

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (UFPR)

JULIANA TAHAN

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA GENOTOXICIDADE DE UMA FRAÇÃO RICA EM
POLISSACARÍDEOS EM SUA FORMA SUPERSULFATADA**

Curitiba
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (UFPR)

JULIANA TAHAN

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA GENOTOXICIDADE DE UMA FRAÇÃO RICA EM
POLISSACARÍDEOS EM SUA FORMA SUPERSULFATADA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dra. Daniela Morais Leme.

Co-orientadora: Emanoela Lundgren Thá.

Curitiba
2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora por confiar esse projeto importante à mim, pela oportunidade de realizar meu trabalho de conclusão de curso sob sua orientação e por ser sempre tão solícita ao longo do desenvolvimento do projeto.

À minha co-orientadora Emanoela Lundgren Thá, pelas orientações fornecidas e por toda a atenção e auxílio prestados ao longo do desenvolvimento do projeto.

Às minhas colegas de laboratório, em especial à Isidoris Rodrigues de Souza, pelos ensinamentos compartilhados que me auxiliaram frente às dificuldades que encontrei durante os experimentos.

À minha irmã Giovanna, pelos conselhos, pelo amparo, por acreditar sempre no meu potencial e me dar a força que precisava para seguir em frente nos momentos mais difíceis e atribulados.

Ao meu pai Anuar, minha mãe Marcia e minha avó Anice pelo amor e carinho e pela solicitude frente a qualquer necessidade minha.

Aos meus amigos queridos pela paciência e por todo o apoio emocional ao longo do ano.

À minha banca Profa. Dra. Fernanda Fogagnoli Simas e Profa. Dra. Izonete Cristina Guiloski por aceitarem avaliar o meu Trabalho de Conclusão de Curso.

Ao Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência da UFPR (CTAFUFPR) pelo uso dos equipamentos adquiridos com recursos do edital Proequipamentos (CAPES) e Pro-Infra (INEP).

E por fim, gostaria de agradecer à Universidade Federal do Paraná (UFPR) e à todos os professores e funcionários, pelo ensino gratuito de qualidade e pelas oportunidades proporcionadas.

“Estou convencido das minhas próprias
limitações – e esta convicção é minha força.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

O aumento da exposição humana a substâncias genotóxicas (*i.e.*, substâncias com potencial de danificar o DNA), têm estimulado estudos de identificação de biocompostos com ação protetora ao material genético (atividade antígenotóxica). Neste sentido, polissacarídeos sulfatados (PSs) são promissores compostos candidatos e suas propriedades benéficas à saúde humana têm sido extensamente exploradas. Algumas destas propriedades benéficas são atribuídas ao grau de sulfatação dos PSs. Contudo, a aplicabilidade destes PSs como produtos para a saúde humana requerer primeiramente a determinação da segurança toxicológica destes compostos, sendo que nesse processo de avaliação diversas vias de efeitos adversos devem ser consideradas. Frente a isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico de uma fração de polissacarídeos, extraída de *Spatoglossum schroederi* (alga marrom), carregados negativamente pela presença de carboxilato e sulfato, em sua forma supersulfatada (FPS). Para isso, células HepG2 (linhagem celular de hepatocarcinoma humano) foram expostas a diferentes concentrações da FPS (25, 50 e 100 µg/mL) e posteriormente processadas para o teste de genotoxicidade ensaio Cometa (versão alcalina). Não foi verificado aumento de danos no DNA nas células expostas a FPS em relação ao controle, indicando, assim, ausência de genotoxicidade para essa fração de polissacarídeos. Estes dados se mostram concordantes com estudos toxicológicos de outros PSs, como por exemplo, a Fucana A, PS também presente na fração de estudo, para qual ausência de toxicidade e genotoxicidade já foram demonstradas em modelos murinos e de células humanas. Apesar da necessidade de avaliação de outros *endpoints* de efeitos adversos, a FPS mostra-se uma promissora candidata a estudos de antígenotoxicidade por não conferir perigo à saúde humana quanto a indução de danos no DNA.

Palavras chave: polissacarídeos; Fucana A; alginato de sódio; segurança toxicológica; genotoxicidade; ensaio Cometa.

ABSTRACT

The increasing exposure of DNA to genotoxic agents (*i.e.*, *compounds with potencial to cause dna damage*), has stimulated studies that identify biocompounds that offer protection against DNA damage (antigenotoxic activity). In this way, sulfated polysaccharides (PSs) are promising candidates whose beneficial actions have been widely explored. Some of these actions were positively related to the sulfation degree of these molecules. Meanwhile, the applicability of these PS in human health require determination of the toxicological security of these compounds, in which a diverse adverse effects pathways must be considered. Therefore, this study had as objective assess the genotoxic potential of a polysaccharide fraction, extracted from *Spatoglossum schroederi* (*brown algae*), negatively charged by the presence of carboxylate and sulfate, in its oversulfated form (FPS). For this purpose, HepG2 cell lines have been exposed to different concentrations of the FPS (25, 50 e 100 µg/mL) and then processed for the genotoxicity assessment Comet Assay (Alkaline version). It haven't been verified increase in the DNA damage on cells exposed to FPS comparing with control, indicating ausence of genotoxicity for this polysaccharide fraction. This data is in agreement with toxicological studys of other PSs, like the fucan A, also present on the fraction of study, for which the ausence of toxicity and genotoxicity have been shown in murine models and human cells. Besides the need of evaluate other *endpoints* of adverse effects, the FPS appears to be a promising candidate for antigenotoxicity studies.

