



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do potencial mutagênico e recombinogênico do  
Pantoprazol<sup>®</sup> em células somáticas de *Drosophila  
melanogaster*.**

**Aluno:** Jeyson Césary Lopes

**UBERLÂNDIA - MG**

**2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do potencial mutagênico e recombinogênico do Pantoprazol<sup>®</sup>  
em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.**

**Aluno:** Jeyson Césary Lopes

**Orientador:** Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Uberlândia  
como parte dos requisitos para  
obtenção do Título de Mestre em  
Genética e Bioquímica (Área: Genética)

**UBERLÂNDIA - MG**

**2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

L864a    Lopes, Jeyson Césary, 1987-  
2012      Análise dos efeitos genotóxicos do Pantoprazol® sobre células  
somáticas de *Drosophila melanogaster* / Jeyson Césary Lopes. --  
2012.  
60 f. : il.

Orientador: Júlio César Nepomuceno.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Mutagênese - Teses. 3. *Drosophila melanogaster* - Teses. 4. Câncer - Aspectos genéticos - Teses. 5. Pantoprazol - Teses. I. Nepomuceno, Júlio César. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575

---

PALAVRAS CHAVE DO TRABALHO: Pantoprazol. SMART. Genotóxico.  
*Drosophila melanogaster*.

**Avaliação do potencial mutagênico e recombinogênico do Pantoprazol<sup>®</sup>  
em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.**

**ALUNO:** Jeyson Césary Lopes

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

**Examinadores:** Prof. Dr. Mário Antônio Spanó - UFU

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula de Melo Loureiro - USP

**Data da Defesa:** 30 / 07 / 2012

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

---

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Contudo, seja qual for o grau a que chegamos, o que importa é prosseguir decididamente. (Fil 3, 14).

Dedico este trabalho aos meus pais **Paulo Celso Lopes** e **Rosângela Aparecida Lopes** por todo o carinho, apoio, confiança e estímulo. A vocês meu eterno amor e carinho.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço, primeiramente, a **Deus**, por me dar coragem e determinação para lutar pelos meus sonhos, perseverança para superar os obstáculos, por me guiar sempre pelos melhores caminhos e por me cercar de tantas pessoas maravilhosas.

Aos meus pais, **Paulo** e **Rosângela**, pela dedicação em me proporcionar uma vida feliz, confortável e permeada de sucessos. Obrigado por fazerem de meus sonhos os sonhos de vocês, por acreditarem tanto em mim e me incentivarem a caminhar sempre, pelo carinho e amor... Sem vocês eu nada seria!

Aos meus irmãos, **Marcos Paulo**, **Láise** e **Tháise**, pelo seu incentivo, exemplo de determinação e dedicação. Obrigado por estar presente em todos os momentos de minha vida e por se fazer tão especial.

À minha namorada e amiga, **Lorena**, agradeço pelo apoio, companheirismo, compreensão pelos momentos de ausência e, sobretudo, pelo amor incondicional que me conforta e me dá forças para seguir em busca de meus sonhos. A sua alegria, presença e entusiasmo contribuíram muito para que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador **Júlio César Nepomuceno**, doutor também nas faculdades da vida, por todo o conhecimento passado, acessibilidade, pela confiança em minha capacidade e por ter sempre uma boa piada para aliviar o estresse do dia a dia.

Agradeço ainda aos meus colegas do LABCIM (Laboratório de Citogenética e Mutagênese): **Bethânia**, **Priscila**, **Rosiane Gomes**, **Paula**, **Adriana**, **Arabela**, **Nayane** e **Rosiane Soares**, pelo apoio, colaboração e amizade. Vocês tornaram cada dia de trabalho um acontecimento novo.

Aos **amigos** de velhos tempos, de tempos recentes e aos eternos, agradeço simplesmente por serem meus amigos e por compartilharem momentos importantes da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador, **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno**, por sua excelente orientação, que não se restringiu somente a essa dissertação. Sua atenção, sabedoria e dedicação foram fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigado por me acolher desde a Graduação e auxiliar de forma tão importante no meu crescimento profissional.

Aos membros da banca examinadora, **Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro** e **Prof. Dr. Mário Antônio Spanó**, pela disponibilidade para a leitura deste trabalho, bem como pelas relevantes sugestões.

Ao **Dr. Ulrich Graf** do Instituto de Toxicologia da Universidade de Zurich, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*.

Aos **professores** do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pelos valiosos ensinamentos e pela significativa contribuição em minha formação científica.

Aos **colegas de Mestrado**, agradeço pela convivência, pelas experiências trocadas, pelos trabalhos e momentos compartilhados. Sobretudo, a **Nayane Moreira Machado** e **Rosiane Soares Saturnino**, além de colegas de aula, grandes companheiras de república, obrigado por terem estado comigo nessa fase tão importante.

A **Todos do Laboratório de Citogenética e Mutagênese** do Centro Universitário de Patos de Minas, por fazerem com que o trabalho se realizasse em clima de companheirismo e amizade. Em especial, à **Nayane Moreira Machado**, por seu grande auxílio na condução da parte experimental deste trabalho e à **Bethânia Cristhine de Araújo**, pelo auxílio, incentivo e amizade de sempre. Tenho em você um grande exemplo!

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES** pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a **todos** que contribuíram para mais esta conquista.

## **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM – Patos de Minas, MG.

Com o apoio financeiro dos seguintes órgãos e instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG;
- Universidade Federal de Uberlândia – UFU;
- Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM.

## Lista de Abreviaturas

<b>AA</b> .....	Aminoácido.
<b>BH</b> .....	Balanceador heterozigoto.
<b>CYP450</b> .....	Citocromo P450.
<b>DNA</b> .....	Ácido Desoxirribonucléico.
<b>DRGE</b> .....	Doença do Refluxo Gastroesofágico.
<b>DXR</b> .....	Doxorrubicina.
<b>flr</b> .....	<i>flare</i> .
<b>H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> – ATPase</b> .....	Hidrogênio-Potássio Adenosina Trifosfatase
<b>HB</b> .....	High Bioactivation Cross.
<b>IARC</b> .....	International Agency for Research on Cancer.
<b>IBP</b> .....	Inibidores da Bomba de Prótons.
<b>MG</b> .....	Manchas Gêmeas
<b>MH</b> .....	Marcador trans-heterozigoto.
<b>MSG</b> .....	Manchas Simples Grandes.
<b>MSP</b> .....	Manchas Simples Pequenas.
<b>mwh</b> .....	<i>multiple wing hairs</i> .
<b>mg/mL</b> .....	Miligramas por mililitros
<b>mM</b> .....	Milimolar
<b>ORR</b> .....	oregon R.
<b>Panto</b> .....	Pantoprazol.
<b>Pgp</b> .....	P-glicoproteína.
<b>ROS</b> .....	Espécies Reativas de Oxigênio.
<b>SMART</b> .....	Somatic Mutation And Recombination Test.
<b>ST</b> .....	Standard Cross.
<b>TM</b> .....	Total de Manchas
<b>μM</b> .....	Micromolar

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de <i>Drosophila melanogaster</i> , do cruzamento padrão, tratados com diferentes concentrações de Pantoprazol.....	34
<b>Tabela 2</b> - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de <i>Drosophila melanogaster</i> , do cruzamento padrão, tratados com diferentes concentrações de Pantoprazol associadas com DXR (0,4mM).....	35
<b>Tabela 3</b> - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de <i>Drosophila melanogaster</i> , do cruzamento de alta bioativação, tratados com diferentes concentrações de Pantoprazol.....	36
<b>Tabela 4</b> - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de <i>Drosophila melanogaster</i> , do cruzamento de alta bioativação, tratados com diferentes concentrações de Pantoprazol associadas com DXR (0,4mM).....	37
<b>Tabela 5</b> - Frequência padronizada de indução de clones <i>mwh</i> por mg/mL de concentração de exposição e a prevalência de eventos recombinacionais.....	38

# Lista de Figuras

## Capítulo I

<b>Figura 1.</b>	Fórmulas estruturais dos IBPs.....	07
<b>Figura 2.</b>	Fórmula estrutural do Pantoprazol sódico.....	09
<b>Figura 3.</b>	Fórmula estrutural da Doxorubicina.....	13
<b>Figura 4.</b>	Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, dos pêlos da asa de <i>Drosophila melanogaster</i> , obtida no Laboratório de Citogenética e Mutagênese – Centro Universitário de Patos de Minas. Apresentação de pêlos múltiplos ( <i>mwh</i> ), seta maior, e apresentação de pêlos flare ( <i>flr<sup>3</sup></i> ), seta menor.....	16
<b>Figura 5.</b>	Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, dos pêlos da asa de <i>Drosophila melanogaster</i> , obtida no Laboratório de Citogenética e Mutagênese – Centro Universitário de Patos de Minas. Apresentação de descendentes marcador trans-heterozigoto (MH: <i>mwh</i> <i>+/+</i> <i>flr<sup>3</sup></i> ) letra <b>a</b> e balanceador heterozigoto (BH: <i>mwh</i> <i>+/+</i> <i>TM3</i> , <i>Bd<sup>6</sup></i> ) letra <b>b</b> .....	17

## SUMÁRIO GERAL

<b>Apresentação.....</b>	<b>01</b>
<b>Capítulo I</b>	
1. Fundamentação Teórica.....	03
1.1. Inibidores da Bomba de Prótons.....	03
1.2. Pantoprazol.....	06
1.3. Doxorubicina.....	09
1.4. Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em células de <i>Drosophila melanogaster</i> – Somatic Mutation And Recombination Test (SMART).....	11
2. Referências .....	15
<b>Capítulo II</b>	
Resumo.....	23
Abstract.....	24
1. Introdução.....	25
2. Material e Métodos.....	27
2.1. Compostos Químicos.....	27
2.2. Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em células de <i>Drosophila melanogaster</i> – Somatic Mutation And Recombination Test (SMART).....	27
2.2.1. Linhagens estoque, cruzamento e tratamento.....	27
2.2.2 Preparação e análise microscópica das asas.....	28
2.2.3 Análise estatística.....	29
3. Resultados e Discussão.....	29
4. Considerações Finais.....	39
5. Referências.....	40

## APRESENTAÇÃO

O estudo da Genética tem se tornado um importante campo de pesquisa para se obter informações sobre os processos patológicos das doenças bem como seus processos fisiológicos no organismo, principalmente buscando-se entender as mutações, estas alterações sutis que ocorrem progressivamente ao longo da cadeia de DNA sendo elas espontâneas ou mesmo induzidas.

Dentre as várias doenças causadas por mutações encontra-se o câncer, que pode se originar de maneira induzida por agentes químicos ou biológicos. Existem também substâncias tanto sintéticas quanto naturais que podem impedir ou até mesmo inibir o desenvolvimento de processos carcinogênicos, sendo uma importante área de estudo da Genética, que busca compreender os efeitos de tais substâncias ou mesmo identificá-las.

Dentre os fármacos alvos de estudos atualmente está o Pantoprazol (Fig1) (Panto) [5-(difluorometoxi)-2-[[[(3,4-dimetoxi-2-piridinil) metil] sulfinil]-1H-benzimidazol], que é um composto benzoimidazólico, semelhante aos antagonistas dos receptores  $H_2$  na sua estrutura, porém, apresenta mecanismo de ação completamente diferente, bloqueando a enzima Hidrogênio-Potássio Adenosina Trifosfatase. É um IBP que possui ação biológica e farmacológica diferenciada devido a sua afinidade de ligação única às bombas de prótons e a baixa velocidade de reversibilidade.

São vários os estudos que sugerem correlação entre o Pantoprazol e o câncer gástrico havendo muita contradição entre os vários estudiosos. Enquanto alguns afirmam que o Pantoprazol auxilia no desaparecimento dos tumores outros afirmam que eles aceleram o aparecimento de carcinomas. Estudos apontam que seu uso prolongado pode induzir hiperplasia das células gástricas, carcinóides gástricos, adenocarcinoma colorretal e pólipos gástricos. Ainda não se sabe se sua ação é atenuada ou potencializada na presença de quimioterápicos, porém são largamente usados por pacientes em quimioterapia.

Devido ao grande consumo do Pantoprazol pelos pacientes em quimioterapia e os poucos estudos relacionados à sua genotoxicidade e interação com quimioterápicos, é fundamental que seja avaliada a ação mutagênica e/ou carcinogênica associada à sua utilização.

Diante do exposto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de avaliar os possíveis efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos do Pantoprazol nas concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ , por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*.

