

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR

DANIELE DE ARAÚJO MOYSÉS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E
GENOTÓXICO DO PIROXICAM EM LINHAGEM VERO**

BELÉM
2016

DANIELE DE ARAÚJO MOYSÉS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO
PIROXICAM EM LINHAGEM VERO**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do 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

DANIELE DE ARAÚJO MOYSÉS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO
PIROXICAM EM LINHAGEM VERO**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do 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: 08/ 08/ 2016.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Carlos Alberto Machado da Rocha (Membro) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA).

Prof^a. Dr^a. Tatiane Cristina Mota (Membro) – Escola Superior da Amazônia (ESAMAZ).

Prof. Dr. André Salim Khayat (Suplente) - Instituto de Ciências Biológicas (ICB) / UFPA.

BELÉM
2016

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

INSTITUIÇÕES

Universidade Federal do Pará (UFPA) – Laboratório de Citogenética Humana - LCH,
Instituto de Ciências Biológicas - ICB.

FONTES FINANCIADORAS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Bolsa de
mestrado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Dr. Marcelo Bahia, por aceitar me orientar, me acolher, por suas observações, sugestões, apoio nesta pesquisa e por me ensinar muitas coisas, contribuindo tanto no meu crescimento profissional quanto pessoal. Obrigada pela oportunidade.

Ao professor Dr. Rommel Burbano por me acolher no laboratório e pela colaboração no trabalho.

Ao professor Dr. André Salim Khayat por me acolher no NPO, pela amizade e pela colaboração.

As Prof^a Adriana Guimarães e Prof^a Carolina de Souza pelas suas sugestões e colaborações neste trabalho.

Ao Henrique Fonseca por me ajudar no Ensaio do Cometa, colaborando com meu aprendizado, pela amizade e brincadeiras.

A minha querida amiga Natasha Galucio, pela ajuda nos ensaios, pelo carinho, amizade, atenção, conversas, força, brincadeiras e por fazer dos momentos difíceis suportáveis.

Ao meu amigo Thiago de Jesus pelo apoio prestado, com suas riquíssimas sugestões, conselhos, pelo seu tempo, carinho e amizade.

As queridas Lorena Gomes e Tatiane Mota pela amizade, colaboração em muitas atividades do laboratório e pela companhia de horas de trabalho.

Aos colegas do NPO pelo acolhimento, em especial a Taíssa, Luciana, Adryan, Michele, Antônio, e aos colegas do LCH pelo acolhimento, em especial a Regianne Maciel, Plínio Cardoso, Camila Pinto, Felipe Mesquita, Emerson Lucena, Ingrid Ramos e Laine Celestino, pela amizade e brincadeiras. E a todos os membros do LCH que de alguma forma contribuíram para meu aprendizado.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AA - Ácido Araquidônico
- AC - Alterações Cromossômicas
- AINEs - Antiinflamatórios não esteroidais
- COX - Ciclooxygenases
- Coxibs – Antiinflamatórios inibidores da COX-2
- CtB - Citocalasina - B
- DAPI - 4', 6 -diamidino -2 -fenilindol
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
- EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- FBS - Fetal Bovine Serum (Soro Bovino Fetal)
- FITC - Fluorescein Isothiocyanate (Isotiocianato de Fluoresceína)
- GI - Gastrointestinal
- ID - Índice de Dano
- MTT - Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
- NMU - N-Metil-N-Nitrosourea
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PI - Iodeto de propídeo
- PGs - Prostaglandinas
- PS - Fosfatidilserina
- q.s.p – quantidade suficiente para
- ROS - Reactive oxygen species (Espécies Reativas de Oxigênio)
- rpm - Rotações por minuto
- TRITC - Tetramethylrhodamine (Tetrametilrodamina)
- VERO - Linhagem de rim de macaco verde africano

RESUMO

O Piroxicam é um AINE que pertence farmacologicamente a classe oxicam e é indicado para tratar diversos males como artrite reumatoide, dismenorreia primária, endometriose, entre outros. Suas propriedades anti-inflamatórias são bem conhecidas e está relacionada a sua capacidade não seletiva de inibição reversível das COXs, mas sabe-se pouco a respeito de sua atividade citotóxica e de sua ação no DNA. São escassos dados a respeito dos possíveis efeitos genotóxicos do Piroxicam em células de mamíferos. Esses efeitos podem ser monitorados para a prevenção e controle de algumas reações adversas e efeitos colaterais importantes. O presente estudo foi delineado para investigar os possíveis efeitos genotóxicos e citotóxicos induzidos *in vitro* pelo fármaco Piroxicam em linhagem de rim de macaco verde africano (VERO). A viabilidade das células expostas ao Piroxicam foi avaliada pelo ensaio MTT, a citotoxicidade do Piroxicam foi verificada pela quantificação de apoptose e necrose utilizando corantes fluorescentes (Hoechst, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína) e a genotoxicidade do Piroxicam foi avaliada pelo teste do cometa. Os resultados do ensaio de viabilidade celular mostraram que o Piroxicam reduz significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade das células nas concentrações de 1,0 mM, 2,0 mM, 4,0 mM e 8,0 mM. Observou-se também que o Piroxicam induz morte significativa ($p < 0,01$) por apoptose em todas concentrações testadas, tanto para tratamento de 24h quanto para 48h. No caso do ensaio cometa, não houve danos ao DNA em nenhuma concentração testada. Os dados defendem a ideia de que o Piroxicam possui atividade citotóxica, mas não apresenta potencial genotóxico nas condições testadas.

Palavras-Chave: AINE, Piroxicam, VERO, MTT, Apoptose, Cometa.

ABSTRACT

The Piroxicam is a NSAID that pharmacologically belongs to oxicam class and is indicated to treat various ailments such as rheumatoid arthritis, primary dysmenorrhea, endometriosis, among others. Its anti-inflammatory properties are well known and is related to its non-selective ability to reversible inhibition of COX, but it is known little about their cytotoxic activity and its effect on DNA. There are few data on the possible genotoxic effects of Piroxicam in mammalian cells. These effects can be monitored for the prevention and control of some adverse reactions and major side effects. This study was designed to investigate the possible genotoxic and cytotoxic induced in vitro by Piroxicam drug in kidney line of African green monkey (VERO). The viability of cells exposed to piroxicam was evaluated by MTT assay, cytotoxicity of piroxicam was verified by quantifying apoptosis and necrosis using fluorescent dyes (Hoechst, propidium iodide and fluorescein diacetate) and genotoxicity of piroxicam was evaluated by the comet assay. The results of the cell viability assay showed that Piroxicam reduces significantly ($p < 0.05$) cell viability in the concentrations of 1.0 mM, 2.0 mM, 4.0 mM and 8.0 mM. It is also noted that piroxicam induced significant killing ($p < 0.01$) by apoptosis in all concentrations tested, both as to 24h treatment 48h. In the case of the comet assay, there was no damage to the DNA in any concentration tested. The data support the idea that piroxicam has a cytotoxic activity, but has no genotoxic potential in the tested conditions.

Keywords: NSAIDs, Piroxicam, VERO, MTT, Apoptosis, Comet assay.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS (AINEs)	1
1.2	GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DOS AINEs	4
1.3	PIROXICAM	7
1.4	LINHAGEM DE RIM DE MACACO VERDE AFRICANO (VERO) COMO MODELO DE ESTUDO	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1	CULTIVO E SUBCULTIVO DA LINHAGEM VERO	13
3.2	TRATAMENTO	13
3.3	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	14
3.3.1	Princípio da Técnica	14
3.3.2	Procedimento Experimental	15
3.4	ANÁLISE MORFOLÓGICA PARA DETECÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE POR MEIO DOS CORANTES FLUORESCENTES: IODETO DE PROPÍDEO, FLUORESCÉINA DIACETATO E HOECHST 33342	16
3.4.1	Princípio da Técnica	16
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
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4	RESULTADOS	21
4.1	VIABILIDADE CELULAR	21

4.2	DETECÇÃO DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE E NECROSE.....	21
4.3	ENSAIO DO COMETA (VERSÃO ALCALINA)	22
5	DISCUSSÃO	24
6	CONCLUSÕES	29
7	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS (AINEs)

A humanidade sempre procurou amenizar e curar vários males por meio do uso de substâncias químicas, sendo o controle da dor e da inflamação um dos aspectos mais buscados (CHAHADE, GIORGI & SZAJUBOK, 2008). Com a descoberta da ação antipirética da salicilina em 1829, por Leraux, e a introdução, na medicina do ácido acetilsalicílico, por Dresser em 1899 (BRENOL *et al.*, 2000), os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) ganharam destaque por apresentarem uma ampla indicação terapêutica (DUBOIS, *et al.*, 1998).

O termo AINE surgiu na década de 60 com o artigo de Whitehouse intitulado “Uma distinção bioquímica entre drogas não-esteróides anti-inflamatórias e analgésicas” (Whitehouse, 1963 apud BUER, 2014). Os AINEs estão entre os agentes farmacológicos mais utilizados na prática médica atual (KUMMER & COELHO, 2002), e alcançam em torno de 30% das vendas, incluindo os com e os sem prescrição médica (LITALIEN & JACQZ-AIGRAIN, 2001), também compõem um grupo diversificado de compostos apresentando um ou mais anéis aromáticos ligados a um grupo ácido funcional (OLIVEIRA JÚNIOR, 2007).

Os AINEs apresentam-se em formulações diferenciadas como comprimidos, injeções e géis (RANG & DALE, 2007) e, apesar de suas distinções químicas, compartilham algumas ações terapêuticas, efeitos colaterais (sendo o mais comum o gastrointestinal - GI) e mecanismos de ação semelhantes (BURKE, SMYTH & FITGERALD, 2005). Os efeitos terapêuticos dos AINEs são, antipirese, analgesia e ação anti-inflamatória, sendo que o efeito de analgesia e antipirese podem estar interligados com seu efeito anti-inflamatório (BURKE, SMYTH & FITGERALD, 2005).

O processo inflamatório envolve uma série de eventos que podem ser desencadeados por numerosos estímulos acompanhados de sinais clínicos bem conhecidos como, eritema, edema, hipersensibilidade (hiperalgesia) e dor (BURKE, SMYTH & FITGERALD, 2005). Durante a resposta inflamatória, mediadores proteicos (como citocinas) e lipídicos (como as prostaglandinas) juntamente com substâncias liberadas localmente, as quais incluem, histamina, bradicinina e substância P, são responsáveis pela manutenção e amplificação do processo inflamatório

(GRANGEIRO *et al.*, 2008). Os AINEs agem neste processo inibindo a produção de prostaglandinas, como será discutido adiante.

As prostaglandinas (PGs) participam de várias funções-chave, pois suas ações biológicas são mediadas por receptores nas membranas plasmática e nuclear, que variam nos diferentes tecidos e tem papel central na inflamação, coagulação sanguínea, ovulação, cicatrização de feridas, função renal, respostas imunes, entre outras (KUMMER & COELHO, 2002; CHAMPE, HARVEY & FERRIER, 2006; GRANGEIRO *et al.*, 2008). As PGs são produzidas em quantidades pequenas por todos os tecidos e tem sua origem a partir de ácidos graxos com 20 carbonos (CHAMPE, HARVEY & FERRIER, 2006), e uma das suas principais vias da síntese são a liberação de fosfolípídeos de membrana de células lesionadas, por ação catalítica da fosfolipase A₂, que produzem o ácido araquidônico (AA), derivado do ácido linoleico, que é utilizado como substrato para duas vias enzimáticas, as lipooxigenases, responsáveis pela síntese dos leucotrienos e as ciclooxigenases (COX), dentre as quais pode-se citar a ciclooxigenase 1 (COX-1) e a ciclooxigenase 2 (COX-2), responsáveis pela síntese das PGs (KUMMER & COELHO, 2002; CHAHADE, GIORGI & SZAJUBOK, 2008).

Descobertas no início da década de 90 como enzimas associadas à membrana (GRANGEIRO *et al.* 2008), as COXs são inseridas de modo único no retículo endoplasmático e membrana nuclear, embolsadas com o substrato de ligação e precisamente orientadas para reagir com o AA liberado (FUNK, 2001). Possuem estruturas cristalinas, sendo semelhantes entre COX-1 e COX-2, com uma diferença de aminoácidos notável que conduz a um maior acesso de AA para a COX-2 (SMITH, DEWITT & GARAVITO, 2000).

