA.

Prof^a. Dr^a. Maria Fani Dolabela (Membro) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas (ICS)/ UFPA.

Prof. Dr. Plínio Cerqueira dos Santos Cardoso (Membro) – Faculdade de Castanhal (FCAT)

BELÉM
2016

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio da Silva Gomes e Valdelice do Socorro Monteiro Gomes, pelo amor, apoio incondicional e felicidade que me proporcionam por tê-los ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por iluminar meus caminhos e por me dar forças para superar as dificuldades e para vencer todos os desafios que a vida nos impõe.

Aos meus pais Antonio Gomes e Valdelice Gomes, por sempre estarem presentes em toda minha história acadêmica e sempre me aconselhando e apoiando em todas as minhas decisões.

Ao meu irmão Fellipe Gomes, pelas conversas e pelo apoio em momentos difíceis.

Ao meu noivo Alexandre Tenório, pela paciência, pela preocupação com meu bem estar e pelo respeito para com meus estudos.

Ao meu orientador professor Dr. Marcelo Bahia, por me acolher no laboratório, por suas observações, pelas críticas, pelo apoio e por ser um “pai” na área da pesquisa.

Ao professor Dr. Rommel Mario Rodrigues Burbano, pelos momentos de descontração, pela preocupação com o andamento do trabalho e pelo apoio.

À minha colega de trabalho Dra. Tatiane Mota, pela dedicação e preocupação ao me ensinar as técnicas e análises, pelos conselhos, orientações pela sua amizade e pelas brincadeiras.

Ao Dr. Plínio Cardoso, por me auxiliar em algumas técnicas do laboratório, por se preocupar com o andamento dos trabalhos e pelo carinho.

À minha colega de laboratório Daniele Moyses, pela parceria em quase todas as atividades do laboratório, pela companhia de horas de trabalho e pela sua amizade.

Ao MsC. Henrique pela ajuda em alguns experimentos, pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório e pela sua amizade.

À todos os colegas do laboratório que de alguma forma contribuíram para meu aprendizado.

Aos meus amigos Carlos e Laíza, que estiveram comigo durante a batalha do vestibular e outras bem mais difíceis, pelas suas amizades fraternas e pelo carinho que sempre tivemos.

À minha amiga-irmã Darlyce, cuja companhia nos foi privada por um infeliz descuido do destino, mas que enquanto presente sempre me apoiou em tudo, sempre foi uma amiga maravilhosa e sei que está muito feliz por me ver realizando mais um sonho.

RESUMO

A dipirona sódica ou metamizol sodium, pertencente à família das pirazolonas, é um dos compostos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) mais utilizados, inclusive no Brasil, principalmente devido a sua comercialização ser de baixo custo financeiro. Porém, em determinados países a venda deste medicamento é proibida devido a relatos de casos graves de agranulocitose em decorrência do seu uso. Apesar de sua ampla utilização, estudos demonstrando efeitos genotóxicos e citotóxicos da dipirona em células de mamíferos são escassos. Portanto, o presente trabalho pretende avaliar a viabilidade celular, os efeitos genotóxicos, os efeitos citotóxicos (indução de apoptose e necrose) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em linhagem VERO (linhagem renal de macaco verde africano) expostas a dipirona. Nossos resultados demonstraram uma redução significativa na viabilidade das células expostas a dipirona pelo ensaio MTT. Um aumento significativo no índice de dano avaliado pelo teste do cometa também foi observado, indicando o potencial genotóxico da droga. No que diz respeito aos efeitos citotóxicos da dipirona, observou-se um aumento significativo no número de células apoptóticas utilizando-se corantes fluorescentes tanto em 24 quanto em 48 h de tratamento com a droga. Nossos resultados também mostraram que não houve indução significativa na geração de ROS pela droga por meio da técnica do DCFH-DA. Desta forma, demonstrou-se em nosso trabalho, que a dipirona é uma droga genotóxica e citotóxica em linhagem VERO, nas condições avaliadas.

Palavras-chave: Dipirona sódica. VERO. Genotoxicidade. Ctitotoxicidade. ROS.

ABSTRACT

The dipyrone or metamizole belongs to the family of the pyrazolones. It is one of the nonsteroidal anti-inflammatory compounds (NSAIs) most used, Brazil included, mainly due to its low financial cost. However, in some countries the sale of dipyrone is prohibited due to reported severe cases of agranulocytosis as a result of its use. Despite its high usage, studies showing genotoxic and cytotoxic effects of dipyrone in mammalian cells are scarce. Therefore, in the present study we will assess cell viability, genotoxic effects, cytotoxic effects (by apoptosis and necrosis induction) and the induction of reactive oxygen species (ROS) in VERO cells (a cell line obtained from red kidney of green monkey) exposed to dipyrone. Our results showed a significant reduction in viability of cells exposed to dipyrone by the MTT assay. A significant increase in damage index evaluated by comet assay was also observed, which indicate its genotoxic effects. In which concerns the cytotoxic effects of dipyrone, we observed a significant increase in the number of apoptotic cells using fluorescent dyes after 24h and 48 h of treatment with the drug. Ours results also showed that there was no significant difference in the induction of ROS generation after treatment of the cells with the drug assessed by the DCFH-DA technique. Thus, our work showed that dipyrone is both a genotoxic and cytotoxic drug to VERO cells in the assessed conditions.

Key-words: Dipyrone. VERO. Genotoxicity. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais.....2
- FIGURA 2 - Estrutura da Dipirona e seus principais metabólitos 4-MAA e 4-AA..... 6
- FIGURA 3 - A redução de MTT em células vivas por redutase mitocondrial resultando na formação de formazana insolúvel.....16
- FIGURA 4 - Micrografia do ensaio do cometa.....20
- FIGURA 5 - Porcentagens de sobrevivência celular observadas na cultura de células VERO após 24h de tratamento com dipirona.....24
- FIGURA 6 - Índice de dano (ID) ao DNA observado pelo ensaio cometa em linhagem VERO tratada com dipirona após 3h de tratamento.....25
- FIGURA 7 - Frequência de apoptose e necrose induzida pela dipirona em cultura de linhagem VERO analisados por marcação fluorescente após 24 e 48 h de exposição.....26
- FIGURA 8 - Micrografias de células da linhagem VERO após o tratamento com dipirona e a realização do ensaio de Apoptose por marcação fluorescente.....27
- FIGURA 9 - Efeito da dipirona na produção de ROS em linhagem VERO analisado pela técnica do DCFH-DA.....28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AAA - 4-N-acetilaminoantipirina
AA - Ácido araquidônico
AA - 4-aminoantipirina
AC - Aberrações cromossômicas
AINEs - Antiinflamatórios não esteroidais
CAT- Catalase
CC₅₀ - Concentração citotóxica para 50% das células
COX – Ciclooxygenases
DAF - fluoresceína diacetato
DOXO- doxorubicina
DCFH-DA - 2',7'-diclorofluorescina diacetato
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FBS - Fetal Bovine Serum (Soro Bovino Fetal)
GPx - Glutathione peroxidase
GSH – Glutathione
HO - Hoechst 33342
ID – Índice de Dano ao DNA
LPS - Lipopolissacarídeo
LPX - Peroxidação lipídica
MAA - 4- metilaminoantipirina
MIP - Medicamento isento de prescrição
MN - Micronúcleo
NMU - *N-Metil-N-Nitrosourea*
PCC - Proteína carbonil
PCI- Permuta de cromátides irmãs
PI - Iodeto de propídeo
PGD2 - Prostaglandina D2
PGE2- Prostaglandina E2

PGF2 - Prostaglandina F2

PGG2 – Prostaglandina G2

PGH2 - Prostaglandina H2

PGI2 – Prostaciclina

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SOD - Superóxido dismutase

SNC - Sistema nervoso central

TXA2 - Tromboxano A2

VERO - Linhagem de rim de macaco verde africano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Anti-inflamatórios Não Esteroidais	1
1.2 Dipirona Sódica	4
1.2.1 Características Farmacológicas.....	5
1.2.2 Mecanismo De Ação.....	6
1.2.3 Toxicidade.....	7
1.2.4 Genotoxicidade de antiinflamatórios não esteroidais.....	8
1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Estresse Oxidativo	9
1.4 Apoptose e Necrose	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Dipirona Sódica.....	14
3.2 Linhagem Celular.....	14
3.3 Cultivo da Linhagem Celular	15
3.4 Viabilidade Celular.....	15
3.4.1 Princípio da Técnica.....	15
3.4.2 Procedimento experimental.....	16
3.5 Ensaio do Cometa (Versão Alcalina)	17
3.5.1 Princípio da Técnica.....	17
3.5.2 Procedimento Experimental.....	18
3.5.2.1 Preparação das Lâminas.....	18
3.5.2.2 Eletroforese.....	18
3.5.2.3 Coloração.....	19
3.5.2.4 Análise das Lâminas.....	19
3.6 Avaliação De Necrose E Apoptose Por Meio De Corantes Fluorescentes: Iodeto De Propídeo, Fluoresceína Diacetato E Hoechst 33342.....	20
3.6.1 Princípio da Técnica.....	20
3.6.2 Procedimento Experimental.....	21
3.7. Níveis Intracelulares De Espécies Reativas De Oxigênio (ROS).....	22
3.7.1 Princípio da Técnica.....	22
3.7.2 Procedimento Experimental.....	22

3.8 Análise Estatística.....	23
4 RESULTADOS	23
4.1 Viabilidade Celular.....	23
4.2 Efeito da Dipirona Sódica em Linhagem Vero Analisado pelo Ensaio do Cometa.....	24
4.3 Efeito da Dipirona Sódica em Linhagem Vero por meio da Avaliação de Apoptose e Necrose por Marcação Fluorescente.....	25
4.4 Efeito da Dipirona Sódica em Linhagem Vero na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	27
5 DISCUSSÃO.....	28
6 CONCLUSÃO.....	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

1- INTRODUÇÃO.

1.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS.

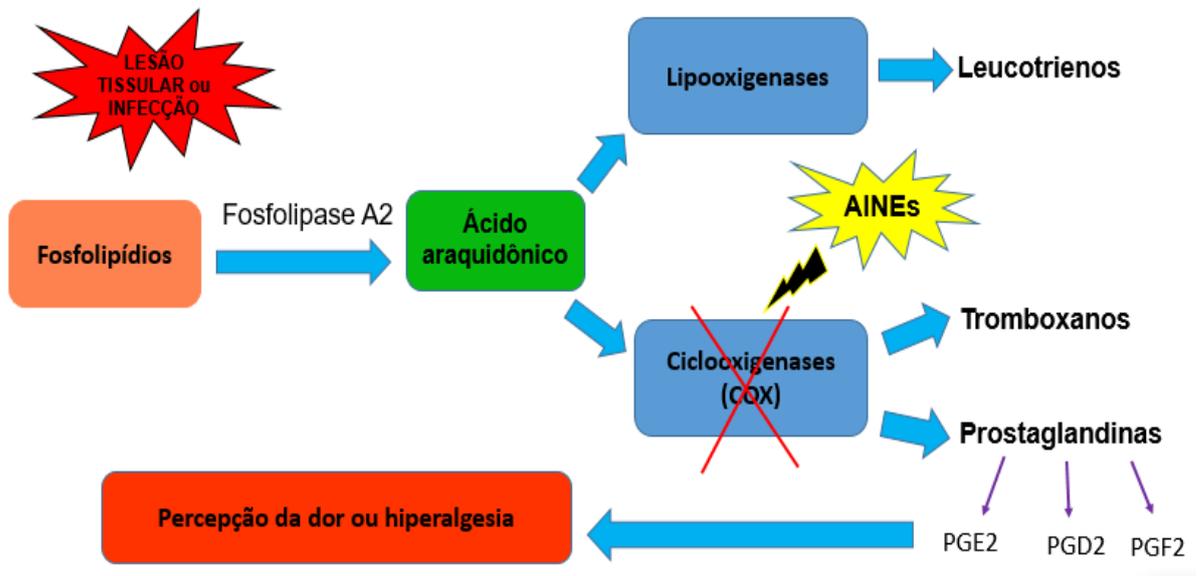
Há cerca de cem anos, os compostos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) têm estado entre os agentes farmacológicos mais utilizados na prática médica. Esses fármacos apresentam um amplo espectro de indicações terapêuticas, como: analgesia (relacionada a perda ou ausência de sensibilidade à dor), antipirese (controle da temperatura corporal), anti-inflamação e profilaxia contra doenças cardiovasculares (DUBOIS *et al.*,1998). Em todo o mundo, os AINEs são uns dos medicamentos mais vendidos, alcançando em torno de 30% das vendas, incluindo os prescritos e os não prescritos, pelos médicos (LITALIEN ,2001).

Os AINEs fazem parte de um grupo diversificado de compostos, os quais apresentam um ou mais anéis aromáticos que estão ligados a um grupamento ácido funcional. Assim como as demais formas farmacêuticas sólidas, os AINEs apresentam uma absorção rápida e completa quando administrados oralmente. (JÚNIOR *et al.*, 2007; SOLOMON,2007). Além disso, todos os AINEs são convertidos em metabólitos inativos pelo fígado, embora alguns também possam ser metabolizados nos rins. A excreção desses fármacos ocorre predominantemente pela urina, no entanto, alguns AINEs e seus metabólitos apresentam excreção biliar (KLIPPEL *et al.*,2001).

De acordo com Hilário *et al.* (2006), os AINEs agem promovendo a redução dos efeitos inflamatórios induzidos por lesões tissulares ou infecções, as quais podem desencadear eventos que envolvem especificamente a ação degradatória de fosfolípidios de membrana. Estas lesões promovem um processo inflamatório que estimula a liberação de citocinas, como, por exemplo, as interleucinas (IL)-1 e (IL)-2, fator de necrose tumoral (TNF), entre outras, as quais atuam na ativação de uma enzima, denominada fosfolipase A2, a qual também pode ser ativada por outros estímulos (químico, traumático e mitogênico). Esta enzima, presente nos leucócitos e plaquetas, irá atacar e promover a degradação de fosfolípidios de membrana, levando a produção de um metabólito conhecido como ácido araquidônico (AA).

