Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

RENATO CORRÊA NOGUEIRA

**Mecanismos envolvidos no remodelamento vascular
promovido pelo tratamento com omeprazol**

Ribeirão Preto - SP

2019

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia**

RENATO CORRÊA NOGUEIRA

**Mecanismos envolvidos no remodelamento vascular
promovido pelo tratamento com omeprazol**

Ribeirão Preto - SP

2019

RENATO CORRÊA NOGUEIRA

**Mecanismos envolvidos no remodelamento vascular
promovido pelo tratamento com omeprazol**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos
Santos

Ribeirão Preto - SP

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Nogueira, Renato Correa

O omeprazol causa remodelamento vascular via xantina oxidoreductase com participação de metaloproteinases de matriz. Renato Corrêa Nogueira; Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos. Ribeirão Preto, 2019. 69f.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Omeprazol 2. Xantina Oxidoreductase 3. Metaloproteinases de Matriz 4. Alopurinol 5. Remodelamento Vascular

*Dedico este trabalho ao meu pai,
minha mãe e meu irmão, que são
meus maiores incentivadores e
sonham meus sonhos comigo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora de Nazaré, que nunca deixaram de iluminar meu caminho, sempre me concederam grandes oportunidades e conquistas e me ajudaram em todos os momentos.

Agradeço aos meus pais, Juracy e Nilza, que são meus guias e orientadores na vida, e desde cedo priorizaram o bem-estar e qualidade de vida dos filhos, acima de muitas necessidades próprias. Obrigado por nunca me deixarem e por me apoiarem para tudo, lhes amo com o maior e mais puro amor do mundo. Ao meu irmão, toda a minha gratidão, por compartilhar tudo desde sempre, pela parceria de gêmeos, e por tudo o que já passamos juntos, nos piores e melhores momentos. Muito obrigado pela oportunidade de crescer junto de ti, eu te amo, mano. Aos meus primos, Adriane e Alexandre, que são mais meus irmãos do que primos, obrigado pelos melhores momentos da infância e pela amizade até hoje. Aos meus tios Reinaldo, Reginaldo, Lúcia, Maria José e Marilda, pela diversão que é ser sobrinho de vocês e por todo o amor. Às minhas avós, Benedita e Zizi que são minhas segundas mães e sempre se fizeram presentes como tais. Ao meu avô Arlindo por ter sido uma das melhores pessoas do mundo.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, pelo excelente profissional que é, pela orientação no trabalho e suporte nos momentos difíceis. Obrigado pela inspiração, por acreditar na minha capacidade e me impulsionar a ser melhor profissionalmente e pessoalmente.

Às amigas, Rose, Graziele e Indiara pela amizade que criamos e cultivamos. Vocês tornam os dias de trabalho mais leves e os dias de diversão mais engraçados. Aproveitar essa fase da vida com vocês está sendo um privilégio. Obrigado pelas ajudas no trabalho, pelas risadas, pelos conselhos, pelas orientações, pelas conversas e pela companhia.

À Sandra por ser uma luz na minha vida acadêmica e uma grande amiga na vida pessoal. Obrigado por todo o suporte que me foi dado no laboratório, por todos os ensinamentos, por toda a diversão quando trabalhamos juntos e principalmente, obrigado por não desistir de mim nos meus momentos desastrados.

Aos colaboradores do meu trabalho, Lucas, Jéssica, Juliana e Gustavo, por toda a ajuda na execução do trabalho, pela orientação e paciência. Obrigado por sanar as dúvidas, por todos os ensinamentos e discussões científicas. Agradeço

principalmente à minha amiga e parceira de protocolo, Jéssica, pela ajuda e companheirismo durante os tratamentos diários no biotério.

Aos amigos do laboratório, Evandro, Danielle, Tiago e Jefferson, obrigado pela convivência, por dividir da experiência científica de vocês e por me acolherem e ajudarem em tudo o que eu precisei. Agradeço especialmente ao Evandro por, em boa parte do meu primeiro ano de mestrado, se dedicar a me passar muitos ensinamentos, pelas oportunidades e colaborações, e por ser outro grande orientador para mim. Agradeço também a todos os outros membros do laboratório.

Aos colegas e funcionários do departamento de Farmacologia. Agradeço imensamente à Gislaine pelo trabalho dedicado ao programa da pós e por toda a ajuda e orientação com tudo o que eu precisei. Ao Ramon pelo trabalho e por todo suporte.

Aos amigos, Gabriela, Ana, Jean, Carol, Caio, Luciana, Ruan, Vinicius, Rafaela, Paulo, Lisandra, Lorena, Felype e Valter. Agradeço pela convivência, pela parceria de anos, por todos os momentos compartilhados, sejam bons ou ruins, e principalmente agradeço aos que mesmo na distância não permitem que os sentimentos mudem. A amizade de vocês é essencial na minha vida

Ao meu companheiro e melhor amigo, Higor, pela paciência comigo, pela parceria, por me impulsionar a crescer, pelos momentos tristes e felizes, nos quais sempre segurou a minha mão e pela importância que tens. Obrigado por me conceder os melhores anos da minha vida e por me fazer viver mil anos em tão pouco tempo. Sinto que do teu lado, alcanço qualquer infinito.

Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

“Aqueles que se sentem satisfeitos, sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo”.

Walter S. Landor

RESUMO

NOGUEIRA, R.C. **Mecanismos envolvidos no remodelamento vascular promovido pelo tratamento com omeprazol**. 2019. 69f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Existe uma relação entre o uso abrangente de inibidores da bomba de prótons (IBPs), como o omeprazol, e o aumento de risco cardiovascular. Essa relação está associada ao efeito dos IBPs de interferir na síntese e biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), um fator importante na homeostase vascular. Também foi evidenciado que o omeprazol causa disfunção endotelial junto a um desequilíbrio redox em aortas, mediado pela ativação da enzima xantina oxidoreductase (XOR), responsável pelo catabolismo das purinas e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO decorrentes da atividade da XOR, podem aumentar a expressão e a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs), principalmente a MMP-2, que são promotoras de remodelamento tecidual. Assim, nosso objetivo foi analisar se o omeprazol causa remodelamento vascular em aorta de ratos, frente ao seu efeito de aumento do estresse oxidativo via XOR promovendo ativação de MMPs. Foram utilizados ratos wistar com peso entre 180-200 g (n=40), separados em 4 grupos de tratamento onde cada animal foi tratado com 0,5 mL de solução das drogas nas seguintes especificações: o grupo Controle (C) foi tratado com solução veículo tween 2% (vol./vol.) 1 vez ao dia por gavagem, o grupo Alopurinol (A) recebeu uma solução deste inibidor de XOR por gavagem (50 mg/kg/dia), o grupo Omeprazol (O) que recebeu uma solução de omeprazol diluída em tween 2% por via intraperitoneal (10 mg/kg/dia) e por fim, o grupo Omeprazol+Alopurinol (O+A) que recebeu as duas drogas concomitantemente. O protocolo experimental durou 4 semanas, durante as quais foram realizadas aferições da pressão arterial sistólica por pletismografia de cauda. Ao fim do tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia, onde foi aferido o pH do lavado gástrico e foi coletada a aorta torácica para a análise de reatividade vascular, análise bioquímica de ERO, a análise morfométrica, e ensaio de atividade de MMPs. Não houve variação de pressão arterial em nenhum dos grupos. O tratamento com alopurinol não alterou nenhum dos parâmetros analisados em relação ao grupo controle neste estudo. O pH gástrico aumentou nos grupos tratados com omeprazol. Na reatividade vascular, observamos que o omeprazol

diminuiu o efeito máximo da resposta vasodilatadora dos anéis de aorta à acetilcolina, mas que o tratamento associado ao alopurinol (O+A) preveniu essa diminuição. Em relação ao pD₂, foi constatado que o tratamento com omeprazol resulta na diminuição da potência da acetilcolina em causar relaxamento vascular, e que a associação do tratamento com alopurinol, não foi capaz de prevenir essa diminuição. O grupo O também apresentou aumento de espécies reativas de oxigênio no leito vascular, observados no ensaio DHE e o tratamento com alopurinol preveniu este efeito. No ensaio de atividade gelatinolítica *in situ* observamos um aumento da atividade de MMPs no grupo O, e o tratamento com alopurinol também preveniu esse efeito. Na análise morfométrica observamos que o grupo O apresentou aumento dos parâmetros de remodelamento vascular, denotando um remodelamento hipertrófico, que foi prevenido pela associação com alopurinol. Com base nos resultados, é possível concluir que o tratamento com omeprazol causou remodelamento em aortas de ratos, e que esse efeito ocorreu paralelamente a outros prejuízos, como a diminuição da função vascular avaliada pela resposta à acetilcolina, aumento de espécies reativas de oxigênio e aumento de atividade de MMPs. Como todos esses efeitos resultantes do uso do omeprazol foram prevenidos pela associação do tratamento com alopurinol, é viável inferir que a XOR participe da via pela qual o omeprazol causa efeitos deletérios sobre a vasculatura.

Palavras-chave: Omeprazol, xantina oxidoreductase, metaloproteinases de matriz, alopurinol, remodelamento vascular.