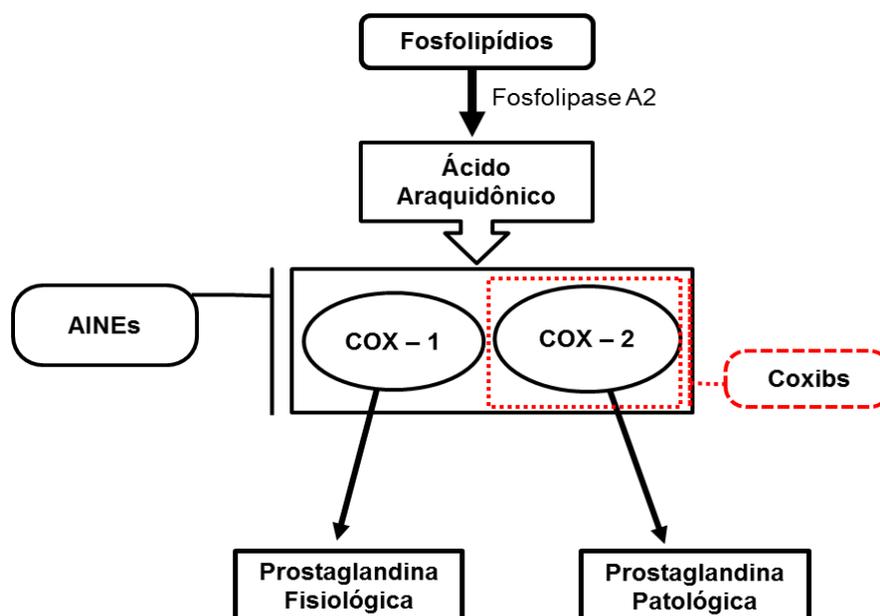
A COX-1 é a enzima responsável pela síntese de prostaglandina constitutiva, enquanto que a COX-2 é importante em várias configurações inflamatórias induzidas (FUNK, 2001). A COX-1 existe constitutivamente na maioria dos tecidos e é necessária para a manutenção da atividade gástrica, renal e de agregação plaquetária (CHAMPE, HARVEY & FERRIER, 2006). Já, a COX-2 também está constitutivamente expressa, mas em pequenas quantidades, nos rins (DUBOIS, *et al.*, 1998). Ela encontra-se envolvida em atividades renais como produção de prostaciclina renal (HARRIS & BRATER, 2001) e é altamente regulada em resposta a alterações no

volume intravascular, pois quando o volume sanguíneo está comprometido, as prostaglandinas derivadas da COX-2 desempenham um importante papel na circulação renal (MICHELIN *et al.*, 2006). Durante o processo inflamatório, é induzida pelas citocinas e outros mediadores nos sítios de inflamação, tendo sua expressão aumentada cerca de 20 vezes ou mais, podendo também ser expressa no sistema nervoso central, desempenhando papel na mediação central da dor e da febre (CHAMPE, HARVEY & FERRIER, 2006).

Neste contexto, a COX-2 é expressa predominantemente durante o processo inflamatório e acredita-se que a ação terapêutica dos AINEs esteja relacionada a esta inibição. Assim, um dos grandes problemas da não seletividade desses fármacos está associado a seus efeitos indesejáveis como, o aumento do risco de sangramentos e a danos no trato GI que resultam predominantemente da inibição da COX-1 (KUMMER & COELHO, 2002; CARVALHO *et al.* 2004; HILÁRIO *et al.* 2006), Além de reduzirem a excreção de sódio, potássio e água, podendo elevar a pressão arterial, causar edema e falência renal aguda em pacientes em que a manutenção da perfusão renal adequada é dependente de prostaglandina (MICHELIN *et al.*, 2006).

O uso indiscriminado destes inibidores inespecíficos das COX pela população causou o aparecimento de efeitos indesejados na função renal, moderados sintomas GI como, dispepsia e náusea, prováveis consequências cardiovasculares e na fertilidade (KUMMER & COELHO, 2002). Na expectativa de causar menores danos aos usuários, foram introduzidos no mercado os Coxibs (Parecoxib, Celecoxib e Rofecoxib), uma nova classe de AINEs inibidores específicos da COX-2 (Figura 1) de eficácia equivalente aos tradicionais (CHAN *et al.*, 1999; JAIN, 2000; LEE *et al.*, 2000; CANNON & BREEDVELD, 2001; CHEER & GOA, 2001; WHELTON, 2001). No entanto, os efeitos adversos na função renal e gastrointestinais persistem (KUMMER & COELHO, 2002). Esse fato pode estar relacionado a presença constitutiva de COX-2 em determinados tecidos, como na mácula densa e em células intersticiais da medula renal de animais (DUBOIS, *et al.*, 1998) e por algumas atividades renais serem dependentes da COX-2 como, produção de prostaciclina renal (HARRIS & BRATER, 2001). Esses fatores demonstram que os Coxibs necessitam de maiores avaliações para o estabelecimento da real segurança no seu uso (KUMMER & COELHO, 2002).

Figura 1 - Mecanismo de ação dos AINEs não seletivos e AINEs inibidores específicos da COX-2 (Coxibs).



Fonte: Adaptado de HILÁRIO, 2006. Legenda: durante processos inflamatórios, os fosfolipídios de membranas de células lesionadas sofrem ação catalítica da fosfolipase A₂ liberando Ácido Araquidônico que é utilizado como substrato pelas COXs para a síntese de prostaglandinas. Os AINEs inibem as COXs de forma não-seletiva, conseqüentemente, inibem a produção de prostaglandinas, tanto fisiológicas (relacionadas a manutenção da atividade gástrica, renal, etc.), quanto patológicas (relacionadas com processos inflamatórios e indutoras de dor, febre e etc.), já os Coxibs, ao inibir seletivamente a COX-2, dificultam a síntese de prostaglandinas patológicas, mas não das prostaglandinas fisiológicas.

1.2 GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DOS AINEs

A genotoxicidade é a capacidade que alguns agentes químicos, físicos ou biológicos apresentam em alterar a integridade do material genético ocasionando danos no DNA, os quais podem ou não ser reparados por mecanismos celulares (LITTLE, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2003). Estes agentes podem interferir no adequado desenvolvimento da célula, conferindo um grande risco para o desenvolvimento de doenças, como por exemplo, as neoplasias (NATARAJAN, 1993). Logo, o potencial genotóxico pode ser monitorado levando-se em conta a vulnerabilidade do material genético (DNA) às agressões impostas pelo ambiente (FERREIRA, 2004). Esses agentes podem ter seu potencial genotóxico detectado por vários testes, tais como: a análise de alterações cromossômicas em células metafásicas, o teste do micronúcleo

(MN), o teste do cometa, entre outros (AL-SABATI *et al*, 1992; GUIMARÃES *et al*, 2003; MOVAJAGH *et al*, 2005).

O ensaio cometa corresponde a um teste 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. Este ensaio tem uma vasta aplicação, destacando-se: biomonitoramento de populações humanas e de outras espécies de animais, além de plantas quanto a exposição ocupacional/ambiental a agentes genotóxicos, avaliação do dano ao DNA e do estresse oxidativo em relação a inúmeras doenças, avaliação da proteção ao DNA pela atuação de antioxidantes, investigação do dano e do reparo de DNA em diferentes tipos celulares quando expostos a potenciais agentes genotóxicos como radiações e radicais livres, investigação de xenobióticos alimentares, farmacêuticos, entre outros (BRENDLER *et al*. 2005; DUSINSKA & COLLINS, 2008; LOVELL & OMORI, 2008; BAGATINI & MALUF, 2011).

Existem na literatura alguns estudos a respeito da genotoxicidade de AINEs, no entanto, eles não são tão numerosos como se poderia presumir. Dentre estes podemos citar o estudo de Hamdani e colaboradores (2013) que relatou a presença de efeitos genotóxicos induzidos pelo Cetoprofeno através do ensaio cometa em linfócitos de ratos, e o trabalho de Rina e colaboradores (2014) que demonstraram que o Diclofenaco Sódico induziu genotoxicidade em células somáticas e germinativas de ratos albinos Swiss por meio do teste de alterações cromossômicas, teste do micronúcleo e anormalidades espermáticas.

Já citotoxicidade é a capacidade que uma substância tem de induzir alteração metabólica nas células (podendo ou não ocasionar danos no DNA). Estas alterações podem intervir em processos celulares de crescimento/replicação, além de favorecer fatores que podem desencadear a apoptose de forma anormal, por meio de níveis aumentados de ROS, ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, privação de fatores de crescimento, entre outros (HENGARTNER, 2000). Logo, esse monitoramento vem sendo considerado como um dos mecanismos de prevenção e controle de algumas reações adversas e efeitos colaterais importantes (MALUF & ERDTMANN, 2003).

Os testes de citotoxicidade possuem uma aplicabilidade geral muito usada na avaliação de danos celulares, crescimento celular e também no estudo de aspectos específicos do metabolismo celular (ISO, 2009). O desenvolvimento destes testes de citotoxicidade *in vitro* passou a ter reconhecimento pelos órgãos internacionais, tais como, a Organization for Economic Cooperation and Development, em 1987 e a FDA (Food and Drug Administration), em 1993 (HUGGET *et al.*, 1996). Algumas técnicas são recomendadas pela ISO (2009) para o biomonitoramento. Um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a citotoxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes como o vermelho neutro e os sais de tetrazólio MTT e XTT (CENNI *et al.*, 1996), além de ensaios como o de formação de colônia, detecção de apoptose, entre outros (CENNI *et al.*, 1996; SALMENA *et al.*, 2003).

Um dos métodos que pode ser utilizado para avaliar a citotoxicidade (assim como a proliferação celular) é o ensaio colorimétrico baseado no sal de tetrazólio MTT (brometo de [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) para avaliar a atividade oxidativa mitocondrial. Este ensaio é muito utilizado para o rastreio e modulação da resistência aos medicamentos em casos clínicos individualizados, como em tratamento de tumores para verificar a concentração inibitória de um antitumoral. Logo, pode-se inferir que é um excelente teste de triagem que norteia os demais ensaios de toxicidade (KEEPERS *et al.*, 1991; SARGENT, 2003; LOTZE & THOMSON, 2005).

No entanto, apesar das inúmeras vantagens do ensaio MTT, o mesmo não indica que tipo de efeito citotóxico a célula está sofrendo. Assim, é necessário que este teste seja complementado com técnicas de detecção específica de morte celular, como apoptose e necrose. Esta detecção pode ser utilizada como biomonitoramento, visto que, a ocorrência não-fisiológica de apoptose pode estar associada a processos patológicos (SALMENA *et al.*, 2003).

A apoptose é um processo importante ativado para a eliminação de células defeituosas, ou células normais que já tenham realizado sua função. Quando utilizada para eliminar células defeituosas, a apoptose pode ser desencadeada por diversos estímulos patológicos, tais como, a indução por uma infinidade de substâncias químicas ou ainda quando o DNA for lesionado (RANGANATH & NAGASHREE, 2001). As etapas deste processo constituem inicialmente em clivagem da cromatina e

colapso nuclear; em seguida, ocorre a condensação do citoplasma e mudanças na membrana plasmática ocasionando a formação de corpos apoptóticos que são fagocitados por macrófagos e removidos sem que ocorra inflamação (COHEN, 1992; ZIEGLER & GROSCURTH, 2004). Logo, tanto a exacerbação quanto a diminuição do processo de morte celular por apoptose podem promover consequências biológicas adversas (NAGATA, 1996).

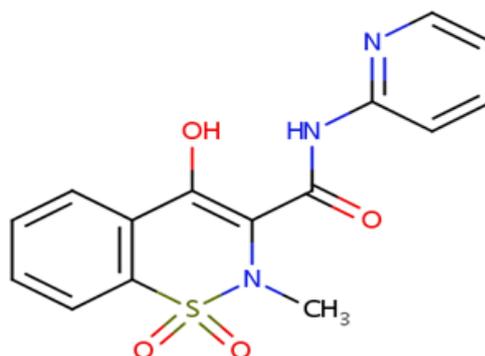
A literatura tem demonstrado que alguns AINEs tem a capacidade de induzir apoptose em células de mamíferos. Por exemplo, Alkan e colaboradores (2012) avaliaram a viabilidade celular, ciclo celular e indução de apoptose em linhagem neoplásica mamária canina, tratadas com Piroxicam e Deracoxib. Os autores observaram diminuição significativa da viabilidade celular em concentrações elevadas de Piroxicam e Deracoxib tanto em tratamentos individuais quanto em combinados, após 72 h de incubação, além da indução de apoptose significativa e acúmulo de células na fase G0/G1. Kim e colaboradores (2012) observaram que células HepG2 tratadas com Piroxicam demonstraram morte celular por apoptose, sem alterações na permeabilidade mitocondrial, enquanto que um aumento de cálcio citosólico foi claramente observado e confirmado por ensaio de inibição da caspase - 8.