Keywords: Polysaccharide; Fucan A; Sodium alginate; Toxicological security; Genotoxicity; Comet Assay.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. OBJETIVO GERAL	8
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
1.3. JUSTIFICATIVA	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E A ATIVIDADE BENÉFICA À SAÚDE HUMANA	9
2.2. EXPOSIÇÃO À GENOTOXICANTES	10
2.3. AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA TOXICOLÓGICA: TESTES DE GENOTOXICIDADE	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. MATERIAL	13
3.2. MÉTODOS	13
3.2.1. Cultivo celular	13
3.2.2. Teste do MTT	14
3.2.3. Ensaio Cometa	15
3.2.4. Análise de dados	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. ENSAIO DO MTT	13
4.2. ENSAIO COMETA	13
5. CONCLUSÃO	13
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1. INTRODUÇÃO

Os xenobióticos são substâncias químicas estranhas aos organismos (*e.g.*, metais pesados, herbicidas, inseticidas, fármacos) e eles podem impactar sistemas biológicos, levando a disfunções na fisiologia e funcionalidade destes sistemas. A crescente industrialização tem resultado no aumento de xenobióticos no meio ambiente. Desta forma, seres humanos são suscetíveis a exposição a xenobióticos tanto pela exposição direta como indireta via cadeia alimentar (CADET; DAVES 2017).

Dá-se o nome de bioprospecção o processo de descoberta e industrialização de biocompostos com atividades benéficas ao organismo, podendo ter origem vegetal ou animal. Já foram descritos na literatura biocompostos capazes de proteger o nosso DNA contra danos causados por xenobióticos, como substâncias provenientes de frutas, plantas ou algas (MUELLER et al., 2016; APROTOSOAIIE et al., 2018). Essas substâncias podem agir removendo ou inativando os genotóxicos antes que haja dano ao DNA ou agindo no processo de reparo corrigindo os danos no DNA e reduzindo a taxa de mutação (VEGA et al., 2017).

Polissacarídeos sulfatados (PSs) são biocompostos encontrados em algas marinhas. O composto está presente nos três maiores grupos de algas: as algas vermelhas, algas marrons e algas verdes, sendo que a estrutura do PS varia entre as espécies. Esses polissacarídeos possuem importantes ações benéficas ao organismo, sendo que estas foram relacionadas ao alto conteúdo de sulfato presente em sua molécula, assim como a distribuição dos grupamentos sulfato em sua estrutura. Sendo assim, a manipulação dessas moléculas para produzir compostos com alto teor de sulfatação é uma área que pode ser explorada na busca de bioativos que ofereçam proteção contra danos causados por xenobióticos (NGO; KIM, 2013).

A aplicação desses PSs como produtos para uso humano requer a avaliação de sua segurança toxicológica. Ensaios toxicológicos verificam a existência de possíveis riscos que o composto possa oferecer ao organismo, garantindo a segurança do seu uso em prol da saúde humana (LAVANDEIRA, 2014). Ensaios de genotoxicidade investigam a capacidade de uma substância em induzir danos ou mutações no DNA. É sabido que agentes carcinógenos agem danificando a molécula de DNA, causando mutações e levando ao desenvolvimento de câncer. Danos no DNA estão relacionados a diversas doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington e Parkinson. Além disso, também podem causar infertilidade, doenças

cardiovasculares, síndromes metabólicas e outras patologias humanas (TURKEZ et al., 2017).

O ensaio cometa é um teste baseado na exposição de células de mamíferos à um composto e que permite detectar danos ao DNA na forma de quebra de fita. É uma técnica muito utilizada na detecção e quantificação de danos no DNA por ser relativamente simples, de baixo custo e com alta sensibilidade, o que faz dele uma ótima ferramenta na verificação da genotoxicidade de um composto.

1.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial genotóxico de uma fração rica em polissacarídeos supersulfatados extraídos da alga *Spatoglossum schroederi* utilizando um modelo *in vitro* hepático humano (linhagem celular de hepatocarcinoma humano – HepG2).

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade de uma fração rica em polissacarídeos contendo alginato de sódio e Fucana A em sua forma supersulfatada (FPS) pelo teste MTT com células HepG2, a fim de definir as concentrações não citotóxicas para a avaliação do potencial genotóxico;
- Avaliar o potencial genotóxico da FPS pelo ensaio Cometa versão alcalina.

1.3. JUSTIFICATIVA

Como a exposição humana a contaminantes ambientais tem sido ligada ao aparecimento de danos no material genético, biocompostos com potencial antigenotóxico/antimutagênico vêm sendo explorados nas últimas décadas, com o intuito de promover proteção ao DNA (VEGA et al., 2017). PSs são biocompostos encontrados na natureza, majoritariamente em algas marinhas, com diversas atividades benéficas ao organismo, sendo que essas atividades vêm sendo relacionadas positivamente com o grau de sulfatação dessas moléculas. (NGO; KIM, 2013). Isso possibilita a criação de PSs com alto teor de sulfatação que possam oferecer maior capacidade genoprotetora. A utilização desses compostos em benefício à saúde humana requer a determinação de sua segurança toxicológica. A

avaliação toxicológica de um composto inclui a investigação de diferentes efeitos adversos, e um deles é o potencial de indução de danos ao DNA. Tendo isso em consideração, este trabalho objetiva verificar a genotoxicidade de uma fração de polissacarídeos carregados negativamente, extraída da alga *Spatoglossum schroederi*, em sua forma supersulfatada (FPS), para posterior verificação de sua ação antígenotóxica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E POTENCIAL DE APLICAÇÃO COMO BIOPRODUTOS PARA SAÚDE HUMANA

Polissacarídeos constituem a classe de moléculas mais encontradas na natureza. São polímeros de carboidratos formados por mais de 20 unidades de monossacarídeos (aldeídos ou cetonas com dois ou mais grupos hidroxila) unidos por ligações glicosídicas.

Os polissacarídeos sulfatados (PS) são um grupo de moléculas presentes no grupo animal e em algas marinhas. A estrutura desses polissacarídeos varia conforme a espécie de alga em que são encontrados. Estas se dividem em 3 grupos: as algas vermelhas (*Rhodophyceae*), que possuem como polissacarídeos as galactanas sulfatadas; as algas marrons (*Phaeophyceae*), que possuem fucanas sulfatadas (homopolissacarídeos) e fucoidanas (heteropolissacarídeos) e as algas verdes (*Chlorophyceae*), formadas por heteropolissacarídeos ricos em galactose, manose, xilose, arabinose, glicose e/ou ácidos urônicos (ROCHA et al., 2004).