Kummer & Coelho (2002) relataram o AA como um ácido graxo de 20 carbonos que apresenta um papel regulador chave na fisiologia celular. O mesmo ao ser liberado tanto por meio de lesões, como fisiologicamente, é utilizado como substrato para duas vias enzimáticas, as lipooxigenases, responsáveis pela síntese dos leucotrienos e as ciclooxigenases (COX), que desencadeiam a produção de tromboxanos e prostaglandinas, onde estes são mediadores químicos associados à evolução e à amplificação da resposta inflamatória, dentre outros efeitos fisiológicos. Desta forma, a atividade da COX baseia-se na conversão do AA em PGG₂ e em sequência, em PGH₂, a qual é convertida em diversas outras prostaglandinas. Essas são posteriormente transformadas por isomerases em prostaciclina (PGI₂) e tromboxanos A₂. O aumento na produção das prostaglandinas, tanto no local da lesão, como também no sistema nervoso central (SNC), leva a percepção da dor ou hiperalgesia (SAMAD *et al.*, 2002). Dentro deste contexto, de acordo com Júnior (2007), o mecanismo de ação dos AINEs ocorre por meio da inibição das COXs, impedindo, desta forma, a conversão do AA em prostaglandinas, tendo como resultado principal desta ação o combate à inflamação, à dor e à febre (Figura 1).

Figura 1- Mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais.



Fonte: Adaptado de SAMAD *et al.*, 2002; HILÁRIO, 2006. Legenda: Durante processos inflamatórios, os fosfolípidios de membranas de células lesadas sofrem ação catalítica da fosfolipase A2 liberando Ácido Araquidônico que ao ser metabolizado é utilizado como substrato pelas enzimas lipooxigenase (formando, assim, os leucotrienos) e pelas COXs (para a síntese de prostaglandinas). Os AINEs inibem as COXs, com consequente diminuição da produção de prostaglandinas, combatendo, assim, a inflamação, a dor e a febre.

No início da década de 1990 houve um avanço importante na terapêutica anti-inflamatória com a descoberta de duas isoformas da COX : COX-1 e COX-2, que são enzimas associadas à membrana (GRANGEIRO *et al.*,2008). A partir desta descoberta rotulou-se a COX-1 como fisiologicamente constitutiva por estar presente em quase todos os tecidos, induzindo a produção de prostaglandinas envolvidas na regulação de funções fisiológicas como citoproteção da mucosa gástrica, homeostasia renal e função plaquetária. (TEGEDER *et al.*,2000; KAYAALP,2000; HILÁRIO *et al.*,2006). Já COX-2 é considerada uma isoforma indutiva, expressa primariamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos e monócitos, sendo também produzida fisiologicamente, porém de forma menos expressiva, principalmente no que diz respeito a atividade metabólica renal. Esta enzima é responsável pela formação das prostaglandinas associadas à resposta inflamatória e tem papel na medição central da dor e da febre, entretanto, sabe-se que ela também é encontrada em outros tecidos e órgãos, como rins, cérebro, ovário, útero e endotélio vascular. Posteriormente foi demonstrada, em estudos *in vitro* com linhagens de macrófagos, a proposta da existência de mais um membro da família das enzimas COX, a COX-3, sendo distribuída principalmente no córtex cerebral e medula espinhal. É sugerido que a COX-3 seja sensível a analgésicos/antitérmicos como o paracetamol e a dipirona sódica (COLVILLE-NASH *et al.*, 1998; CHANDRASEKHARAN *et al.*,2002; CARVALHO *et al.*,2004).

Entre os AINEs, existem aqueles que atuam de maneira não seletiva ou não específica, isto é, inibem indistintamente ambas as isoformas de COX, e os que atuam de forma seletiva para umas das isoformas. Dentre as formas não seletivas, temos, por exemplo, o paracetamol, ácido acetilsalicílico, piroxicam, dipirona, nosso alvo de estudo, dentre outros. Um dos grandes problemas do efeito não seletivo dos AINEs, é que a inibição da COX-1, a forma fisiológica da COX, está associada a efeitos não desejáveis, como infarto agudo do miocárdio, aumento do risco de sangramentos, danos no trato gastrintestinal, dentre outros. Em contrapartida, uma nova perspectiva terapêutica emergiu para o desenvolvimento de fármacos mais seletivas. O conjunto desses agentes originou uma nova geração de anti-inflamatórios, os inibidores seletivos de COX-2, foram desenvolvidos na tentativa de diminuir a incidência dos efeitos adversos da inibição de COX-1. Tais inibidores incluem: naproxeno, nimesulida,

celecoxibe, etoricoxibe, valdecoxibe, parecoxibe e lumiracoxibe (BUTTGEREIT, 2001; FITZGERALD; PATRONO, 2001; CARVALHO *et al.*,2004; HILÁRIO *et al.*,2006). Porém, é sabido que inibidores específicos desta isoforma são capazes de desenvolver efeitos colaterais no sistema renal, além de retardar a cicatrização de úlceras, apesar de provavelmente não iniciarem o dano gástrico como observado com AINEs convencionais (DUBOIS *et al.*,1998; EMERY,2001; KUMMER; COELHO, 2002).

Apesar da eficácia em combater os sintomas da inflamação, o uso dos AINEs, principalmente os não seletivos, trazem efeitos bastante indesejáveis para os seus usuários, sendo assim de suma importância a realização de estudos, em relação ao comportamento celular sob ação dos AINEs, principalmente no que diz respeito ao DNA, o que caracterizaria os efeitos genotóxicos dos mesmos. Por exemplo, como o estudo realizado por Arkhipchuk *et al.* (2004) onde observaram, em plantas, invertebrados e vertebrados, efeitos genotóxicos e citotóxicos sob ação do ácido acetilsalicílico e da dipirona sódica por meio de aberrações cromossômicas e teste do micronúcleo (MN). Tais evidências reforçam a ideia que AINEs como a dipirona, estejam envolvidos em ações genotóxicas.

1.2 DIPIRONA SÓDICA.

A dipirona sódica ou metamizol sodium é um AINE pertencente à família das pirazolonas, uma das substâncias mais antigas obtidas por síntese farmacêutica, e que são utilizadas como anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas em pacientes adultos e pediátricos (BURKE *et al.*,2005).

Em 1883, Perkin pesquisava um termolítico sintético como substituto da quinina, um antimalárico peruano da ilha de Java extraído da casca de *Cinchona*, pertencente à família Rubiaceae. Este produto de eficiência relativa e custo excessivamente alto teria como contraponto a aspirina extraída do salgueiro europeu (*Salix alba*). Devido a quinina apresentar eficiência relativa e custo excessivamente alto, Perkin isolou o primeiro corante sintético, anilina que serviu para extração do derivado pirazolônico, a antipirina (fenozona), que permitiu o combate à febre de forma mais eficaz, na

Alemanha em 1920. No ano seguinte, foi comercializada a primeira pirazolona de uso clínico, a dipirona (CATELLI, 1993; VALE, 2006).

Desde sua introdução no mercado mundial, e no Brasil em 1922, sob o nome de Novalgina® pela Hoechst, a dipirona tem sido amplamente utilizada (BRUNE,1997). Sua comercialização foi mundialmente crescente até 1970, quando foram relatados casos graves de agranulocitose devido ao seu uso. Por isso foi proibida em muitos países como os EUA, Suécia, Inglaterra, Austrália e Japão. Porém, seu efeito analgésico e baixo custo levaram ao seu amplo comércio em países da Europa (Alemanha, Itália e Espanha) e América do Sul (DALL'OLIO *et al.*,2003).

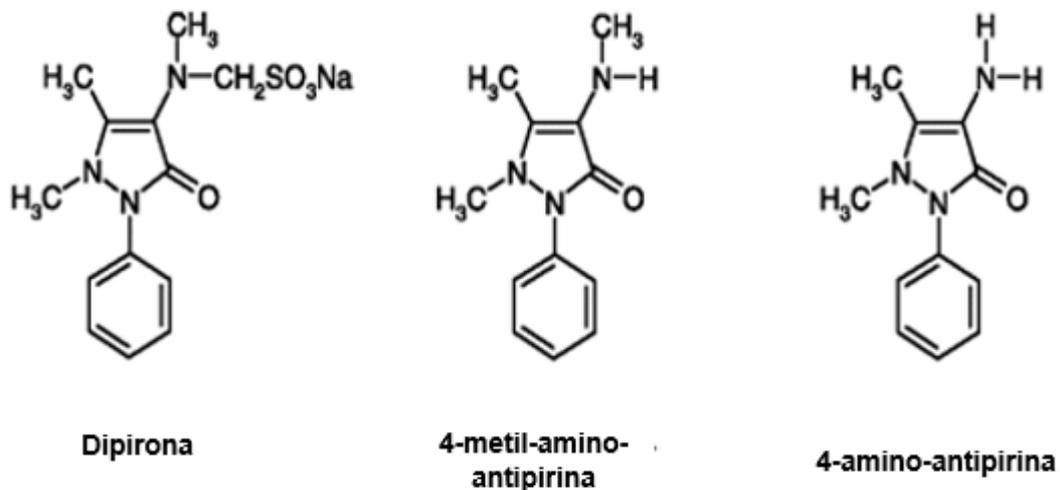
Sendo um pó cristalino branco ou quase branco, inodoro, solúvel em água, pode ser administrado parenteralmente em grandes doses, o que contribui para o abuso deste fármaco, que é muito utilizado pela população brasileira por ser um medicamento isento de prescrição (MIP), de menor preço e com diferentes formulações farmacêuticas (solução oral, injetável, comprimidos e supositórios) (KNAPPMANN ; MELO, 2010). A dipirona é o principal analgésico da terapêutica brasileira ocupando 31,8% do mercado; o paracetamol ocupa 29,7% e o AAS (ácido acetilsalicílico) encontra-se em terceiro lugar com 27,1%. A maior parte das vendas (em torno de 80%) ocorre sem prescrição médica, representando um papel importante na condenável automedicação (BENSEÑOR, 2001; BURKE *et al.*,2005).

1.2.1 Características Farmacológicas.

A dipirona, que apresenta um grupo metanossulfônico na estrutura é comercializada em formas de administração oral, retal, e injetáveis, contendo 500mg (NOVALGINA,1999). Após administração oral, o fármaco é metabolizado no trato intestinal ao seu principal metabólito, 4- metilaminoantipirina (4-MAA). No fígado, o 4-MAA sofre uma hidrólise não enzimática dando origem a outros metabólitos como, 4-aminoantipirina (4-AA), 4-N-acetilaminoantipirina (4-AAA) e 4-N-formilaminoantipirina (4-FAA) (ERGÜN *et al.*,2004; LEVY *et al.*,2000). Tanto o fármaco matriz quanto seus metabólitos ligam-se fracamente às proteínas plasmáticas e difundem-se rápida e uniformemente nos tecidos. O grau de ligação às proteínas plasmáticas é de 58% para

4-MAA, 48% para 4-AA, 18% para 4-FAA e 14% para 4-AAA. Weithmann & Alpermann (1985) avaliaram os efeitos bioquímicos e farmacológicos da dipirona e metabólitos em relação a cascata do ácido araquidônico e verificaram que os metabólitos 4-MAA e 4-AA são os responsáveis pelo efeito clínicos da dipirona (Figura 2). Os metabólitos são totalmente excretados pelos rins (HINZ *et al.*,2007).

Figura 2- Estrutura da Dipirona e seus principais metabólicos 4-MAA e 4-AA, respectivamente.



Fonte: HINZ *et al.*,2007.

1.2.2 Mecanismo De Ação.

Os mecanismos de ação pelo qual se evidencia o efeito analgésico da dipirona sódica ainda não estão claramente elucidado. Alguns estudos foram realizados para compreender a base de ação da dipirona como um agente anti-inflamatório, mostrando que tanto as atividades centrais quanto periféricas podem estar envolvidas no mecanismo de ação. A dipirona tem demonstrado como componente periférico o controle da hiperalgesia decorrente da lesão tecidual, tanto por inibição da ativação da adenilciclase por substâncias hiperalgésicas, como por bloqueio direto do influxo de cálcio no nociceptor (LORENZETTI ; FERREIRA ,1985). Para atividade de efeito anti-inflamatório, ocorre o bloqueio das COX-1 e COX-2 reduzindo síntese de

prostaglandinas e conseqüentemente a inibição na produção de citocinas pro-inflamatórias (BURKE *et al.*,2005).

A ação analgésica central é exercida pelos metabólitos ativos 4-MAA e 4-AA que são capazes de inibir as cicloxigenases e atuar em vários níveis sinergicamente com o sistema peptidérgico (endorfina e encefalinas) e serotonina, além de atuar sobre áreas talâmicas. Sua potência como inibidor da síntese de prostaglandinas é similar à do ácido acetilsalicílico (FERREIRA; LORENZETTI,1994; EROL, *et al.*, 2004). Estudos de Carlsson *et al.* (1986) evidenciaram um mecanismo de ação da dipirona onde a mesma atuaria nas fibras nervosas aferentes, medula espinhal e substância cinzenta periaquedutal, interferindo na produção das prostaglandinas. Apesar de não haver muitos estudos, recentemente foi relatado que a dipirona tem a capacidade de inibir a isoenzima ciclooxigenase do tipo 3 (COX 3), encontrada no sistema nervoso central (CHANDRASEKHARAN *et al.*,2002).

1.2.3 Toxicidade.

Apesar da inquestionável eficácia, estudos relataram que a dipirona produz, embora raramente, intoxicação sobre a série de células brancas do sangue, o que justifica a sua condenação em vários países na década de 70. A agranulocitose produzida pela dipirona, na maioria das vezes, é precedida de febre alta, calafrios, mal-estar, dentre outras reações. A contagem dos leucócitos em níveis muito baixos indica risco de morte ao paciente, caso o tratamento com o fármaco não seja imediatamente interrompido (HEDENMALM ; SPIGSET, 2002; IBANEZ *et al.*,2005).

Também sendo classificada como um evento raro, as reações alérgicas foram observadas apresentando potenciais agravantes transitando de reações leves, como a hipersensibilidade cutânea (urticária) para formas agressivas como urticária generalizada. Sintomas envolvendo arritmias cardíacas, queda da pressão arterial e choque anafilático também podem surgir devido ao uso indiscriminado da droga (ECKLE *et al.*,2005; KOWALSKI *et al.*,1988; LEVY, 2000).

Além dessas, outras reações adversas também foram relatadas devido ao uso da dipirona. Estudos envolvendo o sistema nervoso central descreveram que doses elevadas podem provocar excitação ou hipotermia (KEHLET, 1989). Em casos de uma superdosagem do fármaco foram observadas reações como náuseas, vômito, dor abdominal, deficiência/insuficiência aguda dos rins, sonolência, coma, convulsões e um quadro de nefrite intersticial que pode chegar a papilite necrotizante (BENTUR ; COHEN, 2004; BURKE *et al.*,2005 ; SÁNCHEZ *et al.*,2003).