Uma célula também pode sofrer necrose, dependendo da indução de danos que a mesma irá sofrer (FENECH *et al.*, 1999). A necrose é caracterizada por um aumento de volume celular, com citoplasma e mitocôndrias aumentados, perda da integridade da membrana plasmática e liberação do conteúdo celular, causando danos nas células vizinhas e iniciando uma reação inflamatória no local (WALKER *et al.*, 1988; ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).

1.3 PIROXICAM

O Piroxicam (Figura 2) foi introduzido em 1980 como AINE (WESSLING *et al.*, 1990). Seu nome químico é 4-hidroxil-2-metil-N-2-piridinil-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida-1,1-dióxido e sua fórmula molecular $C_{15}H_{13}O_4N_3S$. Pertence farmacologicamente ao grupo Oxicam, possuindo elevada afinidade para ambas formas de COX, com certa predominância para inibir a atividade da COX-2 (ZAJAC, 2000; ZEJC, 2002; PULGARÍN, MOLINA & BORAS, 2010).

Figura 2 - Fórmula Estrutural do Piroxicam.



Fonte: FDA, 2016.

Apesar de não ser o medicamento de primeira escolha em alguns tratamentos (em comparação a outros AINEs), devido aos problemas gastrointestinais que podem ser desenvolvidos ou intensificados, sua atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética é bem conhecida, sendo indicado no tratamento de patologias como, distúrbios musculoesqueléticos agudos, dor pós-traumática e pós-operatória, artrite reumatoide e osteoartrite, dismenorreia primária, endometriose e cisto hemorrágico (SANTOS *et al.*, 2011).

O Piroxicam não é considerado uma droga restrita na U. S. FDA (administração de alimentos e drogas norte americana), nem na lista japonesa de índice terapêutico de drogas restritas ou no sistema de saúde Canadense para dose crítica de drogas, portanto, não é realizado nenhum monitoramento da droga durante o tratamento (SHORIN *et al.*, 2013).

A dose diária habitual varia entre 10 a 20 mg, mas a dose diária máxima é de 20 mg de Piroxicam, podendo ser dividida em duas doses de acordo com a necessidade e indicação para o tratamento (HEYNEN, 1987; FDA, 2016). Os excipientes utilizados para formulações orais em diversos países são: celulose microcristalina, croscarmelose sódica, lactose, leucina, estereato de macrogol, estearato de magnésio, manitol, hidroxibenzoato de metilo, polisorbato, povidona, hidroxibenzoato de propilo, sílica, laurilsulfato de sódio, glicolato de amido sódico, amido, ácido esteárico, talco, entre outros (SHOHIN *et al.*, 2013). Esses excipientes possuem diversas funções, como solubilizar, suspender, espessar, diluir, emulsificar, estabilizar, colorir, flavorizar, entre outras, e são usados para assegurar a estabilidade,

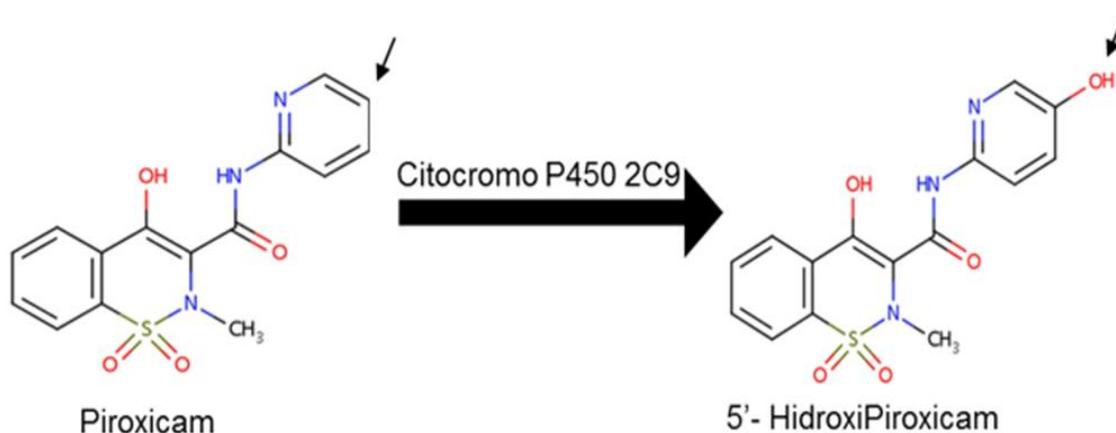
a eficácia e as propriedades físico-químicas, farmacológicas e organolépticas dos produtos farmacêuticos (BALBANI *et al.*, 2006; TONAZIO *et al.*, 2011)

O Piroxicam possui uma rápida e completa absorção após administração oral (SHOHIN *et al.*, 2013; FDA, 2016). O pico de concentração plasmática ocorre dentro de 2-5 h pós-administração. A dose única de 20 mg geralmente produz níveis de pico plasmático de 1,5 a 2 µg/mL, enquanto que a concentração plasmática máxima do fármaco, após ingestão diária contínua de 20 mg, se estabiliza entre 3 e 8 µg/mL. Sua meia-vida varia entre 30 e 60 h (WOOLF *et al.*, 1983; FDA, 2016). Uma vez absorvido, o Piroxicam liga-se extensamente as proteínas plasmáticas, limitando a sua distribuição principalmente para o plasma e o espaço extracelular, assim, atinge o estado de equilíbrio dinâmico entre 7 a 12 dias depois da administração do medicamento (WOOLF *et al.*, 1983; SHOHIN *et al.*, 2013; FDA, 2016).

Embora seu mecanismo de ação não esteja completamente esclarecido, foi demonstrado em testes *in vitro* que o fármaco bloqueia a síntese de prostaglandinas, por inibição reversível competitiva da atividade das COXs (BURKE, SMYTH & FITGERALD, 2005). Além disto, inibe a ativação dos neutrófilos, independentemente de sua capacidade de inibir as COXs. A inibição de neutrófilos também contribui para os efeitos anti-inflamatórios, visto que os radicais reativos de oxigênio produzidos por tais células e macrófagos estão implicados na lesão tecidual em algumas afecções (BURKE, SMYTH & FITGERALD, 2005). O Piroxicam em altas concentrações também inibe a migração e função dos leucócitos polimorfonucleares (KATZUNG, 2003).

Uma das vias metabólicas mais importante do Piroxicam consiste na hidroxilação do anel piridil mediada pela CYP2C9 (Figura 3), uma enzima citocromo P450 envolvida na formação do seu principal metabolito o 5'-hidroxi-piroxicam (ZHAO, LEEMANN & DAYER, 1992; MARTÍNEZ *et al.*, 2006). Esse metabolito inativo e seu conjugado glicurônico são responsáveis por cerca de 60% do fármaco excretado na urina (predominantemente) e nas fezes (BURKE, SMYTH & FITGERALD, 2005). Não é relatada atividade anti-inflamatória aos produtos de biotransformação do Piroxicam e exposição sistêmica mais elevada de Piroxicam tem sido observada em indivíduos com polimorfismos da CYP2C9, em comparação com indivíduos tipo metabolizadores normais (FDA, 2016).

Figura 3 - Metabolização do Piroxicam pela CYP2C9.



Fonte: adaptado da FDA, 2016. Legenda: após a metabolização do Piroxicam pela enzima do citocromo CYP2C9, um hidróxido é adicionado no carbono 5 do anel piridil, indicado pela seta, originando como principal metabolito inativo o 5'-hidroxi-piroxicam.

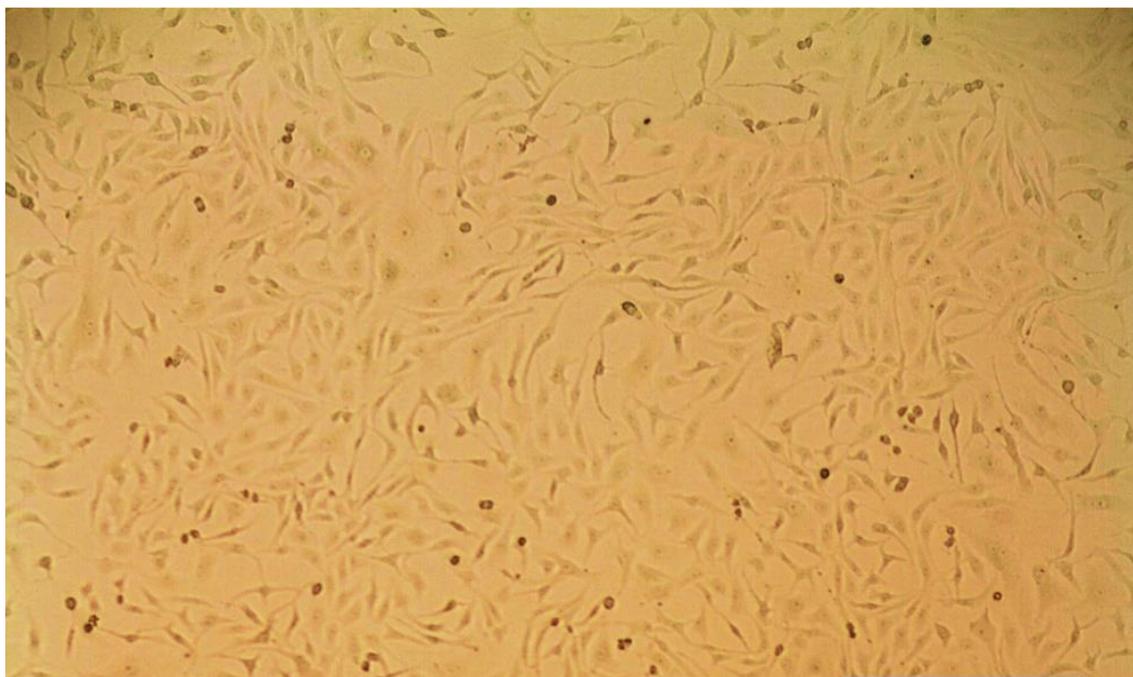
A incidência relatada de efeitos adversos desse fármaco é cerca de 20% (aproximadamente 5% dos pacientes interrompem a terapia devido a ocorrência de efeitos colaterais). Os efeitos mais comuns são GI, incluindo ulceração e perfuração do estômago e intestino (SHOHIN *et al.*, 2013; FDA, 2016). O risco relativo de danos GI de usuários de Piroxicam é de 6,2 vezes maior comparado com usuários que não utilizam o medicamento (RODRIGUEZ & HERNANDEZ-DIAZ, 2001). O Piroxicam pode aumentar o risco de dano cardiovascular como, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e eventos trombóticos (SHOHIN *et al.*, 2013; FDA, 2016). Há também relatos de hepatite relacionados a vários AINEs e, em especial, casos de hepatite aguda grave associado com Piroxicam (HEPPS *et al.*, 1991).

Já os excipientes podem interagir com o princípio ativo de suas formulações farmacêuticas, com outros medicamentos ou outros excipientes (PIFFERI & RESTANI, 2003; URSINO *et al.*, 2011) e, com isso, ocasionar reações adversas. Os excipientes farmacêuticos podem ser os responsáveis por inúmeras reações adversas ligadas a medicamentos (NAPKE, 2004). No entanto, não há relatos de reações adversas e carcinogenicidade dos excipientes lauril sulfato de sódio (MORTELMANS *et al.*, 1986; FDA, 2016), amido (OSHA, 2016), lactose (BALDRICK & BAMFORD, 1997), estereato de magnésio (ILO-ICSC, 2001) e croscarmelose sódica (OSHA, 2016) presente em muitas formulações do Piroxicam.