As fucanas são PS formados por L-fucose presentes na parede celular de algas marrons. A maior parte das fucanas sulfatadas provenientes de algas marrons possuem esqueleto que contém longos resíduos de L-fucose alternados (1-3) e (1-4), carregando um grupamento sulfato no C2 ou C4 (BOUËT et al., 2017).

Esses polissacarídeos têm sido muito estudados devido às suas diversas propriedades terapêuticas conferidas pela sua atividade antioxidante, anticoagulante, antitumoral, antiviral, anti-alérgica e anti-inflamatória (NGO; KIM, 2013). Galactanas sulfatadas e carrageninas (encontradas em algas vermelhas) e fucoidanas sulfatadas apresentam alta atividade anticoagulante, podendo ser usadas como uma alternativa à heparina no tratamento da hemofilia (WIJEKESARA, 2011). De acordo com Witvrouw & De Clercq (1997) a fucoidana apresenta grande atividade viral contra doenças infecciosas como o HIV, herpes e citomegalovírus. As carrageninas,

fucoidanas e rhamnogalactanas sulfatadas inibem a entrada de vírus envelopados nas células, com herpes e HIV. PSs também possuem importante papel como antioxidante, atuando na captação de radicais livres e na proteção do DNA contra danos oxidativos, conferindo a esses compostos a capacidade de prevenir a iniciação de processos tumorais (WANG et al., 2007; WIJESEKARA et al., 2011).

Além das fucanas, o alginato de sódio também é um composto extraído de algas marrons, muito usado como veículo de medicamentos. São copolímeros formados pelos ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos com ligações 1-4. As propriedades físicas desse composto dependem da proporção entre os resíduos manurônicos (M) e gulurônicos (G), sendo que polímeros com maiores proporções de G formam um gel rígido enquanto maiores proporções de M formam um gel mais fraco e elástico. Devido às suas propriedades é muito usado como veículo de medicamentos e prevenção de refluxo gástrico (CHATURVEDI et al., 2019). Além disso, seu derivado sulfatado também apresenta propriedade anticoagulante, demonstrando efeito análogo à heparina (FERNANDO et al., 2019).

Xiao-Tao Ma et al. (2017) utilizaram em seu estudo quatro tipos de PS com diferentes conteúdos de sulfato para investigar sua capacidade de reparação em organelas subcelulares. São eles os polissacarídeos derivados das algas *Porphyra yezoensis* (17,9% de sulfato), *Gracilaria lemaneiformis* (13,3% de sulfato), *Sargassum fusiform* (8,2% de sulfato) e *Undaria pinnatifida* (5,5% de sulfato). O estudo demonstrou que os PSs com maiores concentrações de sulfato apresentaram maior capacidade de captação de radicais hidroxila. Além disso, os PSs utilizados no estudo apresentaram grande capacidade de reparação de danos nessas organelas causados por radicais livres, sendo que quanto maior o grau de sulfatação maior foi o efeito de reparação.

3.2. EXPOSIÇÃO HUMANA A GENOTOXICANTES

A molécula de DNA é responsável por carregar toda a informação que determina o crescimento, desenvolvimento e reprodução em seres vivos. Possui duas fitas com estrutura de dupla-hélice, formadas por monómeros chamados nucleotídeos. Esses monómeros são compostos por desoxirriboses, grupos fosfato e bases nitrogenadas como purinas (A, G) e pirimidinas (C, T, U). Danos ao DNA são caracterizados por alterações na estrutura primária da dupla hélice, e podem ser causados por exposição

à contaminantes ambientais ou fatores endógenos (TRAVERS; MUSKHELISHVILI, 2015).

Esses agentes são denominados genotóxicos e podem ser classificados em agentes biológicos, agentes endógenos, agentes físicos e agentes químicos (AMBEKAR, 2017). A radiação UV causa danos ao DNA nas bases C e T, causando quebra das ligações entre bases púricas e pirimídicas e subsequente união entre bases pirimidínicas adjacentes. Essa ligação leva a formação de dímeros de pirimidina, impedindo a replicação do DNA. Outro agente físico como a radiação ionizante, causa quebra da fita simples de DNA por radiólise (*i.e.*, clivagem de moléculas por radiação ionizante) e oxidação de bases nitrogenadas. Alterações na temperatura podem causar danos por depurinação e quebra de fita simples, alterando a estrutura de dupla hélice do DNA (CHATTERJEE; WALKER, 2017).

Dentre os agentes biológicos podemos citar o vírus HIV-1, o vírus da hepatite C (HCV) estimula a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e inibe vias de reparo do DNA em células hospedeiras. A bactéria *Escherichia coli* possui uma ampla rede de proteínas que, quando super expressas, levam ao aumento de EROS e causam danos ao DNA (XIA et al., 2019). A infecção por *Helicobacter pylori*, bactéria que coloniza a mucosa gástrica, causa aumento de EROS e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), levando à danos à molécula de DNA e consequente instabilidade genômica e câncer (CAETANO et al., 2019).

A exposição do DNA a contaminantes ambientais, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, leva a formação de adutos de DNA que bloqueiam o pareamento de bases Watson-Crick e causam mutações. Além disso, causam crosslinking de DNA e induzem a formação de EROS (AMBEKAR, 2017). Os agentes alquilantes, como as mostardas nitrogenadas, etileneiminas e metilmelaminas e alquilsulfonato, são agentes capazes de adicionar covalentemente um grupo alquila à biomoléculas, como o DNA. Agem em todas as fases do ciclo celular pela formação de ligação cruzada com os filamentos de DNA impedindo sua replicação (AVENDANO; MENENDEZ, 2015). O Metanossulfonato de metila (MMS) é um agente alquilante geralmente empregado controle positivo em testes de genotoxicidade. Ele age alquilando o nitrogênio de posição 7 da guanina e posição 3 da adenina, produzindo N7-metilguanina e N3-metiladenina, moléculas cujas ligações N-glicosídicas são suscetíveis a quebra, produzindo sítios apurínicos (CHATTERJEE; WALKER, 2017).