1.2.4 Genotoxicidade de anti-inflamatórios não esteroidais.

É conhecido que populações humanas podem apresentar danos genéticos por exposição accidental, ocupacional ou ambiental a agentes genotóxicos químicos (agentes alquilantes, peróxidos, acridinas, fumo, etc.), físicos (radiação ionizante, raios UVC e UVB, etc.) ou mesmo biológicos (vírus e bactérias). Estes agentes podem interferir no adequado desenvolvimento da célula, causando danos em seu material genético e conferindo um grande risco para o desenvolvimento de doenças, como por exemplo, as neoplasias (NATARAJAN, 1993).

Os agentes químicos e físicos capazes de induzir a formação de aberrações cromossômicas (AC) são chamados de agentes clastogênicos, os quais podem ter seu potencial genotóxico detectado por vários testes, tais como: a análise de aberrações cromossômicas em células metafásicas, o teste MN, o teste do cometa, entre outros (AL-SABATI *et al.*,1992; GUIMARÃES *et al.*,2003; MOVAJAGH *et al.*,2005).

Os danos no DNA induzidos por diversos agentes mutagênicos podem ser reparados ou processados, porém, muitos deles podem levar à formação de AC, as quais podem ser estáveis ou não. As primeiras referem-se a pequenos danos como, translocações recíprocas e algumas aneuploidias, que não impedem a divisão e a proliferação celular; enquanto que as segundas, tais como, os cromossomos dicêntricos e em anel e as grandes deleções, normalmente são letais à célula. Em vista disso, diferentes alterações podem se acumular nas sucessivas divisões celulares e, conseqüentemente, produzir mutações em genes, os quais teriam um papel fundamental no processo de carcinogênese (LITTLE, 2000), o que ressalta a

importância da avaliação genotóxica de substâncias usadas como medicamentos, como por exemplo, a dipirona.

Apesar de serem escassos os trabalhos que investiguem a genotoxicidade da dipirona sódica em células de mamíferos, a literatura mostra alguns trabalhos neste sentido explorando outros AINEs. Tripathi *et al.* (2012), ao estudarem o ibuprofeno, anti-inflamatório não esteroidal utilizado por indivíduos com artrite reumatoide, osteoartrite e dismenorreia primária, mostraram que o mesmo é capaz de induzir genotoxicidade em células de medula óssea de ratos por meio do teste de aberrações cromossômicas. Em outro estudo, Mezzelani *et al.* (2016) investigaram efeitos de bioacumulação e celulares de vários AINEs (acetaminofeno, ibuprofeno, diclofenaco e nimusulida) em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, por serem boas espécies sentinelas para a presença de monitorização e testes ecotoxicológicos. Além da detecção da acumulação de alguns desses fármacos, efeitos genotóxicos foram revelados pela rupturas da cadeia de DNA particularmente causados pelo ibuprofeno e pelo diclofenaco e o aumento da frequência acentuada de MN em mexilhões expostos a todos os fármacos.

1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E ESTRESSE OXIDATIVO.

Espécies reativas de oxigênio são substâncias produzidas naturalmente durante o metabolismo normal da célula, sendo seu excesso eliminado por sistemas antioxidantes bem elaborados. Desta forma, em baixas concentrações fisiológicas, as ROS não representam perigo à célula, pelo contrário, apresentam um papel importantíssimo na regulação de mecanismos moleculares fundamentais, tais como, a transdução de sinal ou ainda a expressão gênica, por meio do balanço redox celular (SEN, 1998; DRÖGE, 2002; KNOW *et al.*, 2003).

Em contrapartida, em condições patológicas, como por exemplo, durante os processos de inflamação, metabolismo de xenobióticos, estresse ou liberação de altas concentrações de íons metálicos; a formação de ROS pode exceder a capacidade protetora da célula, levando, portanto, ao estresse oxidativo. Esta condição pode ser resultado de uma variedade de fatores, entre os quais podemos citar a depleção

significativa de glutathione (GSH), um dos principais agentes antioxidantes intracelulares (KEHRER, 2000; CHATGILIALOGLU; O'NEILL; DRÖGE, 2002).

Neste contexto, o estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção de ROS e as enzimas antioxidantes responsáveis pelos mecanismos de defesa oxidativa da célula. Assim, ROS produzidas em nível acima do normal tornam-se descompensadas em relação a uma taxa normal de antioxidantes, bem como alterações nos sistemas de defesa antioxidante podem permitir a ação não regulada de uma quantidade normal de ROS. Ambas as condições levam ao estresse oxidativo que poderá produzir uma série de danos celulares (NOH ; HA, 2011).

Segundo Brezniceanu *et al.* (2008), o sistema de defesa antioxidante das células envolve tanto um mecanismo enzimático, por meio das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), quanto um mecanismo não-enzimático, que tem como um dos seus principais componentes, o tripeptídeo glutathione. Estes mecanismos são de extrema importância na regulação dos níveis de ROS intracelular em estado fisiológico e alterações neste sistema levam ao estresse oxidativo.

Existem algumas evidências de que os AINEs estão envolvidos com o estresse oxidativo. Gómez-Oliván *et al.* (2014) mostraram que o diclofenaco, o ibuprofeno e o naproxeno induzem estresse oxidativo em crustáceos da espécie *Daphnia magna* após 48h de exposição. Os autores ainda concluíram que o aumento observado na quantidade de espécies reativas de oxigênio poderia estar associado ao aumento no efeito genotóxico avaliado pelo ensaio do cometa. Os biomarcadores utilizados neste estudo foram o CAT, GPx, SOD, além de peroxidação lipídica (LPX) e proteína carbonil (PCC). Raza *et al.*(2016) observaram que células HepG2 tratadas apenas com lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), ou em combinação com aspirina, sofrem respostas tóxicas subcelulares que são acompanhadas por aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e apoptose.

Sabe-se que o estresse oxidativo pode afetar de forma danosa uma grande variedade de macromoléculas biológicas, tais como os ácidos graxos insaturados

presentes na bicamada lipídica, o DNA, entre outras (BASU *et al.*,2001; KOCHIAN *et al.*, 2005). Porém, como mecanismo de defesa, a célula com o estado redox alterado ativa vias que permitem uma resposta adaptativa a essa nova condição. Tal ativação depende da intensidade de ROS produzida. Desta forma, se a produção for moderada, são ativadas vias que levam à transcrição de genes promotores de sobrevivência, os quais irão codificar moléculas antioxidantes, moléculas antiapoptóticas (Bcl-2), entre outras; por outro lado, se muito intensa, ocorre a ativação de vias que levam ao processo de morte celular (apoptose ou necrose) (BOGLIOLO, 2009).

1.4 APOPTOSE E NECROSE.

O termo apoptose foi primeiramente introduzido por Kerr *et al.* (1972) que o definiu como morte celular programada. Este fenômeno pode ser induzido por uma infinidade de agentes, sendo um processo evolutivo bem conservado e, portanto, essencial para o desenvolvimento do organismo. As características da apoptose estão relacionadas a condensação e fragmentação da cromatina, juntamente com a compactação das organelas citoplasmáticas e redução no volume celular. Estes fatores acabam resultando na formação dos corpos apoptóticos que, em seguida, são fagocitados por macrófagos ou por células vizinhas (BÖHM ; SCHILD, 2003).

De acordo com Kanduc *et al.* (2002) a morte celular está envolvida no ciclo normal de desenvolvimento e maturação das células, sendo responsável por muitas respostas a nível tissular, por agentes químicos e inflamação. Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, tais como: danos ao DNA, níveis aumentados de ROS, ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, choque térmico, privação de fatores de crescimento e baixa quantidade de nutrientes (HENGARTNER, 2000).

Uma das principais funções da apoptose diz respeito a proteção de organismos multicelulares. A integridade do DNA genômico está sob constante ameaça, mesmo em células perfeitamente saudáveis. Organismos celulares respondem à presença de lesões no DNA através de mecanismos de reparo e têm a possibilidade adicional de eliminar células danificadas por meio da ativação de mecanismo de morte celular

programada, em caso de falhas nos mecanismos de reparo (NORBURY; ZHIVOTOVSKY, 2004).

A literatura tem demonstrado que alguns AINEs tem a capacidade de induzir apoptose em células de mamíferos. LIU *et al.* (2009), demonstraram que o valdecoxib induz apoptose em células Eca109 (células de câncer de esôfago humano). Estes autores verificaram que o valdecoxibe ativa a via de p38MAPK, aumentando, portanto, a expressão das proteínas Fas e FasL, o que pode ser um dos mecanismos através dos quais o valdecoxib induz a apoptose. Outro relato de citotoxicidade por um AINE foi observado em células MG-63; quando tratadas com o fármaco celecoxibe, tais células sofreram uma inibição do ciclo celular de forma significativa na fase S e um aumento da indução de apoptose tanto em 24 como em 48 horas de tratamento (ZHOU *et al.*,2015).

Outro tipo de morte celular clássica é a necrose. O diferencial entre esta e a apoptose é que na necrose as células incham e se rompem, liberando o material citoplasmático e atraindo leucócitos para a região, o que caracteriza uma resposta inflamatória. Também se destaca o fato de que a necrose, causada por injúria, resulta na morte de grupos de células, contrastando com a apoptose que acomete morte de células individuais (ZIEGLER ; GROSCURTH, 2004).

A dipirona é usada extensivamente pelo fato de possuir um forte efeito analgésico. Apesar de ser um AINE clássico, são muito raros os estudos a respeito dos efeitos citotóxicos e, principalmente, genotóxicos desta droga em células de mamíferos. Isto é surpreendente, tendo em vista que se trata de um medicamento comercializado há muito tempo. Assim, o presente estudo visa avaliar os efeitos genotóxicos induzidos *in vitro* pela dipirona sódica em linhagem de rim de macaco verde africano (VERO), além de avaliar respostas celulares tais como citotoxicidade e indução de estresse oxidativo. A expectativa é de que os resultados produzidos possam fornecer subsídios que colaborem no sentido de trazer algum impacto na forma como a dipirona é utilizada atualmente, uma vez que os danos genotóxicos eventualmente gerados por esta droga, podem aumentar o risco de carcinogênese.

2 OBJETIVO.

2.1 OBJETIVO GERAL.

Avaliar *in vitro* os possíveis efeitos genotóxicos e citotóxicos da droga dipirona sódica (metamizol sódico) em linhagens de células VERO

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Avaliar a viabilidade celular da linhagem de rim de macaco verde africano (VERO) após exposição a diferentes concentrações de dipirona sódica;
- Avaliar o índice de dano ao DNA demonstrado pela linhagem de rim de macaco verde africano (VERO) após o tratamento com diferentes concentrações da dipirona sódica utilizando o ensaio do cometa;
- Investigar a indução de apoptose e necrose demonstrada pela linhagem de rim de macaco verde africano (VERO) após o tratamento com diferentes concentrações da dipirona sódica por marcação fluorescente diferencial;
- Avaliar o efeito da dipirona sódica na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em linhagem de rim de macaco verde africano (VERO).

3 MATERIAL E MÉTODOS.

3.1 DIPIRONA SÓDICA.

Para a realização do presente estudo foram utilizadas comprimidos de 500 mg do anti-inflamatório não esteroideal dipirona sódica da empresa farmacêutica EMS obtidas em farmácia. Para a diluição foram utilizadas duas comprimidos do fármaco. Os comprimidos foram maceradas com o auxílio de um pistilo e cadinho em 30 ml de água destilada até a obtenção de uma solução homogênea numa concentração à 20mM. Em seguida, a dipirona diluída foi filtrada por um filtro de seringa estéril para obtenção de uma solução de coloração amarelada. A solução, já estéril, foi armazenada em um tubo também estéril de 50ml em local refrigerado.

3.2 LINHAGEM CELULAR.

A linhagem celular VERO foi primeiramente estabelecida a partir de rim normal de macaco verde africano adulto (*Cercopithecus aethiops*), sendo obtida do banco de células do Rio de Janeiro – BCRJ.

Para a realização dos experimentos foram utilizadas ampolas contendo aproximadamente um milhão de células cada uma, mantidas em solução de congelamento, constituída por 5% de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), 47,5% de meio de cultura HAM F10 + DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) na proporção de 1:1 e 47,5% de Soro Bovino Fetal (Gibco, Grand Island, NY, USA), 0.1 mg/ mL de estreptomicina e 99 U/ mL de penicilina. As ampolas foram armazenadas em botijões de nitrogênio líquido por período indeterminado, retiradas somente no momento do uso e descongeladas em banho-maria. Após o descongelamento, as células foram imediatamente transferidas para frascos próprios para cultivo celular com superfície igual a 25cm², suplementando-se com 10 ml de meio de cultura DMEM (Sigma Chemical Co., St.Louis, USA) e 10% de Soro Bovino Fetal (Gibco, Grand Island, NY, USA). Posteriormente, as células foram cultivadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 24 horas. Após este período, o meio contendo DMSO foi substituído por meio completo para melhor crescimento da monocamada celular. Todos

os procedimentos envolvendo cultura de células foram realizados em cabine de fluxo laminar.

3.3 CULTIVO DA LINHAGEM CELULAR.

As garrafas contendo as culturas celulares foram mantidas em estufa de CO₂ 5% com temperatura constante de 37°C até que as células chegassem à confluência, isto é, a monocamada celular estivesse completamente fechada, o que poderia ocorrer por volta de 72 horas após o descongelamento. A confluência celular foi acompanhada observando-se o crescimento das células com auxílio de microscópio invertido. Para o subcultivo, o meio utilizado pelas células foi desprezado em recipientes apropriados e a monocamada foi lavada duplamente pela solução salina balanceada de Hanks (0,4g de KCl, 0,06g de KH₂PO₄, 0,04g de Na₂HPO₄, 0,35g de NaHCO₃, 1g de glicose, 8g de NaCl, H₂O q.s.p 1000 ml) por aproximadamente 2 minutos, sendo utilizado um volume de 5ml em cada lavagem. A solução obtida após a lavagem das células foi retirada com auxílio de pipetas volumétricas. Após isto, foi necessária a utilização de tripsina (0,125g de tripsina, 0,02g EDTA diluídos em 100ml de solução de Hanks) na quantidade de 5ml para cada garrafa de 25cm² por 1 ou 2 minutos ou até que as células se desprendam da parede da garrafa de cultivo, sendo possível verificar a soltura em microscópio invertido. Posteriormente, a tripsina foi inativada pela adição de 15ml de meio de cultura DMEM acrescido com 20% de SBF, 0.1 mg/mL de estreptomicina e 99 U/mL de penicilina e a suspensão celular foi agitada e dividida igualmente para duas garrafas de cultivo de 25 cm² ou uma de 75 cm², até que houvesse novamente a confluência das células, e então o procedimento foi repetido, até obter-se uma quantidade de células suficiente para os experimentos.