1.4 LINHAGEM DE RIM DE MACACO VERDE AFRICANO (VERO) COMO MODELO DE ESTUDO

A linhagem VERO (Figura 4) foi isolada em 1962 (AUGUSTO & OLIVEIRA, 2001) a partir de células epiteliais normais extraídas dos rins de um macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) saudável. A linhagem foi obtida por transformação espontânea, após passagens seriais *in vitro* das células e, em 1987, foi registrada no banco da *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde) como WHO Vero RCB 10-87. A linhagem VERO faz parte do banco de células de referência que constituem estoques criopreservados gerados a partir de um *pool* único e homogêneo de células submetidas a testes de caracterização (OMS, 2010).

Figura 4: Microscopia da monocamada de células VERO.



Fonte: Acervo do autor.

As células VERO crescem com relativa rapidez e adquirem boa densidade celular, razão pela qual são muito usadas para a produção de vacinas atenuadas e inativadas (OMS, 1998). A grande vantagem na utilização dessas células é seu longo histórico de publicações e revisões sobre sua segurança, por isso, foi a linhagem contínua mais usada para a produção de vacinas ao longo dos últimos vinte anos e é considerada como nível 1 com relação à biossegurança (OMS, 2010). Os usos ainda podem incluir a avaliação de citotoxicidade, detecção de toxinas, testes de eficácia,

testes de meios e micoplasma, uso como substrato e como hospedeiro para transfecção (ALVES *et al.*, 2008). Além do mais, pesquisas de drogas em células renais *in vitro* podem demonstrar possíveis danos sem influência de fatores de risco como, idade, doença cardíaca, hipertensão, diabetes, uso concomitante de diuréticos, ou abuso de analgésicos (MICHELIN *et al.*, 2006) e com isso apresentar dados relativos apenas aos medicamentos testados.

Neste contexto, a necessidade de comparar os dados da literatura sobre os aspectos da citotoxicidade e genotoxicidade do Piroxicam com células renais, torna-se importante, pois sabe-se pouco a respeito de sua atividade citotóxica e não existem relatos atualizados na literatura a respeito de seus efeitos genotóxicos. Uma vez que este medicamento tem sido amplamente utilizado ao longo dos anos como anti-inflamatório e, considerando que aspectos citotóxicos e genotóxicos podem ter um impacto na saúde dos usuários deste tipo de medicamento, o presente trabalho investigou os possíveis efeitos genotóxicos e citotóxicos induzidos *in vitro* pelo Piroxicam em linhagem de rim de macaco verde africano (VERO).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e citotóxicos do AINE Piroxicam na linhagem VERO.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Investigar a viabilidade celular de células VERO após exposição a diferentes concentrações de Piroxicam através do teste do MTT;
- Observar o padrão de morte celular (apoptose ou necrose) induzido pelas diferentes concentrações do Piroxicam em linhagem VERO através de marcação diferencial com corantes fluorescentes específicos.
- Verificar se há ocorrência de danos no DNA de células VERO expostas a diferentes concentrações de Piroxicam através do teste do cometa;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTIVO E SUBCULTIVO DA LINHAGEM VERO

Para a realização dos experimentos, foram utilizados criotubos contendo aproximadamente um milhão de células os quais foram mantidos em solução de congelamento, constituída por 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) e 90% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco, Grand Island, NY, USA) conforme a recomendação do protocolo do banco de células do Rio de Janeiro, de onde as mesmas foram obtidas. Os criotubos armazenados em botijões de nitrogênio líquido foram retirados somente para descongelamento. Após o descongelamento, as células foram transferidas para garrafas de cultura com superfície igual a 25 cm², contendo com 5 mL de meio de cultura DMEM (Sigma Chemical Co. St.Louis, USA) a 10% de SBF (Gibco, Grand Island, NY, USA) e cultivadas em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C por 24 h. Após este período, o meio contendo DMSO foi substituído por meio completo para o melhor crescimento da monocamada celular.

A linhagem VERO foi mantida em estufa de CO₂ (5%) com temperatura constante de 37°C até que a monocamada celular estivesse entre 80% e 90% de confluência. Para o subcultivo, o meio utilizado pelas células foi desprezado e a monocamada lavada duplamente com solução salina balanceada de Hanks (0,4 g de KCl, 0,06 g de KH₂PO₄, 0,04 g de Na₂HPO₄, 0,35 g de NaHCO₃, 1,0 g de glicose, 8,0 g de NaCl, H₂O q. s. p 1000 mL). Após a lavagem, acrescentou-se às células, tripsina (0,125 g de tripsina, 0,02 g de EDTA diluídos em 100 mL de solução de Hanks), na quantidade de 3,0 mL para cada garrafa de cultura por aproximadamente 2 min para dissociação das mesmas. Posteriormente, a tripsina foi inativada pela adição de 6,0 mL de meio de cultura completo. Com a suspensão celular homogeneizada, alíquotas foram acrescentadas à três garrafas de cultura contendo meio completo.

3.2 TRATAMENTO

O Piroxicam foi obtido comercialmente em drogarias localizadas em Belém-PA, comercializado como produto genérico Piroxicam[®] (EMS S/A), contendo 15 cápsulas na concentração de 20 mg cada. As caixas utilizadas pertenciam aos lotes 575730 e 587844 e foram fabricadas em 08/2013 com validade prevista para 08/2016. Os

excipientes contidos na formulação são semelhantes ao medicamento de referência Feldene® (Pfizer), são eles: croscarmelose sódica, lactose monoidratada, laurilsulfato de sódio, estereato de magnésio e amido (EMS, 2015).

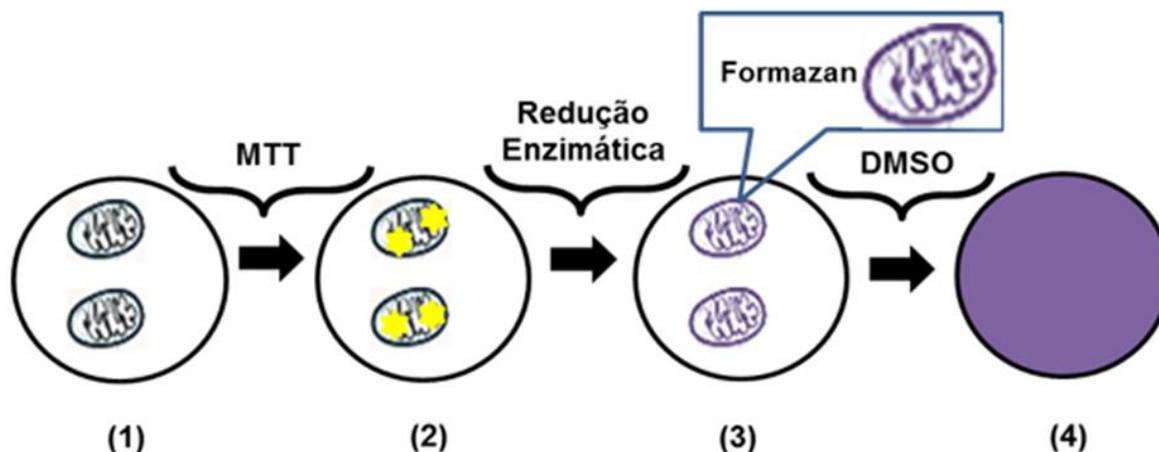
Foi preparada uma solução estoque de Piroxicam a 48,29 mM, a qual foi diluída em DMSO (5%), e armazenada a - 20 °C. Para realização dos ensaios, a mesma foi diluída pelo processo de microdiluição em meio incompleto (DMEM + F12). As concentrações de Piroxicam utilizadas no presente trabalho foram definidas tomando como base a pesquisa de Alkan e colaboradores (2012). As células foram tratadas com 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 2,0 mM, 4,0 mM e 8,0 mM para o ensaio de viabilidade celular e para os demais ensaios, foram utilizadas as concentrações de 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM por estarem acima e próximo do IC50% de acordo com o protocolo definido por Galloway *et al.* (2011) para citotoxicidade em testes citogénéticos *in vitro*. Para o controle negativo as células foram cultivadas com meio de cultura sem soro para todos os experimentos. Como controles positivos foram usados o NMU (N-Metil-N-Nitrosourea), na concentração de 1,2 mM, para o ensaio do cometa e a Doxorubicina, na concentração de 0,0005 mM, para o ensaio de detecção de apoptose e necrose. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

3.3.1 Princípio da Técnica

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico baseado no sal de tetrazólio MTT. Este método foi proposto por Mosmann (1983), adaptado por Denizot & Lang (1986) e indicado pela ISO 10993-5 (2009). O sal é reduzido em cristais de formazana em mitocôndrias de células viáveis através da clivagem da enzima succinato desidrogenase (Figura 5). Estes cristais têm coloração púrpura e são dissolvidos através de solventes apropriados. A variável continua resultante de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Os resultados podem ser quantificados em espectrofotômetro de múltiplos poços e apresentam um elevado grau de precisão (MOSMANN, 1983).

Figura 5 - Processo de redução do MTT.



Fonte: adaptado de EBADA *et al.*, 2008. Legenda: 1) Célula Normal Viável; 2) Redução do MTT por enzimas mitocondriais; 3) Formação de Formazana na mitocôndria; 4) Dissolução de Formazana por DMSO.

3.3.2 Procedimento Experimental

Foram cultivadas $8,0 \times 10^3$ células/mL em placas de cultura de 96 poços durante 24 h. Após esse período, o meio foi removido e realizado o tratamento durante 24 h. Em seguida, o meio do tratamento foi removido e acrescentado 100 μ L de MTT (5000 μ g/mL) às células por 3 horas. O MTT então foi retirado e adicionado 100 μ L de DMSO com o objetivo de dissolver a formazana obtida durante o processo. As leituras foram realizadas em Leitor de Elisa (ELx800, Biotek Instruments, EUA) a um comprimento de onda de 562 nm.

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

3.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA PARA DETECÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE POR MEIO DOS CORANTES FLUORESCENTES: IODETO DE PROPÍDEO, FLUORESCEÍNA DIACETATO E HOECHST 33342

3.4.1 Princípio da Técnica

A apoptose é caracterizada por processos morfológicos relacionados 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 (BOHM & SCHILD, 2003). Já, na necrose, as células incham e se rompem, liberando o material citoplasmático e atraindo leucócitos para a região, o que origina 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 a morte de células individuais (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).

Para a detecção das células apoptóticas de forma diferencial em relação às normais e necróticas, três corantes de DNA são empregados. As células viáveis são detectadas pelo corante Hoechst 33342 (HO) que se liga ao DNA corando-o em azul. O iodeto de propídeo (PI) cora de vermelho células que perderam a integridade da membrana, uma indicação de apoptose tardia ou necrose. O diacetato de fluoresceína (DAF) cora em verde o citoplasma das células viáveis.

3.4.2 Procedimento Experimental

Para detecção de apoptose, células VERO foram cultivadas em densidade de $3,0 \times 10^3$ células/mL, em placas de 12 poços a 37 °C em estufa de CO₂ a 5% por 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com Piroxicam nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mM, além do controle positivo com Doxorubicina a 0,0005 mM e do controle negativo, por 24 e 48 h de tratamento. Após o período de tratamento, foi realizada a colheita do material, e o meio de cultura transferido de cada poço para microtubos de centrífuga com a finalidade de coletar também as células que se desprenderam da superfície dos poços. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com 100 µL de Hanks 1x, sendo os sobrenadentes adicionados aos microtubos de centrífuga. As células foram então tripsinizadas nos poços com posterior inativação do processo. Todo o líquido foi então transferido para o microtubo de centrífuga, centrifugado por 5

min a 1000 rpm e o sobrenadante descartado, deixando apenas uma pequena quantidade para ressuspender as células.

Posteriormente, foi preparado um mix de corantes com volume final de 100 μL , composto por 25 μL de PI (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 50 μL de DAF (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 10 μL de HO (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 15 μL de PBS, e retirado 2 μL do mix de corantes, misturados a 100 μl da suspensão celular, sendo a mesma deixada a 37°C em banho-maria por 5 min. Foram preparadas lâminas para as análises, adicionando-se 15 μL da suspensão celular sobre cada lâmina, as quais foram cobertas com lamínulas. As células foram analisadas em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, contendo três filtros (DAPI/FITC/TRITC).