O presente trabalho está estruturado do seguinte modo:

O Capítulo I traz a fundamentação teórica, abordando aspectos preliminares necessários para a compreensão do assunto. Inicia-se a temática com a discussão sobre os aspectos genéticos envolvidos com a gênese e progressão do câncer. Na sequência discute-se o uso e ação do Pantoprazol, Inibidor da Bomba de Prótons bastante utilizado no tratamento de patologias gástricas. Posteriormente, são relatados os mecanismos de ação do quimioterápico: Cloridrato de Doxorrubicina, uma droga comprovadamente mutagênica, utilizada como controle positivo na pesquisa. E, finalmente, o teste para detecção de mutação e recombinação somática em *D. melanogaster* (SMART) é apresentado.

O Capítulo II apresenta o manuscrito intitulado “Avaliação do potencial mutagênico e recombinogênico do Pantoprazol<sup>®</sup> em células somáticas de *Drosophila melanogaster*” que deverá ser enviado para publicação no periódico “Journal of Biosciences”.

---

---

# **CAPÍTULO I**

## **Fundamentação Teórica**

---

---

## **1. Fundamentação teórica.**

### **1.1. Genética, Câncer e Inibidores da Bomba de Prótons.**

O estudo da Genética tornou-se essencial para compreendermos a fisiopatogenia das doenças, fornecendo informações para a compreensão da constituição e função biológica do organismo (LOURO *et al.*, 2002). Ao longo de sua existência, as células humanas sofrem alterações sutis e progressivas na sequência de DNA, denominadas mutações, que podem estar associadas a erros de duplicação ou à exposição dessas células a uma série de agentes mutagênicos (OJOPI; DIAS NETO., 2004).

Mutação é o processo pelo qual os genes mudam de uma forma alélica para outra devido a deleções, inserções ou troca de bases. (GRIFFITHS *et al.*, 2002). São mudanças no material genético que fornecem a matéria-prima para a evolução e ocorrem em todos os genes de todos os organismos vivos. Estas mutações fornecem nova variabilidade genética que permite aos organismos se adaptarem às mudanças do meio ambiente, sendo muito importantes para o processo evolutivo (SNUSTAD; SIMMONS, 2006).

Para serem reconhecidas, as mutações devem resultar em alguma mudança fenotípica detectável. Estes efeitos podem variar desde alterações pequenas, que só são descobertas com técnicas de bioquímica e de genética especiais, até alterações grosseiras na morfologia cromossômica (SNUSTAD; SIMMONS., 2006).

Durante as três últimas décadas houve grande avanço no delineamento da biologia e patologia do câncer. De acordo com Latorre (2001), o câncer é constituído de um conjunto de mais de 200 doenças diferentes, com multiplicidade de causas, história natural diversa e uma gama imensa de abordagens terapêuticas. A hipótese de que o processo carcinogênico é composto por múltiplas etapas nas quais um conjunto de eventos ocorre, contribuindo para a transformação celular e subsequentes estágios malignos, é hoje a mais aceita (LOURO *et al.*, 2002).

O câncer normalmente é causado por uma alteração nos genes supressores de tumor na qual o crescimento e divisão celular desregulam. Sem

regulação, as células se dividem sem parar, acumulando-se e formando tumores. Esta falta de regulação é, em parte, devida a mutações nos genes cujos produtos protéicos estão envolvidos no controle do ciclo de divisão celular (SNUSTAD; SIMMONS., 2006).

Alguns compostos possuem capacidade inibitória da carcinogênese, dentre os quais podemos citar os antioxidantes, que são responsáveis pela remoção de espécies derivadas do oxigênio e são definidos como quaisquer substâncias que, em concentrações relativamente baixas, quando comparadas aos substratos oxidáveis retardam significativamente ou inibem a oxidação deles (HALLIWELL GUTTERIDGE, 1999 apud DIAS; NEPOMUCENO., 2008)

Dentre estes compostos encontram-se os Inibidores da Bomba de Prótons (IBP) que são compostos benzoimidazólicos substituídos, que se assemelham aos antagonistas dos receptores  $H_2$  na sua estrutura, porém, apresentam mecanismo de ação completamente diferente (KATZUNG, 2005). Estes pró-fármacos diminuem a secreção do ácido gástrico, bloqueando a última enzima que transporta ativamente ácido das células parietais gástricas dentro do Lúmen Gastrintestinal (MCDONAGH; CARSON; THAKURTA, 2009).

Os IBP's tem se tornado o principal trunfo no arsenal farmacológico nos últimos 15 anos. Estas drogas são muito eficazes no tratamento de distúrbios ácido-pépticos (KUIPERS, 2006). Frequentemente são usados no tratamento de sintomas da doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), gastrite, úlceras induzidas por medicamentos e são usados ainda no tratamento de esofagite erosiva (MCDONAGH; CARSON; THAKURTA, 2009).

Os IBP's são o sustentáculo no tratamento da DRGE e são os agentes preferenciais para terapia de manutenção em pacientes com esofagite erosiva cicatrizada. Os IBP fornecem controle dos sintomas de forma mais rápida e são os melhores na cicatrização da esofagite erosiva do que os antagonistas dos receptores- $H_2$  e antiácidos (SCHOLTEN, 2007).

Estes pró-fármacos consistem em bases fracas lipofílicas ( $pK_a$  de 4-5) e, portanto, sofrem rápida difusão através das membranas lipídicas para os compartimentos acidificados (canalículos das células parietais), onde é rapidamente protonado e concentrado, sofrendo rápida conversão molecular no cátion sulfonamida tiofílico reativo e ativo. A sulfonamida reage com a

Hidrogênio-Potássio Adenosina Trifosfatase ( $H^+/K^+ - ATPase$ ) e faz uma ligação covalente inativando irreversivelmente a enzima (KATZUNG, 2005).

A bomba  $H^+/K^+ - ATPase$  é o componente responsável pela acidificação da secreção das células parietais. É uma enzima exclusiva do pólo apical dessas células e pode ser eficazmente inibida por diversos compostos benzoimidazólicos substituídos (SILVA, 2006). Desde a sua introdução no final da década de 1980, esses agentes inibidores eficazes da secreção de ácido rapidamente assumiram um importante papel no tratamento dos distúrbios ácido-pépticos (KATZUNG, 2005).

A  $ATPase$  gástrica é membro das  $ATPases$  tipo  $P_2$ . O primeiro passo da reação é a fosforilação da subunidade catalítica por  $MgATP$ , com exportação de prótons, este passo é seguido de desfosforilação luminal potássio-dependente e reabsorção do potássio. A  $H^+/K^+ - ATPase$  é composta por duas subunidades a subunidade catalítica  $\alpha$  e a subunidade  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  é composta por 1033 ou 1034 aminoácidos (AA) e 10 segmentos transmembrana em todas as espécies em que estão presentes, enquanto que a subunidade  $\beta$  consiste de 291 AA e contém seis ou sete sítios de glicosilação N-ligados com um segmento transmembrana (SHIN; SACHS, 2008).

Os IBP's são administrados na forma de pró-fármacos inativos, com formulações de revestimento entérico, resistentes ao ácido, para se evitar sua rápida degradação na luz gástrica. Após ter passado pelo estômago e atingir a luz intestinal alcalina o revestimento entérico se dissolve e o pró-fármaco é absorvido (KATZUNG, 2005).

Do ponto de vista farmacocinético, os IBP's são drogas ideais: possuem meia-vida sérica curta, são concentrados e ativados próximo ao seu local de ação e apresentam longa duração de ação, inibem a secreção tanto em jejum quanto estimulada por alimentos, visto que bloqueiam a via comum final da secreção de ácido, a bomba de prótons (KATZUNG, 2005).

Em doses convencionais, os IBP's inibem 90-98% da secreção de ácido em 24 horas. Em pacientes submetidos a tratamento prolongado com IBP's, o pH gástrico mediano de 24 horas varia de 3,6 a 4,9 e o número médio de horas durante as quais o pH é superior a 4 varia de 10,5 a 16,8 horas (KATZUNG, 2005).

Os IBP's produzem assim, uma elevação considerável, mas dose-dependente do pH gástrico. A hipocloridria prolongada com terapia IBP levantou preocupações de segurança para os pacientes recebendo terapia em longo prazo com esses agentes (possível hiperplasia das células gástricas e carcinoides gástricos, adenocarcinoma colorretal e pólipos). As evidências até agora indicam que quaisquer alterações morfológicas nas células endócrinas gástricas são mínimas e não-neoplásicas, sugerindo que a hipergastrinemia observada durante a terapia com IBP tem pouco significado clínico (SCHOLTEN, 2007).

Os IBP's atualmente disponíveis no mercado são o Omeprazol (mistura racêmica de isômeros *R* e *S*), Esomeprazol (isômero *S* do Omeprazol), Lansoprazol, Rabeprazol e Pantoprazol (SILVA, 2006).

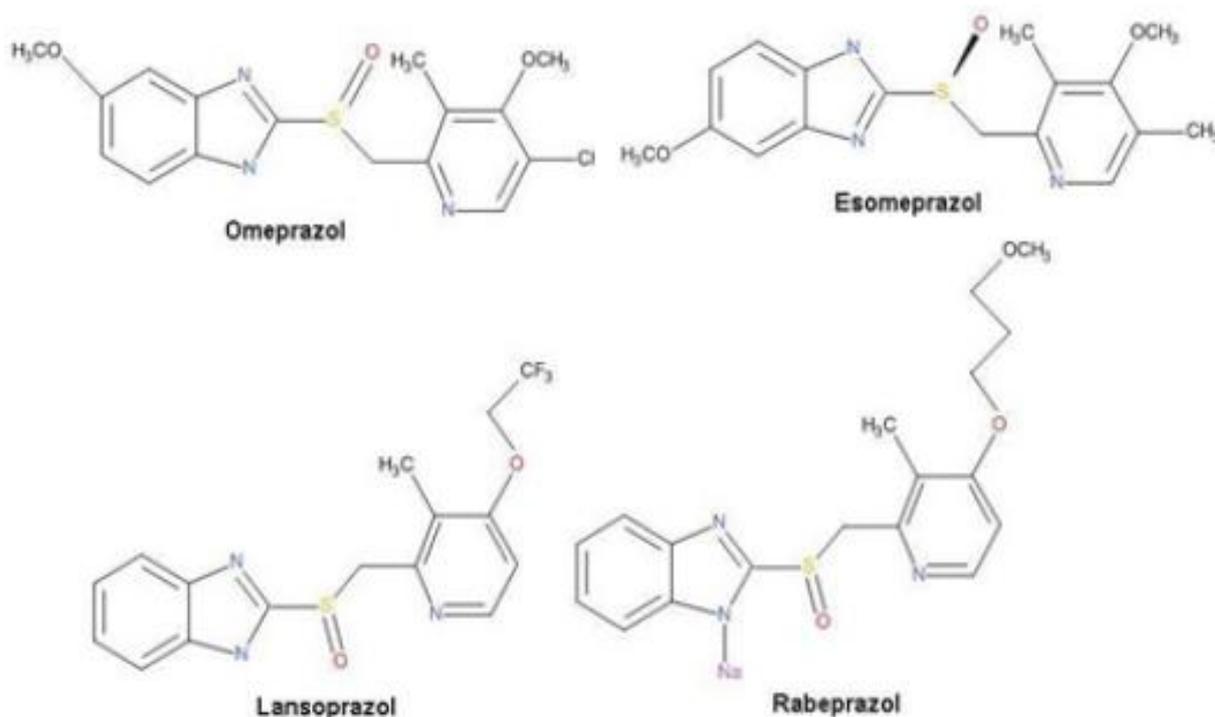


Figura – 1: Fórmulas estruturais dos IBPs

Fonte: Kuipers 2006

O Omeprazol suprime irreversivelmente a secreção de ácido gástrico, não possui ação anticolinérgica, nem bloqueadora de receptores de  $H_2$ . Trata-se de um potente inibidor do ácido gástrico tanto basal quanto estimulada. O Lansoprazol é levemente mais potente que o Omeprazol, porém, semelhante nas suas propriedades. A inibição da  $H^+/K^+ - ATPase$  pelo Lansoprazol é parcialmente reversível. O Rabeprazol causa supressão mais

rápida da secreção de ácido e auxilia na síntese da mucina gástrica. Todavia, a sua potência e eficácia são semelhantes as do Omeprazol. O Esomeprazol produz melhor controle do pH intragástrico do que o Omeprazol em pacientes com Doença por Refluxo Gastroesofágico é tão eficaz quanto o Omeprazol na cicatrização de úlceras gástricas/duodenais e na inibição do *H. pylori* (TRIPATHI, 2006). Vários estudos demonstram a eficácia destes pró-fármacos no tratamento de infecções gástricas bem como ulcerações estomacais.