Danos no DNA também podem ser causados por EROS, por exemplo, O_2^- , H_2O_2 e $\cdot OH$, que apresentam capacidade genotóxica reconhecida. Essas moléculas reagem com pares de bases do DNA, resultando em danos oxidativos. As principais vias de produção de EROS nas células compreendem a mitocôndria, que gera EROS pelo processo de respiração celular; NADPH oxidase, enzima ligada à membrana celular; peroxissomos, que contém enzimas que produzem H_2O_2 ; retículo endoplasmático, cujo processo de enovelamento de proteínas tem como subproduto a produção de H_2O_2 ; e a enzima mieloperoxidase, presente nos grânulos citoplasmáticos em neutrófilos. Assim como os EROS, as espécies reativas de nitrogênio (ERNS) também são potentes oxidantes, como por exemplo o NO, produzido pela enzima NO sintetase (NIMSE; PAL, 2015; SRNIVAS et al. 2018).

3.3. AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA TOXICOLÓGICA: TESTES DE GENOTOXICIDADE

A partir do século XIX a toxicologia cresceu exponencialmente devido ao aumento na produção de fármacos, pesticidas e o surgimento de outros xenobióticos, frente a necessidade de pesquisar efeitos adversos a exposição à essas substâncias. O desenvolvimento de novos fármacos implica que haja uma bateria de exames pré-clínicos que comprovem a segurança do seu uso antes de sua comercialização. Dentre eles estão exames toxicológicos gerais, genotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade e toxicidade sobre a função reprodutora (LAVANDEIRA, 2017).

A maioria dos carcinógenos agem causando lesão no DNA, levando à mutações que serão transmitidas para a próxima geração. A detecção e classificação de possíveis carcinógenos requer uma avaliação de sua atividade genotóxica. Testes de genotoxicidade incluem ensaios *in vivo* e *in vitro* e são utilizados para detectar e classificar agentes que causam danos ao DNA, como agentes carcinógenos e mutágenos. Alguns testes de genotoxicidade incluem o teste de Ames, teste de aberração cromossômica, teste de Micronúcleo e o ensaio Cometa e outras técnicas não tão utilizadas (TURKEZ et al., 2017).

O ensaio cometa é um teste que permite analisar e quantificar danos causados ao DNA. O método consiste na obtenção de nucleóides expostos à substância teste e aplicação de cargas que levam à migração dos fragmentos de DNA, permitindo a quantificação de danos em forma de quebras de fita. A técnica permite detectar

quebras de fita simples, quebras de fita dupla, sítios álcali-lábeis e quebras associadas à sítios incompletos de reparo por excisão (HONG et al., 2018).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Como material de estudo utilizou-se uma fração rica em polissacarídeos carregados negativamente pela presença de carboxilato e sulfato em sua forma supersulfatada (FPS). Esta foi gentilmente cedida pelo Prof. Hugo Alexandre Oliveira Rocha, do Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Natal-RN, Brasil). A fração foi extraída da alga *Spatoglossum schroederi* segundo Leite et al. (1998) e submetida a um processo de sulfatação química para obtenção da forma supersulfatada. As soluções teste foram preparadas diretamente no meio de cultivo das células empregadas.

Como modelo *in vitro* hepático humano foram utilizadas células HepG2 (*Human hepatocellular carcinoma cells*), cedidas pela Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Cultivo celular

As células HepG2 foram cultivadas (Figura 1) em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e adição de antibiótico [Penicilina (10 000 U/mL), Estreptomicina (10 000 ug/mL)] e incubadas a 37°C, 5% CO₂ e atmosfera úmida. As

células foram subcultivadas quando atingiram 80% de confluência na proporção de *split* de 1:3.

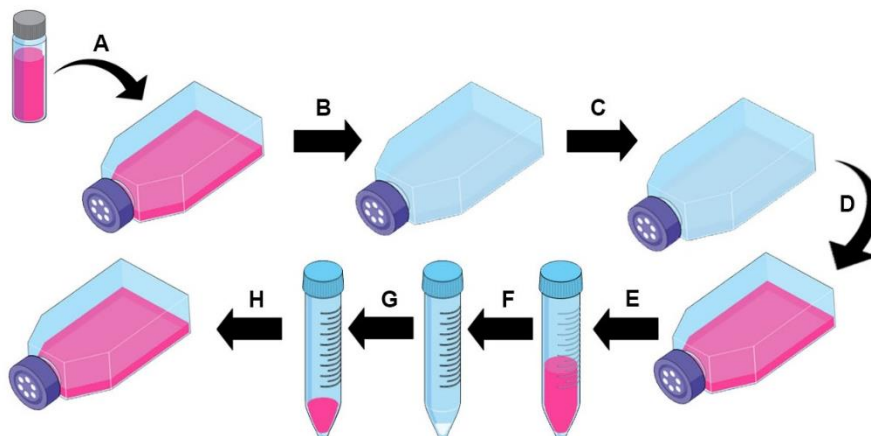


Figura 1. Esquema do Subcultivo de células hepg2. Fonte: A autora. Adaptado da plataforma Mind the Graph.

- (A) Um vial contendo $1,5 \times 10^6$ células foi descongelado e adicionado a uma garrafa T75 com 15mL de meio, que foi incubada por 3 dias. 24 horas após o descongelamento houve troca do meio de cultura.
- (B) A garrafa foi lavada com 10mL de PBS 1x [] LPS free.
- (C) 3mL de tripsina-EDTA 0,05% foram adicionados e a garrafa foi incubada por 3 minutos.
- (D) Após o desprendimento das células, a tripsina foi inativada com 6mL de meio completo.
- (E) O conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo de centrifugação de 15 mL.
- (F) A suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos a 1500rpm e o sobrenadante foi descartado. (G) O *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de meio completo.
- (H) As células foram subcultivadas em uma nova garrafa na proporção de *split* de 1:3.