ABSTRACT

NOGUEIRA, R.C. **Mechanisms involved in vascular remodeling promoted by treatment with omeprazole.** 2019. 69f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

There is a relationship between the use of proton pump inhibitors (PPIs), such as omeprazole, and the increase of cardiovascular risk. This relation is associated with the effect of PPIs on nitric oxide synthesis and bioavailability, which is an important factor to vascular homeostasis. It also clear that omeprazole causes endothelial dysfunction by mechanisms involving xanthine oxidoreductase (XOR) mediated redox imbalance in aortas, which is responsible for purines catabolism, and generates reactive oxygen species (ROS). ROS derived from XOR activity, may increase matrix metalloproteinases expression and activity, mainly MMP-2 that are promoters of tissue remodeling. Thus, our aim was to analyze if omeprazole entails vascular remodeling in rat's aorta, with its effect of causing oxidative stress via XOR, promoting MMPs activation. Male rats weighing between 180-200g (n=40) were assigned to 4 groups with different treatments, where each animal was treated with 0.5 mL of drug solution, following the specification per group: Control group (C) was treated with the vehicle tween 2% (vol./vol.) 1 time a day by gavage; Allopurinol group (A) that received a solution of this XOR inhibitor by gavage (50mg/kg/day), Omeprazole group (O) which was treated by intraperitoneal route with a solution of omeprazole diluted at tween 2% (10 mg/kg/day) and at last, the Omeprazole+Allopurinol group (O+A), that received both drugs concomitantly. The experimental protocol lasted 4 weeks, during which, were performed systolic blood pressure measurements by tail cuff plethysmography. By the end of treatments, the animals were submitted to euthanasia, then the pH of the gastric washing was measured, and the thoracic aorta was collected to study vascular reactivity, biochemical analysis of ROS, morphometric analysis and MMPs activity assay. There was no blood pressure variation in any of the treatment groups. Treatment with allopurinol did not alter any of the parameters that were analyzed in the present study, in comparison to control group. Gastric washing pH increased in groups treated with omeprazole. In vascular reactivity, it was noticed that omeprazole decreased the maximum effect of the aortic ring's vasodilator response to

acetylcholine, while the omeprazole treatment associated with allopurinol (O+A) prevented this decrease. Regarding to pD₂, it was observed that omeprazole treatment results in decreased acetylcholine potency to cause vascular relaxation, and the association to allopurinol treatment was not capable of preventing this decrease. The O group also presented increased reactive oxygen species levels in the vascular bed, according to DHE assay, and the treatment with allopurinol prevented this effect. With respect to in situ gelatinolytic activity assay, we noticed an increase in MMPs activity in the O group, and the treatment with allopurinol prevented that. The morphometric analysis showed the O group with increased vascular remodeling parameters, denoting a hypertrophic remodeling, which was prevented by the association with allopurinol. Based on these results, is possible to conclude that the treatment with omeprazole caused aortic remodeling in rats, and combined to this effect, some other were observed, such as the vascular function impairment evaluated by the response to acetylcholine, the increase of ROS and increase in MMPs activity. As the effects of omeprazole treatment were prevented by the association of treatment with allopurinol, it is reasonable to infer that XOR participates of the pathway by which omeprazole exerts its deleterious effects on the vasculature.

Keywords: Omeprazole, xanthine oxidoreductase, matrix metalloproteinases, allopurinol, vascular remodeling.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Mecanismo proposto de como IBPs aumentam os níveis de ADMA	22
Figura 2. Produção de ERO pela XOR induzida por hipóxia ou inflamação	24
Figura 3. Estrutura geral das MMPs e das gelatinases	26
Figura 4. Abordagem experimental	36
Figura 5. Efeito dos tratamentos sobre a pressão arterial sistêmica dos ratos	43
Figura 6. O pH gástrico de animais de diferentes tratamentos	44
Figura 7. Os efeitos dos tratamentos sobre a resposta relaxante da aorta à acetilcolina.....	46
Figura 8. Produção de ERO em aortas de animais de diferentes tratamentos.....	48
Figura 9. Atividade gelatinolítica <i>in situ</i> em aorta de animais de diferentes tratamentos.....	50
Figura 10. Parâmetros de remodelamento vascular de aortas dos animais de diferentes grupos.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA – dimetil-arginina assimétrica

AE – área externa

AI – área interna

ANOVA – análise de variância

CMLV – células do músculo liso vascular

CSA – área da secção transversal

CYP – citocromo p 450

DDAH – dimetil-arginina dimetil-amino hidrolase

DE – diâmetro externo

DHE – dihidroetidíio

DI – diâmetro interno

DMA – dimetil-arginina

DPI – difenileneiodoníio

Emax – efeito máximo

EPM – erro padrão da média

ERO – espécies reativas de oxigénio

FAD – flavina adenina dinucleotídeo

GSNO – S-nitrosoglutationa

IBPs- inibidores da bomba de prótons

IRP – índice de reatividade plaquetária

L-NAME – N^w-nitro-arginina-metil-ester

L-NMMA – L-N^G-monometil-arginina

M/L – média por lúmen

MLV – músculo liso vascular

MMPs – metaloproteinases de matriz

Moco – cofator de molibdopterina

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NAD⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

ONO-4817 – N-[(1S,3S)-1-[(Etoximetoxi)metil]-4-(hidroxiamino)-3-metil-4-oxobutil]-4-fenoxibenzamida.

PAS – pressão arterial sistólica

PBS – tampão fosfato salino

pD2 – potência

PFA – paraformaldeído

PRMTs – proteína-arginina metiltransferases

SCA – síndrome coronariana aguda

XDH – xantina desidrogenase

XO – xantina oxidase

XOR – xantina oxidoreductase

TIMPs – inibidores teciduais de metaloproteinases

Conteúdo

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Uso e mecanismo de ação do omeprazol	18
1.2 O omeprazol e o risco cardiovascular.	20
1.3 O sistema da xantina oxidoredutase e sua atividade.	22
1.4 As metaloproteinases de matriz e o sistema vascular	25
1.5 Remodelamento vascular e doença vascular	28
2. HIPÓTESE	31
3. OBJETIVOS	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Considerações gerais	35
4.2 Animais e Protocolo experimental de tratamento	35
4.3 Abordagem experimental.....	36
4.4 Pletismografia de cauda	36
4.5 Determinação do pH do lavado gástrico	37
4.6 Avaliação da reatividade vascular da aorta.....	37
4.7 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio	39
4.8 Determinação da atividade gelatinolítica <i>in situ</i> de MMPs	40
4.9 Análise morfológica da aorta	41
4.10 Análise estatística dos resultados	41
5. RESULTADOS.....	43
5.1 Os tratamentos não alteram a Pressão Arterial Sistêmica.....	43
5.2 O omeprazol causa elevação do pH do lavado gástrico.....	44
5.3 O omeprazol diminui a resposta relaxante da aorta à acetilcolina a associação do tratamento com alopurinol atenua esse efeito	45
5.4 O omeprazol aumenta produção de ERO na aorta e a associação com alopurinol previne esse efeito.....	47
5.5 O tratamento com omeprazol resulta em aumento da atividade gelatinolítica de MMPs na aorta, sendo esse efeito prevenido pela associação com alopurinol....	49
5.6 O tratamento com omeprazol causa aumento dos parâmetros de remodelamento vascular e o alopurinol previne esse efeito	51
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES	60
8. REFERÊNCIAS.....	62

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Uso e mecanismo de ação do omeprazol

O omeprazol faz parte da classe dos Inibidores da Bomba de Prótons (IBPs), que são pró-fármacos considerados seguros, de alta eficiência e baixa toxicidade (Nelis, 1989; Forgacs e Loganayagam, 2008). Os IBPs são amplamente utilizados em casos de acometimentos advindos da elevação da acidez gástrica, como refluxo gastroesofágico, úlceras pépticas e outras condições dispepticas, por inibir a secreção ácida no estômago, além de também ser usado na erradicação de *Helicobacter pylori* (Chubineh e Birk, 2012). Estes medicamentos são usualmente a primeira linha de prescrição para terapia antiácida por terem sido demonstrados como superiores aos antagonistas de receptor H2 de histamina em casos de lesão do trato gástrico superior, úlceras e erosões da mucosa (Mo *et al.*, 2015).

Apesar de serem considerados seguros e aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso a curto prazo, alguns estudos trazem preocupações acerca dos efeitos adversos em consequência do uso indiscriminado (Ali *et al.*, 2018) e a longo prazo desta classe de medicamentos (Corleto *et al.*, 2014). Foi descrito que, globalmente, ocorre um excesso de prescrição e dispensação de inibidores da bomba de prótons muitas vezes desnecessária ou erroneamente antes de procedimento endoscópico e em pacientes que não se adequam aos critérios de uso do omeprazol (Nauton *et al.*, 2000). O número de prescrições de omeprazol, desde sua implementação como genérico em 2002, dobrou em apenas 5 anos, e além disso, estima-se que cerca entre 25% a 70% dos pacientes utilizando esse medicamento, não apresentam indicação apropriada (Forgacs e Loganayagam,

2008). No Brasil foi realizado um estudo em 2016 sobre os medicamentos mais utilizados por automedicação e em uma lista de 12 medicamentos o omeprazol ocupou o décimo lugar (Arrais *et al.*, 2016).

Os inibidores da bomba de prótons dependem de ativação em ambiente ácido. Uma vez que absorvidos para a circulação sistêmica, são transportados para as células parietais do estômago, onde são acumulados nos canalículos de ambiente ácido dessas células, o que ativa o fármaco pela formação de uma sulfenamida tetracíclica (Goodman e Gilman, 2012). A forma ativa do fármaco se liga de maneira covalente formando uma ligação dissulfeto com grupos sulfidril nos resíduos de cisteína presentes na $H^+-K^+-ATPase$, conhecida como a bomba de prótons. A $H^+-K^+-ATPase$ é uma enzima α,β -heterodimérica, que tem como ação realizar a troca de hidrogênio intracelular por íons extracelulares de K^+ através de um canal iônico presente na membrana, com consumo de ATP, resultando em aumento da acidez gástrica (Shin *et al.*, 2011). Ao ligar-se nesta enzima, o IBP a torna irreversivelmente inativa (Goodman e Gilman, 2012).

Apesar de sua inativação pelos IBPs ser considerada irreversível por causa da ligação covalente dissulfeto, demandando assim, de nova síntese proteica de bombas de prótons para restauração da secreção gástrica (Goodman e Gilman, 2012), alguns estudos demonstraram que existe uma inconsistência nos tempos de meia vida da ligação do fármaco com a bomba de prótons, da bomba de prótons *in situ* e da atividade do IBP (Shin *et al.*, 2002 e Im *et al.*, 1985). Isto foi atribuído à grande concentração de glutatona nas células parietais (2-3 mM) que pode ser responsável por clivar ligação dissulfeto resultando em restauração da atividade da enzima, sendo, portanto, a estabilidade da ligação um fator vital para a ação dos inibidores da bomba de prótons (Shin *et al.*, 2013).