As porcentagens de células necróticas e apoptóticas foram calculadas pela contagem de 300 células por grupo. Foram consideradas normais, células com citoplasma corado em verde com núcleo integro em azul. Já as células apoptóticas foram consideradas aquelas com citoplasma verde e núcleo fragmentado (corpos apoptóticos) corados em azul. Células com núcleo e citoplasma na coloração vermelha, corados homoganeamente, foram consideradas necróticas.

3.5 ENSAIO DO COMETA (VERSÃO ALCALINA)

3.5.1 Princípio da Técnica

Esta técnica foi primeiramente apresentada por Ostling & Johanson (1984) como método do microgel e adaptada por Singh e colaboradores (1988) e Olive (1989), sendo posteriormente modificada por Anderson e colaboradores (1994). As células são aplicadas em um gel de agarose sobre uma lâmina de microscópio, suas membranas são lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares (incluindo as histonas) extraídas e submetidas a um campo elétrico em tampão alcalino. 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 será retido em uma estrutura residual semelhante a um núcleo denominada nucleóide (COOK & BRAZELL, 1976). 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,

formando um halo e partes dessas moléculas migram em direção ao anodo (COOK & BRAZELL, 1976; COOK *et al.*, 1978; VOGELSTEIN *et al.*, 1980).

Desta forma, após aplicação de corantes específicos (como o Brometo de Etídio, Acridina Orange e Iodeto de Propídio) pode-se visualizar em microscópio de fluorescência a migração do DNA formando uma estrutura que se assemelha a um cometa. O tamanho da cauda aumenta proporcionalmente à quantidade de danos, mas a migração máxima é determinada pelas condições da eletroforese (SINGH *et al.*, 1988; FAIRBAIN *et al.*, 1995, TICE, 1995).

3.5.2 Procedimento Experimental

As lâminas foram previamente cobertas em solução de agarose (ponto de fusão normal - 1,5%) e mantidas em temperatura ambiente até sua solidificação. Foram cultivadas $150,0 \times 10^3$ células/mL em placas de cultura de 6 poços que permaneceram em cultura durante 21 h. Após esse período, o meio foi removido e então realizados os diferentes tratamentos.

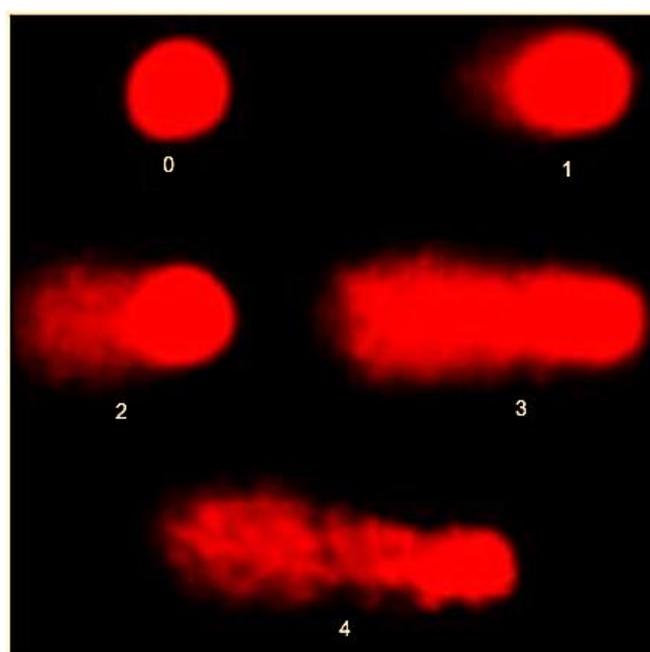
Após 3 h de tratamento, coletou-se 1000 μ L de amostra de cada grupo e em seguida realizou-se uma centrifugação a 1000 rpm por 5 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado deixando-se 200 μ L para a ressuspensão. Deste conteúdo, 30 μ L foram acrescentados em 300 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,8%). Subsequentemente, 100 μ L deste conteúdo foram aplicados rapidamente sobre as lâminas previamente preparadas contendo agarose de ponto de fusão normal (1,5%).

Em seguida, cada lâmina foi coberta com uma lamínula (24 x 60 mm) e mantida a 4 °C por 5 min até a solidificação da agarose. Após este período, as lamínulas foram removidas cuidadosamente e as lâminas, mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 e 10% DMSO; pH: 10), mantidas a 4 °C e protegidas da luz. Após a remoção das lâminas da solução de lise, as mesmas foram dispostas em posição horizontal na cuba de eletroforese. Em seguida, a cuba foi preenchida com a solução de eletroforese (1mM EDTA, 300mM NaOH; pH \geq 13) a 4°C recém preparada, a um nível superior às lâminas (0,25cm, em média). As lâminas foram mantidas em repouso por 20 minutos 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 34V em corrente de 300mA por um período de 25 minutos. Vale ressaltar que todos esses processos foram realizados em baixa luminosidade. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas rapidamente em água destilada gelada (4°C), para a remoção dos resquícios da solução de eletroforese, em seguida transferidas para um novo mergulho em água destilada gelada por 5 minutos para a neutralização. As lâminas foram fixadas com etanol a 100% por 3 minutos e posteriormente coradas com 50 µL de solução de Brometo de Etídio a 20 µg/mL. Em seguida, cobertas com lamínula (24 X 60 mm) para a realização das análises.

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, contendo três filtros (DAPI/FITC/TRITC). A captura e análise das imagens foram realizadas pelo programa “Applied Spectral Imaging”. Foram analisadas 100 células por grupo. A análise foi realizada segundo o padrão de escores, em que, de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa (halo), podem ser obtidas cinco categorias de 0 a 4 (Figura 6), levando-se em consideração a percentagem de DNA na cauda do cometa, o que indica o grau de lesão sofrido pela célula.

Figura 6 - Fotomicrografia do ensaio cometa.



Fonte: BITIREN *et al.*, 2010. Legenda: fotomicrografia obtida a partir de linfócitos corados com Brometo de Etídio mostrando a classificação visual dos danos, representados em uma escala de 0 a 4.

O índice de dano ao DNA (ID) foi calculado multiplicando-se o número de células em cada nível (N0, N1, N2, N3 e N4) pelo escore ao qual ela se enquadra (0, 1, 2, 3 ou 4) e somando-se esses valores. Por fim, o resultado obtido foi dividido por 100, como mostra a seguinte equação:

$$ID = \frac{[(N0 \times 0) + (N1 \times 1) + (N2 \times 2) + (N3 \times 3) + (N4 \times 4)]}{100}$$

Equação 1 - Índice de Dano (ID) ao DNA das células por meio do ensaio Cometa.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

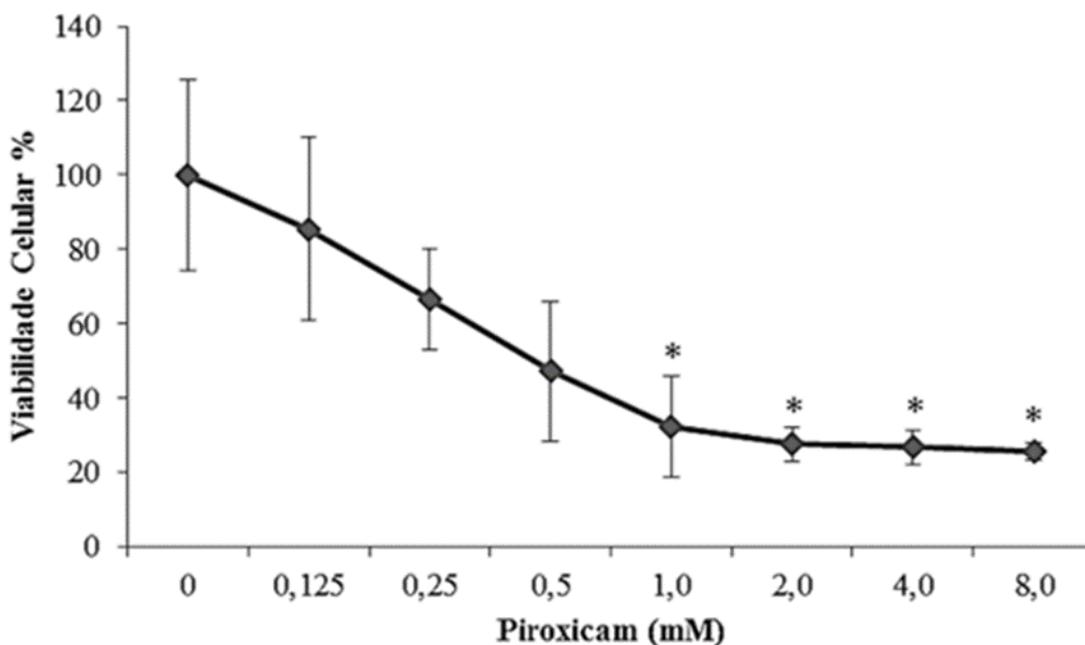
Para a comparação das frequências dos vários parâmetros, os resultados que se enquadravam na premissa de normalidade foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey. Já os resultados que não se enquadraram na premissa de normalidade foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis, seguido pelo pós-teste de DUNN. O programa estatístico utilizado foi o BIOESTAT 5.0 (AYRES *et al*, 2007). Em todas as análises, o nível de significância utilizado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 VIABILIDADE CELULAR

Os resultados do teste de viabilidade celular, após 24 h de tratamento com o Piroxicam, demonstraram que a sobrevivência diminuiu de forma dependente da concentração (Figura 7), chegando a uma redução acima de 70% na maior concentração testada.

Figura 7 - Sobrevivência celular observadas na linhagem VERO após 24h de tratamento com diferentes concentrações de Piroxicam.



Legenda: Média de seis experimentos. * $p < 0,05$ (ANOVA) em relação ao controle negativo.

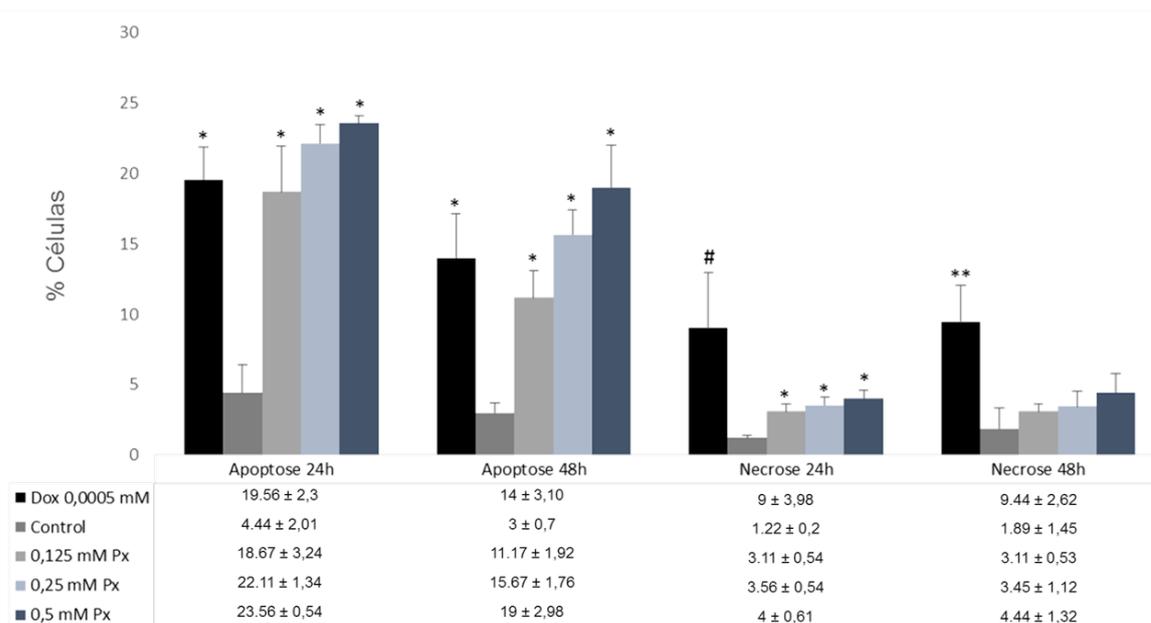
4.2 DETECÇÃO DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE E NECROSE

A avaliação do potencial citotóxico do Piroxicam foi realizada após 24 h e 48 h de tratamento com a droga. De forma geral, observou-se um aumento de células apoptóticas conforme se aumentou a concentração de Piroxicam. Este aumento foi estatisticamente significativo ($p < 0,01$) para todas as concentrações de Piroxicam nos tratamentos de 24h e 48h testados, quando comparados ao controle negativo. Houve também diferença significativa ($p < 0,01$) entre a quantidade de células apoptóticas

observadas entre o controle positivo e o negativo nos tratamentos de 24 h e 48 h. Nos dois tempos de tratamento, a concentração de 0,125 mM de Piroxicam induziu menos apoptose que o controle positivo com Doxorubicina (1,2 mM), no entanto, as concentrações de 0,25 mM e 0,5 mM de Piroxicam induziram mais apoptose que o controle positivo (Figura 8).