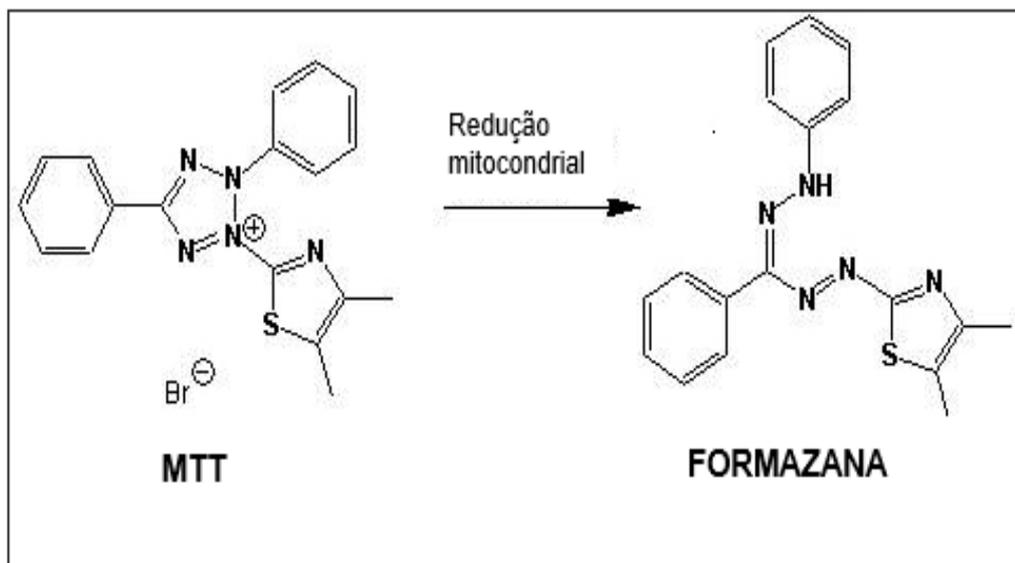
3.4 VIABILIDADE CELULAR.

3.4.1 Princípio da Técnica.

O teste do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] é um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio,

transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração purpura, chamado de formazana [E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan], que são cristais insolúveis em soluções aquosas que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Assim sendo, a produção de formazana reflete o estado funcional da cadeia respiratória (VALADARES *et al.*,2007; BRESCIA; BANKS 2009).

Figura 3- A redução de MTT em células vivas por redutase mitocondrial resultando na formação de formazana insolúvel.



Fonte: BRESCIA; BANKS 2009.

3.4.2 Procedimento experimental.

Foram cultivadas $0,016 \times 10^6$ células/poço em placas de cultura de 96 poços. As células foram incubadas por 24 horas e, em seguida, foram tratadas com as concentrações de 20mM; 10mM; 5mM; 2,5mM; 1,25mM e 0,625mM de dipirona durante 24 horas. Ao término deste período, 100 μ L de MTT (5000 μ g/mL) foram acrescentados às células por 3 horas. O MTT foi então retirado e foram acrescentados 100 μ L de dimetilsufóxido (DMSO) por uma hora com o objetivo de dissolver a formazana obtida durante o processo. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a um

comprimento de onda de 562nm. A sobrevivência celular foi calculada como a porcentagem de absorvância em relação à absorvância do controle. Foram consideradas as quatro primeiras concentrações com sobrevivência acima de 50% para as técnicas desenvolvidas posteriormente, de acordo com o protocolo definido por Galloway *et al.* (2011) para citotoxicidade em testes citogenéticos *in vitro*.

3.5 ENSAIO DO COMETA (VERSÃO ALCALINA).

3.5.1 Princípio da Técnica.

Esta técnica foi desenvolvida por Singh *et al.* (1988) e, posteriormente, modificada por Anderson *et al.* (1994). Corresponde a um ensaio de grande sensibilidade para a detecção de vários tipos de danos no DNA (quebra de fitas duplas ou simples, danos oxidativos e ligações cruzadas) induzidos por compostos genotóxicos e mutagênicos. Partindo-se do pressuposto de que o DNA encontra-se fortemente compactado dentro do núcleo, formando alças de 5-200 Kpb, as quais se encontram aderidas a uma rede proteica ou matriz nuclear (COOK ; BRAZELL, 1976; COOK *et al.*, 1978; RAZIN *et al.*, 1995; ERIKSSON *et al.*, 2002); se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares (incluindo as histonas) extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, sendo maior e mais pesado que o restante dos componentes ocupará um espaço no gel, o qual era anteriormente preenchido pela célula e foi retido em uma estrutura residual semelhante a um núcleo denominada nucleóide (COOK ; BRAZELL, 1976). Desta forma, o nucleóide é por definição, uma série de alças superenoveladas de DNA desprovido de histonas, aderidas à matriz nuclear residual do tamanho do núcleo da célula. Portanto, caso existam quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofrerá mudanças, uma vez que as alças de DNA se desenovelam, tornando-se mais frouxas e formando um halo (COOK ; BRAZELL, 1976; COOK *et al.*, 1978; VOGELSTEIN *et al.*, 1980).

3.5.2 Procedimento Experimental.

3.5.2.1 Preparação das Lâminas.

As lâminas foram previamente cobertas em solução de agarose (ponto de fusão normal - 1,5 %). Posteriormente, foram mantidas em temperatura ambiente até a solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão na segunda camada de agarose (baixo ponto de fusão - 0,8 %), na qual a amostra foi diluída. Foram cultivadas $0,1 \times 10^6$ células/poço em placas de cultura de 12 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com as seguintes concentrações de dipirona: 5mM; 2,5mM; 1,25mM e 0,625mM, além do o controle positivo *N-Metil-N-Nitrosourea* (NMU) na concentração de 1,2mM. As células foram tratadas com as diferentes concentrações de dipirona por 3 h (27 h de cultura) e, em seguida, foram coletados 450 μ L de amostra de cada grupo para centrifugação a 1000 rpm por 5 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado deixando-se 30 μ L para a ressuspensão. Deste conteúdo, 15 μ L foram acrescentados em 300 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,8 %), sendo em seguida homogeneizado. Subsequentemente, 100 μ L deste conteúdo foram aplicados rapidamente sobre cada lâmina contendo agarose e, em seguida, cada lâmina foi coberta com uma lamínula (24 x 60 mm). As lâminas foram mantidas a 4°C por 5 min até a solidificação da agarose. Após este período, as lamínulas foram removidas cuidadosamente, mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1 % Triton X-100 e 10 % DMSO; pH: 10) e mantidas a 4°C protegidas da luz.

3.5.2.2 Eletroforese.

Após a remoção das lâminas da solução de análise, as mesmas foram dispostas em posição horizontal na cuba de eletroforese. Em seguida, a cuba foi preenchida com a solução de eletroforese (1 mM EDTA, 300 mM NaOH; pH \geq 13) a 4°C recém-preparada, a um nível superior (0,25 cm, em média) às lâminas. As lâminas foram mantidas em repouso por 20 min antes da eletroforese a fim de permitir o desenovelamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios álcali-lábeis. Após este processo, a eletroforese foi realizada a uma tensão (d.d.p:

diferença de potencial) de 34 V em corrente de 300 mA por um período de 25 min. Vale ressaltar que todos esses processos foram realizados em baixa luminosidade. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas rapidamente em H₂O destilada gelada (4°C) para a remoção dos resquícios da solução de eletroforese, sendo, em seguida, transferidas para um novo mergulho em H₂O destilada gelada por 5 min para a neutralização.

3.5.2.3 Coloração.

As lâminas foram fixadas com etanol a 100% por 3 min e posteriormente coradas com 50 µL de solução de Brometo de Etídio (20 µg/mL). Em seguida, foram cobertas com lamínula (24 X 60 mm) para a realização das análises.

3.5.2.4 Análise das Lâminas.

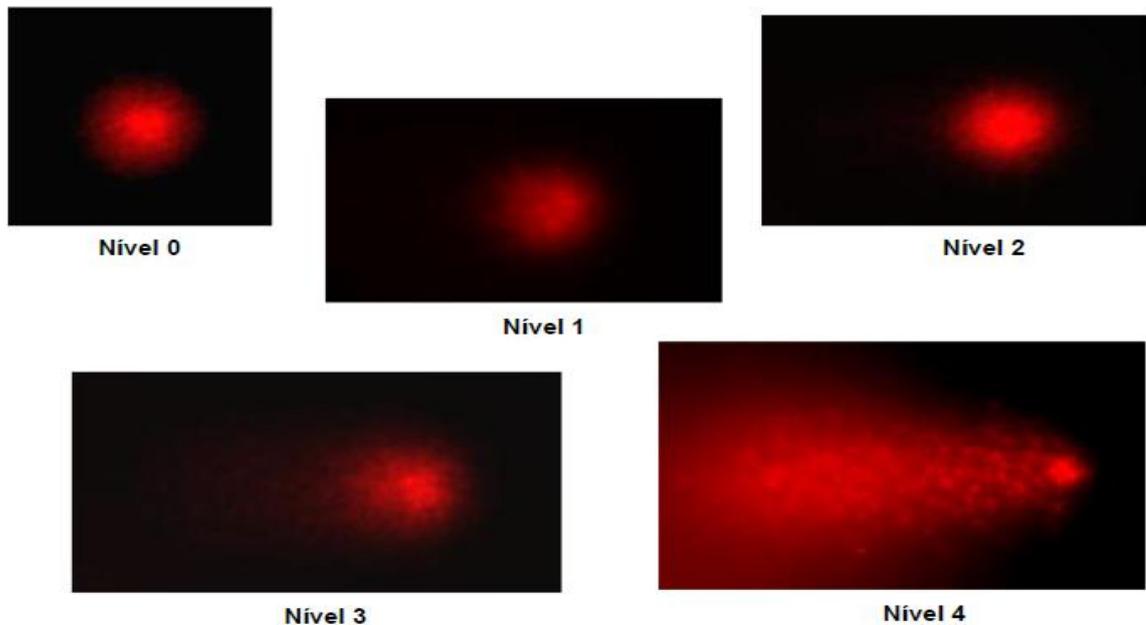
As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, contendo três filtros (DAPI/FITC/TRITC). O sistema de captura e a análise da imagem foram realizados pelo programa "Applied Spectral Imaging". A análise foi realizada segundo o padrão de escores (Figura 3), em que, de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa (halo), podem ser obtidas cinco categorias (0 - 4), levando-se em consideração a percentagem de DNA na cauda do cometa, o que indicou o grau de lesão sofrido pela célula (MALUF; ERDTMANN, 2000).

- 0 = sem danos (< 5 %)
- 1 = baixo nível de danos (5 – 20 %)
- 2 = médio nível de danos (20 – 40 %)
- 3 = alto nível de danos (40 - 95 %)
- 4 = dano total (≥ 95%)

O índice de dano ao DNA (ID) foi calculado multiplicando-se o número de células em cada nível pelo escore ao qual ela se enquadra (0, 1, 2, 3 ou 4), somando esses

valores, e por fim, o resultado obtido foi dividido por 100, que corresponde ao total de células analisadas.

Figura 4- Micrografia do ensaio do cometa.



Fonte: MOTA,2011. Legenda: Classificação visual dos danos, representados em uma escala de 0-4, sugeridos por Collins *et al* (1997). Imagens de cometas (a partir de linfócitos), coradas com Brometo de Etídio.

3.6 AVALIAÇÃO DE NECROSE E APOPTOSE POR MEIO DE CORANTES FLUORESCENTES: IODETO DE PROPÍDEO, FLUORESCÉINA DIACETATO E HOECHST 33342.

3.6.1 Princípio da técnica.

A apoptose é um processo fisiológico que ocorre desde o período embrionário para a manutenção da homeostase. Ela é caracterizada por processos morfológicos, incluindo a perda da assimetria da membrana plasmática, condensação da cromatina e núcleo fragmentado. Para a detecção das células apoptóticas de forma diferencial em relação às normais e necróticas, três corantes fluorescentes foram empregados: o

Hoechst 33342 (HO) que liga-se ao DNA corando-o em azul, o Iodeto de Propídeo (PI) que tem por finalidade determinar as células que perderam a integridade da membrana, uma indicação de apoptose ou necrose corando-as em vermelho e o Fluoresceína Diacetato (DAF) que cora em verde o citoplasma das células viáveis.

3.6.2 Procedimento experimental.

Para detecção de apoptose foram cultivadas $0,25 \times 10^6$ células em garrafas de cultura de 25cm² que foram posteriormente incubadas por 24 horas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Passada as 24h de cultivo, as células foram tratadas com as diferentes concentrações de dipirona 5mM; 2,5mM; 1,25mM e 0,625mM e o controle positivo doxorrubicina (DOXO) na concentração de 0,0005 mM, além de um controle negativo. As células permaneceram em tratamento durante o período 24h e 48h. Posteriormente, finalizado cada tempo de tratamento, foi feita a colheita do material. O meio de cultura foi transferido de cada poço a tubos de centrífuga com a finalidade de coletar também as células que se desprenderam da superfície do fundo dos poços. Em seguida, os poços foram lavados com 3ml de Hanks 1x, sendo estes adicionados aos tubos de centrífuga. O próximo passo foi a tripsinização das células aderidas e posterior inativação. Todo o líquido foi então transferido para o tubo de centrífuga, centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm e o sobrenadante descartado, deixando-se apenas uma pequena quantidade para ressuspender as células. Posteriormente, foi preparado um mix de corantes com volume final de 100 µl (25 µl de PI; 50 µl de DAF; 10 µl de HO e 15 µl de PBS) cuja as concentrações utilizadas foram de 5 µg/ml para PI, 15 µg/ml para DAF e 2 µg/ml para HO. Dois µl da solução de corante foram misturados a 100 µl da suspensão celular, sendo esta mistura deixada a 37°C em banho-maria por 5 minutos. Na sequência, em uma lâmina limpa, foram adicionados 15 µl dessa suspensão celular que foi coberta com lamínula. As células foram analisadas no microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, contendo três filtros (DAPI/FITC/TRITC)

3.7 NÍVEIS INTRACELULARES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS).

3.7.1 Princípio da Técnica.

É conhecido que o composto 2'-7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) pode ser oxidado intracelularmente por vários agentes oxidantes, tais como, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânion radical superóxido, hidroperóxidos lipídicos, entre outros; o que o torna um importante marcador para a determinação de espécies reativas de oxigênio (ROTA *et al*, 1999; BILSKI *et al*, 2002). O reagente DCFH-DA difunde-se passivamente pela membrana plasmática e no interior da célula é hidrolisado por uma esterase, reação que provoca a liberação de uma substância denominada 2'-7'-diclorofluorescina (DCFH), a qual tem afinidade por espécies reativas de oxigênio. Desta forma, a diclorofluorescina liberada reage com as ROS liberando uma grande quantidade de substância fluorescente conhecida como, 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), a qual é impermeável à membrana plasmática ficando aprisionada no meio intracelular. Assim, esta substância pode ser mensurada e os níveis de ROS estimados de acordo com a intensidade de fluorescência produzida (LIU *et al*, 2001).