A *H. pylori* é um importante patógeno humano que infecta 50% da população mundial. *H. pylori* em seres humanos está associada com o desenvolvimento de numerosas patologias gástricas, como: úlcera péptica, gastrite crônica e câncer gástrico (ZHANG, *et al*, 2010). Estudos epidemiológicos foram os primeiros a demonstrar a associação da infecção de *H. pylori* e o câncer gástrico. Em 1994 a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou este microrganismo como carcinógeno tipo I, porque uma minoria de indivíduos infectados desenvolve câncer gástrico. Entretanto, diversos trabalhos têm tentado estabelecer o exato papel dessa bactéria na carcinogênese (LOURO, 2002).

O tratamento de *H. pylori* com IBP's é bastante eficaz, porém, pode causar progressão ou aceleração da gastrite crônica, predominante no antro gástrico, para gastrite crônica predominante no corpo, podendo tornar-se um fator de risco para o câncer gástrico. A erradicação do *H. pylori* pode causar regressão da atrofia gástrica ou metaplasia intestinal ou não (THOMSON, 2010).

As células neoplásicas expressam um repertório exclusivo de bombas de prótons específicas do tumor, que aumentam a sobrevivência das células tumorais. Assim, uma das mais recentes abordagens na terapia antineoplásica é atacar as bombas de prótons das células tumorais com IBP's. Relatórios anteriores indicaram ações variáveis dos IBP's na homeostase da medula óssea em algumas patologias não-malignas. No entanto, não está claro se a administração de IBP's para um paciente tumoral pode fornecer benefícios terapêuticos adicionais, por aliviar a mielo e imuno supressão associadas ao tumor (VISHVAKARMA; SINGH, 2011).

## 1.2. Pantoprazol.

O Pantoprazol (Fig2) (Panto) [5-(difluorometoxi)-2-[[[(3,4-dimetoxi-2-piridinil) metil] sulfinil]-1H-benzimidazol], é um IBP que se distingue dos demais em sua ação biológica e farmacológica devido à sua afinidade de ligação única às bombas de prótons e à baixa velocidade de reversibilidade (VISHVAKARMA; SINGH, 2011).

O mecanismo de ação do Panto baseia-se na sua ativação no ambiente ácido das células parietais gástricas, após sua absorção intestinal e circulação na corrente sanguínea. A ativação leva à formação de uma sulfonamida catiônica cíclica, que se liga a uma ou mais subunidades catalíticas da bomba de prótons, alterando sua configuração e provocando uma inibição irreversível do transporte ácido (RAFFIN, 2007). A forma ativa reage com o grupo tiol das cisteínas 813 e 822 da  $H^+/K^+ - ATPase$  transmembrana. Esta reação ocorre dentro das células parietais gástricas que possuem pH 1. (RAFFIN, *et al*, 2009).

Como os outros IBP's é um pró-fármaco fracamente básico que se acumula dentro de ambientes altamente ácidos e se torna rapidamente ativado em uma sulfonamida catiônica. Em comparação com outros IBP's, o pantoprazol é menos ativado em ambientes neutros para moderadamente ácidos (pH 3 a 5). A estreita janela de pH impede o Pantoprazol de atuar em áreas do corpo que não são o alvo, reduzindo assim os efeitos adversos. (MATHEWS; *et al*. 2010).

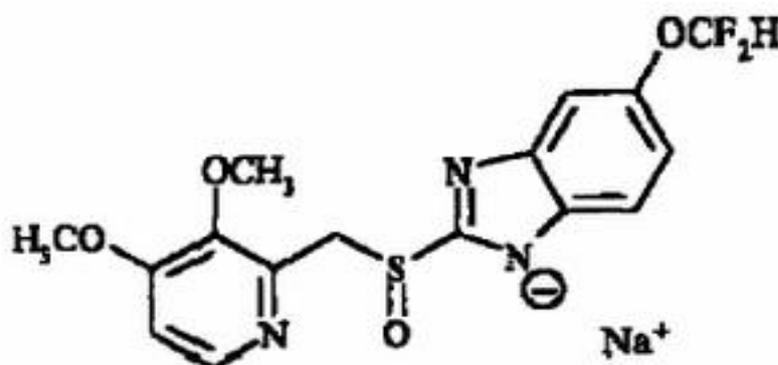


Figura – 2: Fórmula estrutural do Pantoprazol sódico.

Fonte: Mathews 2010.

O Panto é o IBP que apresenta menos interações com outras drogas, sendo preferido em diversas situações de risco, como em pacientes graves em unidades de terapia intensiva. Entretanto, os dados da Food and Drug Administration demonstram que os efeitos colaterais não são menos frequentes no uso do Panto do que no uso de outros IBP's (SILVA, 2006).

O Panto segue dose farmacocinética linear. Sua versão oral tem uma biodisponibilidade de 77% e sua absorção não é afetada por ingestão prévia de alimentos ou antiácidos. Em última análise, é absorvido no intestino, resultando em uma máxima concentração no soro cerca de 2 a 3 horas após a ingestão (MATHEWS; *et al.* 2010). A formulação intravenosa do Panto exhibe características semelhantes à administração oral. Quando administrado a um paciente em jejum, ele inativa as bombas de ácido que estão secretando ativamente, porém não tem nenhum efeito sobre as bombas em vesículas quiescentes e não secretoras (KATZUNG, 2005).

Portanto, o Panto é mais eficaz quando administrado antes das refeições assim ele atinge níveis séricos de pico, quando o número máximo de bombas de prótons é ativado. Ao contrário de outros IBP's, a concentração sérica do Panto não é dose-dependente; a concentração sérica depois da primeira dose é semelhante à de várias doses depois. O metabolismo do Panto é independente da via de administração, possuindo meia-vida de aproximadamente 1,1 hora. No entanto em pacientes com uma mutação no gene que codifica a enzima CYP2C19, a meia-vida pode ser de até 3 horas (MATHEWS; *et al.* 2010). Porém, a meia-vida de uma única injeção da formulação intravenosa é curta, assim, para se obter uma inibição máxima, o Panto intravenoso deve ser administrado durante 24-48 horas na forma de infusão contínua ou em injeções repetidas (KATZUNG, 2005).

A Via Citocromo P450 (CYP) é importante no metabolismo de várias drogas, incluindo: ciclofosfamida, antidepressivos, diazepam, carisoprodol, nelfinavir, clopidogrel, voriconazol, talidomida, clonazepam e inibidores da bomba de prótons. O apuramento das drogas metabolizadas por CYP varia de 5 a 20 vezes entre indivíduos e grupos étnicos, principalmente por causa dos efeitos dos polimorfismos genéticos, mas também como resultado de fatores não genéticos, por exemplo: interações de droga, idade, gravidez e estado de doença (DESTA *et al.*, 2009).

O Panto tem um baixo potencial de interações metabólicas com o sistema de oxidase CYP e portanto é especialmente indicado para pacientes em co-medicações (STUPNICKI *et al*, 2004). Ao passo que Mathews, *et al*. (2010), cita em seus estudos que o Panto é completamente metabolizado através do sistema CYP hepático e mais de 80% dos metabolitos inativos são eliminados via excreção renal.

Vários estudos sugerem uma correlação entre os IBP's e o câncer gástrico alguns mencionam que estes pró-fármacos auxiliam no desaparecimento dos tumores e outros afirmam que eles aceleram o aparecimento de tais carcinomas. Ainda não se sabe se sua ação é atenuada ou potencializada na presença de quimioterápicos, uma vez que são largamente usados por pacientes em quimioterapia, pois os IBPs aliviam o desconforto gástrico gerado pelo quimioterápico.

Dos cinco IBP's conhecidos, o Pantoprazol é o menos estudado quanto a sua relação com o aparecimento ou desaparecimento de gastrinomas. Sendo assim, diante de tantas controvérsias, mais pesquisas são necessárias para elucidar a ação deste fármaco. Portanto este trabalho torna-se relevante, uma vez que visa avaliar a possível ação genotóxica do Pantoprazol ou sua ação potencializadora da ação do quimioterápico Doxorubicina, aqui usado como controle positivo.

### **1.3 - Doxorubicina (CAS: 25316-40-9).**

Os agentes que causam danos no material genético e que induzem neoplasias são normalmente presentes no ambiente como: a luz solar, radiações ionizantes ou agentes químicos. Um tipo de agente químico mutagênico é o cloridrato de Doxorubicina (Fig 3), que possui efeitos cardiotoxícos, teratogênicos e, ainda, tem a capacidade de intercalar-se à molécula de DNA gerando radicais livres que estão envolvidos no seu mecanismo de citotoxicidade contra uma variedade de tumores (ARAÚJO, 2008).

Muitas das drogas anticâncer em uso clínico são produtos naturais, ou derivados de produtos naturais, por exemplo, antraciclinas como a doxorubicina, alcalóides extraídos da vinca (vincristina e taxanos), e compartilham mecanismos comuns de resistência (PATEL; TANNOCK, 2009).

A doxorubicina (DXR) é um antibiótico antraciclino usado frequentemente na quimioterapia de uma variedade de tumores sólidos e leucemias. A eficácia do tratamento por DXR é limitada por mecanismos de resistência de droga. Embora o mecanismo subjacente de resistência à DXR não seja totalmente entendido, pesquisadores já determinaram vários fatores que influenciam a toxicidade celular da DXR, mais notavelmente a expressão dos transportadores de membrana Glicoproteína-P MDR1 (Pgp) e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) via ciclo redox da DXR (FINN; FINDLEY; KEMP, 2011).

A quimioterapia, normalmente, induz as células cancerosas a morrerem por via apoptótica, que é pouco imunogênica. No entanto antraciclinas, em particular DXR, são considerados como os únicos agentes quimioterápicos que provocam também uma morte imunogênica em células tumorais (BOO *et al*, 2009).

A farmacogenética tem uma grande relevância na terapia do câncer, pois agentes quimioterápicos são, em geral, não específicos e com índices terapêuticos estreitos que resultam em frequentes toxicidades graves ou mesmo fatais. Além disso, a ausência de efeito terapêutico pode ter consequências críticas para o paciente (INGELMAN-SUNDBERG, *et al*. 2007).

Um tratamento quimioterápico perfeito atacaria, seletivamente, células tumorais sem provocar toxicidade em tecidos normais. No entanto, esta seletividade ideal ainda não foi atingida pela quimioterapia tradicional, que é conhecida por afetar tanto células normais quanto tumorais (VENDRAMINI, *et al*, 2010).

Foram propostos vários mecanismos para as ações citotóxicas da DXR, incluindo: (a) intercalação no DNA, através dos anéis planos tetraciclina, entre os pares de bases, levando a inibição da síntese macromolecular; (b) geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a peroxidação lipídica ou danos no DNA; e (c) inibição de topoisomerase II, seguido por danos no DNA (SAUTER *et al*, 2010).

A eficácia clínica da DXR é limitada por complicações agudas e crônicas. Pacientes que receberam DXR frequentemente apresentam efeitos secundários agudos, tais como: fadiga, náusea, vômito, dor, perturbações do sono, caquexia e depressão. Além disso, os pacientes podem desenvolver cardiomiopatia e insuficiência cardíaca (SAUTER *et al*, 2010). Portanto, a DXR provoca manifestações tóxicas diversas como mielossupressão, tromboplastina, anemia, estomatite, perturbações gastrintestinais, manifestações dermatológicas, toxicidade cardíaca e derrame pericárdico (GILMAN; *et al.* 1996).

Os efeitos genotóxicos da DXR são responsáveis por induzir aumento na frequência de aberrações cromossômicas em células somáticas e redução na produção de células germinativas, comprovados em testículos de camundongos e em cultura de linfócitos (VALADARES, 2002). Outros estudos demonstraram, ainda, que a DXR induz mutações e recombinações somáticas em células de asas de *Drosophila melanogaster* (LEHMANN *et al.*, 2003; COSTA; NEPOMUCENO, 2006; FRAGIORGE *et al.*, 2008).

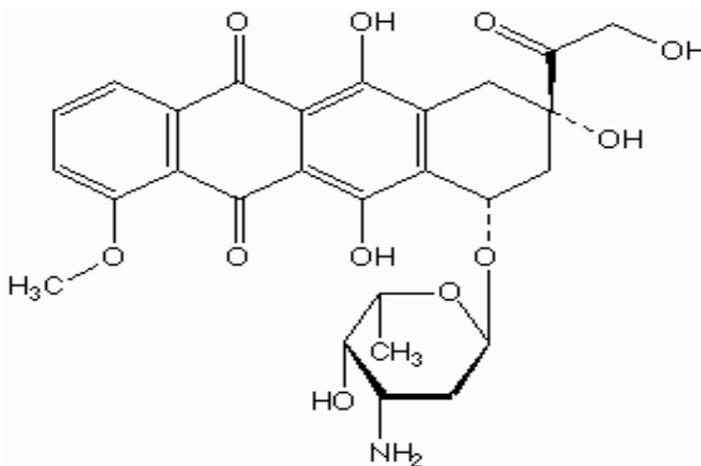


Figura – 3: Fórmula estrutural da Doxorrubicina.