4.2.2. Teste do MTT

O teste de MTT foi realizado seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983). Para a realização do teste foram plaqueadas 10000 células por poço em uma placa de 96 poços. 24 horas após o plaqueamento as células foram expostas por 24 horas a 3 concentrações da FPS: 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Como controle negativo foi utilizado o próprio meio de cultura, para o controle positivo foi utilizado Triton X-100 1%-v/v e para o controle branco apenas meio DMEM, sem células.

O MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, CAS 298-93-1, Sigma-Aldrich) foi dissolvido em PBS na proporção 0,5 mg/mL e filtrado em condições estéreis. Após 24 horas de exposição das células à Fucana os poços foram lavados com PBS e expostos à solução de MTT por 3 horas. Decorridas as 3 horas de exposição a solução de MTT foi retirada dos poços, DMSO foi adicionado e a placa foi agitada para a dissolução dos cristais de formazan. A leitura da placa foi realizada utilizando

um leitor de microplaca Epoch™ e o programa Gen.1.11. a 570 nm para a obtenção das medidas de absorvância.

A viabilidade celular foi calculada através da seguinte fórmula:

$$viabilidade\ celular = \frac{(Média\ tratamento - média\ controle\ branco) \times 100}{Média\ controle\ negativo - média\ controle\ branco}$$

4.2.3. Ensaio Cometa

O ensaio Cometa é utilizado para detectar e quantificar a presença de danos no material genético. A versão alcalina do ensaio Cometa permite detectar quebras de fita simples, quebras de fita dupla, sítios incompletos de reparo e sítios álcali-lábeis (sítiosapurínicos e sítiosapurimídínicos). Para a realização do teste de genotoxicidade (Figura 2), as células foram expostas por três horas à três concentrações da FPS: 25, 50 e 100 µg/mL. E o controle positivo foi exposto por três horas ao MMS.

Uma vez realizado os tratamentos acima descritos, suspensões celulares foram obtidas por tripsinização centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Sobrenadantes foram descartados de modo que restassem aproximadamente 100 µL para as células serem ressuspensas. Para a contagem da viabilidade celular, foram retirados 10 µL da suspensão para posterior adição de 10µL de Trypan Blue e avaliação da viabilidade celular.

Foram adicionados 150 µL de agarose de baixo ponto de fusão à 37°C a cada suspensão celular. Foram distribuídos 100 µL em lâminas previamente cobertas com agarose normal. Estas foram colocadas em solução de lise por 2 horas para a remoção dos componentes celulares, restando apenas o DNA.

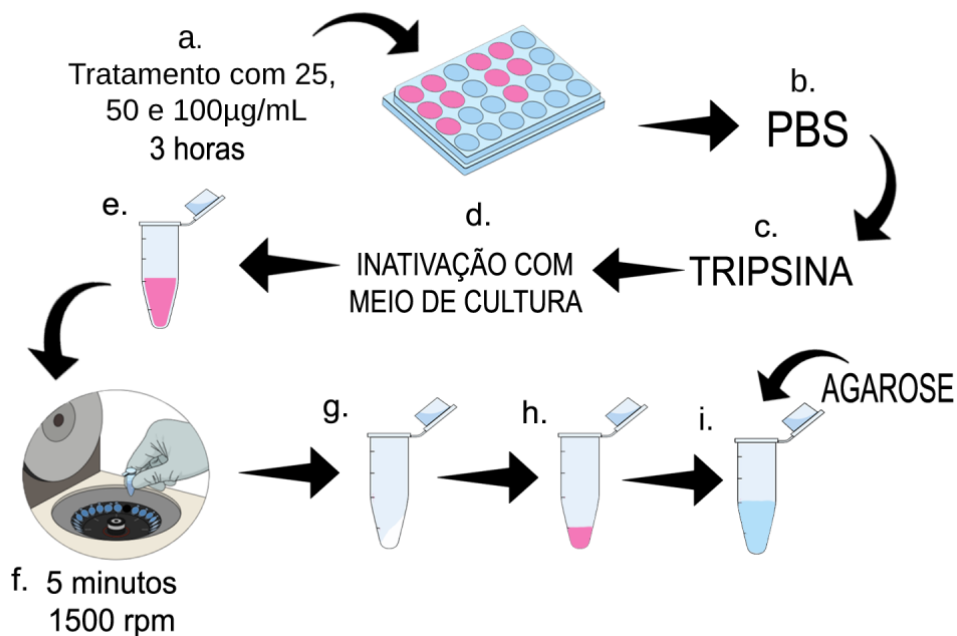


Figura 2. Obtenção da suspensão celular. Fonte: A autora. Adaptado da plataforma Mind the Graph.

- (a) Tratamento com três concentrações de Fucana: 25, 50 e 100 µg/mL.
- (b) Lavagem dos poços com PBS.
- (c) Adição de mL de tripsina-EDTA 0,05%.
- (d) Inativação com 1 mL de meio de cultura.
- (e) Transferencia para um eppendorf.
- (f) Centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm.
- (g) Descarte do sobrenadante.
- (h) ressuspensão em 100 µL de meio.
- (i) Adição de 150 µL de agarose de baixo ponto de fusão.

Para a etapa de eletroforese, os nucleóides foram estabilizados por 25 minutos em tampão de eletroforese (200 mM EDTA; 10 M NaOH; pH \geq 13) para a desespiralização. A corrida eletroforética foi realizada por 25 minutos a 300 mA, 1 V/cm e a 4°C. Após a corrida, as lâminas foram neutralizadas com tampão de neutralização com 3 lavagens de 5 minutos cada. Após a secagem das lâminas, estas foram colocadas em etanol absoluto por 5 minutos para a fixação das lâminas.