1.2 O omeprazol e o risco cardiovascular.

Com a popularidade e aumento do uso de IBPs, houve um aumento da preocupação sobre os efeitos adversos com o uso desses medicamentos a curto e longo prazo (Strand *et al.*, 2017). Uma preocupação maior foi despertada quanto ao seu risco cardiovascular, quando estudos demonstraram que a associação do omeprazol, para evitar sangramentos gástricos decorrentes da terapia antiplaquetária em pacientes com síndrome coronariana aguda (SCA), que fazem uso do clopidogrel, causava um aumento no índice de reatividade plaquetária (IRP) ao clopidogrel, aumentando a ocorrência de trombose (Gilard *et al.*, 2006).

O clopidogrel assim como o omeprazol, é um pró-fármaco, e precisa passar por metabolização para ser convertido em seu metabólito ativo e promover ação biológica. O omeprazol é metabolizado principalmente pelas CYP2C19 e CYP3A4, e a via de ativação do clopidogrel também engloba essas enzimas (Goodman e Gilman, 2012). A competição por essas vias metabólicas foi considerada o mecanismo dos efeitos prejudiciais do omeprazol sobre o efeito do clopidogrel em pacientes cardíacos (Gilard *et al.*, 2008).

O uso do omeprazol sem associação ao clopidogrel ou qualquer associação medicamentosa também foi relacionado com um aumento no risco de insuficiência cardíaca (Lázaro *et al.*, 2017), morte (Charlot *et al.*, 2010) e infarto do miocárdio não só em pacientes com doença arterial coronariana mas também na população geral (Shah *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrado que IBPs podem atingir outros sistemas no organismo por também estarem associados com morbidade renal e neurológica, podendo causar insuficiência renal (Lazarus *et al.*, 2016) e demência

(Haenisch *et al.*, 2015), demonstrando a importância do uso racional deste medicamento.

Estudos sugerem que a relação dos IBPs e o aumento do risco cardiovascular, se deve principalmente ao prejuízo causado nas duas vias de produção do Óxido Nítrico (NO), uma molécula gasosa e lipofílica que age como fator relaxante derivado do endotélio. A síntese do NO pelo endotélio regula a homeostase vascular, agindo sobre o tônus vascular, pressão arterial, hemóstase ou remodelamento vascular (Naseem, 2005).

Foi demonstrado que IBPs interferem na via clássica de formação do NO, que é mediada pelas NOS (óxido nítrico sintases), por acarretarem aumento na concentração endotelial e sérica de dimetil-arginina assimétrica (ADMA) (Ghebremariam *et al.*, 2013), inibidor endógeno e competitivo da NOS. Os IBPs aumentam ADMA através da inibição da atividade da dimetil-arginina dimetil-amino hidrolase (DDAH), enzima responsável por metabolizar ADMA (Ghebremariam *et al.*, 2013).

Também foi descrito que estes pró-fármacos alteram a via nitrato-nitrito-NO, que é uma via de produção de NO independente das NOS (Gladwin *et al.*, 2005; Lundberg *et al.*, 2008), para a qual se faz necessário o pH ácido do estômago. Com isso, o aumento do pH estomacal pelos IBPs reduz os efeitos anti-hipertensivos do nitrito e a formação de espécies nitrosiladas relacionadas ao NO (Pinheiro *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2015).

Além desse aumento de fator de risco cardiovascular, o uso de IBPs a longo prazo também foi considerado como fator acelerador do envelhecimento de células endoteliais (Yepuri *et al.*, 2016), e como agente causal de disfunção endotelial (Pinheiro *et al.*, 2016). A disfunção endotelial é caracterizada pelo desbalanço de

fatores vasoativos produzidos pelo endotélio, apresentando diminuição da biodisponibilidade de vasodilatadores, principalmente o NO, e/ou desequilíbrio de produção e liberação de fatores vasoconstritores e vasorelaxantes derivados do endotélio (Hado *et al.*, 2005). Assim, o omeprazol causa essas alterações endoteliais por aumentar o estresse oxidativo via aumento do ADMA e também causa ativação da enzima pró-oxidante xantina oxido redutase (XOR) (Pinheiro *et al.*, 2016).

O esquema sugerido de ação dos IBPs no aumento de ADMA está representado na figura 1.

Figura 1. Mecanismo proposto de como IBPs aumentam o fator de risco cardiovascular ADMA. Os IBPs inibem a DDAH, diminuindo assim a degradação de ADMA em DMA(dimetil-arginina)+citrulina. Com o aumento dos níveis de ADMA no endotélio e no sangue, por competitividade, ocorrerá a inibição da óxido nítrico sintase, diminuindo a produção e biodisponibilidade de NO. A diminuição da produção de NO e espécies relacionadas a ele, ocorre de maneira dependente da concentração de IBP utilizada, havendo assim, uma perda da homeostase vascular. Adaptado de (Ghebremariam *et al.*, 2013).

1.3 O sistema da xantina oxidoreductase e sua atividade.

A xantina oxidoreductase, é uma molibdo-flavoenzima, estruturalmente homodimérica, sendo cada monômero constituído por 3 domínios: um na porção c-

terminal formada por um cofator de molibdopterina contendo molibdênio (Moco) e sítios de ligação para purinas e nitrato/nitrito, um domínio intermediário que contém cofator de flavina adenina dinucleotídeo (FAD), responsável por doar o elétron para o acceptor final, e por fim, na porção n-terminal, um domínio com dois grupos ferredoxina (2Fe-2S) que transporta o elétron do Moco para o FAD (Battelli *et al.*, 2016).

Esta enzima pode ser apresentada em duas isoformas interconvertíveis: a xantina desidrogenase (XDH), que usa preferencialmente nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD^+) como substrato, e a xantina oxidase (XO) que usa oxigênio (O_2) como substrato (Hille *et al.*, 2011). A conversão de XDH em XO pode ocorrer de maneira reversível pela oxidação dos grupos tiol nos resíduos de cisteína nos domínios Moco e FAD, ou irreversível por proteólise, sendo essa conversão ocorrente em consequência do catabolismo da XOR ou sob uma variedade de condições patofisiológicas como hipóxia, dano hepático ou dano por isquemia/reperfusão (Battelli *et al.*, 2016). Sua principal função no organismo é catalisar o metabolismo das purinas, catalisando a hidroxilação de hipoxantina em xantina, e de xantina em ácido úrico (Chen *et al.*, 2016). O ácido úrico possui propriedades antioxidantes em quantidades fisiológicas, entretanto, em excesso no plasma, está relacionado à fisiopatologia da gota, nefrolitíase e hipertensão (Day *et al.*, 2016; Borghi e Desideri 2016). Para o tratamento de doenças advindas do excesso de ácido úrico, clinicamente são utilizados inibidores da XOR, como o alopurinol e oxipurinol, que são análogos de hipoxantina e xantina respectivamente, e o febuxostat, que forma um complexo estável com a enzima a inibindo tanto em sua forma reduzida quanto oxidada (Goodman e Gilman, 2012).

A XOR sob condições específicas de queda de pH, hipóxia e isquemia, tem sua afinidade por xantina diminuída e por nitritos aumentada (Cantu-Medellin e kelley, 2013), apresentando assim uma ação de síntese do fator de homeostase vascular óxido nítrico, por catalisar conversão de nitratos e nitrito a NO (Millar et al., 1998). No entanto, as atividades basal da XOR e a induzida por inflamação ou hipóxia, geram como subprodutos, as espécies reativas de oxigênio (ERO) ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e superóxido de hidrogênio (H_2O_2), além de, na presença de ferro, gerar radicais hidroxil ($HO^{\cdot}$) e também gerar $O_2^{\cdot-}$ o suficiente para reagir com NO resultando em produção de espécies reativas de nitrogênio, principalmente o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Battelli et al., 2016.1). Na figura 2 é apresentado o meio de produção de ERO decorrente da atividade da XOR induzida por hipóxia ou inflamação.

Figura 2. Situação de hipóxia ou citocinas inflamatórias aumentam a transcrição de XDH, que é transportada para fora da célula endotelial e rapidamente convertida a XO por proteases. Na superfície das células endoteliais, glicosaminoglicanos se ligam fortemente sequestrando XO, que na presença de xantina aumenta a produção de ERO. Na parte inferior da figura é demonstrado que a porcentagem de formação das ERO H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ pela XO depende da concentração de O_2 molecular presente. Adaptado de (Cantu-Medellin e kelley, 2013).

Então a XOR apesar de ter participação no ciclo do NO em condições críticas, também participa da patogênese de doenças cardiovasculares ao aumentar a formação de ERO causando estresse oxidativo, disfunção endotelial e processos inflamatórios (Touyz, 2004; Berry e Hare, 2003). Alguns estudos também demonstraram que pela capacidade de produção de ERO, a XOR pode regular as metaloproteinases de matriz (MMPS), aumentando sua atividade e expressão. As MMPS são promotoras de remodelamento tecidual, e têm sua atividade associada a acometimentos cardiovasculares (Rajagolapan *et al.*, 1996; Valentin *et al.*, 2005)

Mesmo que a XOR seja capaz de agir como enzima metabolizadora de uma gama de compostos endógenos e exógenos, incluindo drogas como alguns imunossupressores, antimicrobianos, antivirais, entre outros (Battelli *et al.*, 2016.2), não existe nenhum estudo demonstrando alguma ação desta enzima sobre IBPs. Porém, como já exposto anteriormente, o uso do omeprazol causa um aumento na atividade de XOR (Pinheiro *et al.*, 2016) e apesar de não se ter nenhuma via esclarecida de como ocorre essa ativação, foi sugerido que pela capacidade do NO em causar inativação da XOR (Ichimori *et al.*, 1999; Berry e Hare, 2003), a diminuição da biodisponibilidade de NO em decorrência do uso do omeprazol, poderia acarretar em aumento da atividade de XOR (Pinheiro *et al.*, 2016).