Fonte: Costa e Nepomuceno 2006.

#### **1.4 – Teste para Detecção de Mutação e Recombinação em células somáticas de *Drosophila melanogaster* – Somatic Mutation And Recombination Test (SMART).**

A genética toxicológica tem centrado suas investigações no uso de diferentes bioensaios capazes de detectar mutações pontuais, aberrações cromossômicas e, mais recentemente, eventos aneuploidogênicos (LOCATELLI, 2008).

A *Drosophila melanogaster* foi um dos primeiros organismos modelos a serem usados em genética, no laboratório do Dr. T.H. Morgan. Foi escolhida por possuir um ciclo vital curto do tipo diplóide, e é simples de cultivar em frascos contendo meio de cultura. (SPRADILING; *et al.*, 1995; apud, STRACHAN, 2002). A importância da *D. melanogaster* como modelo para a genética humana é demonstrada pelo fato de que 60% dos genes causadores de doenças em humanos, bem como 70% dos genes do câncer estão presentes neste organismo teste (GRIFFITHS, *et al.*, 2002).

Testes bem definidos, para verificação da mutagenicidade de agentes físicos e químicos, têm sido desenvolvidos em *D. melanogaster*. Estes testes são capazes de mensurar um amplo espectro de danos genéticos induzidos em células germinativas, assim como em células somáticas (WÜRGLER *et al.*, 1984). Além disso, já está muito bem documentado o fato de a *D. melanogaster* possuir um eficiente sistema para o metabolismo de agentes xenobióticos (BAARS, 1980; HÄLLSTRÖM *et al.*, 1984; VOGEL, 1980).

De acordo com GRAF *et al.* (1984), a análise dos possíveis efeitos de substâncias mutagênicas e recombinogênicas pode ser realizada por meio do teste da mancha da asa, denominado SMART (*Somatic Mutation And Recombination Test*), que detecta diferentes tipos de manchas mutantes que podem ser resultantes tanto de mutação, recombinação, deleção ou não disjunção cromossômica, ocorridas no cromossomo nº 3 da *D. melanogaster*.

O SMART foi desenvolvido para detectar a perda da heterozigose de genes que determinam a expressão de fenótipos nas asas de *Drosophila melanogaster*. Este teste é rápido, fácil e de baixo custo (Graf *et al.*, 1984). São utilizadas três linhagens mutantes de *D. melanogaster*: *mwh/mwh* (*mwh*,

*multiple wing hairs*), *flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3* (*flr<sup>3</sup>*, *flare-3*) e *ORR; flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3* (*Oregon R*, *flare-3*) com expressões fenotípicas bem definidas (Fig 4).

A linhagem *mwh* é mantida como um alelo viável em homozigose recessiva. A mutação *mwh* está localizada na extremidade do braço esquerdo do cromossomo 3 (3 – 0,3) e em condições de homozigose produz múltiplos tricomas por célula ao invés de apenas um único tricoma, como normalmente acontece (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

A linhagem *flr<sup>3</sup>* possui um alelo recessivo que, afeta o fenótipo do pêlo da asa. Ele também está localizada no braço esquerdo do cromossomo 3, mas em posição mais proximal (3 – 38,8). Ela produz pêlos mal formados que têm a forma de uma chama. Todos os três alelos mutantes conhecidos são letais em homozigose recessiva nos zigotos (os zigotos, homozigotos para o *flr<sup>3</sup>*, não são capazes de desenvolver moscas adultas). Ao contrário, células homozigotas do disco imaginal são viáveis e levam à formação de células mutantes nas asas. Devido à letalidade no zigoto, o alelo *flr<sup>3</sup>* é mantido na linhagem estoque com a presença de um “balanceador cromossômico” com múltiplas inversões cromossômicas (do inglês: *TM3, Bd<sup>6</sup> - Third multiple 3, Beaded-Serrate*) (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

A linhagem *Oregon R, flare-3* (ORR) foi construída por Frölich e Würgler (1989) e apesar de apresentar o marcador *flr<sup>3</sup>* se difere da linhagem *flare-3* por apresentar os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem *Oregon R* resistente ao DDT, além de possuir alta atividade de enzimas citocromo P 450 (HALLSTRÖM, 1986). Pelo alto nível de citocromo P 450 constitutivo na linhagem ORR, o teste SMART torna-se mais sensível a ativação de promutágenos dependentes de ativação de CYP 450.

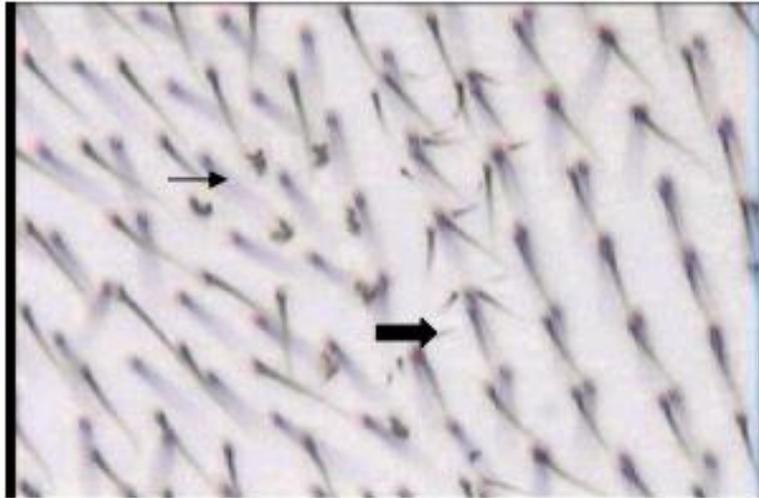


Figura – 4: Fotomicrografia, em microscópio óptico de luz, dos pêlos da asa de *Drosophila melanogaster*, obtida no Laboratório de Citogenética e Mutagênese – Centro Universitário de Patos de Minas. Apresentação de pêlos múltiplos (*mwh*), seta larga, e apresentação de pêlos *flr*<sup>3</sup>, seta menor.

Caso ocorra uma alteração genética em uma das células do disco imaginal, tal alteração poderá estar presente em todas as células descendentes, e formará um clone de células mutantes. A alteração gênica é responsável por uma mudança visível no fenótipo. Assim sendo, as células mutantes serão detectadas como uma mancha de pêlos mutantes na asa da mosca adulta (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

No SMART, são realizados dois tipos de cruzamentos: Padrão (ST) e Alta Bioativação Metabólica (HB). No cruzamento ST fêmeas virgens da linhagem *flr*<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3 são cruzadas com machos *mwh/mwh* e no cruzamento HB são cruzadas fêmeas virgens da linhagem ORR; *flr*<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3 com machos *mwh/mwh*. Destes cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: trans-heterozigoto marcado (MH: *mwh* +/+ *flr*<sup>3</sup>) que possuem asas borda lisa; e heterozigoto balanceado (BH: *mwh* +/+ TM3, Bd<sup>6</sup>) com asas fenotipicamente serrilhadas (Fig 4).

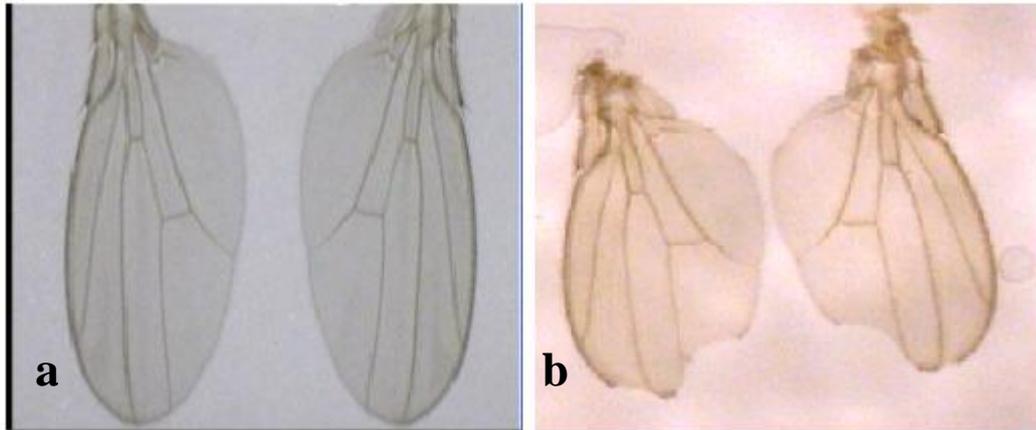


Figura – 5: Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, das asas de *Drosophila melanogaster*, obtida no Laboratório de Citogenética e Mutagenese – Centro Universitário de Patos de Minas. Apresentação de descendentes marcador trans-heterozigoto (MH: *mwh +/+ flr<sup>3</sup>*) letra **a** e balanceador heterozigoto (BH: *mwh +/+ TM3, Bd<sup>6</sup>*) letra **b**.

Durante a metamorfose, grupos específicos de células chamados discos imaginais se proliferam mitoticamente. Em contato com o mutágeno. Caso aconteça uma mutação em uma dessas células, esta mutação estará presente em todas as células filhas, expressando-se nos tricomas das asas (GRAF *et al.*, 1984).

As manchas também podem ser classificadas como pequenas e grandes, uma mancha pequena possui uma ou duas células, caracterizados por se formarem durante os últimos estágios de divisão mitótica durante a formação das asas; as manchas grandes possuem três ou mais células alteradas e se originam nos primeiros estágios de desenvolvimento larval. (GRAF *et al.*, 1998).

## 2. REFERÊNCIAS.

ARAÚJO, B. C.; **Efeito protetor do chá verde (*Camellia sinensis*) contra a ação genotóxica da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2008.

BAARS, A.J. Biotransformation of xenobiotics in *Drosophila melanogaster* and its relevance for mutagenicity testing. **Drug. Metab. Rev.** V. 11 p. 191-221. 1980.

BOO. S. D., KOPECKA. J., BRUSA. D., GAZZANO. E., MATERA. L., GHIGO. D., BOSIA. A., RIGANTI. C.; iNOS activity is necessary for the cytotoxic and immunogenic effects of doxorubicin in human colon cancer cells. **Molecular Cancer**. v. 8, n. 108, 2009.

COSTA, W.F., NEPOMUCENO, J.C; Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Enviromental and Molecular Mutagenesis**. v. 47, p. 18-24. 2006.

DESTA, Z., MODAK, A., NGUYEN, P. D., LEMLER, S. M., KUROGI, Y., LI, L., FLOCKHART, D. A.; Rapid Identification of the Hepatic Cytochrome P450 2C19 Activity Using a Novel and Noninvasive [13C]Pantoprazole Breath Test. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v.329, n.1, p. 297–305, 2009.

DIAS, C. D.; **Efeito Protetor do Betacaroteno Contra a Ação Genotóxica da Doxorubicina, em Células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2008. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

DUTRA, E. S.; **Efeito protetor do extrato de tomate (*Lycopersicon esculentum*)**. 2007. 64f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) –

Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2007.

FINN. N.A., FINDLEY. H.W., KEMP. M.L.; A Switching Mechanism in Doxorubicin Bioactivation Can Be Exploited to Control Doxorubicin Toxicity. **PLoS Computational Biology**. v.7, n. 9, 2011.

FRAGIORGE, E. J.; SPANÓ, M. A.; ANTUNES, L. M. G. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 449-455, 2007.

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F.E; New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila melanogaster* wing spot test. *Mutation Research*, v. 216, p. 179-187, 1989.

GILMAN, A. G., LIMBIRD, F.E; **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Press, 1996. 1671 p.

GRAF, U; WÜRGLER F.E; KATZ, A. J; FREI, H; HALL, C. B; KALE, P.B. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environ mutagen**, v.6, p. 153-188, 1984.

GRAF, U; ABRAHAM, S.K; GUZMÁN-RICON, J.; WÜRGLER F.E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, n. 222, p. 359-373, 1998.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **Introdução à genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002. 856p.

GUZMÁN-RICON, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In : **Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change**, Edit by F. M. Butterworth *et al.*, Phenunm Press, N.Y., pp 169-181. 1995.

HÄLLSTRÖM, I.; BLANCK, A., ATUMA, S. Genetic variation in cytochrome P450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Pharmacology**, v.33, p.13-20, 1984.