3.7.2 Procedimento Experimental.

A produção de ROS intracelular foi determinada pelo método fluorométrico por meio da oxidação intracelular do composto DCFH-DA (Sigma Chemical Co. / St. Louis, MO, USA) como descrito anteriormente por Bai & Cederbaum (2003). Foram cultivadas 0,016x10⁶ células/poço em 3 placas de cultura de 96 poços. As células foram incubadas por 24 horas e, em seguida, foram tratadas com as concentrações de, 2,5mM e 5mM de dipirona. Vale ressaltar que além do tratamento com as drogas, foram feitos um controle negativo, somente com meio de cultura e um controle positivo na concentração de 2mM de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) de acordo com Engelmann *et al*. (2005). Passadas 3 h do tratamento, as células foram incubadas com 10 µM de DCFH-DA (diluído em DMSO) por 30 min a 37°C na ausência de luz. Após este período, as células foram centrifugadas a 800 rpm por 5 min e o sobrenadante descartado. Em seguida, as células serão lavadas uma vez em PBS 1X para a remoção dos resquícios de DCFH-

DA e novamente centrifugadas a 800 rpm por 5 min. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de PBS 1X. Na sequência, amostras foram coletadas para análise em espectrofotômetro de fluorescência (RF-5301PC, Shimadzu), com absorvância de 488 nm para excitação e 525 nm para emissão.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

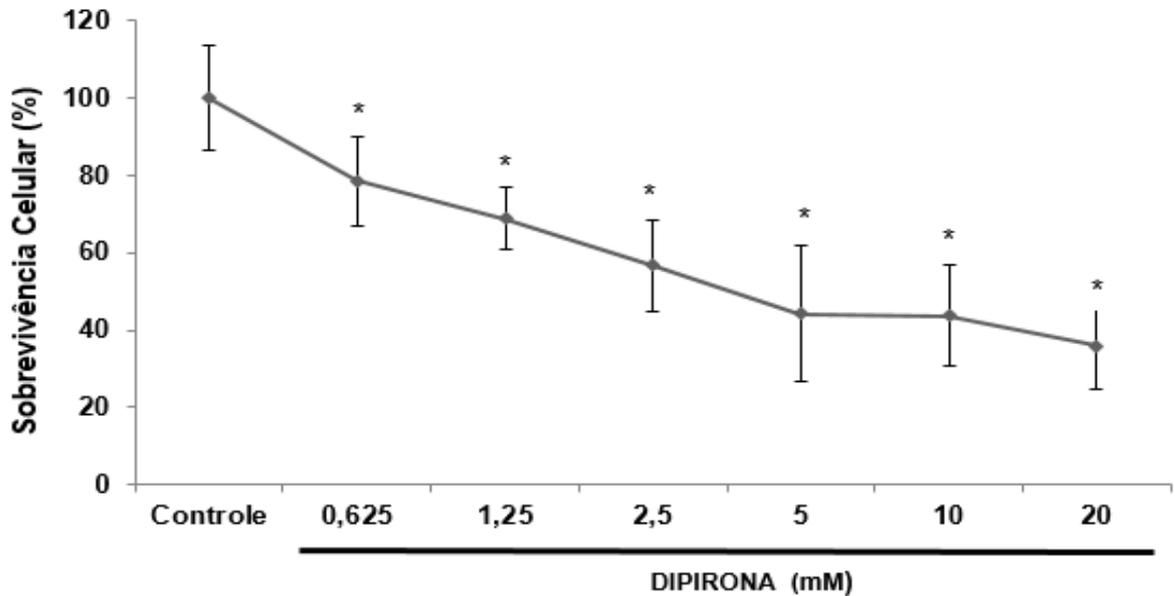
Para a comparação das frequências dos vários parâmetros, os resultados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo Teste Tukey do programa Bioestat 5.0 (AYRES *et al*, 2007). Em todas as análises o nível de significância utilizado foi de 5%. A concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) foi calculada pelo programa GrapPad Prism 6.0.

4 RESULTADOS.

4.1 VIABILIDADE CELULAR.

Os resultados do teste de viabilidade celular, após 24 horas de tratamento com a dipirona, demonstraram que a porcentagem de sobrevivência diminuiu conforme se aumenta a concentração da droga (figura 5). As porcentagens de sobrevivência foram de 78,43%; 68,86%; 56,77%; 50,02%; 43,66% e 35,94% para as concentrações de 0,625mM; 1,25mM; 2,5mM; 5mM; 10mM e 20mM, respectivamente. Tal diminuição foi considerada estatisticamente significativa ($p < 0,01$) para todas as concentrações em relação ao controle (100%). A concentração citotóxica CC₅₀ para 50% das células foi observada na concentração de 5mM de dipirona na linhagem VERO.

Figura 5- Porcentagens de sobrevivência celular observadas na cultura de células VERO após 24h de tratamento com dipirona.

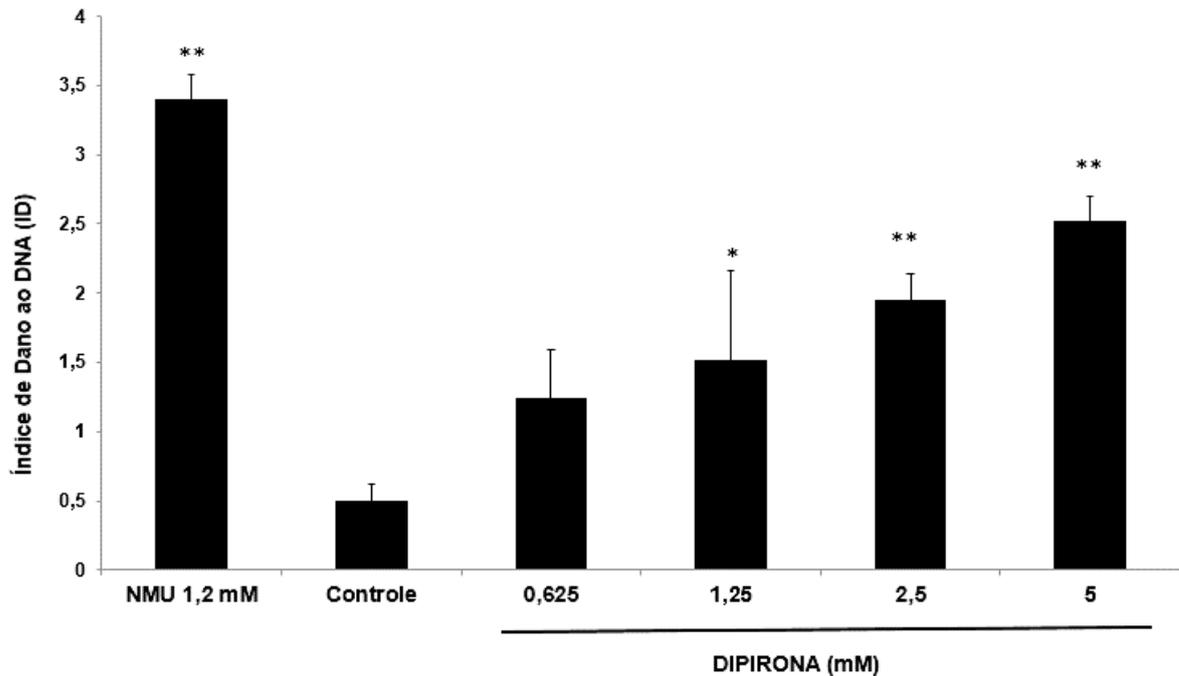


Legenda: Média de seis experimentos. * $p < 0,01$ (ANOVA) em relação ao controle negativo.

4.2 EFEITO DA DIPIRONA SÓDICA EM LINHAGEM VERO ANALISADO PELO ENSAIO DO COMETA.

Após três horas de tratamento das culturas com a dipirona, observou-se um aumento significativo no índice de dano (ID) ao DNA das células na concentração de 1,25mM (ID=1,51) ($p < 0,05$) e nas concentrações de 2,5mM (ID=1,95) e 5mM (ID=2,51) ($p < 0,01$), em relação ao controle negativo (ID=0,5). Este aumento foi dependente da concentração da droga. O índice de dano ao DNA do controle negativo também diferiu significativamente ($p < 0,01$) do índice das células tratadas com o NMU (ID=3,4) (Figura 6).

Figura 6- Índice de dano (ID) ao DNA observado pelo ensaio cometa em linhagem VERO tratada com dipirona após 3h de tratamento.



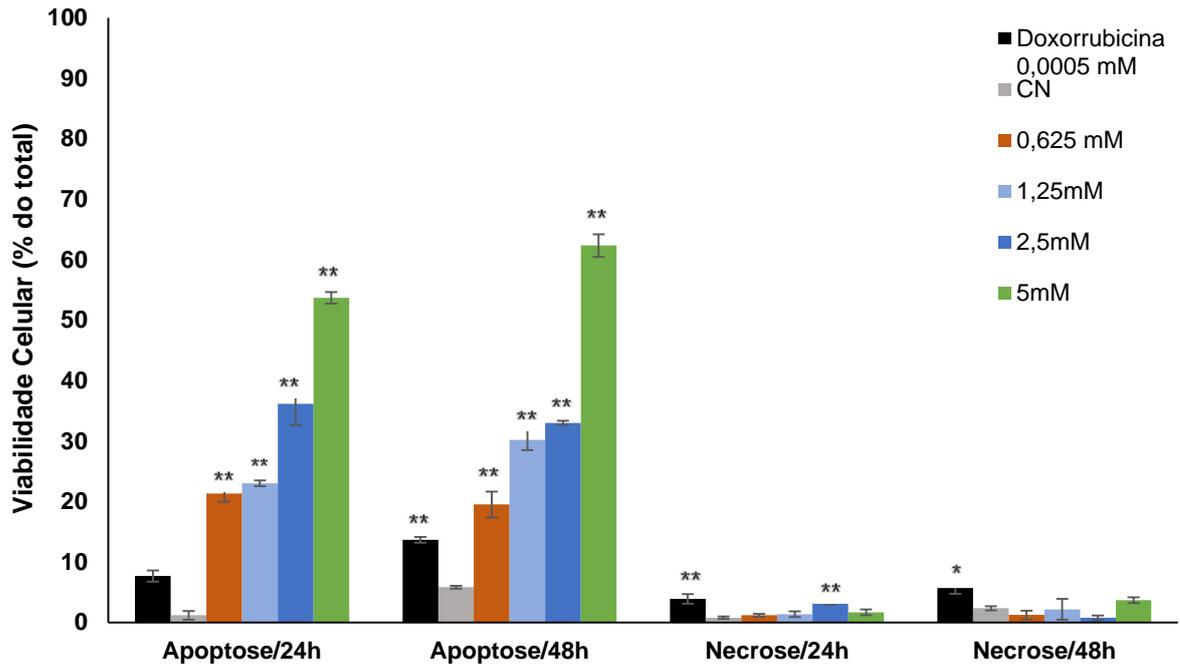
Legenda: Média de três experimentos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.

4.3 EFEITO DA DIPIRONA SÓDICA EM LINHAGEM VERO POR MEIO DA AVALIAÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE POR MARCAÇÃO FLUORESCENTE.

Quando analisada a morte celular após o tratamento com dipirona, percebeu-se que tanto em 24 quanto em 48 h houve um aumento significativo no número de células apoptóticas em relação ao controle. Tal aumento foi observado em todas as concentrações testadas e de forma dependente da concentração. Observou-se também que o controle positivo DOXO aumentou significativamente a morte celular por apoptose em relação ao controle negativo ($p < 0,01$), após 48 horas de tratamento. No que diz respeito às células necróticas, observou-se que em 24 h houve um aumento significativo deste tipo de morte celular no controle positivo ($p < 0,01$) e na concentração de 2,5mM ($p < 0,01$) de dipirona em relação ao controle negativo. Em contrapartida, em 48 h, o aumento significativo no número de células necróticas foi observado somente no controle positivo ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo (Figura 7). Os padrões

de fluorescência e morfologia distintivos de morte celular, observados em nossos experimentos, estão mostrados na Figura 8.

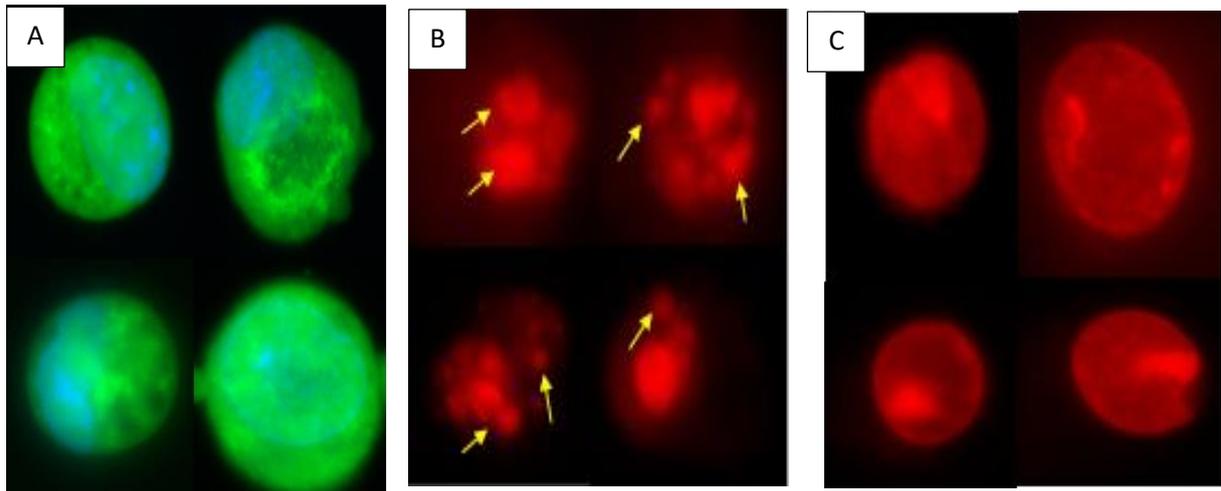
Figura 7: Frequência de apoptose e necrose induzida pela dipirona em cultura de linhagem VERO analisados por marcação fluorescente após 24 e 48 h de exposição.



Legenda: Média de quatro experimentos. *p < 0,05 e **p < 0,01 (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.

Na figura 8, observa-se o padrão de células normais, apoptóticas e necróticas obtidas em nossos experimentos, em que por meio da distinção do padrão de fluorescência e morfologia, conseguimos nitidamente classificá-las e assim realizar nossas análises.