1.4 As metaloproteinases de matriz e o sistema vascular

As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco (Zn) que possuem como principal atividade a degradação de componentes da matriz extracelular e proteínas do tecido conjuntivo. São classificadas em: collagenases (MMPs 1, 8 e 13), gelatinases (MMPs 2 e 9), estromelisinases (MMPs 3 e 10), matrilisinas (MMP 7 e 26) e MMPs de membrana (MMPs 14, 15, 16 e 24) (Wang *et al.*, 2018). De um modo

geral, a estrutura dessas metaloproteínas é semelhante, sendo constituídas por uma sequência de sinalização na porção n-terminal, um domínio pró-peptídeo que possui aproximadamente 80 aminoácidos, um sítio catalítico onde se encontra o íon Zn^{2+} , que possui aproximadamente 170 aminoácidos, um peptídeo de ligação de tamanho variado chamado região de Hinge, e um domínio hemopexina na porção c-terminal com 200 aminoácidos (Wang *et al.*, 2018).

As MMPs mais comumente associadas a acometimentos cardiovasculares como formação de aneurismas, aterosclerose e remodelamento vascular são as gelatinases (Raffetto e Khalil, 2008; Grote *et al.*, 2003), que se diferenciam estruturalmente das demais por possuírem 3 domínios de fibronectina do tipo II no sítio catalítico, que possibilitam a clivagem de colágeno do tipo IV, laminina, fibronectina e elastina (Papazafiropoulou e Tentolouris 2009). As gelatinases também desempenham funções em muitos processos biológicos do sistema cardiovascular, participando do processo de relaxamento do músculo liso vascular (MLV), promovendo remodelamento tecidual vascular, crescimento, diferenciação e proliferação de células do MLV, invasão tecidual e angiogênese (Wang *et al.*, 2018). A figura 3 demonstra a diferença estrutural das gelatinases.

Figura 3. Estrutura geral das MMPs demonstrando o domínio pró-peptídico ligado ao sítio catalítico que contém zinco, a região de Hinge e o domínio hemopexina na porção C-terminal. A estrutura inferior é a das gelatinases que mostra os 3 domínios de fibronectina tipo II no sítio catalítico. Adaptado de (Wang *et al.*, 2018).

Devido ao alto potencial de degradação e reorganização da matriz extracelular, as MMPs são sintetizadas inicialmente em pré-pró-MMPs, que são posteriormente transformadas em pró-MMPs sendo essas formas inativas, também denominadas zimogênios. Um resíduo de cisteína no domínio pró-peptídeo é responsável por se ligar ao Zn^{2+} do domínio catalítico, assim, mantendo a latência da forma inativa. A regulação das MMPs pode ocorrer em três níveis: pela ativação dos seus zimogênios latentes, pela regulação de transcrição gênica e pela interação com seus inibidores endógenos, os inibidores teciduais de metaloproteínases (TIMPs) (Galis e Khatri, 2002). A ativação dos zimogênios ocorre pela ação de proteases que clivam o domínio propeptídeo deixando o sítio catalítico exposto e resultando numa metaloproteinase de menor peso molecular, como é o caso da MMP-2 que quando ativada tem seu peso diminuído de 72 para 64 kDa (Chow *et al.*, 2007). Entretanto a ativação de zimogênios pode ocorrer também por dissociação da ligação do resíduo de cisteína presente no propeptídeo com o zinco do sítio catalítico, gerando um deslocamento do propeptídeo e consequente ativação da MMP, sem que haja diminuição do seu peso molecular. Esta ativação não proteolítica ocorre na presença de glutatona e peroxinitrito (Schulz, 2007).

Como exposto anteriormente, a XOR por aumentar produção de ERO, pode aumentar a atividade e expressão de MMPs, principalmente da MMP-2. Também foi descrito que as MMPs podem ser ativadas pelas ERO, por regulação de expressão gênica, ou por oxidação do resíduo de cisteína do propeptídeo das MMPs. (Fu *et al.*, 2001; Birukov 2009)

1.5 Remodelamento vascular e doença vascular

O remodelamento vascular é definido como um fenômeno decorrente da necessidade de adaptação vascular às alterações hemodinâmicas de longo prazo, como a estenose por formação de ateromas e o aumento de pressão arterial e de fluxo sanguíneo, sendo principalmente caracterizado pela alteração funcional, estrutural e/ou dimensional de um vaso sanguíneo maduro (Gibbons e Dzau, 1994; Korshunov *et al.*, 2007).

O remodelamento vascular pode ser classificado de acordo com o tamanho luminal do vaso, como remodelamento concêntrico (*inward*) quando há a diminuição do lúmen, e excêntrico (*outward*) quando ocorre o aumento. Além de também poder ser classificado de acordo com a quantidade de material celular na parede do vaso sanguíneo, como hipotrófico, eutrófico e hipertrófico. Os parâmetros de remodelamento vascular área da secção transversal (CSA) e razão média/lúmen (M/L) quando diminuídos, caracterizam o remodelamento hipotrófico, quando elevados, caracterizam o remodelamento hipertrófico, e quando o vaso apresenta aumento de M/L sem alteração de CSA, ocorre o remodelamento eutrófico (Martinez-Lemus *et al.*, 2009).

As principais alterações que resultam no remodelamento são: alteração do fenótipo contrátil das Células do Músculo Liso Vascular (CMLV), a proliferação e diferenciação de CMLV e a deposição de componentes da matriz extracelular pelas MMPs. Em conjunto, essas alterações podem prejudicar a função vascular e são as principais razões para a associação entre o remodelamento vascular e morbidade e mortalidade cardiovascular (van Varik *et al.*, 2012). Outra via de alteração estrutural/dimensional da parede vascular ocorre através do estresse oxidativo tecidual (Birukov, 2009).

Com a ativação da XOR, e posterior aumento na atividade de MMPs, existe a possibilidade de uma ativação sinérgica de vias interrelacionadas de remodelamento vascular, tanto pelo aumento de estresse oxidativo resultando em disfunção endotelial, angiogênese, crescimento de células vasculares lisas, e ativação de MMPs, quanto pela ativação direta de MMPs pelas ERO derivados da atividade da XOR, causando proteólise de componentes da matrix extracelular (Touyz, 2004; Taniyama e Griendling, 2003).

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

Tendo em vista que estudos demonstram possíveis aumentos de risco cardiovascular decorrente do uso de omeprazol, e que este uso causa disfunção endotelial via xantina oxidoreductase, foi postulada a hipótese de que o consequente aumento da atividade da XOR pelo tratamento com omeprazol, por induzir aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e ativação de MMPs, pode acarretar remodelamento vascular na aorta de ratos normotensos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

- Examinar se o tratamento com omeprazol causa aumentos de marcadores relacionados ao estresse oxidativo em aortas de ratos;
- Examinar se a alteração bioquímica acima mencionada é acompanhada de aumentos de atividade de MMPs nos vasos;
- Examinar se as alterações bioquímicas vasculares acima mencionadas estão associadas a remodelamento vascular;
- Avaliar histologicamente a aorta dos animais tratados para examinar se o tratamento com inibidor da XOR atenua todas as alterações vasculares acima mencionadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações gerais

O estudo foi realizado seguindo as diretrizes da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O protocolo de tratamento e cuidados com os animais foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais, sendo registrado com o número 171-2016.

4.2 Animais e Protocolo experimental de tratamento

Foram utilizados ratos wistar (n=40) pesando entre 180 e 200 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada entre 22 e 25°C, sob ciclos claro/escuro de 12 horas, respeitando o ciclo circadiano, e obtiveram livre acesso à água e ração.

Os animais foram aleatoriamente separados e designados a 4 grupos de diferentes tratamentos, sendo eles: o grupo Controle (C) que foi tratado com o veículo Tween 2% (vol./vol.) 1 vez ao dia por gavagem, o grupo Alopurinol (A) que recebeu uma solução deste inibidor da XOR por gavagem na dose de 50 mg/kg/dia (Zajackowski *et al.*, 2018), o grupo Omeprazol (O) que recebeu uma solução de omeprazol diluído em tween 2% por via intraperitoneal na dose de 10 mg/kg/dia (Pinheiro *et al.*, 2015) e por fim, o grupo Omeprazol+Alopurinol (O+A) no qual os animais receberam o tratamento concomitante com as duas drogas nas mesmas doses utilizadas nos grupos de seus tratamentos isolados. Os cálculos da dose a ser administrada em cada tratamento, foram realizados para administração de um

volume fixo de 0,5 mL de solução por animal, tanto pelo tratamento via oral quanto intraperitoneal.

4.3 Abordagem experimental

Ao início de cada semana de tratamento os animais foram pesados para adequar a quantidade de droga a ser administrada, com o peso de cada animal. Também foi aferida a pressão sistólica por pletismografia de cauda para avaliar se existiam alterações hemodinâmicas em consequência dos tratamentos. O protocolo de tratamento durou 4 semanas (Pinheiro *et al.*, 2015) e ao fim, os animais foram submetidos à eutanásia para posterior coleta de tecidos e execução de ensaios bioquímicos.

Figura 4. Abordagem experimental.

4.4 Pletismografia de cauda

A aferição da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada da seguinte maneira: pela manhã os ratos eram submetidos à ambientação por um período de 1h em uma sala aquecida, sem privação de água e ração. Após ambientação, os ratos eram alocados em aparatos de contenção para limitação de movimentos, e então, apostos sobre uma plataforma aquecida para evitar vasoconstrição caudal por estresse. As caudas dos animais foram inseridas em *cuffs* com função de ocluir o fluxo sanguíneo caudal e em posição distal a estes, foram alocados os detectores de pressão que após a liberação do fluxo sanguíneo, é responsável por detectar e

monitorar a pressão sanguínea transmitida para o pletismógrafo (CODA noninvasive blood pressure system).

4.5 Determinação do pH do lavado gástrico

Após anestesia e posterior confirmação de ausência de sinal de dor, os animais foram submetidos a laparotomia para coleta de plasma da veia cava inferior. Também foi feita a aferição de pH gástrico, que foi realizada da seguinte maneira: a porção pilórica do estômago foi laqueada e com uma pequena incisão, a parte terminal do esôfago foi aberta, para então ser inserido um catéter no estômago, por onde foi aplicado 1mL de solução salina e coletados 0,5mL de lavagem gástrica (Campbell *et al.*, 2008). As amostras de lavagem gástrica foram centrifugadas a 6000g por 1 minuto para diminuir os resíduos de comida no momento da análise (Pinheiro *et al.*, 2012). Utilizando um microeletrodo acoplado a um pHmetro, foi determinado o pH do sobrenadante de cada amostra.