HALLSTRÖM, I.; Genetic regulation of the cytochrome P-450 in *Drosophila melanogaster*. **Progress in Clinical and Biological Research**, n. 209, p. 419-425, 1986.

INGELMAN-SUNDBERG, M., SIM, S. C., GOMEZ, A., RODRIGUEZ-ANTONA, C.; Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. **Pharmacology & Therapeutics**. n. 116, 496–526, 2007.

KATZUNG, B.G. Farmacologia Básica e Clínica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 855p.

KUIPERS, E J. ; Proton pump inhibitors and gastric neoplasia. **Gut**, n.55, 1217–1221, 2006.

LATORRE, Maria do Rosário Dias de Oliveira. **Câncer em Goiânia**: análise da incidência e mortalidade no período de 1988 a 1997. 172 f. Tese (Livre Docência) Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

LEHMANN, M. **Toxicidade genética das antraciclinas**: associação entre estrutura química e ação inibitória sobre a topoisomerase II. 2003. 103p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular), Faculdade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

LOCATELLI, K. M. M.; **Genotoxicidade dos corantes artificiais Amarelo Tartrazina e Vermelho 40, pelo teste SMART de asa, em *Drosophila melanogaster***. 2008. 55f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2008.

LOURO, I. D.; LLERENA Jr., J. C.; MELO, M. S. V.; PROLLA, P. A.; FROES, N. C. **Genética Molecular do Câncer**. 2. ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002. 275 p.

MATHEWS S. REID, A., TIAN, C., CAI, Q.; An update on the use of pantoprazole as a treatment for gastroesophageal reflux disease. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, n. 3, 11–16, 2010.

MCDONAGH, M. S; CARSON S; THAKURTA S.; **Drug Class Review Proton Pump Inhibitors**. 5.ed. Oregon: Oregon Health & Science University, 2009.

OJOPI, E. P. B.; DIAS NETO, E. **Genômica e oncologia**. In: MIR, L. (Org.). *Genômica*. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap 19. P. 364-385.

PATEL. K. J., TANNOCK. I. F.; The influence of P-glycoprotein expression and its inhibitors on the distribution of doxorubicin in breast tumors. **BMC Cancer**. v.9, n.356, 2009.

RAFFIN, R. P., COLOMBO, P., SONVICO, F., ROSSI, A., JORNADA, D. S., POHLMANN, A. R., GUTERRES S. S.; Agglomerates Containing Pantoprazole Microparticles: Modulating the Drug Release. **AAPS PharmSciTech**, v.10, n.2, 335-345, 2009.

RAFFIN, R. P., COLOMÉ, M., GUTERRES, S. S.; Validation of analytical methodology by hplc for quantification and stability evaluation of sodium pantoprazole. **Quim. Nova**, v.30, n.4, 1001-1005, 2007.

SAUTER, K. A.D., MAGUN, E. A., IORDANOV, M. S. MAGUN, B. E.; ZAK is required for doxorubicin, a novel ribotoxic stressor, to induce SAPK activation and apoptosis in HaCaT cells. **Cancer Biology & Therapy**. v.10, n.3, 258 – 266, 2010.

SCHOLTEN, T.; Long-term management of gastroesophageal reflux disease with pantoprazole. **Therapeutics and Clinical Risk Management**. v.3, n.2. p. 231–243, 2007.

SHIN J. M.; SACHS G.; Pharmacology of Proton Pump Inhibitors. **Curr. Gastroenterol Rep**. n.10, 528–534, 2008.

SILVA, P. *Farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 845p.

SNUSTAD, P. SIMMONS, M.J. **Fundamentos de genética**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 740 p.

STRACHAN, T.; READ, A. P.; **Genética Molecular Humana**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 576p.

STUPNICKI, T., DIETRICH, K. GONZALES, C. P.; Efficacy and tolerability of pantoprazole compared with misoprostol for the prevention of NSAID-related gastrointestinal lesions and symptoms in rheumatic patients. **Digestion**, n.70, p.61–69, 2004.

THOMSON, A. B. R., SAUVE, M. D., KASSAM, N., KAMITAKAHARA, H.; Safety of the long-term use of proton pump inhibitors. **World J Gastroenterol**. v.16, n.19, p. 2323-2330, 2010.

TRIPATHI, K.D. Farmacologia Médica, 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 750p.

VALADARES, B. L. B; **Ação anti-recombinogênica da própolis contra efeitos genotóxicos da Doxorubicina em *Drosophila melanogaster***. 2002. 68p. Dissertação de Mestrado: Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG, 2002.

VENDRAMINI, V., SASSO-CERRI, E., MIRAGLIA, S., M.; Amifostine reduces the seminiferous epithelium damage in doxorubicin-treated prepubertal rats without improving the fertility status. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 8, n.3, 2010.

VISHVAKARMA, N.K.; SINGH, S.M.; Augmentation of myelopoiesis in a murine host bearing a T cell lymphoma following in vivo administration of proton pump inhibitor pantoprazole. **Biochimie**, n.93, p.1786-1796, 2011.

VOGEL, E. Genetical relationship between resistance to insecticides and procarcinogens in two *Drosophila* populations. **Arch. Toxicol**. v. 43, p. 201-211. 1980.

WÜRGLER, F. E., SOBELS, F. H. and VOGEL, E. *Drosophila* as an assay system for detecting genetic changes. In: **Handbook of mutagenicity test procedure** (B.J., KILBEY et al., Eds.), 2 nd ed. Elsevier, Amsterdam p.p. 555-601. 1984.

ZHANG, Z.; LIU, Z.; ZHENG, P.; TANG, F.; YANG, P.; Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. **World J. Gastroenterol**. v.16, n.10, p. 1279-1284. 2010.

---

---

## CAPÍTULO II

**Avaliação do potencial mutagênico e recombinogênico do Pantoprazol<sup>®</sup> em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.**

---

---

## RESUMO

Os Inibidores da Bomba de Prótons (IBP) têm se tornado o principal trunfo no arsenal farmacológico nos últimos 15 anos. Estas drogas são compostos benzoimidazólicos substituídos, que se assemelham aos antagonistas dos receptores H<sub>2</sub> na sua estrutura, porém apresentam mecanismos de ação completamente diferentes. O Pantoprazol (Panto) é um dos IBP's mais importantes no tratamento de uma variedade de doenças relacionadas ao trato gastrointestinal superior. Estudos demonstram aumento no risco de desenvolvimento de câncer gástrico, metaplasia intestinal e hiperplasia das células endócrinas após o uso prolongado de inibidores da H<sup>+</sup> K<sup>+</sup>/ATPase. Neste trabalho o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster* (SMART) foi empregado para se avaliar os efeitos mutagênicos e recombinogênicos do Panto. Tratamentos crônicos com Panto foram realizados em larvas de 72 horas de vida provenientes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação metabólica (HB), nas concentrações de 2,5; 5,0; ou 10,0 µM, o agente antineoplásico doxorrubicina foi administrado na concentração de 0,4mM como controle positivo. Quando o Panto foi administrado isoladamente no cruzamento ST o total de manchas foi estatisticamente relevante nas concentrações 2,5 e 5,0µM e quando associado com DXR, a frequência de manchas pequenas foi reduzida. Ao analisar a mutagenicidade no cruzamento HB, foi encontrado aumento significativo no total de manchas dos descendentes MH, procedendo-se assim a análise dos descendentes BH, em que se constatou efeito recombinogênico em todas as concentrações. Por outro lado, ao se avaliar as associações foi encontrado aumento significativo na frequência apenas de manchas gêmeas. Diante de tais resultados e nas condições experimentais, pode-se afirmar que o Pantoprazol é um fármaco mutagênico direto e possui efeito potencializador da DXR. Os resultados revelam ainda que o Pantoprazol é recombinogênico e potencializador dos efeitos recombinogênicos da DXR.

**Palavras chave:** Pantoprazol, SMART, Mutagenicidade, Recombinogenicidade, *Drosophila melanogaster*.

## ABSTRACT

Proton pump inhibitors (PPIs) have become a major asset in pharmacological armamentarium over the past 15 years. These drugs are substituted benzoimidazolic compounds, which resemble the H<sub>2</sub> receptor antagonists in its structure, but have completely different mechanism of action. Pantoprazole<sup>®</sup> (Panto) is one of the most important PPI to treatment of a variety of diseases related to upper gastrointestinal tract. Studies have shown an increased risk for developing gastric cancer, intestinal metaplasia and hyperplasia of endocrine cells after prolonged use of H<sup>+</sup> K<sup>+</sup>/ATPase inhibitors. In this work, the Somatic Mutation And Recombination Test in *Drosophila melanogaster* (SMART) was employed to determine the mutagenic effects of Panto. Chronic treatments with Panto were performed with 72 hours old larvae of the standard (ST) cross and high bioactivation cross (HB) at concentrations of 2,5; 5,0; or 10,0 µM. In addition, the chemotherapeutic doxorubicin (DXR) was administered at 0,4 mM, as a positive control. When administered in isolation at ST cross total spots was only statistically relevant in 2.5 and 5.0 µ M concentrations and when associated with DXR, the frequency of small spots was reduced. When analyzing the mutagenicity at HB cross, found a significant increase in the total number of spots of descendants MH, so proceed the analysis of BH descendants, found recombinogenic effect at all concentrations. On the other hand, when evaluate the association found significant increase in frequency of twin spots only. Faced with such experimental conditions and results, we can say that the Pantoprazole is a direct genotoxic and has DXR enhancer effect, these results reveal that the Pantoprazole is recombinogenic and enhancer of the DXR recombinogenic effects.

**Keywords:** Pantoprazole, SMART, Mutagenicity, Recombinogenicity, *Drosophila melanogaster*.

## 1. Introdução

Os Inibidores da Bomba de Prótons (IBP) têm se tornado o principal trunfo no arsenal farmacológico nos últimos 15 anos. Estas drogas são muito eficazes no tratamento de desordens ácido-pépticas (KUIPERS, 2006). São compostos benzoimidazólicos substituídos, que se assemelham aos antagonistas dos receptores H<sub>2</sub> na sua estrutura, porém apresentam mecanismos de ação completamente diferentes (KATZUNG, 2005).

Os IBP's atualmente disponíveis no mercado são o Omeprazol (mistura racêmica de isômeros *R* e *S*), Esomeprazol (isômero *S* do Omeprazol), Lansoprazol, Rabeprazol e Pantoprazol (SILVA, 2006). Frequentemente são usados no tratamento de sintomas da doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), gastrite, úlceras induzidas por medicamentos, no combate a *Helicobacter pylori* e ainda no tratamento de esofagite erosiva (MCDONAGH; CARSON; THAKURTA, 2009).

O Pantoprazol (Panto) [5-(difluorometoxi)-2-[[[(3,4-dimetoxi-2-piridinil) metil] sulfinil]-1H-benzimidazol] é um pró-fármaco fracamente básico que se acumula dentro de ambientes altamente ácidos e se torna rapidamente ativado em uma sulfonamida catiônica (VISHVAKARMA, SINGH, 2011; RAFFIN, 2007).

De acordo com Stupnicki *et al.* (2004) o Panto tem um baixo potencial de interações metabólicas com o sistema de oxidase Citocromo P450 e portanto é especialmente indicado para pacientes em co-medicações. Ao passo que Mathews, *et al.* (2010), cita em seus estudos que este fármaco é completamente metabolizado através do sistema Citocromo P450 hepático e mais de 80% dos metabolitos inativos são eliminados via excreção renal.

Yeo *et al.*,(2007) testou os efeitos de vários fármacos usados em tratamentos gástricos sobre células tumorais gástricas. No qual ele mostra que o Panto possui efeito citotóxico, uma vez que desencadeia o processo apoptótico das células tumorais por via mitocôndria dependente.

O uso a longo prazo de Panto pode acarretar na formação de hipergastrinemia, possível hiperplasia das células entéricas, carcinóides no estômago, adenomas e carcinomas no fígado, além de mudanças neoplásicas na tireoide (PANTOLOC, 2003).

A doxorubicina (DXR) é um antibiótico antraciclino que é frequentemente usado na quimioterapia de uma variedade de tumores sólidos e leucemias. A eficácia do tratamento por DXR é limitada por mecanismos de resistência de droga (FINN, FINDLEY, KEMP; 2011). É um pó liofilizado composto por metilparabeno, lactose, além da doxorubicina, sendo usado restritamente por hospitais e laboratórios com emprego específico em neoplasias malignas. A DXR é eficaz em leucemias agudas e linfomas malignos, em tumores sólidos e é um componente valioso de vários esquemas de quimioterapia (GILMAN *et al.*, 1996).