Figura 8: Micrografias de células da linhagem VERO após o tratamento com dipirona e a realização do ensaio de Apoptose por marcação fluorescente.

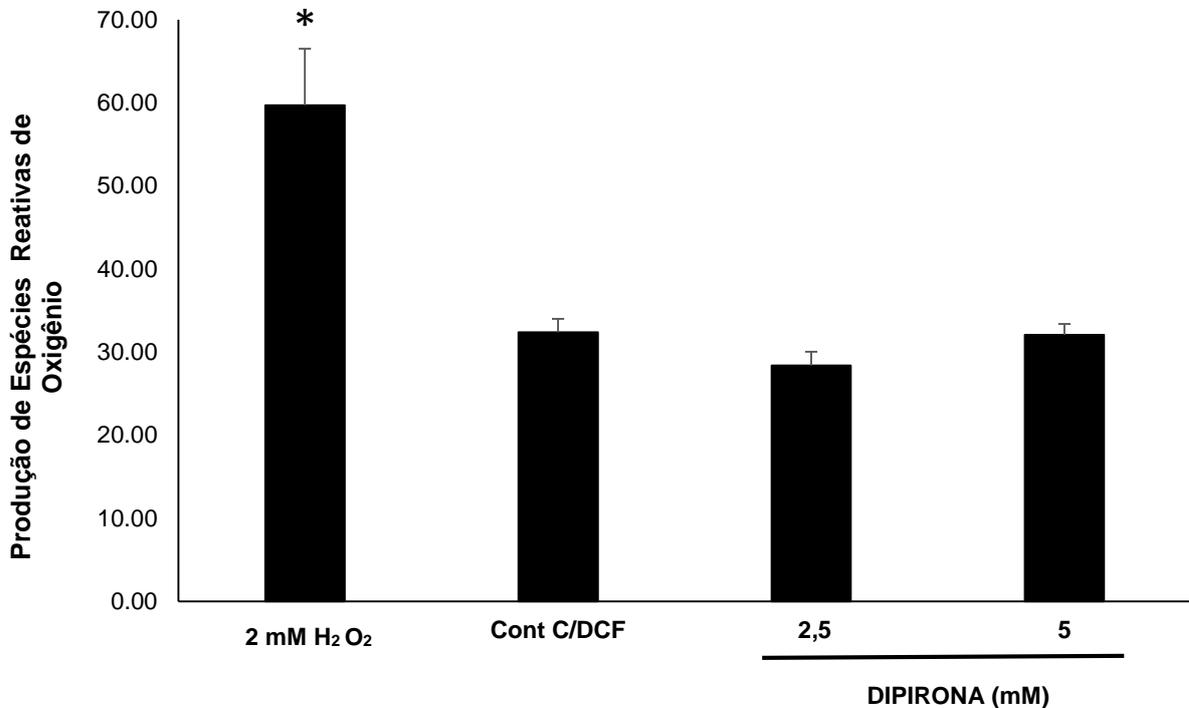


Fonte: Acervo do autor. Legenda: A) Células normais coradas com Hoechst 33342 (HO) que liga-se ao DNA corando o núcleo em azul e com Fluoresceína Diacetato (DAF) corando o citoplasma em verde. B) Células apoptóticas coradas em vermelho pelo Iodeto de Propídeo (PI), com destaque para a presença de corpos apoptóticos (setas amarelas). C) Células necróticas coradas em vermelho pelo PI.

4.4 EFEITO DA DIPIRONA SÓDICA EM LINHAGEM VERO NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS).

Resultados sobre a avaliação do efeito da dipirona sódica na produção de ROS, após uma hora de tratamento demonstraram que ambas as concentrações de 2,5mM e 5mM do fármaco não foram capazes de induzir ROS de forma significativa em relação ao controle sem DCFH-DA (Figura 9).

Figura 9: Efeito da dipirona na produção de ROS em linhagem VERO analisado pela técnica do DCFH-DA.



Legenda: Média de três experimentos. * $p < 0,01$ (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.

5 DISCUSSÃO

A dipirona é um analgésico e antipirético muito utilizado em diversos países e um dos principais da terapêutica brasileira. No entanto, poucos são os estudos avaliando seus efeitos genotóxicos e citotóxicos. Assim, objetivamos com o presente trabalho avaliar *in vitro* estes efeitos em linhagem VERO exposta a este AINE, visto que a exposição ambiental a agentes químicos, físicos ou mesmo biológicos pode interferir no adequado desenvolvimento da célula causando danos em seu material genético (NATARAJAN, 1993). Os parâmetros utilizados foram: viabilidade celular pelo teste do MTT, detecção de genotoxicidade pelo teste do cometa, avaliação da citotoxicidade utilizando-se o teste de apoptose e necrose por marcação fluorescente diferencial e a

análise da produção de ROS, por meio da quantificação utilizando-se o composto (DCFH-DA).

Quando as células foram tratadas com dipirona para se avaliar a viabilidade celular, observou-se uma diminuição dose-dependente significativa ($p < 0,01$) da sobrevivência celular (Figura 5). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Nicpoń *et al.* (2015). Tais autores observaram que a dipirona e o ácido tolfenâmico apresentaram um forte impacto negativo na sobrevivência de células de tecido adiposo de equinos e caninos, por meio do revelador Alamar Blue. De Luna-Bertos *et al.* (2013) também constataram que a dipirona diminuiu a viabilidade celular da linhagem MG-63 e, conseqüentemente, o processo de diferenciação dos osteoblastos, reduzindo assim a sua capacidade para produzir ossos novos na matriz extracelular mineralizada.

Outros AINEs também mostraram efeitos semelhantes aos induzidos pela dipirona no presente estudo. Wiktorowska-Owczarek *et al.* (2015) ao testarem o efeito do ibuprofeno em células HMEC-1 (células microvasculares endoteliais humanas), verificaram que tal droga tem a capacidade de diminuir a viabilidade celular, pelo ensaio do MTT, de forma dose-dependente. Liu *et al.* (2015) também observaram, pelo mesmo ensaio, a inibição significativa da proliferação da linhagem tumoral ECA-109 sob efeito da nimesulida, bem como a indução de apoptose, a qual foi acompanhada por uma diminuição significativa na expressão de COX-2.

Hamdani *et al.* (2013) demonstraram que o AINE cetoprofeno também mostrou-se potencialmente capaz de inibir a viabilidade celular em linhagem VERO por meio do ensaio do MTT, a concentração citotóxica CC_{50} para 50% das células foi observada a uma concentração de 5,2 mM. Este dados corroboram com nossos resultados uma vez que evidenciamos a CC_{50} da dipirona na concentração de 5mM. Além disto, Royals *et al.* (2005) verificaram que o tratamento de células de osteossarcoma canino com piroxicam e deracoxib, faz com que haja diminuição significativa na proliferação destas células. Por fim, Chiu *et al.* (2005) observaram que os AINEs celocoxib e indometacina reduzem a viabilidade da linhagem melanoma humano A-375.

Os resultados referentes aos efeitos genotóxicos da dipirona, no presente trabalho, demonstram a capacidade deste AINE em causar danos ao DNA de forma dependente de concentração na linhagem VERO (Figura 6). Trabalhos prévios que avaliem a genotoxicidade da dipirona em células de mamíferos são muito escassos. Um dos únicos encontrados na literatura é o de Giri *et al.* (1998). Tais autores verificaram que a dipirona aumenta significativamente a frequência de TCI (trocas entre cromátides-irmãs) em células da medula óssea de ratos *Mus musculus*. Estes resultados, da mesma forma que os nossos resultados obtidos no teste cometa, apontam para um efeito genotóxico da dipirona em células de mamíferos.

Embora trabalhos prévios em células de mamíferos sejam muito raros, existem relatos de pesquisas com outros modelos experimentais que também sustentam a possibilidade de que a dipirona seja genotóxica em determinadas condições. Por exemplo, uma abordagem complexa, baseada na utilização de organismos que pertencem a diferentes grupos sistemáticos (plantas, vertebrados e invertebrados), utilizou a dipirona sódica e o ácido acetilsalicílico em testes envolvendo biomarcadores nucleolares e o teste de MN. O estudo constatou que ambos os anti-inflamatórios causaram danos citotóxicos e genotóxicos às células vegetais e animais (ARKHIPCHUK *et al.*, 2004). Os resultados obtidos por estes pesquisadores também corroboram com os nossos, uma vez que a ação genotóxica foi observada em quase todas as concentrações de dipirona.

Efeitos genotóxicos da dipirona pelo ensaio do cometa foram também demonstrados *in vivo* por Pamplona *et al.* (2011) ao avaliarem os potenciais efeitos tóxicos do fármaco sobre o meio aquático, usando uma espécie de peixe nativo, jundiá. Os autores demonstraram que a dipirona era capaz de causar danos ao DNA na concentração mais baixa, resultados estes semelhantes aos nossos pelo fato de que evidenciamos efeito genotóxico da dipirona a partir da segunda concentração mais baixa (1,25mM). O fármaco também provocou alterações histopatológicas significativas nos rins de indivíduos do grupo testado, sugerindo que a exposição constante de organismos aquáticos a dipirona apresenta potenciais efeitos tóxicos. Em raízes de *Allium cepa*, a dipirona e o paracetamol foram capazes de causar um aumento de AC (cromossomos soltos, fragmentos, pontes e cromossomos em atraso na anáfase) e

aumento dos índices de danos em todas as concentrações em relação ao controle (REGO *et al.*, 2015).

Efeitos genotóxicos de outros AINEs são relatados de maneira extensiva na literatura. Por exemplo, Ribas *et al.* (2014) demonstraram que células monocíticas renais de *H. malabaricus*, um peixe de água doce, apresentavam inibição na produção de óxido nítrico e danos genotóxicos (observados pelo ensaio cometa) após tratamento com diclofenaco, ibuprofeno ou acetaminofeno. Já a nimesulida, outro fármaco bastante utilizado no combate a dor, febre e inflamação, também foi avaliado por Tripathi *et al.* (2014) no que diz respeito a sua genotoxicidade. Os autores verificaram que este fármaco induz de forma dose-dependente um aumento de AC, bem como um aumento da frequência de MN, em eritrócitos policromáticos em ratos albinos Wistar. A nimesulida também induz efeitos genotóxicos (avaliados por marcadores como MN, AC e ensaio do cometa) em eritrócitos de ratos albinos Wistar (BORKOTOKY *et al.*, 2014).

Tais resultados demonstram que tanto a dipirona, quanto os outros AINES, apresentam um grande potencial genotóxico, o que justifica a necessidade de estudos relacionados à avaliação deste potencial. No que diz respeito a dipirona, tal afirmação fica mais evidente quando se leva em consideração que esta droga é um dos AINEs mais utilizados como anti-inflamatório em todo o mundo. Além disto, trata-se de droga comercializada sem prescrição médica, o que pode levar a um uso excessivo da mesma.

Danos ao DNA são eventos relativamente comuns na vida de uma célula. Estes danos levam a várias respostas celulares que permitem que a célula ative um processo de morte celular programada, provavelmente para eliminar mutações potencialmente catastróficas (SANCAR *et al.*, 2004). Assim, no que diz respeito ao processo apoptótico, os resultados do presente trabalho demonstraram que a dipirona induz um aumento estatisticamente significativo no número de células apoptóticas, tanto em 24, quanto em 48h de tratamento em todas as concentrações testadas (Figura 7). Recentemente De Luna-Bertos *et al.* (2015) também constataram que a dipirona, juntamente com o cetorolaco e o dexcetoprofeno têm a capacidade de induzir apoptose em células de osteossarcoma humano MG-63 pelo método da anexina V, suprimindo a formação e

prejudicando a remodelação óssea. Porém, diferente dos nossos resultados, Shao & Feng (2013) ao estudarem o efeito citotóxico da dipirona, oxitretaciclina e propafenona em células HeLa evidenciaram a indução de células apoptóticas apenas após o tratamento com propafenona por meio da coloração Hoechst 33258.

A ação anti-proliferativa também tem sido observada em outros AINEs em decorrência da indução apoptótica em diferentes tipos celulares. Lin *et al.* (2016) investigaram o mecanismo dos efeitos gastroprotetores de trealose, um dissacarídeo que suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias, em relação ao efeito da aspirina. Os autores observaram que na linhagem celular gástrica humana AGS e mucosa gástrica de ratos, o tratamento com aspirina provou ser claramente capaz de induzir apoptose. Como um meio de supressão da morte celular, os autores realizaram o procedimento de co-liofilização da aspirina com trealose, o que reduziu significativamente a ação apoptótica induzida pelo fármaco.

A exposição ao diclofenaco, também causou efeito citotóxico que resultou em uma proporção mais elevada de apoptose de um modo dependente do tempo através da inibição do proteassomo em células A549 e COS-7, em comparação as células do controle (AMANULLAH *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram encontrados com o tratamento do AINE ibuprofeno, uma vez que o mesmo reduziu a atividade do proteassomo, provocando perda de potencial de membrana mitocondrial interna e liberação de citocromo C no citosol desencadeando efeito apoptótico em células A549 (UPADHYAY *et al.*, 2015).

No presente trabalho, a morte celular do tipo necrose foi induzida pela dipirona de modo significativo apenas na concentração de 2,5mM no período de 24h (Figura 7), demonstrando que em nossas condições experimentais, a dipirona induz apoptose de forma bem mais acentuada do que necrose. A literatura parece corroborar estes resultados; por exemplo, Shao & Feng (2013) demonstraram que três drogas (dipirona, oxitretaciclina e propafenona) não foram capazes de causar necrose na linhagem HeLa, pelo ensaio LDH, que é baseado na liberação da lactato desidrogenase, uma enzima citosólica, de células que tiveram a sua membrana plasmática rompida. Outra pesquisa avaliando a ação da dipirona no que diz respeito ao seu efeito necrótico foi realizada

por Ergün *et al.* (2001). Tais autores testaram o efeito da droga em retalhos cutâneos de ilha epigástrica em ratos e, após o uso do corante fluoresceína para observação visual e medição da área de sobrevivência dos retalhos, concluíram que houve uma redução significativa na quantidade de necrose isquêmica na área após uma única dose de dipirona. Estes dados sugerem que a dipirona é um agente útil na prevenção e no tratamento da isquemia e necrose.

No que diz respeito a morte celular por apoptose, sabe-se que a mesma é desencadeada por diversos fatores, tais como: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos ao DNA, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de ROS. O aumento nos níveis de ROS leva à oxidação de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, o que altera o potencial de membrana mitocondrial, podendo assim agir como uma via importante para o início da apoptose (GRIVICICH, 2007). Assim, realizou-se experimentos para investigar a indução de ROS pela dipirona nas células VERO. Os resultados mostraram que, nas condições experimentais avaliadas, a dipirona não induziu a indução destas espécies de oxigênio (Figura 9).