4.6 Avaliação da reatividade vascular da aorta

Após a determinação do pH gástrico e coleta de plasma, os animais passaram por toracotomia para coleta da aorta. Os pulmões e o coração de cada animal foram excisados deixando a aorta visível e com o auxílio de uma tesoura em ângulo perpendicular, a aorta foi cortada acima do diafragma. Então foram realizados cortes sucessivos com a tesoura em um ângulo de 45°, próximo à coluna vertebral na direção caudal-cranial para a excisão íntegra da aorta sem que haja danos ao tecido.

Após o isolamento da artéria, um pequeno segmento (4 mm) com tecido perivascular foi reservado para análise morfológica, enquanto que do restante de

aorta foi retirado o tecido perivascular. A aorta livre do tecido conectivo e gordura foi cortada em anéis, dos quais um foi submerso em *Tissue-Tek* OCT, outro foi congelado para análises bioquímicas posteriores, e por fim, um anel de aproximadamente 4 mm de comprimento, foi alocado em banho de órgãos contendo 10 mL da solução fisiológica de Krebs (pH 7,4) com a seguinte composição (em mM): NaCl 130; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; KCl 4,7; NaHCO₃ 14,9; glicose 5,5. A solução foi continuamente gaseificada com 95% de O₂ e 5% de CO₂ e aquecida a 37°C, para análise de reatividade da aorta. Os anéis de aorta analisados no estudo foram transpassados em seu lúmen por dois ganchos: um fixo no fundo da cuba e outro acoplado a um transdutor de deslocamento de força isométrica. Os registros das respostas de tensão foram adquiridos através do software LabChart 4.04, PowerLab ADInstruments (2000) Program. Inicialmente as aortas foram submetidas à uma tensão basal de 1,5 g por um período de estabilização de 1 hora. Após atingir estabilidade, os anéis foram contraídos com fenilefrina (10⁻⁷ M) e posteriormente relaxados com acetilcolina (10⁻⁶ M), assim as aortas que produziram uma resposta de relaxamento à acetilcolina de 80% em relação à contração com fenilefrina, foram consideradas viáveis para o estudo por apresentarem endotélio funcional. Foi então realizada novamente a contração com fenilefrina (10⁻⁷ M), e administradas concentrações crescentes e cumulativas de acetilcolina (10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ e 10⁻⁵ M) para analisar a resposta vasodilatadora e produzir uma curva de relaxamento concentração-resposta.

A análise dos resultados foi feita inicialmente com o cálculo dos valores absolutos de relaxamento em cada ponto da curva, que foi obtido subtraindo-se o valor da contração à fenilefrina dos valores de relaxamento obtidos após a administração de cada concentração de acetilcolina. Posteriormente, foi feito o

cálculo da porcentagem de relaxamento em cada ponto da curva separadamente, fazendo uso da seguinte fórmula: $X = \left(\frac{\text{Valor absoluto de relaxamento} \cdot 100}{\text{valor absoluto de contração à fenilefrina}} \right) \cdot (-1)$, onde X é a porcentagem de relaxamento. As médias de porcentagem de relaxamento por grupo, em cada ponto da curva, foram processados e plotados graficamente no programa GraphPad Prism versão 6 (Califórnia, EUA). As curvas concentração-efeito foram analisadas por regressão não linear para obtenção dos valores de efeito máximo (Emax) e pD2 (-log EC50) da resposta vasodilatadora da acetilcolina na aorta, que posteriormente foram analisados por ANOVA de dois fatores.

4.7 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

Para avaliar a possível ocorrência de estresse oxidativo tecidual, foi realizado o ensaio bioquímico de análise da produção de espécies reativas de oxigênio que utiliza o dihidroetídio (DHE), um corante fluorescente sensível a espécies reativas de oxigênio, para detectar a produção in situ de ERO pela aorta dos ratos que receberam diferentes tratamentos.

Primeiramente, foram feitos os cortes das aortas congeladas em *Tissue-Tek* OCT em criosecções de 4 µm de espessura em lâminas. Então, o ensaio foi realizado como previamente descrito (Ceron *et al.*, 2013), onde resumidamente foram adicionados sobre os cortes de aorta, 100 µL de uma solução tampão sódio-fosfato (PBS) na concentração de 0,1 M, de maneira a cobrir a aorta. Após isto, as lâminas foram acondicionadas por 15 minutos em uma estufa a 37°C. Passados os 15 minutos, o PBS foi retirado com a ajuda de uma pipeta, e foram adicionados 10 µL de DHE a uma concentração de 10 µM nas criosecções, para incubação por 30 minutos à 37°C. Após a incubação com DHE, as lâminas foram lavas 3 vezes por

submersão em PBS, para que então, fossem realizadas leituras por microscopia de fluorescência com comprimentos de onda de 525nm para excitação e 605 nm para emissão.

As imagens foram capturadas sob um aumento de 400x, e a fluorescência vermelha foi quantificada utilizando programa ImageJ (NIH, EUA). Para este ensaio também foram realizadas incubações de aortas do grupo Controle e Omeprazol com as drogas DPI, que é um inibidor de flavoproteínas, utilizado como um controle para este experimento, e Febuxostat, que é um inibidor seletivo da XOR. As incubações com essas drogas foram feitas com a adição de 10 µL de solução de DPI na concentração de 10 µM, ou de Febuxostat na concentração de 50 nM durante 1 hora na estufa a 37°C, sendo realizadas previamente à incubação com DHE. Os grupos resultantes deste experimento foram: Controle, Controle+DPI, Controle+Febuxostat, Omeprazol, Omeprazol+DPI e Omeprazol+Febuxostat.

4.8 Determinação da atividade gelatinolítica *in situ* de MMPs

A atividade de MMPs *in situ*, foi analisada utilizando como substrato DQ-*gelatin* diluído na proporção de 1:10 em 50 mM Tris-HCl + 10 mM CaCl₂.2H₂O num pH de 7,4, resultando na concentração de 1 mg/mL adicionadas em cortes de aorta com 4 µm de espessura anteriormente imersas em *Tissue-Tek* OCT. Os cortes foram alocados em lâminas e foram incubadas com o substrato a 37 °C em câmara úmida e escura. Então as lâminas foram lavadas 3 vezes por 1 minuto com a solução tampão sódio-fosfato (PBS) a 0,1 M. Após as lavagens, os cortes foram incubados com paraformaldeído 4% por 20 minutos em temperatura ambiente e lavados a última vez com PBS 0,1 M. A degradação da DQ-*gelatin* emite uma fluorescência verde. Com auxílio de um microscópio de fluorescência as imagens

foram fotografadas em objetiva de 400x e a fluorescência quantificada utilizando o programa ImageJ (NIH, EUA).

4.9 Análise morfológica da aorta

Segmentos da aorta torácica com tecido perivascular foram fixados com uma solução tamponada de paraformaldeído (PFA) 4%, e submersos em blocos de parafina para serem cortadas no micrótomo, em lâminas com 4 µm de espessura do tecido. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina. Os parâmetros de remodelamento foram quantificados pelo programa Image J (NIH, EUA). Os cálculos foram realizados da seguinte maneira: a área da secção transversal (CSA) foi determinada subtraindo a área interna do lúmen da área externa (AE-AI), já a razão média por lúmen (M/L) foi determinada com a divisão da espessura da camada média (M) pelo diâmetro interno (DI). A espessura média é calculada pelo produto da subtração do DI do diâmetro externo (DE), dividido por 2 $\left(M = \frac{DE-DI}{2}\right)$, e os valores de DE e DI são dados respectivamente pela raiz quadrada de $4.AE/\pi$ e a raiz quadrada de $4.AI/\pi$ (Castro *et al.*, 2009).

4.10 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico utilizado nos resultados foi análise de variância de dois fatores (two way ANOVA), usando a correção de Bonferroni, pelo programa GraphPad Prism versão 6 (Califórnia, EUA). O resultado foi considerado significativo quando o valor de probabilidade foi menor que 0,05 ($P < 0,05$).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Os tratamentos não alteram a Pressão Arterial Sistêmica

Nenhum dos tratamentos realizados neste estudo causou alterações hemodinâmicas nos animais, tendo estes apresentado valores da pressão arterial sistêmica (PAS) inferiores a 140 mmHg. Também não houve diferença de valores de PAS entre os grupos tratados com drogas e o grupo controle, ou sequer qualquer diferença intergrupar ($P>0,05$; fig 5). Tampouco foi observada alguma alteração no crescimento dos animais de acordo com o peso corporal ($P>0,05$).

Figura 5. O efeito dos tratamentos com veículo, alopurinol, omeprazol ou omeprazol+Alopurinol, sobre a pressão arterial sistêmica de ratos (n=10/grupo).

5.2 O omeprazol causa elevação do pH do lavado gástrico

Nossos resultados (Fig. 6) mostram que o omeprazol foi eficaz em causar seu efeito principal de inibição da secreção gástrica, resultando em elevação significativa do pH do lavado gástrico tanto nos animais tratados somente com omeprazol, quanto nos tratados com associação de omeprazol e alopurinol, em comparação aos animais tratados com veículo e alopurinol ($P < 0,05$). Com isso foi demonstrado que o tratamento com alopurinol não tem efeito algum sobre o pH gástrico ou sobre o efeito principal do omeprazol. Os valores de pH obtidos por grupo foram: C = $2,8 \pm 0,1$; A = $2,6 \pm 0,2$; O = $5,0 \pm 0,1$; O+A = $4,7 \pm 0,2$.

Figura 6. Efeito dos diferentes tratamentos sobre o pH gástrico dos animais (n=10/grupo). Dados demonstrados como media $\pm$ E.P.M * $P < 0,05$ versus Controle e Alopurinol.