Foram propostos vários mecanismos para as ações quimioterápicas da DXR, incluindo: intercalação no DNA; geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibição de topoisomerase II; (SAUTER., 2010). Quando usada em tratamento frequentemente apresenta efeitos secundários agudos, tais como: fadiga, náusea, vômito, dor, perturbações do sono, caquexia e depressão. Além disso, os pacientes podem desenvolver patologias cardíacas (SAUTER., 2010). Portanto, a DXR provoca manifestações tóxicas diversas como mielossupressão, tromboplastina, anemia, estomatite, perturbações gastrintestinais, manifestações dermatológicas, toxicidade cardíaca e derrame pericárdico (GILMAN *et al.*, 1996).

A DXR é um agente quimioterápico que inibe a atividade da enzima topoisomerase II, resultando no acúmulo de quebras da cadeia de DNA que, se não for reparado pela célula, pode provocar mutações e aberrações cromossômicas em células tumorais e não-tumorais (FRAGIORGE, SPANÓ, ANTUNES; 2007). Estes efeitos da DXR são facilmente detectáveis pelo Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART). O SMART baseia-se na premissa de que durante a metamorfose, grupos específicos de células, chamados discos imaginais, se proliferam mitoticamente em contato com o mutágeno. Se acontecer uma mutação em uma dessas células, esta mutação estará presente em todas as células filhas, expressando-se nos tricomas das asas (GRAF *et al.*, 1984).

Utilizando-se deste teste, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a possível mutagenicidade/recombinogenicidade do Panto e a influência potencializadora dos efeitos mutagênicos/recombinogênicos da Doxorubicina (0,4 mM) por parte do Panto.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Compostos Químicos

O Pantoprazol<sup>®</sup>, lote n°73078, manipulado pela Farmácia Universitária do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), Patos de Minas, Brasil foi preparado em três concentrações distintas (2,5; 5,0 e 10,0 µM). A definição das concentrações foi baseada no trabalho previamente publicado por Masubuchi; Okazaki. (1999).

O Cloridrato de Doxorrubicina (DXR), conhecido pelo nome comercial de Doxolen, lote n° 83520, é produzido pela Eurofarma Laboratórios e distribuído pela Zodiac Produtos Farmacêuticos S.A., São Paulo, Brasil. Neste trabalho, foi utilizado na concentração de 0,4mM.

### 2.2. Teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

#### 2.2.1 Linhagens estoque, cruzamentos e tratamento

Foram utilizadas três linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*, portadoras dos marcadores genéticos *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3), *flare-3* (*flr<sup>3</sup>*, 3-38,8) e *ORR; flare-3* (*ORR; flr<sup>3</sup>*).

Os estoques destas linhagens são mantidos em incubadora B.O.D. - 411D NOVA ÉTICA à temperatura de aproximadamente 25° C, com 60% de umidade, em frascos de 250 mL contendo um meio preparado com 820 mL de água, 11g de ágar, 156 g de banana, 1 g de nipagim e 25 g de fermento biológico (*Sacharomyces cerevisiae*).

Foram realizados dois tipos de cruzamentos: (1) Cruzamento padrão (*ST- Standard Cross*) em que fêmeas virgens *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM*, *ri p<sup>p</sup> sepl(3)89Aa bx<sup>34e</sup>* e *Bd<sup>s</sup>* são cruzadas com machos *mwh/mwh* e (2) Cruzamento de alta

biotivação (*HB - High Bioactivation Cross*"), onde fêmeas virgens *ORR; flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM, ri p<sup>o</sup> sepl(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>s</sup>* são cruzadas com machos *mwh/mwh*.

De ambos os cruzamentos foram obtidos dois tipos de descendentes: marcador trans-heterozigoto (MH) com genótipo (*mwh +/+ flr<sup>3</sup>*) - asas fenotipicamente do tipo selvagem e, balanceador heterozigoto (BH) com genótipo (*mwh +/+ TM3 Bd<sup>s</sup>*) - asas fenotipicamente do tipo serrilhada. As larvas, de ambos os genótipos, emergentes destes cruzamentos, foram tratadas com diferentes concentrações do agente químico testado.

A postura dos ovos foi realizada por um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (4% de ágar em água) e uma camada de fermento (*S. cerevisae*) suplementado com açúcar. Após 72 +/- 4 horas, as larvas de 3<sup>o</sup> instar foram lavadas em água Osmostose Reversa-GEHAKA e coletadas com auxílio de uma peneira de aço de malha fina.

Grupos de aproximadamente 100 larvas foram transferidos para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) contendo 1,5 g de meio de cultura de purê de batatas instantâneo (HIKARI<sup>®</sup>) e 5,0 mL de diferentes concentrações do agente a ser testado. As moscas adultas emergentes foram coletadas e conservadas em etanol 70%.

Larvas de 72 horas de idade, provenientes dos cruzamentos ST e HB foram submetidas a um tratamento crônico de aproximadamente 48 horas, com três diferentes concentrações de Panto: 2,5µM; 5,0 µM ou 10,0 µM, em seguida, estas passaram para o estágio de pulpa. Foi utilizada H<sub>2</sub>O (osmose reversa) como solvente e controle negativo e doxorrubicina (DXR 0,4mM) como controle positivo.

### 2.2.2 Preparação e análise microscópica das asas

As asas das moscas adultas, preservadas em etanol 70%, foram retiradas com o auxílio de pinças entomológicas e microscópio estereoscópico, embebidas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 1,5 g de hidrato de cloral e 50 mL de água destilada) e distendidas sobre uma lâmina seca e codificada. Em seguida, as lâminas secaram por

aproximadamente 2 horas sobre placa aquecedora (40°C). No final, procedeu-se a montagem com lamínula e deixou-se secar.

A análise das asas foi realizada em microscópio óptico de luz, com aumento de 400X (objetiva 40x). Foram registrados o número, os tipos (simples ou gêmeas) a posição e o tamanho das manchas. Aproximadamente 24.800 células foram analisadas por asa.

### 2.2.3 Análise estatística

A análise estatística do experimento, foi realizada por meio do teste qui quadrado ( $X^2$ ) descrito por Frei e Würgler (1988). O teste não paramétrico *U* de Mann, Whitney e Wilcoxon foi utilizado para excluir resultados falsos positivos. Para a análise de antimutagenicidade, as frequências de cada tipo de mancha foram comparadas aos pares, usando o teste *U* (Frei e Würgler, 1995), ao nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

Esta análise propicia o alcance dos objetivos propostos e elucida a ação que o Panto exerce sobre o organismo testado, que é possuidor de um sistema enzimático e genético semelhante ao ser humano.

## 3. Resultados e Discussão

O Pantoprazol foi escolhido para este teste pelo fato de ser um fármaco muito usado como co-medicação por pacientes em quimioterapia, entretanto, apesar de largamente utilizado, os efeitos de seu uso a longo prazo ainda são desconhecidos. Poucos são os relatos bibliográficos sobre os possíveis efeitos mutagênicos associados ao seu uso prolongado.

Neste estudo foram analisadas cerca de 24.800 células em cada asa de *D. melanogaster* e a análise estatística forneceu os dados apresentados nas tabelas, referentes as frequências de manchas mutantes: manchas simples pequenas (MSP), manchas simples grandes (MSG), manchas gêmeas (MG) e total de manchas (TM). As tabelas informam ainda a frequência de indução de manchas ( $10^5$ ) sem correção e corrigida pelo controle.

A Tabela 1 apresenta os resultados das frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH e BH do cruzamento padrão (ST), tratados com o Panto em três diferentes concentrações (2,5; 5,0 ou 10,0), e o controle positivo (DXR 0,4mM) e negativo (H<sub>2</sub>O osmose reversa). Enquanto que a Tabela 2 apresenta os resultados das frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH e BH do cruzamento HB, tratados com o Panto nas mesmas concentrações anteriormente mencionadas, e controle positivo e negativo.

Quando comparado com o controle negativo, o Panto aumentou significativamente a frequência de manchas simples pequenas em todas as concentrações, enquanto que o total de manchas só foi estatisticamente significativo nas concentrações 2,5 e 5,0 µM. Por essa razão também foram analisados os descendentes BH a fim de analisar as taxas reais de mutação e recombinação, não encontrando nenhum resultado significativo. Diante de tais resultados pode-se afirmar que o Panto é um fármaco mutagênico direto, pois desencadeou aumento expressivo de manchas no cruzamento ST.

No cruzamento HB, ao se avaliar o seu potencial mutagênico (Tabela 2), o total de manchas dos descendentes MH, comparado com o controle negativo, apresentou aumento significativo em todas as concentrações, sendo assim procedeu-se a análise dos descendentes BH, apresentando efeito recombinogênico em todas as concentrações do composto analisado. Ao se analisar as asas dos indivíduos BH (*mwh/TM3*), é possível separar a taxa de eventos recombinogênicos da taxa de eventos mutagênicos, uma vez que os eventos do tipo recombinação são letais e portanto inviáveis nas células das moscas com este genótipo.

Kuipers (2006) cita que o uso prolongado de IBP's pode estar relacionado ao desenvolvimento de câncer gástrico. Sabe-se que o tratamento com IBP's não protege contra este tipo de câncer, mas, quanto ao aumento do risco de seu desenvolvimento, devido ao seu uso prolongado, ainda permanece desconhecido.

Em pessoas com diagnóstico negativo para *H. pylori* em que não pré-existia gastrite, os IBP's não causaram gastrite crônica. Em contrapartida, pessoas com infecção por *H. pylori* possuem um quadro clínico de gastrites crônicas persistentes, atrofia e metaplasia, podendo evoluir para atrofia

gástrica, metaplasia intestinal ou câncer gástrico. O uso de IBP's no tratamento dessa infecção podem causar a progressão ou a aceleração do desenvolvimento da gastrite (THOMSON *et al.*, 2010). Até o momento não existem provas de que os IBP's aumentam o risco de câncer gástrico. Entretanto, atrofia e gastrites persistentes predominantes no corpo são considerados fatores de risco importantes para o desenvolvimento de câncer gástrico, porém mais estudos ainda são necessários para se chegar a uma conclusão definitiva (KUIPERS, 2006).

É importante ressaltar que os ensaios para avaliação mutagênica são limitados para detectar efeitos mutagênicos, mas nem toda alteração no material genético é uma mutação, isso torna o SMART uma importante ferramenta de avaliação mutagênica, pois permite a avaliação não apenas de eventos mutacionais como também de eventos recombinogênicos como foi mostrado neste trabalho.

É sabido que uma substância causadora de danos ao DNA é também indutora de recombinação, o que gera mais danos ao DNA (Hoffman, 1994). A recombinação pode promover perda da heterozigose em células somáticas e germinativas, o que pode influenciar na progressão do câncer (Happle, 1999).

Muitos compostos são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas, compostas principalmente pelas enzimas do Citocromo P450 (CYP450). Dessa forma, através da introdução de um ou mais grupamentos hidroxila no substrato, um pró carcinógeno pode se tornar um carcinógeno (Gregory, 1986).

Estudos recentes tem mostrado que a recombinação homóloga é um dos principais processos de alteração genética (Andrade; Lehmann, 2003; Erdtmann, 2003). A recombinação homóloga consiste num mecanismo de reparo errôneo no DNA que pode levar a perda de heterozigose ou rearranjos genéticos e é crucial no desenvolvimento de inúmeras doenças genéticas, dentre elas o câncer (Sinigaglia *et al.*, 2004).

Resultados semelhantes aos aqui apresentados também foram encontrados no trabalho de Brambilla *et al.* (2010), em que foram analisados os efeitos genotóxicos e carcinogênicos de 71 drogas gastrointestinais. Os autores

demonstraram que o Panto foi genotóxico em vários dos testes realizados, além de causar danos cromossômicos.

Estes resultados estão consistentes com os apresentados neste artigo uma vez que o Panto aumentou a frequência de manchas nas células somáticas revelando ser mutagênico direto, induzindo elevadas taxas de mutações, evento este que não ocorre nas células tumorais. A genotoxicidade de uma determinada substância não é causada exclusivamente por mutação, mas também através de recombinação que também pode causar danos cromossômicos.

A Tabela 3 mostra a frequência padronizada de indução de clones *mwh* por mg/mL de concentração de exposição e a prevalência de eventos recombinacionais. Estes dados mostram que o Panto produziu 0,27 clones *mwh* por  $10^5$  por mg/mL para os descendentes MH e 0,09 para os descendentes BH, a partir de tais resultados pode-se concluir que o Panto é um agente genotóxico, porém, fraco genotóxico. Esta tabela também mostra o valor de 67% de clones mutantes induzidos pelo Panto através de recombinação mitótica, este resultado mostra que aproximadamente 70% da frequência de danos ao DNA está associada a eventos recombinogênicos, sugerindo que o Panto pode causar instabilidade genômica.