As lâminas foram coradas com brometo de etídio e analisadas pelo microscópio de fluorescência Axio Imager Z2 (Carl Zeiss) equipado com o programa de análise de imagem Metafer 4-Monochrome (Metafer System - Zeiss).

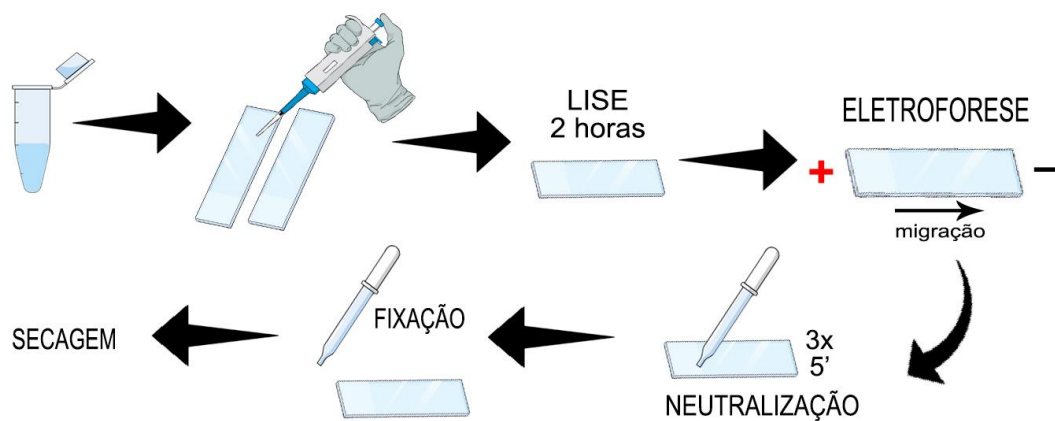


Figura 2. Corrida eletroforética. Fonte: A autora. Adaptado da plataforma Mind the Graph.

- (k) Suspensão celular com adição de agarose baixo ponto de fusão.
 (l) Distribuição de 100 µL da suspensão em lâmina previamente coberta com agarose, em duplicata.
 (m) Lâminas foram deixadas por 2 horas em solução de lise para a remoção dos componentes celulares.
 (n) Neutralização das lâminas através de 3 banhos de 5 minutos com tampão de neutralização.
 (o) Estabilização das lâminas em tampão de eletroforese por 25 minutos e realização da corrida eletroforética por 25 minutos a 300 mA, 1V/CM A 4°C.
 (p) Fixação das lâminas com etanol e secagem.

4.2.4. Análise de dados

Os dados de viabilidade celular foram avaliados estatisticamente pelo teste one-way ANOVA, para determinação de efeitos citotóxicos. Células com viabilidade celular menor que 30% em relação ao controle negativo serão consideradas inviáveis para a realização do ensaio Cometa.

A verificação do potencial genotóxico pelo ensaio Cometa foi determinada pela porcentagem de DNA na cauda (Figura 3). A genotoxicidade foi avaliada estatisticamente pelo teste one-way ANOVA seguido de comparação múltipla pelo teste de Dunnett's. Respostas genotóxicas positivas serão consideradas quando observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo.

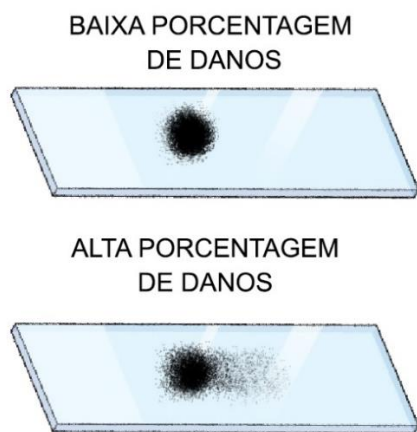


Figura 3. Porcentagem de danos na cauda do nucleóide após o ensaio cometa
 Fonte: A autora (2019).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TESTE DO MTT

A FPS não apresentou efeitos citotóxicos às células HepG2 em nenhuma das concentrações avaliadas (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 5). Esse resultado indica que essas concentrações, por serem não citotóxicas, podem ser utilizadas para a determinação da genotoxicidade desta FPS pelo ensaio Cometa.

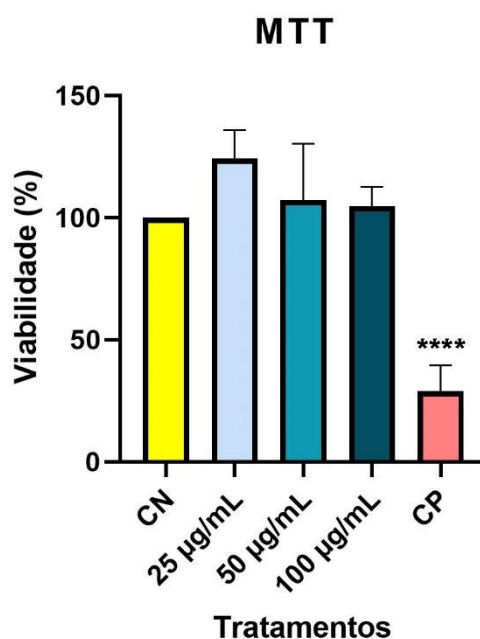


Figura 5. Avaliação da viabilidade celular de células HepG2 expostas (24 horas) a uma fração de polissacarídeo na forma supersulfatada pelo teste do MTT. CN:

Controle negativo, CP: Controle positivo. *Significativo em relação ao CN ($p < 0,05$)
Fonte: A autora (2019).