A literatura tem mostrado, de forma geral, que a dipirona realmente não tem a capacidade de induzir a formação de ROS, contribuindo, assim para estresse oxidativo; ao contrário, os estudos nesta linha tem mostrado que a dipirona, além de não induzir ROS, tem um papel de sequestradora destas moléculas, funcionando como um agente antioxidante. Esta habilidade foi demonstrada por Costa *et al.* (2006). Estes autores avaliaram o efeito das pirazolonas dipirona, aminopirina, isopropilantipirina e antipirina em inibir a “explosão respiratória” de neutrófilos e sequestrar radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxilo (HO^{\cdot}), radical peróxido (ROO^{\cdot}) e ácido hipocloroso ($HOCl$). Seus resultados mostraram que a dipirona e a aminopirina eram eficientes em inibir a explosão respiratória induzida por forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) em neutrófilos. Dipirona e aminopirina também se mostraram sequestradores altamente potentes de HO^{\cdot} e de $HOCl$, sendo que a dipirona também mostrou ser a mais reativa contra ROO^{\cdot} .

Em outro estudo, Costa *et al.* (2008) demonstraram que a dipirona e a aminopirina também demonstraram ser, de longe, os mais potentes sequestrantes do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) quando comparados a vários outros AINEs. Segundo os autores, esta característica certamente contribui para os seus efeitos no tratamento de inflamação prolongada ou crônica.

Uma vez que não observamos estresse oxidativo induzido pela dipirona, buscou-se na literatura outras formas de explicar os efeitos genotóxicos e citotóxicos observados no presente estudo. Pamplona *et al.* (2011) verificaram que a dipirona induz aumento no índice de dano ao DNA (pelo teste do cometa) em uma espécie de peixe nativo (jundiá). Os autores atribuíram este efeito genotóxico da dipirona ao fato de que esta droga pode ser transformada em N-nitrosodimetilamina (NDMA), um composto N-nitroso genotóxico e carcinogênico. Tal transformação pode ocorrer tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (BRAMBILLA ; MARTELLI, 2007). O NDMA é uma substância que possui a capacidade de induzir quebras de fita-simples e quebras de fita-dupla na molécula de DNA (JORQUERA *et al.*, 1994; LIN *et al.*, 1999), que podem ser detectadas pelo teste do cometa.

Quebras em fitas do DNA induzidas por NDMA podem disparar mecanismos de apoptose. Lin *et al.* (1999) verificaram características de apoptose em células GM2E1 que apresentaram um aumento na quantidade de quebras de fita-dupla após exposição ao NDMA. Os autores acreditam que esta atividade pró-apoptótica deva-se a ativação de endonucleases e membros da família das caspases, sem, no entanto, descartar o papel de outras vias transdutoras de sinal no processo de morte celular medida pelo NDMA. É possível que os efeitos citotóxicos e genotóxicos observados no presente estudo possam estar relacionados a uma possível transformação da dipirona em NDMA em nossas condições experimentais, no entanto, experimentos adicionais que detectem esta transformação e avaliem diretamente quebras de fita do DNA seriam necessários para confirmar tais hipóteses.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a dipirona, apresenta um claro efeito genotóxico e citotóxico. Uma das grandes preocupações que surge a partir dessa conclusão é a de que as modificações induzidas no DNA (efeito

genotóxico/mutagênico) possam resultar em um aumento no risco de carcinogênese nos indivíduos que são submetidos ao tratamento, principalmente em relação a automedicação exacerbada. Além disto, a morte celular (efeito citotóxico) induzida pode levar a uma disfunção imune que poderia também influenciar no desenvolvimento e progressão do câncer (SHENKER *et al.*, 2000; ARARAGI, 2003).

6 CONCLUSÃO

- A dipirona sódica reduz a viabilidade celular na linhagem de rim de macaco verde africano (VERO);
- A dipirona sódica induz um aumento no índice de dano ao DNA na linhagem de rim de macaco verde africano (VERO);
- A dipirona sódica induz apoptose na linhagem de rim de macaco verde africano (VERO) após 24 e 48 h de exposição;
- A dipirona sódica não apresenta efeito na indução para geração de ROS a linhagem de rim de macaco verde africano (VERO).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SABATI, K.; LLOYD, D.C.; EDWARDS, A. A. & STEGNAR, P. A Survey of Lymphocyte Chromosomal Damage in Slovenian Workers Exposed to Occupational Clastogens. **Mutat. Res.**280 (3): 215-223. 1992.
- AMANULLAH, A.; UPADHYAY, A.; CHHANGANI, D.; JOSHI, V.; MISHRA, R.; YAMANAKA, K.; MISHRA, A. Proteasomal Dysfunction Induced By Diclofenac Engenders Apoptosis Through Mitochondrial Pathway. **J Cell Biochem.** 2016.
- ANDERSON, D.; YU, T. W.; PHILLIPS, B. J. & SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. **Mutat. Res.** **307**: 261-271. 1994
- ARARAGI, S.; KONDOH, M.; KAWASE, M.; SAITO, S.; HIGASHIMOTO, M. ; SATO, M. Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway in human leukemia cells. **Toxicology**, **184**: 1 - 9. 2003.
- ARKHIPCHUK, V.V.; GONCHARUK, V.V.; CHERNYKH, V.P.; MALOSHTAN, L.N.; GRITSENKO, I.S. Use of a complex approach for assessment of metamizole sodium and acetylsalicylic acid toxicity, genotoxicity and cytotoxicity. **J Appl Toxicol.** **24(5)**:401-7.2004.
- AYRES, M.; AYRES, M. J.; AYRES, D. M ; DOS SANTOS, A. S. **Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Belém Pará, 2007.
- BASU, U.; GOOD A. G.; TAYLOR G. J. Transgenic Brassica napus plants overexpressing aluminum-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminum, **Plant Cell Environ.**, **24**: 1269 – 1278. 2001.
- BAI, J. ; CEDERBAUM, A. I. Catalase protects HepG2 cells from apoptosis induced by DNA-damaging agents by accelerating the degradation of p53. **J. Biol. Chem.** **278**: 4660 - 4667. 2003.
- BENSEÑOR, M. I. To use or not to use dipyrone? Or maybe, Central Station versus E.R? That is the question. **São Paulo Med. J.**119:190-191. 2001.
- BENTUR, Y; COHEN, O. Dipyrone overdose. Journal Of Toxicology. **Clinical Toxicology. United States.** **(42)**: 261-265. 2004.
- BILSKI, P.; BELANGER, A. G.; CHIGNELL, C. F. Photosensitized oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein: singlet oxygen does not contribute to the formation of fluorescent oxidation product 2',7'-dichlorofluorescein. **Free Radic. Biol. Med.** **33**: 938 – 946. 2002.
- BOGLIOLO, L. **Patologia Geral.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- BÖHM, I.; SCHILD, H. Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. **Mol Imaging Biol.** **5(1)**:2-14.2003.
- BORKOTOKY, D.; PANDA, S.K.; SAHOO, G.R.; PARIJA, S.C. Genotoxicity of nimesulide in Wistar rats. **Drug Chem Toxicol.** **37(2)**:178-83. 2014.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxic and carcinogenic risk to humans of drug-nitrite interaction products. **Mutation Research**. **635(1)**:17-52. 2007.

BREZNICEANU, M. L.; LIU, F.; WEI, C. C.; CHÉNIER, I.; GODIN, N.; ZHANG, S. L.; FILEP, J. G.; INGELFINGER, J. R.; CHAN, J.S. Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. **Diabetes**, **57**: 451 - 459. 2008.

BUTTGEREIT, F.; BURMESTER, G.R.; SIMON, L.S. Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase-2 specific inhibitors. **Am J Med**.**110**: 13s-19s.2001;.

BURKE A.; SMYTH E.; FITGERALD, G. A. Analgesic-Antipyretic and Antiinflammatory Agents; Pharmacotherapy of Gout, em: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL – **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, McGraw-Hill 11th ed N York, p 671. 2005.

BRESCIA, P.; BANKS, P. Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer. **BioTek**. 2009.

BRUNE, K.. The early history of non-opioid analgesics. **Acute Pain**. v. 1, p. 33-40.1997.

CARLSSON, K. H.; HELMREICH, J.; JURNA, I. Activation of inhibition from the periaqueductal gray matter mediates central analgesic effect of metamizol (dipyrone).**Pain**. **27**:373-90.1986.

CARVALHO, W. A. ; CARVALHO, R.D.S; SANTOS, F.R. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos. **Bras Anestesiol**. **54**: 3: 448 – 464. 2004.

CATELLI, R. O Mundo Contemporâneo: Novalgina 70 anos. **Hoeschst**. São Paulo: DBA Artes Gráficas.1993.

COLVILLE-NASH, P.R.; QURESHI, S.S.; WILLIS, D.; WILLOUGHBY, D.A. - Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. **J Immunol**.**161**:978-984. 1998.

COLLINS, A. R., DOBSON, V. L.; DUSINKÁ, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, v. 375, p. 183-193, 1997.

COSTA, D., VIEIRA, A., FERNANDES, E. Dipyrone and aminopyrine are effective scavengers of reactive nitrogen species. **Redox Rep**:**11**: 136–142. 2006.

COSTA, D., GOMES, A. ; LIMA, J.L. ; FERNANDES, E. Singlet oxygen scavenging activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Redox Rep**: **13(4)**:153-60. 2008.

COOK, P. R. ; BRAZELL, I. A. Detection and repair of single-strand breaks in nuclear DNA. **Nature**, **263 (5579)**: 679 – 82. 1976.

COOK, P. R.; BRAZELL, I. A.; PAWSEY, S. A.; GIANNELLI, F. Changes induced by ultraviolet light in the superhelical DNA of lymphocytes from subjects with xeroderma pigmentosum and normal controls. **J Cell Sci.**, **29**: 117 - 27. 1978.

CHATGILIALOGLU, C.; O'NEILL, P. Free radicals associated with DNA damage. **Exp Gerontol**, **36**: 1459 - 1471. 2001.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX 3, a cyclooxygenase-1 variant inhibition by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Proc Natl Acad Sci USA.** **99**: 13926-31.2002.

CHIU, L. C. M.; TONG, K. F.; OOI, V.E.C. Cytostatic and cytotoxic effects of cyclooxygenase inhibitors and their synergy with docosahexaenoic acid on the growth of human skin melanoma A-375 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 59, supplement 2, pp. S293–S297, 2005.

DALL'OLIO, G.; BETTI, E.; MACHADO, P.L.R.C.; GUIMARÃES, S.O. Agranulocitose induzida por dipirone. **Rev Bras Med.** **60(9)**: 693-700.2003.

DE LUNA-BERTOS, E.; RAMOS-TORRECILLAS, J.; GARCÍA-MARTÍNEZ, O.; GUILDFORD, A.; SANTIN, M.; RUIZ, C. Therapeutic Doses of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Osteosarcoma MG-63 Osteoblast-Like Cells Maturation, Viability, and Biomineralization Potential. **Scientific World Journal**, 2013.

DE LUNA-BERTOS, E.; RAMOS-TORRECILLAS, J.; MANZANO-MORENO, F.J.; GARCÍA-MARTÍNEZ, O.; RUIZ, C. Effects on Growth of Human Osteoblast-Like Cells of Three Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Metamizole, Dexketoprofen, and Ketorolac. **Biol Res Nurs.** **17(1)**:62-7. 2015.

DUBOIS, R.N.; ABRAMSON, S.B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R.A.; SIMON, L.S.; VAN DE PUTTE, L.B.A.; LIPSKY, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. **Faseb J.**, **12**:1063-1088. 1998.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.**, **82**: 47 - 95. 2002.

ECKLE, T.; GHANAYIM, N.; TRICK, M. *et al* .Intraoperative metamizol as cause for acute anaphylactic collapse. **Eur J Anaesthesiol.** **22**: 810-812. 2005.

EMERY, P. Cyclooxygenase-2: A major therapeutic advance? **Am J Med**, **110**:42-45.2001.

ENGELMANN, J.; Volk, J.; LEYHAUSEN, G. & GEURTSSEN, W. ROS Formation and Glutathione Levels in Human Oral Fibroblasts Exposed to TEGDMA and Camphorquinone. **J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater.** **75B**: 272 – 276. 2005.

EROL, K.; KILIC, F.S.; YILDIRIM, E. *et al* . Modulation of central antinociceptive or dipyrone by serotonergic mechanism. **Fund Clin Pharmacol.** **1**:41-48. 2004.

ERGÜN, H.; CILINGIR, M.G.; APAYDIN, I.; ERÇÖÇEN, A.R.; TULUNAY, F.C. The effect of dipyrone on survival of skin flaps. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.** **35(1)**:19-22. 2001.

ERGÜN, H.; FRATTARELLI, D. A.; ARANDA, J. V. Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dipyrone. **J. Pharm. Biomed.** **35**: 479–487. 2004.

ERIKSSON, S.; NYGREN, J. & AHNSTRÖM, G. Matrix association of early- and late-replicating chromatin studied by single-cell electrophoresis. **Biochim Biophys Acta.** **1590 (1 - 3)**: 103 - 8. 2002.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. **Neuropharmacology**.**33**:1479-1485. 1994

FITZGERALD, G.A; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. **N Engl J Med**.**345**:433-442. 2001.

GALLOWAY, S.; LORGE, E.; AARDEMA, MJ.; EASTMOND, D.; FELLOWS, M.; HEFLICH, R.; KIRKLAND, D.; LEVY, DD.; LYNCH, AM.; MARZIN, D.; MORITA, T.; SCHULER, M.; SPEIT, G. Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus). **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 2011.

GIRI, A.K.; MUKHOPADHYAY, A. Mutagenicity assay in Salmonella and in vivo sister chromatid exchange in bone marrow cells of mice for four pyrazolone derivatives. **Mutat Res**. **420(1-3)**:15-25. 1998.

GÓMEZ-OLIVA´N, L. M; GALAR-MARTI´NEZ, M.; GARCÍ´A-MEDINA, S.; VALDE´S-ALANI´S, A.; ISLAS-FLORES, H.; NERI-CRUZ, N. Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. **Drug and Chemical Toxicology**. **37(4)**:391-9. 2014.

GUIMARÃES, A.P.A.; DIAS, F.L.; CARDOSO, R.S.; KRONKA, S.N. & SAKAMOTO-HOJO, E.T. Cromosomal Aberration Induced by 5-azacytidine Combined With VP-16 (etoposide) In CHO-K1 and XRS-5 Cell Lines. **Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis**.**23 (51)**: 171-186. 2003.