A Tabela 4 apresenta os resultados das frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH do cruzamento ST, tratados com Panto em três diferentes concentrações (2,5; 5,0 ou 10,0  $\mu$ M), associados com DXR 0,4mM.

Quando associado com DXR, o Panto reduziu a frequência de MSP em todas as concentrações, mostrando efeito modulador da DXR. Houve diminuição na frequência de manchas tanto em MSP quanto MSG e TM, sendo que, apenas na concentração de 5,0  $\mu$ M foi estatisticamente significativa.

Ao se avaliar a antimutagenicidade (Tabela 5), não foi encontrado resultado estatisticamente significativo em nenhuma das três concentrações nas categorias MSP e MSG. Embora tenha havido uma leve diminuição na frequência das manchas em MSP e leve aumento em MSG e TM, não foram estatisticamente significativos em nenhuma concentração, por esta razão os descendentes BH não foram analisados. Entretanto, os resultados encontrados para manchas gêmeas foram estatisticamente significativos nas três

concentrações, revelando efeito potencializador da ação recombinogênica da DXR.

Com base nestes resultados, pode-se supor que o Panto possui efeito modulador dos efeitos mutagênicos da DXR. Contudo, não pode ser explicada com exatidão no presente trabalho, visto que o teste aqui realizado não dá embasamento para se entender essa interação.

Uma possível explicação para esta redução de manchas seria uma ação apoptótica do Panto, verificada em outros estudos. Em um estudo realizado por Marie *et al.* (2004) foi detectado que o Panto provoca, seletivamente, apoptose de células gástricas tumorais e clivagem do DNA, além de alterações na permeabilidade das membranas apenas das células tumorais, revelando que o Panto induz uma resposta apoptótica seletiva talvez por suprimir as quinases de regulação extracelular e por estimular a fosforilação da p38 apenas em células tumorais.

Chen *et al.* (2012) obtiveram resultados semelhantes ao avaliar a citotoxicidade do Panto em um adenocarcinoma gástrico. Neste experimento, foi verificado que o fármaco potencializa os efeitos citotóxicos dos quimioterápicos além de superar a quimiorresistência celular, revelando um possível papel crucial no tratamento do câncer.

Outra explicação para a redução de manchas na associação DXR e Panto, seria pela inibição do complexo enzimático citocromo P450 (CYP450). Li *et al.* (2004) em seus estudos, verificaram que o Panto é um forte inibidor do complexo enzimático CYP450, e revelou um potencial de interação com outras drogas, principalmente metabolizadas pelo CYP450. Sabe-se que a DXR é um dos principais substratos do CYP450 e que interage de maneira significativa com os inibidores dessa enzima (ADRIBLASTINA, 2011).

O Panto se comporta como um inibidor competitivo de CYP2C19, enzima que também está envolvida no metabolismo da DXR, interferindo assim no metabolismo e na eliminação desta droga, por inibição das funções desta oxidase, ocasionando numa redução do metabolismo de ambas as drogas. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Andersson *et al.* (1990) em que foram avaliados os efeitos do tratamento com Omeprazol sobre os níveis plasmáticos de Diazepam, verificando que o Omeprazol reduziu de maneira significativa a velocidade do metabolismo do Diazepam.

Estes resultados encontram-se em acordo com os apresentados neste trabalho uma vez que o Panto, associado a DXR também reduziu a frequência de manchas, mostrando ação moduladora dos efeitos citotóxicos do quimioterápico. O fármaco interferiu de maneira significativa na ativação do CYP450 podendo assim ter agido como um agente potencializador dos efeitos recombinogênicos da DXR por inibição parcial de sua via metabólica, Esta forte atividade recombinogênica da DXR em células somáticas de *D. melanogaster* já havia sido descrita por Lehmann *et al.* (2003), Costa e Nepomuceno (2006), Fragiorge *et al.* (2007), Castro *et al.* (2008) e Dutra *et al.* (2009).

**Tabela 1** - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão, tratados com diferentes concentrações de Pantoprazol.

Genótipos e Conc. ( mM )	N. de Indiv. ( N )	Manchas por indivíduo ( no. de manchas ) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total manchas mwh <sup>c</sup> ( n )	Média das classes de tam. clones mwh <sup>c,d</sup> ( $\hat{i}$ )	Frequência de indução de manchas (por 10 <sup>5</sup> células por divisão celular) <sup>f</sup>	
		MSP	MSG	MG	TM			S/ correção por tam. <sup>d,e</sup>	C/ correção por tam. <sup>d,e</sup>
		(1-2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 2	(>2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 5	<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 2			<i>n</i> /NC	(2 <sup><i>i</i>-2</sup> ) X ( <i>n</i> /NC)
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>									
Contr. Neg.	50	0,36 (18)	0,06 (3)	0,00 (0)	0,42 (21)	20	1,75	0,82	0,69
DXR 0,4 mM	50	4,90 (245) +	5,92 (296) +	3,30 (165) +	14,12 (706) +	674	3,29 {3,34}	27,62 {26,80}	67,72 {67,90}
Panto 2,5 uM/mL	50	0,90 (45) +	0,08 (4) i	0,02 (1) i	1,00 (50) +	50	1,56 {1,43}	2,05 {1,23}	1,51 {0,83}
Panto 5,0 uM/mL	50	0,82 (41) +	0,08 (4) i	0,04 (2) i	0,94 (47) +	47	1,62 {1,52}	1,93 {1,11}	1,48 {0,79}
Panto 10,0 uM/mL	50	0,66 (33) +	0,02 (1) i	0,00 (0) i	0,68 (34) i	34	1,44 {1,00}	1,39 {0,57}	0,95 {0,29}
<i>mwh/TM3</i>									
Contr. Neg.	20	0,35 (7)	0,00 (0)	<sup>ne</sup>	0,35 (7)	7	1,71	0,72	0,59
DXR 0,4mM	20	0,75 (15) i	0,10 (2) i		0,85 (17) +	17	1,71 {1,70}	1,74 {1,02}	1,42 {0,83}
Panto 2,5 uM/mL	20	0,45 (9) i	0,05 (1) i		0,50 (10) i	10	1,50 {1,00}	1,02 {0,31}	0,72 {0,15}
Panto 5,0 uM/mL	20	0,45 (9) i	0,05 (1) i		0,50 (10) i	10	1,70 {1,67}	1,02 {0,31}	0,83 {0,24}

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ .

<sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

<sup>c</sup>Considerando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

<sup>d</sup>Números entre chaves são as frequências de indução corrigidas em relação a incidência espontânea estimada do controle negativo.

<sup>e</sup>*C* = 48.000, isto é, número aproximado de células examinadas por indivíduo.

<sup>f</sup>Calculado de acordo com Frei et al. (1992).

<sup>g</sup>Apenas manchas simples mwh podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr<sup>3</sup>*.

**Tabela 2** - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento de alta bioativação, tratados com diferentes concentrações de Pantoprazol.

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo ( no. de manchas ) diag. estatístico <sup>a</sup>								Total manchas mwh <sup>c</sup> (n)	Média das classes de tam. clones mwh <sup>c,d</sup> (î)	Frequência de indução de manchas (por 10 <sup>5</sup> células por divisão celular) <sup>f</sup>			
		MSP (1-2 céls) <sup>b</sup>		MSG (>2 céls) <sup>b</sup>		MG (m = 5)		TM (m = 2)				S/ correção por tam. <sup>d,e</sup> (n/NC)	C/ correção por tam. <sup>d,e</sup> (2 <sup>i-2</sup> ) X (n/NC)		
		m = 2	m = 5	m = 5	m = 2										
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>															
Contr. Neg.	50	1,26 (63)	0,12 (6)	0,02 (1)		1,40 (70)			70	1,57	2,87	2,13			
DXR 0,4mM	50	2,74 (137) +	1,28 (64) +	0,42 (21) +		4,44 (222) +			216	2,72 {3,27}	8,85 {5,98}	14,56 {14,40}			
Panto 2,5 uM/mL	50	2,26 (113) +	0,14 (7) i	0,00 (0) i		2,40 (120) +			120	1,48 {1,34}	4,92 {2,05}	3,42 {1,30}			
Panto 5,0 uM/mL	50	1,90 (95) f+	0,10 (5) i	0,02 (1) i		2,02 (101) f+			100	1,43 {1,10}	4,10 {1,23}	2,76 {0,66}			
Panto 10,0 uM/mL	50	1,96 (98) +	0,14 (7) i	0,02 (1) i		2,12 (106) f+			106	1,51 {1,39}	4,34 {1,48}	3,09 {0,97}			
<i>mwh/TM3</i>															
Contr. Neg.	20	0,95 (19)	0,05 (1)		<sup>g</sup>	1,00 (20)			20	1,25	2,05	1,22			
DXR 0,4mM	20	1,10 (22) i	0,05 (1) i			1,15 (23) -			23	1,35 {2,00}	2,36 {0,31}	1,50 {0,31}			
Panto 2,5 uM/mL	20	0,75 (15) -	0,00 (0) i			0,75 (15) -			15	1,13 {1,60}	1,54 -{0,51}	0,84 -{0,39}			
Panto 5,0 uM/mL	20	0,70 (14) -	0,05 (1) i			0,75 (15) -			15	1,47 {0,60}	1,54 -{0,51}	1,06 -{0,19}			
Panto 10,0 uM/mL	20	0,70 (14) -	0,05 (1) i			0,75 (15) -			15	1,20 {1,40}	1,54 -{0,51}	0,88 -{0,34}			

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ .

<sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

<sup>c</sup>Considerando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

<sup>d</sup>Números entre chaves são as frequências de indução corrigidas em relação a incidência espontânea estimada do controle negativo.

<sup>e</sup> $C = 48.000$ , isto é, número aproximado de células examinadas por indivíduo.

<sup>f</sup>Calculado de acordo com Frei et al. (1992).

<sup>g</sup>Apenas manchas simples mwh podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr<sup>3</sup>*.

**Tabela 3 - Frequência padronizada de indução de clones *mwh* por mg/mL de concentração de exposição e a prevalência de eventos recombinacionais**

Compostos	Heterozigotos para os marcadores <i>mwh/flr</i> <sup>3</sup>			Trans-heterozigotos <i>mwh/TM3</i>			Recombinação (%)			
	Frequência padronizada <sup>b</sup> (clones <i>mwh</i> por 10 <sup>5</sup> céls. por mL)	Média da classe de tamanho dos clones <sup>c</sup>	Média geométrica de tamanho dos clones <sup>c</sup> (células)	Frequência padronizada (clones <i>mwh</i> por 10 <sup>5</sup> céls. por mM)	Frequência padronizada <sup>b</sup> (clones <i>mwh</i> por 10 <sup>5</sup> céls. por mM)	Média da classe de tamanho dos clones <sup>c</sup>	Média geométrica de tamanho dos clones <sup>c</sup> (células)	Frequência padronizada (clones <i>mwh</i> por 10 <sup>5</sup> céls. corrigida p/ tam. dos clones <sup>d</sup> )	Sem correção por tamanho de clone	Com correção por tamanho de clone <sup>d</sup>
	$(f_i)$	$(\hat{i}_i)$	$(2^{i-1})$	$(f'_i = 2^{i-2} \times f_i)$	$(f_h)$	$(\hat{i}_h)$	$(2^{h-1})$	$(f'_h = 2^{h-2} \times f_h)$	$(1 - f_h/f_i) \times 100$	$(1 - f'_h/f'_i) \times 100$
Pantoprazol	0,27	1,29	1,23	0,17	0,09	1,20	1,15	0,05	66,86	69,95

<sup>a</sup>Todos os valores são corrigidos pelo controle. As frequências nas moscas heterozigotas para os marcadores *mwh/flr*<sup>3</sup> são calculadas com e sem correção para o tamanho dos clones;

por conseguinte, estimativas um pouco diferentes são obtidas para as contribuições relativas de recombinação para os totais de clones induzidos.

<sup>b</sup>As frequências de clones por indivíduo divididas pelo número de células examinadas por indivíduo (48 800) dão uma estimativa das frequências por célula e por divisão celular em experimentos de exposição crônica (Frei e Würzler, 1988)

<sup>c</sup>A média geométrica e as <sup>d</sup>correções foram calculadas de acordo com Frei *et al.* (1992).