Em relação a necrose, houve indução significativa ($p < 0,01$) deste tipo de morte celular em 24h de tratamento, conforme se aumentou a concentração de Piroxicam. Também foi significativa a diferença de células necróticas entre o controle positivo e o negativo ($p < 0,05$) nos dois tempos de tratamento avaliados. O tratamento de 48h não induziu necrose de maneira significativa (Figura 8).

Figura 8 - Indução de apoptose e necrose em linhagem VERO submetidas a diferentes concentrações de Piroxicam.



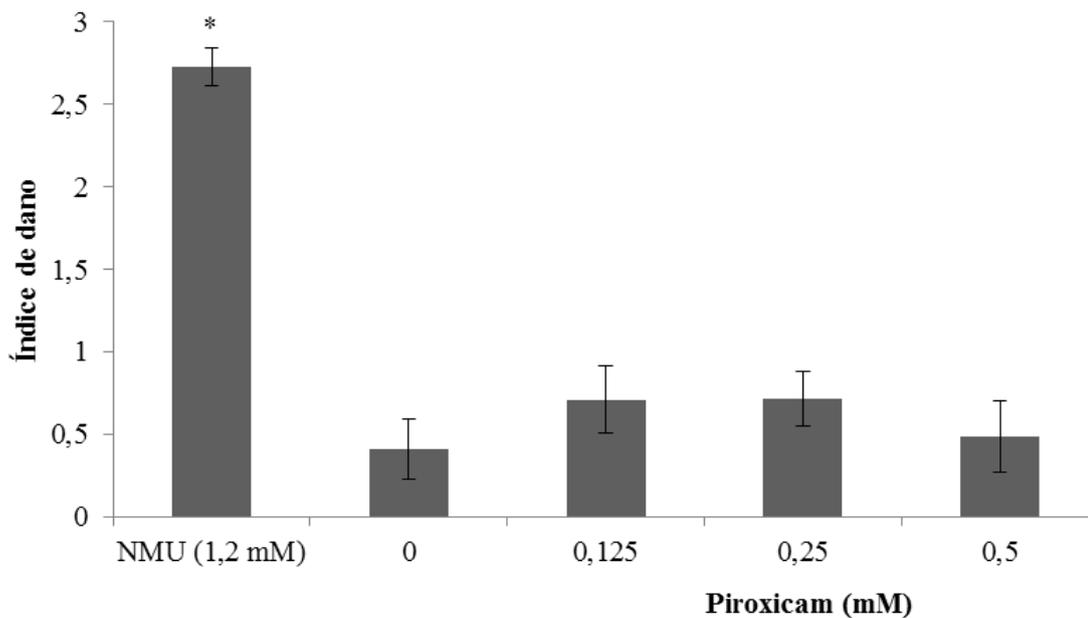
Legenda: 300 células foram analisadas por grupo. A significância foi de * $p < 0,01$ em relação ao controle negativo e ** $p < 0,05$ em relação ao controle negativo, pelo ANOVA com pós-teste de Tukey. Para os testes que não atendem a premissa de normalidade, a significância foi de # $p < 0,05$ em relação ao controle negativo, pelo teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

4.3 ENSAIO DO COMETA (VERSÃO ALCALINA)

Os resultados do ensaio cometa mostraram que o Piroxicam não induziu danos ao DNA. Os índices de dano (ID) ao DNA observados ($0,71 \pm 0,20$, $0,71 \pm 0,16$ e $0,48$

$\pm 0,21$ para as concentrações de 0,125 mM, 0,25 mM e 0,5 mM, respectivamente) não diferiram de forma significativa do ID observado no controle negativo ($0,41 \pm 0,18$). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o ID do NMU ($2,72 \pm 0,11$) e o ID do controle negativo ($0,41 \pm 0,18$), como observado na Figura 9.

Figura 9 - Índice de dano (ID) ao DNA observado pelo ensaio cometa em linhagem VERO tratada com Piroxicam.



Legenda: índice de dano ao DNA após 3h de tratamento com Piroxicam. Média de 4 experimentos.
* $p < 0,05$ (ANOVA) em relação ao controle negativo.

5 DISCUSSÃO

Os AINEs estão entre os agentes farmacológicos mais utilizados na prática médica atual e correspondem a 30% das vendas de medicamentos no mundo (LITALIEN & JACQZ-AIGRAIN, 2001; KUMMER & COELHO, 2002). O Piroxicam, introduzido em 1980 como AINE (WESSLING *et al.*, 1990), pertence farmacologicamente a classe oxicam e é indicado para tratar diversos males como artrite reumatoide, dismenorreia primária, endometriose, entre outros (SANTOS *et al.*, 2011). E, apesar do Piroxicam, assim como outros AINEs, ocasionar problemas gastrointestinais como ulceração, perfuração do estômago e intestino (SHOHIN *et al.*, 2013; FDA, 2016), Hobbs (1986) e Rugstad e colaboradores (1986) sugerem que não existe correlação entre as concentrações plasmáticas de Piroxicam e eventos adversos.

Suas propriedades anti-inflamatórias são bem conhecidas e estão relacionadas a sua capacidade não seletiva de inibição reversível das COXs. Além disto, Haynes e colaboradores (1990) alegam que o Piroxicam e outros AINEs podem estimular ou modular funções imunitárias que exijam linfoproliferação através da supressão da formação de PGE₂. No entanto, sabe-se pouco a respeito de seu comportamento, no que tange a citotoxicidade e genotoxicidade. São escassos dados a respeito dos possíveis efeitos genotóxicos do Piroxicam em células de mamíferos não neoplásicas. Esses efeitos podem ser monitorados para a prevenção e controle de algumas reações adversas e efeitos colaterais importantes. Todas estas questões suscitaram o desenvolvimento do presente trabalho.

A primeira etapa do presente estudo consistiu em avaliar, pelo ensaio MTT, a viabilidade de células VERO tratados com Piroxicam. Os resultados mostraram uma inibição significativa da viabilidade celular em concentrações elevadas do medicamento (Figura 7). Tais dados corroboram resultados prévios da literatura para outros modelos experimentais (HANIF *et al.*, 1996; SHIFF *et al.*, 1996; DING *et al.*, 2003; ALKAN *et al.*, 2012). No entanto, a maioria dos trabalhos de citotoxicidade/viabilidade celular realizados com o Piroxicam verificaram seus efeitos em células neoplásicas. Por exemplo, Royals e colaboradores (2005) relataram que o Piroxicam e o Deracoxib diminuíram significativamente a proliferação de células de osteossarcoma canina altamente metastática. Alkan e colaboradores (2012)

demonstraram que o tratamento combinado de Piroxicam e Deracoxib induziu uma inibição nas células de tumor mamário canino (CMT-U27) significativamente maior do que a estimulada por qualquer destes agentes sozinhos. Knottenbelt e colaboradores (2006) observaram que o Piroxicam inibiu a proliferação celular do carcinoma mamário canino *in vitro*.

Vale ressaltar que outros AINEs também mostraram efeitos semelhantes aos induzidos pelo Piroxicam no presente estudo. Por exemplo, Chiu, Tong & Ooi (2005) relataram que o celocoxib e a indometacina reduziram a viabilidade do melanoma da pele humana A-375. Também são relatados efeitos citotóxicos induzidos pelo Cetoprofeno em linhagem VERO por meio do ensaio com corante MTT (HAMDANI *et al.*, 2013).

A ação antiproliferativa dos AINEs tem sido relacionada com dois principais mecanismos, a indução de apoptose e a interferência no ciclo celular em diferentes tipos de células (HANIF *et al.*, 1996; SHIFF *et al.*, 1996; DING *et al.*, 2003; ALKAN *et al.*, 2012). DING e colaboradores (2003) sugerem que o Piroxicam inibe o crescimento de células orais humanas normais, pré-malignas e malignas, sendo um inibidor altamente seletivo do crescimento de células pré-malignas e malignas. Os autores relatam que este fato ocorre através da inibição de vias de sinalização que regulam a progressão das células na fase S do ciclo celular, concomitante a uma redução acentuada nos níveis de ciclinas, PCNA, cdc2 e proteínas AP-1.

O Piroxicam, nas concentrações de 500 e 1000 μM , também inibiu o ciclo de células de tumor mamário canino (CMT-U27), indicando que o bloqueio do ciclo celular (efeito citostático) é um dos principais mecanismos responsáveis pela ação antiproliferativa deste AINE (ALKAN *et al.*, 2012). Efeitos antiproliferativos induzidos pelo Piroxicam e pelo Sulindac também foram relatados por Hanif e colaboradores (1996) em células de câncer de cólon HCT-15. Por fim, Shiff e colaboradores (1996) ao avaliarem os efeitos da Aspirina, Indometacina, Naproxeno e Piroxicam em células de adenocarcinoma do cólon HT-29 observaram a inibição da proliferação, bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 e indução de apoptose nas mesmas. Todos estes efeitos causam um impacto na proliferação celular, o que se reflete em uma diminuição da viabilidade celular.

O ensaio MTT, apesar de extensivamente utilizado como medida de viabilidade celular, não permite determinar de maneira precisa qual o mecanismo anti-proliferativo as células estão sofrendo. Como citado anteriormente, o Piroxicam parece exercer um claro efeito citostático em células em cultura, principalmente quando se trata de células neoplásicas. No entanto, uma vez que não realizamos estudos para avaliar a cinética do ciclo celular, não podemos afirmar que este mecanismo esteja também ocorrendo em nossas condições experimentais. Por outro lado, o efeito citotóxico observado por um aumento significativo de células apoptóticas e necróticas após tratamento com Piroxicam foi marcante em nossos resultados (Figura 8).

A indução de apoptose pode ser realizada por vários mecanismos, entre eles, as vias apoptóticas extrínseca e intrínseca. Nesse contexto, Kim e colaboradores (2012) relataram que o Piroxicam induz apoptose em células HEPG2 pela via extrínseca, sendo tal via mediada por rTNF (fatores de necrose tumoral), caspase 8 e caspase 3. Por meio desta via, a apoptose é desencadeada por ligantes específicos que interagem com receptores de membrana rTNF, ativando a cascata das caspases (BUDIARDJO et al., 1999) e sinalizando para a apoptose.

Outros estudos apontam que o Piroxicam também induz apoptose pela via intrínseca. Por exemplo, Saini & Sanyal (2015) estudaram o papel das proteínas reguladoras do ciclo celular e fator de transcrição NFkB pró-inflamatório utilizando Piroxicam e C-ficocianina em células neoplásicas de cólon de rato transformadas por dicloridrato de 1,2-dimetil-hidrazina (DMH). Os autores observaram que ambas as drogas induzem apoptose mediada por ativação de p53. Piroxicam e C-ficocianina também estimularam antiproliferação, restringindo a expressão de PCNA e reduzindo a sobrevivência da célula via inibição da proteína nuclear kappa B (NFkB) por inativação do domínio de ativação transcricional proveniente da subunidade p65.

No presente trabalho, a morte celular do tipo necrose também foi induzida pelo Piroxicam, mas em pequenas quantidades, estando abaixo de 5%, como observado na Figura 8. Taxas pequenas de necrose também foram encontradas por outros autores. Alkan e colaboradores (2012) observaram que o Piroxicam induziu necrose em níveis menores do que 8% em células de tumor mamário canino (CMT-U27). Chang e colaboradores (2006) observaram a indução de necrose por Piroxicam em culturas de condrócitos epifisário-articulares de ratos fetais e essa indução foi de

6,07% na concentração de 10^{-5} M e 7,54% na concentração de 10^{-4} M. Apesar de significativos, os resultados de Chang e colaboradores (2006) foram menores do que 8%, corroborando Alkan e colaboradores (2012) e os achados do presente estudo. O panorama global observado na literatura a respeito da citotoxicidade do Piroxicam mostra que este AINE induz apoptose mais expressivamente do que necrose e a necrose, quando induzida, ocorre sempre em baixos níveis.