5.3 O omeprazol diminui a resposta relaxante da aorta à acetilcolina e a associação do tratamento com alopurinol atenua esse efeito

Mesmo sem que houvesse alterações na PAS em decorrência do protocolo de tratamento, os animais tratados cronicamente com omeprazol apresentaram uma diminuição da responsividade da aorta em relação aos grupos C e A. Isso é evidenciado pelos valores obtidos em porcentagem de relaxamento por grupo, onde observamos que o grupo O apresentou um valor de porcentagem de relaxamento menor ($O = 92,2 \pm 2,1 \%$) em comparação aos C e A ($C = 106,5 \pm 2,0 \%$; $A = 99,9 \pm 2,7 \%$), resultando em uma diminuição significativa no efeito máximo da resposta vasodilatadora dos anéis aórticos à acetilcolina ($P < 0,05$; Figura 7 A e B).

Contudo, o tratamento crônico com alopurinol associado ao tratamento do omeprazol (O+A), foi capaz de prevenir ($O+A = 105,7 \pm 2,2 \%$) esse efeito de diminuição do Emax presente no grupo O ($P < 0,05$ para grupo O+A versus grupo O; Figura 7 A e B).

Ao analisarmos o pD2 foi constatado que o tratamento com omeprazol causa uma diminuição da potência da acetilcolina em gerar relaxamento vascular comparado aos grupos C e A ($p < 0,05$; Figura 7 B e D). Graficamente, podemos observar esse efeito pelo deslocamento da curva de relaxamento para a direita, no grupo O em relação aos demais. Em contrapartida, no Emax, obtivemos que mesmo a associação do tratamento do omeprazol com alopurinol, não foi capaz de atenuar a diminuição do pD2 ($p > 0,05$ para o grupo O+A versus grupo O; Figura 7 A e C). Os valores de pD2 por grupo foram: $C = 7,53 \pm 0,05$; $A = 7,65 \pm 0,08$; $O = 7,26 \pm 0,06$; $O+A = 7,26 \pm 0,05$.

Figura 7. O efeito dos tratamentos com veículo, alopurinol, omeprazol ou omeprazol+Alopurinol, sobre a resposta relaxante à acetilcolina em aortas. (A) Porcentagem de vasodilatação dependente do endotélio induzida por acetilcolina em aorta de animais de diferentes grupos de tratamento (n= 4 a 8/grupo). (B) Efeito máximo de relaxamento das aortas à acetilcolina. (C) Valores de pD₂ (-log da concentração de Ach que produz 50% do efeito máximo) das respostas vasculares. Dados demonstrados como média ± E.P.M *P<0,05 versus grupo C. #P<0,05 versus grupo O.

5.4 O omeprazol aumenta a produção de ERO na aorta e sua associação com alopurinol previne esse efeito

O tratamento com alopurinol, não causou alteração nos níveis de ERO tecidual ($A = 10,4 \pm 1,1$ unidades arbitrárias de fluorescência) em comparação com o grupo controle ($C = 10,1 \pm 0,7$ unidades arbitrárias de fluorescência) ($P > 0,05$). Entretanto, o tratamento com omeprazol apresentou um aumento significativo da produção de ERO ($O = 20,4 \pm 1,6$ unidades arbitrárias de fluorescência) na aorta no ensaio do DHE em comparação com os grupos C e A ($P < 0,05$). Enquanto que ao associarmos o tratamento do omeprazol com o tratamento do alopurinol, no grupo O+A, houve uma diminuição de produção tecidual aórtica de ERO ($O+A = 11,4 \pm 1,7$ unidades arbitrárias de fluorescência), tornando evidente que existe um efeito preventivo do alopurinol sobre o efeito prejudicial do omeprazol em aumentar produção de ERO ($P < 0,05$). Esses efeitos estão demonstrados graficamente na figura 8 A e B.

Também foi realizado um segundo ensaio de DHE nas aortas de ratos do grupo Controle e Omeprazol com incubação dos inibidores (Figura 8 C) DPI (inibidor da NADPH oxidase e de flavoproteínas) e Febuxostat (inibidor seletivo da XOR). O grupo controle apresentou em valores de fluorescência em unidades arbitrárias, uma produção de ERO basal ($C = 11,0 \pm 0,2$) que foi reduzida significativamente ($P < 0,05$) com a incubação com DPI ($C+DPI = 5,6 \pm 0,1$) e com febuxostat ($C+Febuxostat = 4,9 \pm 0,5$). O grupo Omeprazol, como já demonstrado no primeiro ensaio de DHE, apresentou um aumento significativo na produção de ERO ($O = 19,5 \pm 1,1$) em relação ao grupo controle ($P < 0,05$ para o grupo O versus grupo C; Figura 8 C), e as incubações com DPI e Febuxostat diminuíram significativamente ($O+DPI = 6,7 \pm 0,2$

e O+Febuxostat= $8,2 \pm 0,2$) esse efeito ($P < 0,05$ para os grupos O+DPI e O+Febuxostat versus grupo O; Figura 8 C).

Figura 8. Efeitos dos diferentes tratamentos sobre a produção de espécies reativas de oxigênio na aorta. (A) Imagens representativas do ensaio de DHE demonstrando uma fluorescência maior em aorta de animais tratados com omeprazol em relação aos demais grupos. (B) Quantificação de fluorescência do DHE demonstrada em unidades arbitrárias, de aorta de ratos tratados com veículo, alopurinol, omeprazol ou omeprazol+alopurinol ($n=6$ /grupo). (C) Quantificação de fluorescência do DHE em aortas do grupo controle e omeprazol ($n=4$ /grupo) na ausência e na presença dos inibidores de flavoproteínas e de XOR (DPI e febuxostat respectivamente). Dados demonstrados como média $\pm$ E.P.M. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo controle e alopurinol em B, e em comparação ao grupo controle em C. # $P < 0,05$ em relação ao grupo omeprazol.

5.5 O tratamento com omeprazol resulta em aumento da atividade gelatinolítica de MMPs na aorta, sendo esse efeito prevenido pela associação com alopurinol

O tratamento com alopurinol não resultou em alteração significativa de atividade gelatinolítica de MMPs ($C = 16,7 \pm 1,4$; $A = 14,1 \pm 1,3$) em comparação com o grupo controle ($P > 0,05$; Figura 9 A e B). Enquanto que a zimografia *in situ* nas aortas do grupo omeprazol apresentou uma elevação significativa da atividade de gelatinases ($O = 31,1 \pm 3,5$) em comparação aos grupos Controle e Alopurinol ($P < 0,05$ para o grupo O versus grupos C e A; Figura 9 A e B). Esse aumento de atividade gelatinolítica de MMPs em resposta ao omeprazol, foi prevenido ($O+A = 18,2 \pm 1,7$) pela associação do tratamento com o alopurinol ($P < 0,05$ para o grupo O+A versus o grupo O; Figura 9 A e B). Os valores de fluorescência resultantes da degradação de DQ-*gelatin* são dados em unidades arbitrárias de fluorescência.

Na figura 9 A, apresentamos imagens representativas do ensaio dos grupos de tratamento, além de demonstrarmos representativas de controle negativo (sem o substrato DQ-*gelatin*) e como controle da especificidade do ensaio para MMPs, utilizamos o inibidor ONO-4817. Sendo esses controles de caráter meramente demonstrativo, não tiveram a fluorescência quantificada.

Figura 9. Atividade gelatinolítica de MMPs *in situ* na aorta de animais dos diferentes grupos de tratamento. (A) Imagem representativa (400 x) do ensaio demonstrando a fluorescência nos cortes de aorta de diferentes grupos (n=7) e dos controles negativo e de seletividade do experimento. (B) Gráfico representa a atividade gelatinolítica de MMPs em unidades arbitrárias da fluorescência do ensaio *in situ*. Dados demonstrados como média $\pm$ E.P.M. *P<0,05 em comparação com o grupo controle. #P<0,05 em relação ao grupo omeprazol.

5.6 O tratamento com omeprazol causa aumento dos parâmetros de remodelamento vascular e o alopurinol previne esse efeito

O tratamento com alopurinol não resultou em nenhuma alteração dos parâmetros de remodelamento em comparação com o grupo controle ($P>0,05$). Já o tratamento com omeprazol, em concordância com os resultados da atividade gelatinolítica de MMPs, causou um aumento significativo tanto da área da secção transversal quanto da razão média/lúmen ($p<0,05$ para o grupo O versus os grupos C e A; Figura 5 A, B e C), caracterizando um remodelamento hipertrófico da aorta. O remodelamento causado pelo tratamento com omeprazol é prevenido pelo tratamento concomitante com alopurinol ($P<0,05$ para o grupo O+A versus o grupo O, em ambos os parâmetros de remodelamento).

Os valores médios do cálculo da área de secção transversal (CSA) em cada grupo de tratamento foram de: C= $1,03 \times 10^4 \pm 0,31 \times 10^3$; A= $1,02 \times 10^4 \pm 0,20 \times 10^3$; O= $1,31 \times 10^4 \pm 0,15 \times 10^3$; O+A= $0,94 \times 10^3 \pm 0,20 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.

Os valores calculados do parâmetro razão média/lúmen (M/L) em cada grupo foram de: C= $5,6 \pm 0,2$; A= $6,1 \pm 0,4$; O= $7,2 \pm 0,2$; O+A= $5,9 \pm 0,2$. Este resultado de prevenção do alopurinol sobre o aumento de parâmetros de remodelamento em consequência do tratamento com omeprazol sugere fortemente que o mecanismo pelo qual este IBP promove remodelamento vascular, tenha participação da XOR.

Figura 10. Parâmetros de remodelamento vascular na aorta de animais dos diferentes grupos de tratamento. (A) Imagem representativa (25 x) do corte histológico da aorta para as análises morfométricas de cada grupo de tratamento. (B) Gráfico demonstrando a Área da secção transversal da aorta dos grupos de tratamento. (C) Gráfico da razão Média/Lúmen da aorta dos animais tratados. Dados demonstrados como média $\pm$ E.P.M. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo controle e alopurinol. # $P < 0,05$ em relação ao grupo omeprazol.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O conhecimento de que o uso de IBPs é diretamente relacionado à disfunção endotelial e risco cardiovascular pelo aumento de ADMA já é bem estabelecido. Contudo nosso estudo é pioneiro em associar o uso de um IBP com aumento de atividade de MMPs e ocorrência de remodelamento vascular. Os principais achados deste trabalho foram que o tratamento com omeprazol resultou em remodelamento vascular na aorta dos animais, e junto a esse remodelamento, foram encontradas atividade elevada de MMPs e produção elevada de espécies reativas do oxigênio, tendo o alopurinol prevenido todos esses efeitos deletérios do omeprazol.