**Tabela 4 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão, tratados com diferentes concentrações de Pantoprazol associadas com DXR (0,4mM).**

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo ( no. de manchas ) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total manchas mwh <sup>c</sup> (n)	Média das classes de clones mwh <sup>c,d</sup> (i)	Frequência de indução de manchas (por 10 <sup>5</sup> células por divisão celular) <sup>f</sup>	
		MSP (1-2 céls) <sup>b</sup>	MSG (>2 céls) <sup>b</sup>	MG (m = 5)	TM (m = 2)			S/ correção por tam. <sup>d,e</sup> (n/NC)	C/ correção por tam. <sup>d,e</sup> (2 <sup>i-2</sup> ) X (n/NC)
		m = 2	m = 5	m = 5	m = 2				
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>									
Contr. Neg.	50	0,36 (18)	0,06 (3)	0,00 (0)	0,42 (21)	20	1,75	0,82	0,69
DXR 0,4mM	50	4,90 (245) +	5,92 (296) +	3,30 (165) +	14,12 (706) +	674	3,29 {3,34}	27,62 {26,80}	67,72 {67,90}
Panto 2,5 uM/mL + DXR	50	3,08 (154) f+	5,42 (271) -	4,04 (202) -	12,54 (627) -	608	3,61 {3,67}	24,92 {24,10}	75,90 {76,69}
Panto 5,0 uM/mL + DXR	50	2,30 (115) +	4,26 (213) f+	3,16 (158) -	9,72 (486) f+	456	3,77 {3,86}	18,69 {17,87}	63,53 {64,77}
Panto 10,0 uM/mL + DXR	50	3,56 (178) f+	5,14 (257) -	4,20 (210) f+	12,90 (645) -	628	3,31 {3,36}	25,74 {24,92}	63,70 {63,90}
<i>mwh/TM3</i>									
Contr. Neg.	20	0,35 (7)	0,00 (0)	<sup>g</sup>	0,35 (7)	7	1,71	0,72	0,59
DXR 0,4mM	20	0,75 (15) i	0,10 (2) i		0,85 (17) +	17	1,71 {1,70}	1,74 {1,02}	1,42 {0,83}
Panto 5,0 uM/mL + DXR	20	0,65 (13) i	0,30 (6) i		0,95 (19) i	19	2,32 {2,67}	1,95 {1,23}	2,42 {1,95}

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ .

<sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

<sup>c</sup>Considerando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

<sup>d</sup>Números entre chaves são as frequências de indução corrigidas em relação a incidência espontânea estimada do controle negativo.

<sup>e</sup>C = 48.000, isto é, número aproximado de células examinadas por indivíduo.

<sup>f</sup>Calculado de acordo com Frei et al. (1992).

<sup>g</sup>Apenas manchas simples mwh podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr<sup>3</sup>*.

**Tabela 5** - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento de alta bioativação, tratados com diferentes concentrações de Pantoprazol associadas com DXR (0,4mM).

Tratamentos	N. de	Manchas por indivíduo ( no. de manchas ) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total manchas	Média das classes de tam.	Frequência de indução de manchas	
	Indiv.	MSP	MSG	MG	TM			(por 10 <sup>5</sup> células por divisão celular) <sup>f</sup>	
	( N )	(1-2 céls) <sup>b</sup>	(>2 céls) <sup>b</sup>	m = 5	m = 2			S/ correção por tam. <sup>d,e</sup>	C/ correção por tam. <sup>d,e</sup>
		m = 2	m = 5			( n )	( i )	n/NC	(2 <sup>i-2</sup> ) X (n/NC)
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>									
Contr. Neg.	50	1,26 (63)	0,12 (6)	0,02 (1)	1,40 (70)	70	1,57	2,87	2,13
DXR 0,4mM	50	2,74 (137) +	1,28 (64) +	0,42 (21) +	4,44 (222) +	216	2,72 {3,27}	8,85 {5,98}	14,56 {14,40}
Panto 2,5 uM + DXR	50	2,28 (114) -	1,56 (78) -	0,90 (45) +	4,74 (237) -	229	3,15 {3,85}	9,39 {6,52}	20,87 {23,48}
Panto 5,0 uM + DXR	50	2,42 (121) -	2,42 (121) -	1,28 (64) +	6,12 (306) -	299	3,44 {4,01}	12,25 {9,39}	33,20 {37,77}
Panto 10,0 uM + DXR	50	2,46 (123) -	2,48 (124) -	1,24 (62) +	6,18 (309) -	297	3,57 {4,18}	12,17 {9,30}	36,03 {42,18}

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância a = b = 0,05.

<sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

<sup>c</sup>Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

<sup>d</sup>Números entre chaves são as frequências de indução corrigidas em relação a incidência espontânea estimada do controle negativo.

<sup>e</sup>C = 48.000, isto é, número aproximado de células examinadas por indivíduo.

<sup>f</sup>Calculado de acordo com Frei et al. (1992).

<sup>g</sup>Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr<sup>3</sup>*.

#### **4. Considerações Finais**

Sendo assim, nas condições experimentais delineadas neste estudo, pode-se afirmar que o Pantoprazol é um fármaco mutagênico, além de ser um agente modulador dos efeitos da Doxorubicina. Há de se ressaltar ainda os acentuados efeitos recombinogênicos em células somáticas de *D. melanogaster*. Na literatura atual não se encontram relatos claros de que o Pantoprazol possui efeitos recombinogênicos, por esta razão estudos mais detalhados ainda precisam ser realizados para se elucidar o potencial recombinogênico deste pró-fármaco.

## 5. Referências

- ADRIBLASTINA<sup>®</sup>, Pó Liofilizado, Farmacêutico Responsável: Dr. José Cláudio Bumerad, Actavis Italy S.p.A. Milão, 2011, Bula de Remédio.
- ANDERSSON, T. *et al.*; Effect of omeprazole treatment on diazepam plasma levels in slow versus normal rapid metabolizers of omeprazole. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 47, p.79-85, 1990.
- ANDRADE, H.H.R., LEHMANN, M.; Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster*. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. (Eds.), **Mutagênese ambiental**. Canoas, Ulbra, 471, p. 281–307, 2003.
- BRAMBILLA, G., MATTIOLI, F., MARTELLI, A.; Genotoxic and carcinogenic effects of gastrointestinal drugs. **Mutagenesis**. v.25, n.4, p.315–326, 2010.
- CASTRO, A. J. S., GRISÓLIA, C. K., ARAÚJO, B. C., DIAS, C. D., DUTRA, E. S. NEPOMUCENO, J. C.; Recombinogenic effects of the aqueous extract of pulp from pequi fruit (*Caryocar brasiliense Camb*) on somatic cells of *Drosophila melanogaster*; **Genet. Mol. Biol.** v.7 p.1375-1383, 2008.
- CHEN, M., *et al.*; Reversal effects of pantoprazole on multidrug resistance in human gastric adenocarcinoma cells by down-regulating the V-ATPases/mTOR/HIF-1 $\alpha$ /P-gp and MRP1 signaling pathway *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Cellular Biochemistry**. 2012.
- COSTA, W.F., NEPOMUCENO, J.C.; Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 47, p. 18-24, 2006.
- DUTRA, E. S., CASTRO, J. C., DIAS, C. D., NEPOMUCENO, J. C.; Effect of organic tomato (*Lycopersicon esculentum*) extract on the genotoxicity of doxorubicin in the *Drosophila* wing spot test (SMART); **Genet. Mol. Biol.** v.32, p.134-152, 2009.

ERDTMANN, B., A genotoxicidade nossa de cada dia. In: SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. (Eds.), **Genética Toxicológica**. Porto Alegre, Alcance, pp. 23–48, 2003.

FRAGIORGE, E. J., SPANÓ, M. A., ANTUNES, L. M. G.; Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*; **Genet. Mol. Biol.** v.30, p.449-455, 2007.

FINN. N.A., FINDLEY. H.W., KEMP. M.L.; A Switching Mechanism in Doxorubicin Bioactivation Can Be Exploited to Control Doxorubicin Toxicity. **PLoS Computational Biology**. v.7, n. 9, 2011.

FREI, H., CLEMENTS, J., HOWE, D., WÜRGLER, F.E., The genotoxicity of the anticancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.**, v. 279, p. 21–33, 1992.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. **Mutat. Res.**, v. 334, p. 247-258, 1995.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutat. Res.**, v. 203, p.297-308, 1988.

GILMAN, A. G., LIMBIRD, F.E; **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Press, 1996. 1671 p.

GRAF, U; WÜRGLER F.E; KATZ, A. J; FREI, H; HALL, C. B; KALE, P.B. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environ mutagen**, v.6, p. 153-188, 1984.

GREGORY, P. Azo dyes: Structure Carcinogenicity Relationships. Dyes and Pigments. **Applied Science Publishers**, n.7, p.45-56, 1986.

HAPPE, R.; Loss of heterozygosity in the human skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 41, p. 143-164, 1999.

HOFFMAN, G. R.; Induction of genetic recombination: consequences and model systems. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v.24, p.59-66, 1994.

KATZUNG, B.G. Farmacologia Básica e Clínica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 855p.

KUIPERS, E J.; Proton pump inhibitors and gastric neoplasia. **Gut**, n.55, 1217–1221, 2006.

LEHMANN, M., FRANCO, A., VILAR, K. S. P., REGULY, M. L., ANDRADE, H. H. R .; Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*; **Mutation Res.** v.539, p.167-175, 2003.

LI, X., *et al.*; Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome p450 activities. **Drug Metabolism and Disposition**. v.32, n.8, p.821–827, 2004.

MARIE, Y., *et al.*; Selective Induction of Apoptosis with Proton Pump Inhibitor in Gastric Cancer Cells. **Clin Cancer Res.** v.10, p. 8687-8696, 2004.

MASUBUCHI, N; OKAZAKI, O. An evaluation of CYP1A induction potential of pantoprazole in primary rat hepatocytes: a comparison with other proton pump inhibitors. **Chemico-Biological Interactions**, v.107, p.63-74, 1999.

MATHEWS S. REID, A., TIAN, C., CAI, Q.; An update on the use of pantoprazole as a treatment for gastroesophageal reflux disease. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, n. 3, 11–16, 2010.

MCDONAGH, M. S; CARSON S; THAKURTA S.; **Drug Class Review Proton Pump Inhibitors**. 5.ed. Oregon: Oregon Health & Science University, 2009.

PANTOLOC<sup>†</sup> (Pantoprazole sodium) 20 and 40 mg Enteric-Coated Tablet. **The Canadian Journal of Gastroenterology**, Banff, v17, sn, 2003.

RAFFIN, R. P., COLOMÉ, M., GUTERRES, S. S.; Validation of analytical methodology by hplc for quantification and stability evaluation of sodium pantoprazole. **Quim. Nova**, v.30, n.4, 1001-1005, 2007.

SAUTER, K. A.D., MAGUN, E. A., IORDANOV, M. S. MAGUN, B. E.; ZAK is required for doxorubicin, a novel ribotoxic stressor, to induce SAPK activation and apoptosis in HaCaT cells. **Cancer Biology & Therapy**. v.10, n.3, 258 – 266, 2010.

SILVA, P. Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 845p.

SINIGAGLIA, M., REGULY, M.L., ANDRADE, H.H.R., Effect of vanillin ontotoxicant-induced mutation and mitotic recombination in proliferating somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mol. Mutagen**. v.44, 394–400, 2004.

SOUZA, I. K. F., *et al*; Estudo histológico e computadorizado das áreas com células parietais e principais no estômago de ratos wistar tratados com pantoprazol e “n-nitroso-n-methylurea”(NMU). **Acta Cir Bras**. v.17, n.4, 2002.

STUPNICKI, T., DIETRICH, K. GONZALES, C. P.; Efficacy and tolerability of pantoprazole compared with misoprostol for the prevention of NSAID-related gastrointestinal lesions and symptoms in rheumatic patients. **Digestion**, n.70, p.61–69, 2004.

THOMSON, A. B. R., SAUVE, M. D., KASSAM, N., KAMITAKAHARA, H.; Safety of the long-term use of proton pump inhibitors. **World J. Gastroenterol**. v.16, n.19, p. 2323-2330, 2010.

VISHVAKARMA, N.K.; SINGH, S.M.; Augmentation of myelopoiesis in a murine host bearing a T cell lymphoma following in vivo administration of proton pump inhibitor pantoprazole. **Biochimie**, n.93, p.1786-1796, 2011.

YEO, M., KIM, D. K., PARK, H. J., CHO, S. W., CHEONG, J. Y., LEE, K. J; Retraction: Blockage of intracellular proton extrusion with proton pump

inhibitor induces apoptosis in gastric cancer. **Cancer Sci**, v. 99, n.01, p. 185-192, 2008.