GRANGEIRO, N.M.G.C.; CHAVES, H.V.; SILVA, A. A. R.; GRAÇA, J.R.V.; LIMA, V.; BEZERRA, M. M. Enzimas Ciclooxygenases 1 e 2: Inflamação e Gastro- Cardio proteção. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**. **2(3)**: 13 – 20. 2008.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, **53(3)**: 335 - 343. 2007.

HAMDANI, D. A.; JAVEED, A.; ASHRAF, M.; NAZIR, J.; GHAFOR, A.; ALTAF, I.; YOUSAF, M. S. In vitro cytotoxic and genotoxic evaluation to ascertain Toxicological potential of ketoprofen. **Academic Journals**. v. 8 (14), p. 386-391. 2013.

HEDENMALM, K.; SPIGSET, O. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyronb(metamizole). **Eur J Clin Pharmacol**.**58**: 265-274. 2002.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, **407**: 770 - 76. 2000.

HILARIO, M. O. E.; TERRERI, T.M.; LEN, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**. **82(5)**:S206-12. 2006.

HINZ, B.; CHEREMINA, O.; BACHMAKOV, J.; RENNER, B.; ZOLK, O.; FROMM M. F.; BRUNE, K. Dipyronne elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. **The Faseb Journal** .**21(10)**:2343-51.2007.

IBANEZ, L; VIDAL, X.; BALLARIN, E. *et al.* Population-Based Drug-Induced Agranulocytosis. **Arch Intern Medic.** **165**:869-874. 2005.

JORQUERA, R.; CASTONGUAY, A.; SCHULLER, H.M. DNA single-strand breaks and toxicity induced by 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone or N-nitrosodimethylamine in hamster and rat liver. **Carcinogenesis.** **15 (2)**: 389-394. 1994.

JÚNIOR, J.O.L.; SERRANO, S.C; TEODORO, A.L; DANA, B.A. Os antiinflamatórios não hormonais. **Prática hospitalar.** **51**:173-8. 2007.

KANDUC, D.; MITTELMAN, A.; SERPICO, R.; SINIGAGLIA, E.; SINHA, A. A.; NATALE, C.; SANTACROCE, R.; DI CORCIA, M. G.; LUCCHESI, A.; DINI, L. *et al.* Cell death: apoptosis versus necrosis (review). **Int. J. Oncol.** **21**: 165-170. 2002.

KAYAALP, O. Medicinal Pharmacology from Rational Cure Aspect (in Turkish). **Feryal Press, Ankara.1026.** 2000.

KEHLET, H. Surgical stress: the role of pain and analgesia. **Br J Anaesth.** **63**:189-95. 1989.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology,** **149**: 43 - 50. 2000.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.** **26**: 239. 1972.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A. & HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity, **Plant Soil** **274**: 175 – 195. 2005.

KOWALSKI, M.L.; WOSZCZE, G.; BIENKIEWICZ, B. *et al.* Association of pyrazolone drug hypersensitivity with HLADQ and DR antigen. **Clin Exp Allergy.** **28**:1153-1158.1998.

KLIPPER, J.H; WEYAND, C.M; WORTAMANN, R.L. Primer ir the rheumatic diseases. **Ed. Arthritis Foudation**, p. 583-91. 2001.

KNAPPMANN, A. L.; MELO, E. B. Qualidade de medicamentos isentos de prescrição: um estudo com marcas de dipirona comercializadas em uma drogaria de Cascavel (PR, Brasil). **C&SC.** v. 15, n. 3, p. 3467-3476. 2010.

KUMMER, C. L; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia. Recife,** v. **52**, n. **4**, p. 498-512. 2002.

KWON, Y. W.; MASUTANI, H.; NAKAMURA, H.; ISHII, Y. & YODOI, J. Redox regulation of cell growth and cell death. **Biol Chem.** **384**: 991 - 996. 2003.

LEVY, M. Hypersensitivity to pyrazolones. **Thorax.** **55(Suppl 2)**:S72-S74. 2000.

LIN, H.L.; PARSELS, L.A.; MAYBAUM, J.; HOLLENBERG, P.F. N-Nitrosodimethylamine-mediated cytotoxicity in a cell line expressing P450 2E1: evidence for apoptotic cell death. **Toxicol Appl Pharmacol.** **157(2)**:117-24.1999.

LIN, L.S.; KAYASUGA-KARIYA, Y.; NAKAMURA, S.; SHIMOHATA, N.; SAKAI, T.; FUJISAWA, A.; AKAGI, Y.; SUZUKI, S.; CHUNG, U.I.; SASAKI, N.; MOCHIZUKI, M. Co-lyophilized Aspirin

with Trehalose Causes Less Injury to Human Gastric Cells and Gastric Mucosa of Rats. **Dig Dis Sci.** **61(8)**:2242-51. 2016.

LITTLE JOHN, B. Ionizing Radiation. In: Cancer Medicine. Bast Jr, R.C.; Kufe D.W.; Pollock, R. E.; Weichselbaum, R.R.; Holland, J.F. and Frei, E. 5th edition. **Ed. B.C. Decker Inc.** 2400 pp. 2000.

LIU, D. X. A new hypothesis of pathogenetic mechanism of viral hepatitis B and C. **Med. Hypotheses.** **56**: 405 - 408. 2001.

LIU, S. X; ZHANG, Y. J.; GUO, H. F.; HAO, J .LIU, Q. J.; LIU, J. R. ; GUO, J. W. ; LIU, J.,H; ZUO, L. F. The regulatory effect of the p38 signaling pathway on valdecoxib-induced apoptosis of the Eca109 cell line. **Oncology reports** **22**: 313-319. 2009.

LIU, J.R.; WU, W.J.; LIU, S.X.; ZUO, L.F.; WANG, Y.; YANG, J.Z.; NAN, Y.M. Nimesulide inhibits the growth of human esophageal carcinoma cells by inactivating the JAK2/STAT3 pathway. **Pathol Res Pract.** **211(6)**:426-34.2015.

LITALIEN, C.; JACQZ-AIGRAIN, E.; Risks and benefits of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in children: a comparison with paracetamol. **Paediatr Drugs.****3**:817-58. 2001.

LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Mode of analgesic action of dipyrrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.** **v114**, p. **375-381**,1985.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. Follow-up Study of the Genetic Damage in Lymphocytes of Pharmacists and Nurses Handling Antineoplastic Drugs Evaluated by Cytokinesis-block Micronuclei Analysis and Single Cell Gel Electrophoresis Assay. **Mutation Research.** **471**: 21 - 27. 2000.

MEZZELANI, M.; GORBI, S.; DA ROS, Z.; FATTORINI, D.; D'ERRICO, G.; MILAN, M.; BARGELLONI, L.; REGOLI, F. Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. **Mar Environ Res.** pii: S0141-1136(16)30030-7. 2016.

MOTA, T.C.; CARDOSO, P.C.; GOMES, L.M.; VIEIRA, P.C.; CORRÊA, R.M.; SANTANA, P.D.; MIRANDA, M.S.;BURBANO, R.M.; BAHIA ,M.O. In vitro Evaluation of the Genotoxic and Cytotoxic Effects of Artesunate, An Antimalarial Drug, in Human Lymphocytes. **Environ Mol Mutagen.** **52(7)**:590-4. 2011.

MOVAJAGH, A.; MALEKI, F.; MOHAMMADZADEH, S.G. & FADARI, S. Association of Glutathione S-transferase and Chromosomal Aberrations as a Means to Determine Occupational Exposure. **Int. Congress Series**, **1276**: 197-198. 2005.

NATARAJAN, A.T. Techniques for Biomonitoring of Human Populations for Genetic Effects. **Rev. Brasil. Genet.** **16(3)**: 841-847. 1993.

NICPOŃ, J.; SIUDZIŃSKA, A.; MAREŃZIAK, M.; ŚMIESZEK, A.; BASIŃSKA, K., KOSZYKOWSKA, M. The effect of metamizole and tolfenamic acid on canine and equine adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) an in vitro research. **Pol J Vet Sci.** **18(1)**:3-11. 2015.

- NOH, H. ; HA, H. Reactive oxygen species and oxidative stress. **Contrib. Nephrol**, **170**: 102 - 12. 2011.
- NORBURY, C. J.; ZHIVOTOVSKY, B. DNA damage-induced apoptosis. **Oncogene** **23**: 2797–2808. 2004.
- NOVALGINA: dipirona sódica. São Paulo: Hoechst, 1999. Bula de remédio
- PESTANA, J.L.; PRADO,M.A.F.; CAMPOS,L.M.M. Desenvolvimento do método por iodometria alternativo para doseamento da dipirona sódica em matéria-prima e medicamento. **Rev. Bras. Farm.** v. 89 n. 1, p. 13-17. 2008.
- PAMPLONA, J.H.; OBA, E.T.; DA SILVA, T.A.; RAMOS, L.P.; RAMSDORF, W.A.; CESTARI, M.M.; RIBEIRO, C.A.; ZAMPRONIO, A.R.; DE ASSIS, H.C. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicol Environ Saf.** **74(3)**:342-9. 2011.
- RAZA, H.; JOHN, A.; SHAFARIN, J. Potentiation of LPS-Induced Apoptotic Cell Death in Human Hepatoma HepG2 Cells by Aspirin via ROS and Mitochondrial Dysfunction: Protection by N-Acetyl Cysteine. **PLoS One.** **11(7)**:e0159750. 2016.
- RAZIN, S. V; GROMOVA, I. I.; IAROVAIA, O. V. Specificity and Functional Significance of DNA Interaction with the Nuclear Matrix: new approaches to clarify the old questions. **Int Rev Cytol.** **162 B**: 405 - 48. 1995.
- REGO, S. C.; MATA, A.M.O.F.; ROSA, M.S.P.S.; ALENCAR, M.V.O.B.; JÚNIOR, A.L.B.; JÚNIOR, A.A.A.; PAZ, M.F.C.J.; CAVALCANTE, A.A.C.M. Evaluation of toxicity, cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity of dipyrone and acetaminophen on root meristem cells of *Allium cepa*. **Boletim Informativo Geum.** v. 6, n. 2, p. 7-14. 2015.
- RIBAS, J.L.; DA SILVA, C.A.; DE ANDRADE, L.; GALVAN, G.L.; CESTARI, M.M.; TRINDADE, E.S.; ZAMPRONIO, A.R.; DE ASSIS, H.C. Effects of anti-inflammatory drugs in primary kidney cell culture of a freshwater fish. **Fish Shellfish Immunol.** **40(1)**:296-303. 2014.
- ROTA, C.; CHIGNELL, C. F. ; MASON, R. P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. **Free Radic. Biol. Med.**, **27**: 873 - 881. 1999.
- ROYALS, S. R.; FARESE, J. P.; MILNER, R. J.; LEE-AMBROSE, L.; VAN GILDER, J. Investigation of the effects of deracoxib and piroxicam on the in vitro viability of osteosarcoma cells from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, vol. 66, no. 11, pp. 1961–1967, 2005.
- SAMAD, T.A.; SAPIRSTEIN, A.; WOOLF, C.J. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. **Trends Mol Med.** v. 8, n. 8, p. 390-6, 2002.
- SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; UNSAL-KAÇMAZ, K. & LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annu. Rev. Biochem.**, **73**: 39 - 85. 2004.

SÁNCHEZ DE LA NIETA, M.D.; RIVERA, F.; DE LA TORRE, M. *et al.* Acute renal failure and oligohydramnios induced by magnesium dypiron (metamizol) in a pregnant woman. **Nephrol Dial Transplant** .18: 1679–1680. 2003.

SHENKER, B. J.; GUO, T. L.; SHAPIRO, I. M. Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. **Environ. Res.**, **84(2)**: 89 - 99. 2000.

SEN, C. K. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. **Biochem. Pharmacol**, **55**: 1747 - 1758. 1998.

SINGH, M. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R. ;SCHNEIDER, P. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA in Individual Cells. **Exp. Cell Res.****175**: 184-191. 1988.

SOLOMON, D.H. NSAIDs:Mechanism of action. UpToDate. 2007.

SHAO, J.; FENG, G. Selective killing effect of oxytetracycline, propafenone and metamizole on A549 or Hela cells. **Chin J Cancer Res.** **25(6)**:662-70. 2013.

TEGEDER, I.; NEUPERT, W.; GUHRING, H.; GEISSLINGER, G: Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. **J Pharmacol Exp Ther.****292**:1161–1168 .2000.

TRIPATHI, R.; PANCHOLI, S.S.;TRIPATHI, P. Genotoxicity of ibuprofen in mouse bone marrow cells *in vivo*. **Drug Chem Toxicol.** **35(4)**: 389–392. 2012.

TRIPATHI, R.; TRIPATHI, P.; PANCHOLI, S.S.; PATEL, C.N. The genotoxic and cytotoxic effects of nimesulide in the mouse bone marrow. **Drug Chem Toxicol.** **37(3)**:255-60. 2014.

UPADHYAY, A.; AMANULLAH, A.; CHHANGANI, D.; JOSHI, V.; MISHRA, R.;MISHRA, A. Ibuprofen Induces Mitochondrial-Mediated Apoptosis Through Proteasomal Dysfunction. **Mol Neurobiol.** 2015.

VALADARES, M.C.; CASTRO, C.N.; CUNHA, L.C. Synadenium umbellatum: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43 (4). 2007.

VALE, N. Desmistificando o uso da dipirona. In: Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro. **Medicina periperatória.** **1**: 1107-1124. 2006.

VOLZ, M.; KELLNER, H. M. Kinetics and metabolism of pyrazolones (propyphenazone, aminopyrine and dipyrone). **Br. J. Clin. Pharmacol.** **10 (Suppl. 2)**:299S–308S. 1980.

VOGELSTEIN, B.; PARDOLL, D. M. ; COFFEY, D. S. Supercoiled loops and eucaryotic DNA replicaton. **Cell**, **22 (1 Pt 1)**: 79 - 85. 1980.

WEITHMANN, K.U.; ALPERMANN, H.G. Biochemical and pharmacological effects of dipyrone and its metabolites in model systems related to arachidonic acid cascade. **Arzneimittelforschung.** **6**: 947- 952. 1985.

WIKTOROWSKA-OWCZAREK, A.; NAMIECIŃSKA, M.; OWCZAREK, J. The effect of ibuprofen on bfgf, vegf secretion and cell proliferation in the presence of lps in hmec-1 cells. **Acta Pol Pharm.** **72(5)**:889-94. 2015.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci.** **19**:124-8. 2004.

ZHOU, X.; SHI, X.; REN, K.; FAN, G.T.; WU S.J.; ZHAO J.N. Celecoxib inhibits cell growth and modulates the expression of matrix metalloproteinases in human osteosarcoma MG-63 cell line. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** **19(21)**:4087-97.