Apesar de alguns estudos atribuírem efeitos antioxidantes e protetores ao omeprazol (Biswas *et al.*, 2003; Shivanna *et al.*, 2011), Kohler *et al.* (2010), demonstraram que o omeprazol é tóxico para células da glândula gástrica de coelhos, e que esse efeito aparentemente decorre de uma atividade oxidante do omeprazol, sendo completamente revertido pelo pré-tratamento com antioxidantes como a vitamina C ou pelo uso de agentes redutores de grupos tiol. Outro estudo demonstrou que o omeprazol aumenta os níveis de H_2O_2 em células endoteliais de pulmão fetal humano (Patel *et al.*, 2016). Esse efeito deletério do omeprazol via aumento de fatores oxidantes está em concordância com nossos resultados, onde o IBP apresentou um aumento na formação de ERO no ensaio de fluorescência do DHE. Além disso, a associação com o alopurinol inibiu esse efeito de desbalanço na produção de espécies reativas, indicando que o efeito pró-oxidante do omeprazol é dependente da ativação da XOR. Isso é compatível com os nossos resultados utilizando o inibidor seletivo para XOR, febuxostat, que também atenuou a produção de espécies reativas de oxigênio decorrentes do tratamento com omeprazol. Tais

resultados estão condizentes com resultados publicados anteriormente (Pinheiro *et al.*, 2016).

É bem descrito que ERO causam prejuízo tanto para o endotélio, diminuindo o relaxamento dependente de endotélio, induzindo apoptose de células endoteliais e favorecendo a angiogênese, quanto em células do músculo liso vascular, promovendo manutenção do fenótipo sintético das CMLV, migração e proliferação dessas células (Tanyama e Griendling, 2003). Nossos resultados foram condizentes com esses achados de que níveis elevados de ERO são associados a mudanças vasculares estruturais e funcionais (Birukov, 2009). Além disso, Pinheiro *et al* (2016) refere que a produção de ERO induzida pelo aumento da atividade da XOR com o uso do omeprazol, acarreta diminuição da responsividade aórtica à acetilcolina, o que foi reproduzido em nosso estudo.

O tratamento crônico com omeprazol diminui a porcentagem de relaxamento dos anéis de aorta em resposta à acetilcolina. Mesmo que no presente trabalho esse efeito seja pequeno, uma vez que o omeprazol relaxou em aproximadamente 90%, é perceber claramente que o grupo omeprazol apresentou um relaxamento significativamente menor que o grupo controle e alopurinol.

O alopurinol preveniu esse efeito deletério do IBP no endotélio, pelo menos em relação ao efeito máximo da acetilcolina, uma vez que sua associação ao tratamento do omeprazol restaurou o efeito máximo da acetilcolina. É importante observar então, que houve a inibição da XOR pelo alopurinol, apesar de este não ter restaurado o pD2 quando associado ao tratamento com omeprazol, o que pode ser interpretado como uma inibição de XOR que provavelmente não foi 100% efetiva em administrações de concentrações menores de acetilcolina. Outro fator que deve ser considerado, é que o alopurinol é ineficaz em inibir a produção de ERO proveniente

da atividade da isoforma XDH, somente inibindo a produção de ERO pela atividade da XO (Battelli *et al.*, 2016), o que poderia também justificar uma inibição não totalmente efetiva do alopurinol sobre os efeitos do omeprazol na função vascular.

Como já explanado anteriormente, foi descrito que o estresse oxidativo aumenta a expressão e ativação de MMPs, tanto por transcrição gênica quanto por ativação não proteolítica de zimogênios inativos (Valentin *et al.*, 2005; Viappiani *et al.*, 2009; Lovett *et al.*, 2012). Rajagolapan *et al.* (1996) demonstrou que zimogênios de MMP-2 e -9, ao serem incubados com xantina ou xantina oxidase, eram ativados por ERO decorrentes da atividade de XOR. Em nosso estudo o resultado do ensaio de zimografia *in situ* corrobora esses achados, onde foi possível observarmos que o tratamento crônico com omeprazol resulta em um aumento de atividade gelatinolítica de MMPs. O tratamento concomitantemente com omeprazol e alopurinol resultou em atividade gelatinolítica atenuada similar aos níveis dos grupos controle e alopurinol, indicando que o alopurinol previne esse efeito do omeprazol sobre MMPs, e que esse efeito ocorre provavelmente pela indução do omeprazol à atividade de XOR.

Concordando com os efeitos do tratamento com omeprazol na atividade gelatinolítica de MMPs, nossos resultados demonstraram que o omeprazol foi capaz de causar aumento de ambos os parâmetros de remodelamento vascular, resultando em remodelamento hipertrófico decorrente do uso deste IBP. Um detalhe interessante, é que esse remodelamento ocorreu sem que houvesse mudança nos valores hemodinâmicos dos animais tratados, tendo estes, mantido valores de normotensão durante todo o período de tratamento.

Assim como os outros resultados, ao inibirmos a XOR utilizando alopurinol nos grupos tratados com omeprazol, ocorreu a prevenção do efeito danoso causado pelo tratamento com este IBP. Esse resultado indica novamente que a XOR participa

da via pela qual efeito do omeprazol resulte em remodelamento vascular. Além dos trabalhos demonstrando a participação das ERO produzidas com a atividade da XOR, Rao *et al* (1991) demonstrou que o próprio ácido úrico, produzido pela atividade catalítica da XOR, pode aumentar a proliferação de CMLVs por causar aumento de um fator de crescimento derivado de plaquetas.

Um estudo recente demonstrou que, inesperadamente, não só o estresse oxidativo pode levar ao aumento de atividade de MMPs no leito vascular, mas que a ativação de MMP-2 pode produzir ERO, desenvolvendo estresse oxidativo na parede vascular, além de facilitar a capacidade de contração da aorta em resposta a fenilefrina. Esses efeitos ocorrem pela ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (Prado, *et al.*, 2018) o que acarretaria prejuízo cíclico entre aumento de atividade de MMPs e de produção de ERO, revelando a seriedade dos efeitos prejudiciais deste ciclo e a necessidade de mais informações sobre efeitos derivados de MMPs e EROs.

Outro âmbito do uso do omeprazol que vêm sendo bastante estudado e que pode oferecer informações sobre seus efeitos no sistema cardiovascular, é a alteração na microbiota intestinal associada ao uso desta droga (Kostrzewska, *et al.*, 2017; Koo, *et al.*, 2018). Diversos trabalhos têm demonstrado a importância da microbiota intestinal na saúde cardiovascular e em doenças cardiovasculares como a aterosclerose (Ascher e Reinhardt, 2017; Tang *et al.*, 2018). Assim o uso de omeprazol prejudicaria o sistema cardiovascular pelos mecanismos citados acima, e também por alterar a microbiota intestinal.

Muito ainda precisa ser estudado sobre os efeitos prejudiciais do omeprazol no sistema cardiovascular, uma vez que as informações sobre o seu uso seguro a

longo prazo, sobre seus efeitos pró ou antioxidantes, e sobre a relação de benefício com seu uso.

Com o término deste trabalho, podemos confirmar o recrutamento de MMPs via ativação de XOR em consequência do uso de omeprazol, causando remodelamento da aorta em ratos normotensos, dando maior fundamentação sobre o efeito prejudicial do omeprazol à homeostase e saúde vascular, em meio a informações discrepantes presentes na literatura.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Em resumo, com os resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que o tratamento com omeprazol resulta em aumento da atividade vascular de XOR, o que contribui para o aumento de espécies reativas de oxigênio na vasculatura, paralelamente ao aumento de atividade vascular de MMPs e remodelamento vascular. Além disso, obtivemos que ao utilizarmos alopurinol, esses efeitos são prevenidos, o que pode ser clinicamente relevante.

.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ALI, O. et al. Irrational use of proton pump inhibitors in general practise. **Ir J Med Sci.** Aug 22 2018.

ARRAIS, P. S. et al. Prevalence of self-medication in Brazil and associated factors. **Rev Saude Publica**, v. 50, n. suppl 2, p. 1-11, Dec 2016.

BATTELLI, M. G. et al., Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, 3527579, 2016a.

BATTELLI, M. G. et al. Xanthine Oxidoreductase in Drug Metabolism: Beyond a Role as a Detoxifying Enzyme. **Curr Med Chem**, v. 23, n. 35, p. 4027-4036, 2016b.

BERRY, C. E.; HARE, J. M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. **J Physiol**, v. 555 n. Pt 3, p. 589-606, Mar 16 2004.

BIRUKOV, K. G. Cyclic stretch, reactive oxygen species, and vascular remodeling. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 7, p. 1651-67, Jul 2009.

BISWAS, K. et al. A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. **J Biol Chem**, v. 278, n. 13, p. 10993-1001, Mar 28 2003.

BORGHI, C.; DESIDERI, G. Urate-Lowering Drugs and Prevention of Cardiovascular Disease: The Emerging Role of Xanthine Oxidase Inhibition. **Hypertension**, v. 67, n. 3, p. 496-8, Mar 2016.

BRUTON, L.L. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CANTU-MEDELLIN, N. KELLEY, EE. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: insights regarding where, when and how. **Nitric Oxide**, v 34, p. 19-26, Nov 1 2013.

CASTRO, M. M. et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 9, p. 1298-307, 2009.

CERON, C. S. et al. Nebivolol attenuates prooxidant and profibrotic mechanisms involving TGF- β and MMPs, and decreases vascular remodeling in renovascular hypertension. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 47-56, 2013.

CHARLOT, M. et al. Proton-pump inhibitors are associated with increased cardiovascular risk independent of clopidogrel use: a nationwide cohort study. **Ann Intern Med**, v. 153, n. 6, p. 378-86, Sep 21 2010.