Em relação aos resultados obtidos pelo ensaio cometa, observou-se que o Piroxicam não induziu dano ao DNA de células VERO (Figura 9), nas condições testadas. Não existem na literatura trabalhos em que os efeitos genotóxicos do Piroxicam tenham sido avaliados com ferramentas mais modernas utilizadas em estudos de genética toxicológica, tais como o teste do cometa e do micronúcleo. Os únicos dados de genotoxicidade deste AINE estão descritos em pouquíssimos trabalhos e foram obtidos através de técnicas básicas de análise cromossômica. No entanto, de maneira geral, tais trabalhos corroboram os achados de cometa do presente estudo. Por exemplo, no trabalho de Kullich & Klein (1986), os autores observaram que o Piroxicam não aumentou significativamente a frequência de troca de cromátides irmãs em linfócitos humanos de sangue periférico de pacientes em tratamento com esta droga por um período de 14 dias a 20 mg/dia.

Resultados similares foram observados por Kullich, Hermann & Klein (1990). Tais autores observaram que linfócitos *in vitro* tratados com doses terapêuticas de Lornoxicam, Tenoxicam e Piroxicam não apresentaram um aumento das frequências de trocas entre cromátides-irmãs. Já com a adição de mitomicina C às culturas (um método que simula uma tensão genotóxica adicional), as taxas de trocas entre cromátides-irmãs elevaram-se significativamente na presença de oxicams em relação aos controles sem um oxicam. Os autores relatam ainda que em um tratamento *in vivo* por 14 dias com Tenoxicam e Lornoxicam mudou as taxas de trocas entre cromátides-irmãs espontâneas, mas o Piroxicam não o fez.

Por fim, Dkhil e colaboradores (2011) relataram achados que divergem dos resultados de genotoxicidade do presente trabalho e também dos da literatura. Tais autores investigaram alterações citogenéticas em células da medula óssea de ratos albinos machos tratados com injeção intraperitoneal de Piroxicam e observaram que, em todos os períodos de tratamento, o número de células com quebras de cromátides

e com alterações estruturais totais aumentaram para níveis estatisticamente significativos. No entanto, não ocorreram alterações significativas nos índices mitóticos. Os autores alegam que seus resultados discrepantes da literatura se devem, provavelmente, ao fato de que alterações cromossômicas têm mecanismos de indução diferentes dos mecanismos de indução de trocas entre cromátides-irmãs.

Os resultados de genotoxicidade do Piroxicam indicam que este AINE parece apresentar tanto efeitos genotóxicos, quanto efeitos não-genotóxicos, com predominância deste último. No entanto, a literatura demonstra que além destes comportamentos, o Piroxicam pode ainda apresentar efeitos antígenotóxicos. Weitberg (1988) demonstrou que o Piroxicam protege células de ovário de hamster chinês (CHO) dos efeitos genotóxicos induzidos por estresse oxidativo, também utilizando o teste de troca entre cromátides-irmãs. Segundo os autores, o estresse oxidativo induz peroxidação lipídica disparando a cascata do ácido araquidônico. Produtos do metabolismo do ácido araquidônico são, por sua vez, clastogênicos. Assim, o Piroxicam, ao inibir as ciclooxigenases e, conseqüentemente, a oxidação do ácido araquidônico, protegeria as células de dano ao seu DNA.

Um estudo que reforça a possibilidade deste mecanismo de proteção contra estresse oxidativo é o de Baudrimont e colaboradores (1997). Estes autores observaram que a Ocratoxina A (OTA) (uma micotoxina produzida por *Aspergillus ochraceus*) pode ser ativada pela via de síntese de prostaglandinas e, assim, produzir espécies reativas de oxigênio que levariam a peroxidação lipídica de membranas em células VERO. O tratamento prévio com Piroxicam impediu a ativação de OTA e a conseqüente peroxidação lipídica induzida por esta micotoxina. A hipótese de que o Piroxicam apresenta efeitos antígenotóxicos precisa ser avaliada em nossas condições experimentais.

De modo geral, observou-se que o Piroxicam diminui a viabilidade celular de forma dependente de concentração e este fator relaciona-se com a indução predominantemente de apoptose. Já a necrose também foi induzida, mas em pequena quantidade. Logo, o Piroxicam foi citotóxico nas condições testadas, mas não genotóxico, pois não induziu danos no DNA de células VERO, quando avaliado pelo ensaio cometa.

6 CONCLUSÕES

- Nas condições testadas, observou-se que o Piroxicam diminui a viabilidade de células VERO;
- O Piroxicam induziu morte apoptótica e necrótica em linhagem VERO, porém com predominância da primeira;
- O Piroxicam, apesar de ter demonstrado um claro efeito citotóxico em células VERO, não foi genotóxico, pois não induziu danos no DNA, quando avaliado pelo ensaio cometa.

7 REFERÊNCIAS

- ALKAN, F. U.; USTUNER, O.; BAKIREL, T; ÇINAR, S.; ERTEN, G.; DENIZ, G. The Effects of Piroxicam and Deracoxib on Canine Mammary Tumour Cell Line. **The Scientific World Journal**. p. 1-8, 2012.
- 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.
- ALVES, P. M. M.; CARRONDO, M. J. T.; CRUZ, P. E. Introdução à tecnologia de cultivo de células animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (eds.). **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. São Paulo: Roca, p. 2-14. 2008.
- 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.
- AUGUSTO, E. F. P.; OLIVEIRA, M. S. Processos com células animais. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDEL, W. Coord. **Biotecnologia industrial**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, p.547-69. 2001.
- 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.
- BAGATINI, P.; MALUF, S. W. Ensaio Cometa. In: MALUF, S. W. **Citogenética Humana**. 1ª edição. Porto Alegre: Artmed, p.194-201. 2011.
- BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Rev Bras Otorrinolaringol**. 72(3):400-6. 2006.
- BALDRICK, P.; BAMFORD, D. G. A toxicological review of lactose to support clinical administration by inhalation. **Food Chem Toxicol**. 35(7):719-33. 1997.

BAUDRIMONT, I.; AHOUANDJIVO, R.; CREPPY, E.E. Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in Vero cells in culture by several agentes. **Chemico-Biological Interactions**. 1997.

BITIREN, M.; MUSA, D.; OZGONUL, A.; OZASLAN, M.; KOCYIGIT, A.; SOGUT, O.; GULDUR, M. E.; KILIC, I. H.; KARAKILCIK, A. Z.; ZERIN, M. Protective Effects of Green tea (*Camelia sinensis*), *Hypericum perforatum* and *Urtica dioica* on Hepatic Injury and Lymphocyte DNA Damage Induced by Carbon Tetrachloride in Wistar Rats. **International Journal of Pharmacology**, 6: 241-248. 2010.

BOHM, I.; SCHILD, H. Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. **Mol Imaging Biol**. 5(1):2-14.2003.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 245-254, 2005.

BRENOL, J. C. T; XAVIER, R. M.; MARASCA, J. Antiinflamatórios não hormonais convencionais. **Rev Bras Med**; 57:33-40. 2000.

BUDIHARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X. WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol**. 1999.

BURKE A.; SMYTH E.; FITGERALD, G. A. Analgesic-Antipyretic and Antiinflammatory Agents; Pharmacotherapy of Gout, IN: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, McGraw-Hill 11th ed N York, p 671. 2005.

BURRILL, W., LEVINE, E. L.; HINDOCHA, P.; ROBERTS, S. A.; SCOTT, D. The use of cryopreserved lymphocytes in assessing inter-individual radiosensitivity with the micronucleus assay. **Int J Radiat Biol**. 76(3):375-82. 2000.

CANNON, G. W.; BREEDVELD, F. C. Efficacy of cyclooxygenase-2 specific inhibitors. **Am. J. Med**. 110:6s-12s. 2001.

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.

CENNI, E.; GRANCHI, D.; CIAPETTI, G.; VERRI, E.; CAVEDAGNA, D.; GAMBERINI, S.; DI LEO, A.; PIZZOFERRATO, A. Cytokine production and adhesive protein expression by endothelial cells after contact with polyethylene terephthalate. **Biomaterials**.17(21):2071-6. 1996.

CHAHADE, W. H.; GIORGI, R. D. N.; SZAJUBOK, J. C. M. Anti-inflamatórios não hormonais. **Einstein**; 6 (Supl 1): S166-S74. 2008.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, R. **Bioquímica Ilustrada**. Tradução: Carla Dalmaz et al. 3º ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

CHAN, C. C.; BOYCE, S.; BRIDEAU, C.; CHARLESON, S.; CROMLISH, W.; ETHIER, D.; EVANS, J.; FORD-HUTCHISON, A. W.; GAUTHIER, J. Y.; GORDON, R.; GRESSER, M.; GUAY, J.; KARGMAN, S.; KENNEDY, B.; LEBLANC, Y.; LEGER, S.; MANCINI, J.; O'NEILL, G. P.; OUELLET, M.; PATRICK, D.; PERCIVAL, M. D.; PERRIER, H.; PRASIT, P.; RODGER, I.; et al. Rofecoxib [VIOXX, MK-0966,4-(4-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]: a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor-pharmacological and biochemical profiles. **J Pharmacol Exp. Ther.** 290:551-560. 1999.

CHANG, J. K.; WU, S. C.; WANG, G.J.; CHO, M. H.; HO, M. L. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cell proliferation and death in cultured epiphyseal-articular chondrocytes of fetal rats. **Toxicology**. p. 111–123. 2006.

CHEER, S. M.; GOA, K. L. Parecoxib (parecoxib sodium). **Drugs**. 61:1133-1141. 2001.

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.

COHEN, G. M., Sun, X. M.; Snowden, R. T.; Dinsdale, D.; Skilleter, D. N. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. **Biochem. J.**, London, v.286, p.331- 334, 1992.

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.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, 89: 271-277. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division).1986.

DING, H.; HAN, C.; GIBSON-D'AMBROSIO, R.; STEELE, V. E.; D'AMBROSIO, S. M. Piroxicam selectively inhibits the growth of premalignant and malignant human oral cell lines by limiting their progression through the S phase and reducing the levels of cyclins and AP-1. **International Journal of Cancer**, vol. 107, no. 5, pp. 830–836, 2003.

DKHIL, M. A.; TOHAMY, A.; GABRY, M. S. Chromosomal aberrations induced in bone marrow cells of mice due to the administration of the nonsteroidal anti-inflammatory drug, Piroxicam. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. vol. 5(1), p. 98-103. 2011.

DUBOIS, R.; ABRAMSON, S.; CROFFORD, L. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **Faseb J.**, 12: 1063-1088. 1998.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A. R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 191-205. 2008.

EBADA, S. S.; EDRADA, R. A.; LIN, W.; PROKSCH, P. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. **Nature Protocols**. v.3, n.12, p. 1820-1831. 2008.

EHRENBERG, L. The relation of cancer induction and genetic damage. In: Evaluation of Genetic Risks of Environmental Chemicals. **Royal Swedish Academy of Sciences**. 1973.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The Comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FDA, Piroxicam official information, side effects and uses. Disponível em: <<http://www.drugs.com/pro/piroxicam.html>> Acessado em: 27/01/2016.

FENECH, M.; Crott, J.; Turner, J.; Brown, S. Necrosis, apoptosis, cytoxicity and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis block-micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, vol. 14, n. 6, p.605- 612, 1999.

FERREIRA, C. M. Análises complementares obtidas a partir de testes de toxicidade aquática. In: RIZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. (eds) **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo, 273-284. 2004.

FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **SCIENCE**. Vol 294: 1871 - 1875. 2001.

GALLOWAY, S.; LORGE, E.; AARDEMA, M. J.; EASTMOND, D.; FELLOWS, M.; HEFLICH, R.; KIRKLAND, D.; LEVY, D. D.; LYNCH, A. M.; 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.

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.

GUIMARÃES, A.P.A.; DIAS, F.L.; CARDOSO, R.S.; KRONKA, S.N. & SAKAMOTOHOJO, E.T. Chromosomal 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.

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. v. 8 (14), p. 386-391. **Academic Journals**. 2013.

HANIF, R.; PITTAS, A.; FENG, Y.; KOUTSOS, M. I.; QIAO, L.; STIANO-COICO, L.; SHIFF, S. I.; RIGGS, B. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. **Biochem. Pharmacol.**, 52, 237-245. 1996.