5.2. ENSAIO COMETA

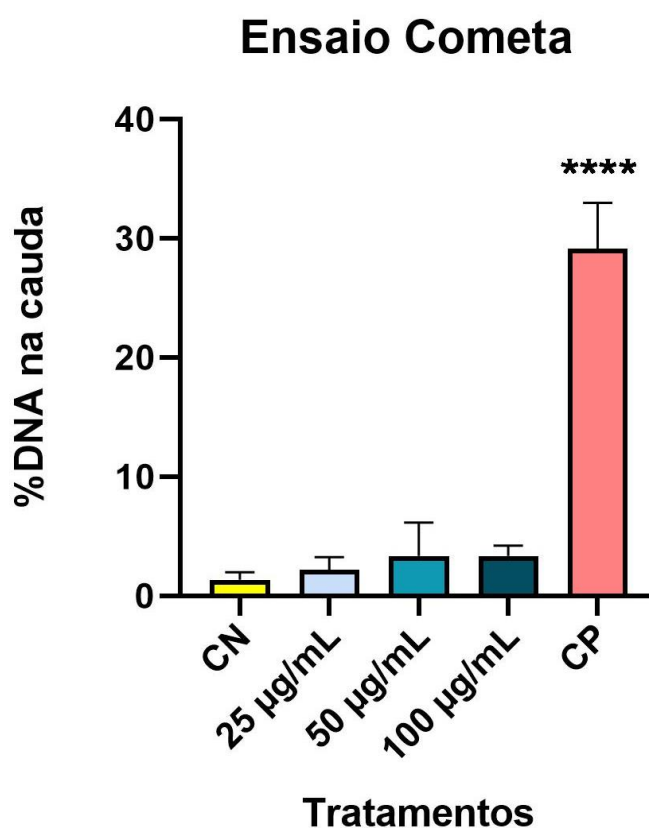


Figura 6. Avaliação da genotoxicidade de uma fração de polissacarídeos, na sua forma supersulfatada, utilizando células HepG2 e ensaio Cometa *in vitro* (versão alcalina). CN: Controle negativo, CP: Controle positivo. *Significativo em relação ao CN ($p < 0,05$). Fonte: A autora (2019).

Estudos anteriores da avaliação toxicológica da Fucana A haviam demonstrado que o composto não apresenta potencial genotóxico. Souza (2018) expôs células HepG2 a 100 µg/mL de Fucana A por 72h e constatou que o composto não era capaz de induzir danos ao DNA. Almeida-lima (2010) utilizou concentrações mais elevadas do que as empregadas neste trabalho (20, 500 e 1000 µg/mL) e através do ensaio Cometa alcalino e o teste de Ames, constatou que a Fucana A não apresenta efeito genotóxico mesmo que em altas concentrações.

Não foram encontrados estudos que avaliem a genotoxicidade do alginato de sódio através do ensaio Cometa. Younes (2017) avaliou a mutagenicidade do alginato

de sódio através do teste de Ames e verificou a ausência de mutações com e sem ativação metabólica. Além disso, também foram realizados testes de quantificação de aberrações cromossômicas e troca de cromátides irmãs. Em nenhum dos testes realizados o alginato de sódio apresentou potencial genotóxico.

Neste trabalho foi realizado o ensaio Cometa para a verificação do potencial genotóxico do FPS, e verificação da segurança toxicológica do composto quanto a indução de danos no DNA (lesões primárias do DNA). O FPS continha em sua composição polissacarídeos sulfatados modificados quimicamente. As três concentrações (25, 50 e 100 µg/mL) não foram capazes de induzir danos ao DNA de células HepG2 detectáveis pela versão alcalina (padrão) do ensaio Cometa (Figura 6), o que corrobora com os estudos encontrados anteriormente.

Dessa forma, o extrato da alga *Spatoglossum schröderi* contendo a Fucana A e o alginato de sódio em sua versão supersulfatada não apresentaram efeitos genotóxicos às células. Portanto, o extrato não causa danos ao DNA, sendo seguro para a utilização na busca de compostos que ofereçam proteção contra genotóxicos.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a genotoxicidade de um polissacarídeo sulfatado composto de alginato de sódio e Fucana A. A Fucana A possui diversas atividades benéficas ao organismo bem documentadas pela literatura. Além disso, a quantidade de grupamentos sulfato presente em PSs pode estar diretamente ligada a algumas de suas propriedades benéficas (e.g., atividade antioxidante). Isso nos leva a crer que a FPS em estudo tem grande potencial para ser utilizado em prol da saúde humana, portanto faz-se necessário um estudo que verifique a capacidade desse composto em proteger o DNA contra danos causados por xenobióticos. A hipótese inicial do estudo era de que o PS não apresentasse efeito genotóxico às células HepG2, o que foi confirmado pelo ensaio Cometa alcalino. As três concentrações utilizadas (25, 50 e 100 µg/mL) não foram capazes de induzir danos à molécula de DNA, mostrando que, nessas concentrações, esse é um composto seguro para ser utilizado na busca de biocompostos com ação antígeno-tóxica. Contudo, ainda são necessários outros estudos para garantir a segurança toxicológica desse composto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-LIMA, J; COSTA, L S; SILVA, N B; MELO-SILVEIRA, R F; SILVA, F; MEDEIROS, S R B; LEITE, E L; ROCHA, H A O. Evaluating the possible genotoxic, mutagenic and tumor cell proliferation-inhibition effects of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan. **Journal Of Applied Toxicology**, [s.l.], v. 30, n. 7, p.708-715. 2010.

AMBEKAR, S. S.; HATTUR, S. S.; BULE, P. B. DNA: Damage and Repair Mechanisms in Humans. **Glob J Pharmaceu Sci**, v. 3(2). 2017.

AVEDAÑO, C.; MENENDEZ, C. Chapter 5 – DNA Alkylating Agents. **Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs**, e. 2, p. 197-241, 2015.

BO, C. et al. A single portion of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L) improves protection against DNA damage but not vascular function in healthy male volunteers. **Nutrition Research**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.220-227. 2013.

BOUËT, D. E., HARDOUIN, K., POTIN, P., KLOAREG, B., HERVE, C., A review about brown algae cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: cell wall context, biomedical properties and key research challenges. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 395-408, 2017.