CHEN, C.; LÜ, J. M.; YAO, Q. Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview. **Med Sci Monit**, v. 22, p. 2501-12, Jul 17 2016.

CHOW, A. K.; CENA, J.; SCHULZ, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. **Br J Pharmacol**, v. 152, n. 2, p. 189-205, Sep 2007.

CHUBINEH, S.; BIRK, J. Proton pump inhibitors: the good, the bad, and the unwanted. **South Med J**, v. 105, n.11, p. 613-8, Nov 2012.

CORLETO, V. D. et al. Proton pump inhibitor therapy and potential long-term harm. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 21, n. 1, p. 3-8, Feb 2014.

DAY, R. O. et al. Xanthine oxidoreductase and its inhibitors: relevance for gout. **Clin Sci (Lond)**, v. 130, n. 23, p. 2167-2180, Dec 1 2016.

FORGACS, I.; LOGANAYAGAM A. Overprescribing proton pump inhibitors. **BMJ**, v. 336, n. 7634, p. 2-3, Jan 5 2008.

FU, X. et al. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. **J Biol Chem**, v. 276, n. 44, p. 41279-87, Nov 2 2001.

GALIS, Z. S.; KHATRI, J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. **Circ Res**, v. 90, n. 3, p. 251-62, Feb 22 2002.

GHEBREMARIAM, Y. T. et al. Unexpected effect of proton pump inhibitors: elevation of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine. **Circulation**, v. 128, n. 8, p. 845-53, Aug 20 2013.

GIBBONS, G. H.; DZAU, V. J. The emerging concept of vascular remodeling. **N Engl J Med**, v. 330, n. 20, p. 1431-8, 1994.

GILARD, M. et al. Influence of omeprazol on the antiplatelet action of clopidogrel associated to aspirin. **J Thromb Haemost**, v. 4, n. 11, p. 2508-9, Nov 2006.

GILARD, M. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole CLopidogrel Aspirin) study. **J Am Coll Cardiol**, v. 22, n. 51(3), p. 256-60, Jan 2008.

GLADWIN, M. T. et al. The emerging biology of the nitrite anion. **Nat Chem Biol**, v. 1, n. 6, p. 308-14, Nov 2005.

GOMM, W. et al. Association of Proton Pump Inhibitors With Risk of Dementia: A Pharmacoepidemiological Claims Data Analysis. **JAMA Neurol**, v. 73, n. 4, p. 410-6, Apr 2016.

GROTE, K. et al. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. **Circ Res**, v. 92, n. 11, p. 80-6, 2003.

HADI, H. A.; CARR, C. S.; AL SUWAIDI, J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. **Vasc Health Risk Manag**, v. 1, n. 3, p. 183-98, 2005.

HAENISCH, B. et al. Risk of dementia in elderly patients with the use of proton pump inhibitors. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 265, n. 5, p. 419-28, Aug 2015.

HILLE, R.; NISHINO, T.; BITTNER F. Molybdenum enzymes in higher organisms. **Coord Chem Rev**, v. 255, n. 9-10, p. 1179-1205, May 1 2011.

ICHIMORI, K. et al. Inhibition of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by nitric oxide. Nitric oxide converts reduced xanthine-oxidizing enzymes into the desulfo-type inactive form. **J Biol Chem**, v. 274, n. 12, p. 7763-8, Mar 19 1999.

IM, W.B.; BLAKEMAN, D. P.; DAVIS, J. P. Irreversible inactivation of rat gastric (H⁺-K⁺)-ATPase in vivo by omeprazole. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 126, n. 1, p. 78-82, Jan 16 1985.

KOHLER, J.E. et al. Antioxidant pre-treatment prevents omeprazole-induced toxicity in an in vitro model of infectious gastritis. **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 5, p. 786-91, Sep 1 2010.

KOO, S. H. et al. Effects of proton pump inhibitor on the human gut microbiome profile in multi-ethnic groups in Singapore. **Singapore Med J**. Nov 29 2018.

KORSHUNOV, V. A.; SCHWARTZ, S. M., BERK, B. C. Vascular remodeling: hemodynamic and biochemical mechanisms underlying Glagov's phenomenon. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 8, p. 1722-8, 2007.

KOSTRZEWSKA, M. et al. The effect of omeprazole treatment on the gut microflora and neutrophil function. **Clin Res Hepatol Gastroenterol**, v. 41, n. 5, p. 575-584, Oct 2017.

LAZARUS, B. et al. Proton Pump Inhibitor Use and the Risk of Chronic Kidney Disease. **JAMA Intern Med**, v. 176, n. 2, p. 238-46, Feb 2016.

LOVETT, D. H. et al. A novel intracellular isoform of matrix metalloproteinase-2 induced by oxidative stress activates innate immunity. **PLoS One**, v. 7, n. 4, e34177, 2012.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 2, p. 156-67, Feb 2008

MARTINEZ-LEMUS, L. A.; HILL, M. A.; MINIGER, G. A. The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure. **Physiology (Bethesda)**, v. 24, p. 45-57, Feb 2009.

MILLAR, T. M. et al. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. **FEBS Lett**, v. 427, n. 2, p. 225-8, May 8 1998.

MO, C. et al. PPI versus Histamine H2 Receptor Antagonists for Prevention of Upper Gastrointestinal Injury Associated with Low-Dose Aspirin: Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS One**, v. 10, n. 7, e0131558, Jul 6 2015.

NASEEM, K. M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Mol Aspects Med**, v. 6, n. 1-2, p. 33-65, Feb-Apr 2005.

NAUTON, M.; PETERSON, G. M.; BLEASEL, M. D. Overuse of proton pump inhibitors. **J Clin Pharm Ther**, v. 25, n. 5, p. 333-40, Oct 2000.

NELIS, G. F. Safety profile of omeprazole. Adverse events with short-term treatment. **Digestion**, v. 44, p. 68-76, 1989.

PAPAZAFIROPOULOU, A.; TENTOLOURIS, N. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. **Hippokratia**, v. 13, n. 2, p. 76-82, Apr 2009.

PATEL, A. et al. Omeprazole induces heme oxygenase-1 in fetal human pulmonary microvascular endothelial cells via hydrogen peroxide-independent Nrf2 signaling pathway. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 311, p. 26-33, Nov 15 2016.

PELLO LÁZARO, A. M. et al. Use of Proton-Pump Inhibitors Predicts Heart Failure and Death in Patients with Coronary Artery Disease. **PLoS One**, p. 12, n. 1, e0169826, Jan 19 2017.

PINHEIRO, L. C. et al. Gastric S-nitrosothiol formation drives the antihypertensive effects of oral sodium nitrite and nitrate in a rat model of renovascular hypertension. **Free Radic Biol Med**, v. 87, p. 252-62, Oct 2015.

PINHEIRO, L. C. et al. Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. **Free Radic Biol Med**, v. 53, n. 4, p. 701-9, Aug 15 2012.

PINHEIRO, L. C. et al. Omeprazole impairs vascular redox biology and causes xanthine oxidoreductase-mediated endothelial dysfunction. **Redox Biol**, v. 9, p. 134-143, Oct 2016.

PRADO, A.F. et al. Matrix metalloproteinase-2-induced epidermal growth factor receptor transactivation impairs redox balance in vascular smooth muscle cells and facilitates vascular contraction. **Redox Biol**, v. 18, p.181-190.

RAFFETTO, J. D.; KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochem Pharmacol**, v. 75, n. 2, p.346-59, 2008.

RAJAGOPALAN, S. et al. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro: implications for atherosclerotic plaque stability. **J. Clin. Invest**, v. 98, p. 2572–9. 1996.

RAO, G.N.; CORSON, M.A.; BERK B.C. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation by increasing platelet-derived growth factor A-chain expression. **J Biol Chem**, v. 266, n. 13, p. 8604-8, May 5 1991.

SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 47, p. 211-42, 2007.

SHAH, N. H. et al. Proton Pump Inhibitor Usage and the Risk of Myocardial Infarction in the General Population. **PLoS One**, v. 10, n. 6, e0124653, 2015.

SHIN, J. M.; KIM, N. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the proton pump inhibitors. **J Neurogastroenterol Motil**, v. 19, n. 1, p. 25-35, Jan 2013.

SHIN, J.M.; MUNSON, K.; SACHS, G. Gastric H⁺,K⁺-ATPase. **Compr Physiol**, v. 1, n. 4, p. 2141-53, Oct 2011.

SHIN, J. M.; SACHS, G. Restoration of acid secretion following treatment with proton pump inhibitors. **Gastroenterology**, v. 123, n. 5, p. 1588-97, Nov 2002.

SHIVANNA, B. et al. Omeprazole attenuates hyperoxic injury in H441 cells via the aryl hydrocarbon receptor. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 10, p.1910-7, Nov 15 2011.

STRAND, D. S.; KIM, D.; PEURA, D. A. 25 Years of Proton Pump Inhibitors: A Comprehensive Review. **Gut Liver**, v. 15, n. 11(1), p. 27-37, Jan 2017.

TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n 6, p. 1075-81, Dec 2003.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? **Hypertension**, v. 44, n. 3, p. 248-52, Sep 2004.

VALENTIN, F. et al. Oxidative stress activates MMP-2 in cultured human coronary smooth muscle cells. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 19, n. 6, p. 661-7, 2005.

VAN VARIK, B. J. et al. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. **Front Genet**, v. 3, p. 290, 2012.

VIAPPIANI, S. et al. Activation and modulation of 72kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. **Biochem Pharmacol**, v. 77, n. 5, p. 826-34, 2009.

WANG, X.; KHALIL, R. A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. **Adv Pharmacol**, v. 81, p. 241-330, 2018.

YEPURI, G. et al. Proton Pump Inhibitors Accelerate Endothelial Senescence. **Circ Res**, v. 118, n. 12, p. 36-42, Jun 10 2016.

ZAJĄCZKOWSKI, S. et al. Promising effects of xanthine oxidase inhibition by allopurinol on autonomic heart regulation estimated by heart rate variability (HRV) analysis in rats exposed to hypoxia and hyperoxia. **PLoS One**, v. 13, n. 2, e0192781, Feb 12 2018.