HARRIS, C. J.; BRATER, D. C. Renal effects of cyclooxygenase 2 selective inhibitors. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.** p. 603-610. 2001.

HAYNES, D. R.; WRIGHT, P. F.; WHITEHOUSE, M. W.; VERNON-ROBERLS, B. The cyclo-oxygenase inhibitor, Piroxicam, enhances cytokine-induced lymphocyte proliferation in vitro and in vivo. **Immunol. Cell Bioi.** 68, 225-230. 1990.

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

HEPPS, K. S.; MALIHA, G. M.; ESTRADA, R.; GOODGAME, R. W. Severe cholestatic jaundice associated with piroxicam. **Gastroenterology.** 101(6):1737-40. 1991.

HEYNEN, M. D. G.TOLERATION AND SAFETY OF PIROXICAM. IN: **Acta Reumatológica Portuguesa.** Vol. XII - tomo 2 (Suplem.). Nº 43: p.43-51,1987.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria.** Sociedade Brasileira de Pediatria. 2006.

HOBBS, D.C. Piroxicam pharmacokinetics: Recent clinical results relating kinetics and plasma levels to age, sex, and adverse effects. **Am. J. Med.** 81 (Suppl. 5B), 22-28. 1986.

HUGGET, A.C.; SCHILTER, B.; ROBERFROID, M.; ANTIGNAC, E.; KOEMAN, J. H. Comparative methods of toxicity testing. **Food. Chem. Toxic.** 34: 183-92, 1996.

INTERNATIONAL LABOUR ORGANIZATION - International Chemical Safety Cards (ICSC) are data sheets intended to provide essential safety and health information on chemicals in a clear and concise way. Peer-Review Status: 17.10.2001 Validated. Disponível em: http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=1403. Acessado em junho, 2016.

INTERNATIONAL STANDARD. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. [Authority: The European Union Per Directive 90/385/EEC]. ISO 10993-5, 2009.

JAIN, K. K. Evaluation of intravenous parecoxib for the relief of acute post-surgical pain. **Expert Opin Investig Drugs.** 9:2717-2723. 2000.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 8. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1054p. 2003.

KEEPERS, Y. P.; PIZAO, P. E.; PETERS, G. J.; ARK-OTTE, J.; WINOGRAD, B.; PINEDO, H. M. Comparison of the Sulforhodamine B Protein and Tetrazolium (MTT) Assay for in vitro Chemosensitivity Testing. **Eur. J. Cancer**. v. 27, n. 7, p. 897-900. 1991.

KIM, J. AH; HAN, E.; EUN, C. J.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Real-time concurrent monitoring of apoptosis, cytosolic calcium, and mitochondria permeability transition for hypermulticolor high-content screening of drug-induced mitochondrial dysfunction-mediated hepatotoxicity. **Toxicology Letters**. 2012.

KNOTTENBELT, C.; CHAMBERS, G.; GAULT, E.; ARGYLE, D. J. The in vitro effects of piroxicam and meloxicam on canine cell lines. **Journal of Small Animal Practice**, vol. 47, no. 1, pp. 14– 20, 2006.

KULLICH, W.; HERMANN, J.; KLEIN, G. Cytogenetic studies of human lymphocytes under the influence of oxicams. **Z. Rheumatol**. 77-81. 1990.

KULLICH, W.; KLEIN, G. Investigations of the influence of nonsteroidal antirheumatic drugs on the sister-chromatid exchange. **Mutat. Res.**, 174, 131-134. 1986.

KUMMER, C. L. COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Rev. Bras. Anesthesiol**. 52: 4: 498 -512. 2002.

LEE, A.; COOPER, M. G.; CRAIG, J. C. et al. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on post-operative renal function in adults. **Cochrane Database Syst. Rev**. 2000.

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

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.

LOTZE, M. T.; THOMSON, A. W. **Measuring Immunity: Basic Science and Clinical Practice**. 1ª ed. Elsevier Science. London: p. 344-346, 2005.

LOVELL, D. P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 171-182. 2008.

MALUF, S. W., ERDTMANN, B. Biomonitoração do dano genético em humanos. In: SILVA, J. D. A.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.) **Genética toxicológica**, p. 183-205, 2003.

MARTÍNEZ, C.; BLANCO, G.; GARCÍA-MARTÍN, E.; AGÚNDEZ, J. A. G. Farmacogenómica clínica de CYP2C8 y CYP2C9: Conceptos generales y aplicación al uso de AINE. **FARM. HOSP**. Vol. 30. N.º 4, pp. 240-248, 2006.

MICHELIN, A. F.; FERREIRA, A. A. P.; BITAR, V. G.; LOPES, L. C. Toxicidade renal de inibidores seletivos da ciclooxigenase-2: celecoxib e rofecoxib. **Rev. Cienc. Méd.** 2016.

MORTELMANS, K.; HAWORTH, S.; LAWLOR, T.; SPECK, W.; TAINER, B.; ZEIGER, E. Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals. **Environ Mutagen**. 8 Suppl 7:1-119. 1986.

MOSMANN, T. C. Rapid colorimetry assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**. V. 65, n. 1-2, p. 55-63. 1983.

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.

NAGATA, S. Fas-mediated apoptosis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v. 406, p.119-124, 1996.

NAPKE, E. A commitment to pharmacovigilance: 40 years on Ed Napke reflects on his life in pharmacovigilance. *Uppsala Rep.*, April, suppl. 25, p.1-15, 2004.

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

OLIVE, P. L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiat. Res.**, v. 117, p. 79-92, 1989.

OLIVEIRA JÚNIOR JO, SERRANO SC, TEODORO AL, DANA BA. Os antiinflamatórios não hormonais. **Prática Hospitalar**, 9(51):173-8. 2007.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks (draft version). Geneva: WHO; maio, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/cells/Cell_Substrates_for_public_consultation_HK_4_May2.pdf>. Acesso em 12/12/2015.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals (requirements for biological substances nº 50). Geneva: WHO Technical Report Series, nº 878; 1998. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/cells/WHO_TRS_878_A1Animalcells.pdf>. Acesso em 12/12/2015.

OSHA- Occupational Chemical Database contains over 800 entries with information such as physical properties, exposure guidelines. Disponível em: <http://www.osha.gov/chemicaldata/chemResult.html?RecNo=734>. Acessado em junho, 2016.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 123, p. 291-298. 1984.

PIFFERI, G.; RESTANI, P. The safety of pharmaceutical excipients. **Farmaco**. 58(8):541-50. 2003.

PULGARÍN, J. A. M.; MOLINA, A. A.; BORAS, N. Determination of piroxicam in pharmaceutical preparations by continuousflow chemiluminescence. *Anal. Methods*, 2, 76–81. **The Royal Society of Chemistry**. 2010.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6ª edição. Editora Elsevier. 2007.

RANGANATH, R. M. NAGASHREE, N. R. Role of programmed cell death in development. **Int. Rev. Cytol.** 2001.

RIBEIRO, R.; SALVADOR, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental.** Canoas Ed. ULBRA. 2003.

RINA, T.; PANKAJ, T.; PANCHOLI, S. S. Genotoxicity Studies of Diclofenac Sodium in the Bone Marrow and Germ cells of Laboratory Mice. **Austin J. Pharmacol Ther.** 2 (10).1054. 2014.

RODRIGUEZ, L. A.; HERNANDEZ-DIAZ S. Relative risk of upper gastrointestinal complications among users of acetaminophen and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Epidemiology.** 12(5): 570– 576. 2001.

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.

RUGSTAD, H. E.; HUNDAL, O.; HOLME, I.; HERLAND, O. B.; HUSBY, G.; GIERCKSKY, K. E. Piroxicam and naproxen plasma concentrations in patients with osteoarthritis: Relation to age, sex, efficacy and adverse events. **Clin. Rheumatol.** 389-398. 1986.

SAINI, M. K.; SANYAL, S. N. Cell cycle regulation and apoptotic cell death in experimental colon carcinogenesis: intervening with cyclooxygenase-2 inhibitors. **Nutr. Cancer.** 620-36. 2015.

SALMENA, L.; LEMMERS, B.; HAKEM, A.; MATYSIAK-ZABLOCKI, E.; MURAKAMI, K.; AU, P. Y.; BERRY, D. M.; TAMBLYN, L.; SHEHABELDIN, A.; MIGON, E.; *et al.* Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. **Genes Dev.** 17:883–895. 2003.

SANTOS, H. C. O.; TACON, K. C. B.; CUNHA, L. C.; CASTRO, E. C.; AMARAL, W. N. Efeito analgésico do piroxicam para tratamento de dor aguda induzida. **Rev. Bras. Clin. Med.** São Paulo: 9 (2):117-20. 2011.

SARGENT, J. M. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples. **Recent Results Cancer Res.** v. 161, p. 13-25. 2003.

SHIBAMOTO, Y.; STREFFER, C.; FUHRMANN, C.; BUDACH, V. Tumour radiosensitivity prediction by the cytokinesis-block micronucleus assay, **Radiat. Res.** 128, 293–300. 1991.

SHIFF, S. L.; KOUTSOSI, M. L.; QIAO, L.; RIGAS, B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: Effects on cell cycle and apoptosis. **Exp. Cell Res.**, 222, 179-188. 1996.

SHOHIN, I. E.; KULINICH, J. I.; RAMENSKAYA, G. V.; ABRAHAMSSON, B.; KOPP, S.; LANGGUTH, P.; POLLI, J. E.; SHAH, V. P.; GROOT, D. W.; BARENDS, D. M.; DRESSMAN, J. B. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Piroxicam. **Journal of Pharmaceutical Sciences.** V. 103. P. 367-377. 2013.

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.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annu. Rev. Biochem.** 69, 145-82. 2000.

TICE, R. R. The single cell gel Comet assay: a micro gel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: **Environmental Molecular Mutagenesis**, Philips, D. H. & S. Vennit (Eds), Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, U. K., p. 315-339. 1995.

TONAZIO, L.; VILELA, M. M. P.; DE JESUS, R. R.; PINTO, M. A. O.; AMARAL, M. P. H. Reações adversas dos adjuvantes farmacêuticos presentes em medicamentos para uso pediátrico. **HU Revista.** 37(1):63-8. 2011.

URSINO, M. G.; POLUZZI, E.; CARAMELLA, C.; PONTI, F. D. Excipients in medicinal products used in gastroenterology as a possible cause of side effects. **Regul Toxicol Pharmacol.** 60(1):93-105. 2011.

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

WALKER, N. I.; HARMON, B. V.; GOBE, G. C.; KERR, J. F. Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.* V. 54, p. 13 - 18. 1988.

WEITBERG, A. B. Effects of arachidonic acid and inhibitors of arachidonic acid metabolism on phagocyte-induced sister chromatid exchanges. *Clin. Genet.*, 34, 288-292. 1988.

WESSLING, A., BOETHIUS, G. & SJOQVIST, F. Prescription monitoring of drug dosages in the county of Jamtland and Sweden as a whole in 1976, 1982 and 1985. *Eur. J. clin. Pharmacol.*, 38, 329-334. 1990.

WHELTON, A. Renal aspects of treatment with conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs versus cyclooxygenase-2 specific inhibitors. *Am. J. Med.* 110:33s-42s. 2001.

WHITEHOUSE, M. W. A Biochemical Distinction Between Non-Steroid Anti-inflammatory and Analgesic Drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 15, 556-557. 1963. In: BUER, Jonas Kure. Origins and impact of the term 'NSAID'. *Inflammopharmacology*, v. 22, n. 5, p. 263-267, 2014.

WOOLF, A. D.; ROGERS, H. J.; BRADBROOK, I. D.; CORLESS, D. Pharmacokinetic observations on piroxicam in young adult, middle-aged and elderly patients. *Br. J. Clin. Pharm.* 16:433-37. 1983.

ZAJAC, M.; PAWEŁCZYK, E.; **Chemia leków**. PZWL, Warszawa. 2000.

ZEJC, A.; GORCZYCA M. **Chemia leków**. PZWL, Warszawa, 2002.

ZHAO, J.; LEEMANN, T.; DAYER, P. In vitro oxidation of oxicam NSAIDS by a human liver cytochrome P450. *Life Sci.* 51: 575-81. 1992.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 2004