CADET, J.; DAVIES, K.J. A. Oxidative DNA damage & repair: an introduction. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 107, p. 2–12, 2017.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C.; Mechanisms of DNA Damage, Repair and Mutagenesis. **Env. And Mol. Mut.**, v. 58, p. 235-263, 2017.

CHATURVEDI, K.; GANGULY, K.; MORE, U. A.; REDDY, K. R.; DUGGE, T.; NAIK, B.; AMINABHAVI, T. M.; NOOLVI, M. N. Sodium alginate in drug delivery and biomedical areas. **Natural Polysaccharides In Drug Delivery And Biomedical Applications**, [s.l.], p.59-100, 2019.

COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, R. M.; OLIVEIRA, D. A.; SABRY, D. A.; CÂMARA, R. B. G.; NOBRE, L. T. D. B.; COSTA, M. S. S. P.; ALMEIDA-LIMA, J.; FARIAS, E. H. C.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Biological activities of sulfated

polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21-28, 2017.

da segurança de novos fármacos. 2014. 70 f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa. 2014.

FERNANDO, L. P. S.; KIM, D.; NAH, J.; JEON, Y. Advances in functionalizing fucoidans and alginates (bio)polymers by structural modifications: A review. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 355, p.33-48. 2019.

HONG, Y.; JEON, H. L.; KO, Y, K.; KIM, J. W. YIL, J. S.; AHN, Y.; KIM, T. A.; LEE, J. K. Assessment of the predictive capacity of the optimized in vitro comet assay using HepG2 cells. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, v. 827, p.59-67. 2018.

J. WANG, Q. ZHANG, AND Z. ZHANG. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from Laminaria japonica. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 127–132, 2008.

LAVANDEIRA, F. M. F. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos na avaliação**

MA, X. T.; SUN, X. Y.; YU, K.; GUI, B. S.; GUI, Q.; OUYANG, J. M. Effect of Content of Sulfate Groups in Seaweed Polysaccharides on Antioxidant Activity and Repair Effect of Subcellular Organelles in Injured HK-2 Cells. **Oxid Med Cell Longev**, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol Methods**, v. 16, n. 1-2, p. 55-63. 1983.

MUELLER, C. A.; OBERMEIER, M. M; BERG G. Bioprospecting plant-associated microbiomes. **J. Biotechnol**, v. 253, p. 171-180. 2016.

NAGARATHNA, P.K.M.; WESLEY, M.J.; REDDY, S.P.; REENA,K. Review on genotoxicity, its Molecular mechanism and prevention. **Int. J. Pharm. Sci. Res.**, v. 22, n. 43, p. 236-243, 2013.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Adv.**, v. 5, 27986-28006, 2015.

RAVANAT, J. L.; DOUKI, T. UV and ionizing radiations induced DNA damage, differences and similarities. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 128, p. 92-102, 2016.

RYAN, E. L.; HOLLINGWORTH, R.; GRAND, R. J. Activation of the DNA Damage Response by RNA Viruses. **Biomolecules**, v. 6, n. 2, 2016.

SOUZA, R. I. **Avaliação do potencial antigenotóxico de polissacarídeos sulfatados em células de hepatocarcinoma humano**. 2018. 100f. Universidade Federal do Paraná. 2018

SRINIVAS, U. S.; TAN, B. W. Q.; VELLAYAPPAN, B. A.; JEYASEKHARAN. ROS and the DNA damage reponse in câncer. **Redox Biology**. 2018.

TRAVERS, A.; MUSKHELISHVILI, G. DNA structure and function. **The FEBS journal**. v. 282, n. 12, p.2279-2295, jun. 2015.

TURKEZ, H.; ARSLAN, M. E.; OZDEMIR, O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. **Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology**, v. 13, n. 10, p.1089-1098. 2017.

ULLAH, S.; KHALIL, A. A.; SHALKAT, F.; SONG, U. Sources, Extraction and Biomedical Properties of Polysaccharides. **Foods**, [s.l.], v. 8, n. 8, p.304-3. 2019.

VEGA, J. A. I.; GONZÁLEZ, J. A. M.; GUTIÉRREZ, M. S.; CABRERA, G. B. DELGADO, S. M. S.; MARTÍNEZ, M. T. S.; GONZÁLEZ, A. M.; PÉREZ, R. P.; BUJAJIDAR, E. M.; SANTILLAN, E. M. Evidence of Some Natural Products with Antigenotoxic Effects. Part 1: Fruits and Polysaccharides. **Nutrients**, v. 9, p. 102-129. 2017.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological activities and potencial health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 14-21. 2011.

YOUNES, M.; AGGETT, P.; AGUILAR, F.; CREBELLI, K.; FILIPIČ, M; FRUTOS, M. J.; GALTIER, P.; GOTT, D.; GUNDERT-REMY, U.; KUHNLE, G. G.; LILLEGAARD, I. T.; MOLDEUS, P.; MORTENSEN, A.; OSKARSSON, A.; STANKOVIC, I.; WAALKENS-BERENDSEN, I.; WOUTERSEN, R. A.; WRIGHT, M.; OLIVER, L. B.; LODI, F.; DUSEMUND, B. Re-evaluation of alginic acid and its sodium, potassium,

ammonium and calcium salts (E 400–E 404) as food additives. **EFSA Journal**, vol. 15, p. 5049-5106. 2017.

Z. S. WEN, L. J. LIU, X. K. OUYANG, Y. L. QU, Y. CHEN, AND G. F. DING. Protective effect of polysaccharides from *Sargassum horneri* against oxidative stress in RAW264.7 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 68, p. 98– 106, 2014.

ZIVKOVIC, L.; BAJIC, V. DEKANSKI, D. PIRKOVIC, A. C; GIAMPIERI, F; GASPARRINI, M; MAZZONI, L; SPREMO, B. Manuka honey attenuates oxidative damage induced by H₂O₂ in human whole blood *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology**. 2018.