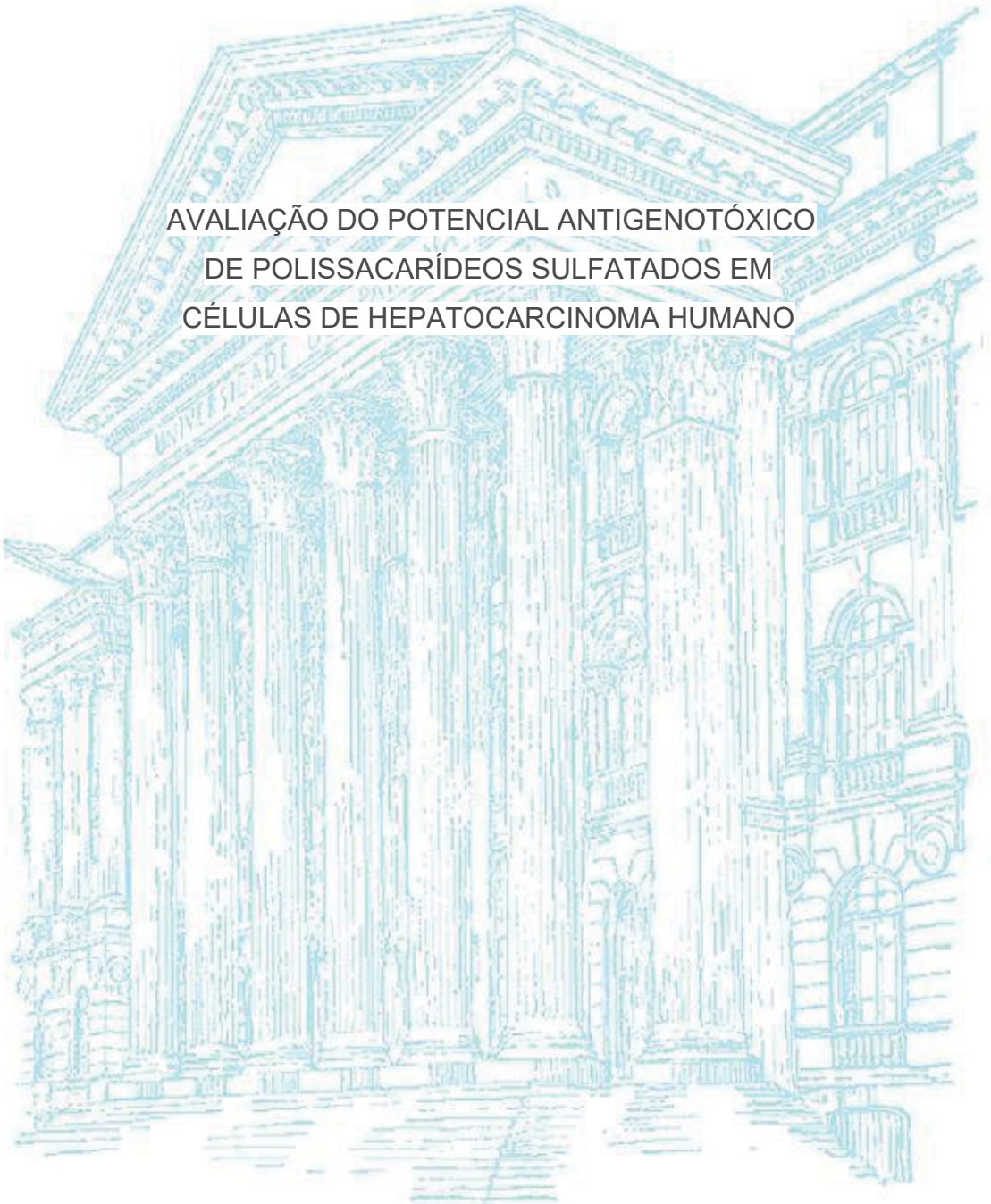
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISISDORIS RODRIGUES DE SOUZA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO



CURITIBA

2018

ISISDORIS RODRIGUES DE SOUZA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Genética, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dr. Daniela Morais Leme
Coorientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

CURITIBA
2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Souza, Isisdoris Rodrigues de
Avaliação do potencial antigenotóxico de polissacarídeos sulfatados em células de hepatocarcinoma humano. / Isisdoris Rodrigues de Souza. – Curitiba, 2018.
101 p.: il.

Orientador: Daniela Morais Leme
Coorientador: Edvaldo da Silva Trindade

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética 2. Fígado 3. Galactanas 4. Dano ao DNA 5. Polissacarídeos 6. Carcinoma I. Título II. Leme, Daniela Morais III. Trindade, Edvaldo da Silva IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 575.1
574.292

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA

ATA Nº296

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM GENÉTICA

No dia vinte e sete de março de dois mil e dezoito às 14:00 horas, na sala 65, Departamento de genética, foram instalados os trabalhos de arguição da mestranda **ISISDORIS RODRIGUES DE SOUZA** para a Defesa Pública de sua dissertação intitulada **Avaliação do potencial antigenotóxico de polissacarídeos sulfatados em células de hepatocarcinoma humano.**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: DANIELA MORAIS LEME (UFPR), DANIEL PACHECO BRUSCHI (UFPR), ELISA RAQUEL ANASTÁCIO FERRAZ (UFF), . Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais. A Banca Examinadora, então, reuniu-se e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela APROVAÇÃO da aluna. A mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. A aprovação no rito de defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais do programa. A outorga do título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, DANIELA MORAIS LEME, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 27 de Março de 2018.

DANIELA MORAIS LEME
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

DANIEL PACHECO BRUSCHI
Avaliador Externo (UFPR)

ELISA RAQUEL ANASTÁCIO FERRAZ
Avaliador Externo (UFF)

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ISISDORIS RODRIGUES DE SOUZA** intitulada: **Avaliação do potencial antigenotóxico de polissacarídeos sulfatados em células de hepatocarcinoma humano.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Março de 2018.

DANIELA MORAIS LEME
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

DANIEL PACHECO BRUSCHI
Avaliador Externo (UFPR)

ELISA RAQUEL ANASTÁCIO FERRAZ
Avaliador Externo (UFF)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e proteção em todos os passos da minha vida.

Ao meu pai, Moisés, por sempre me apoiar em tudo e sonhar comigo, por me ensinar a ser bióloga antes mesmo de entrar na graduação.

À minha mãe, Marleida, por me acalmar nos momentos difíceis e estar sempre ao meu lado.

À minha irmã Iris, por participar desse momento comigo e por todas as conversas na volta para casa.

Às minhas irmãs Gabizinha e Izabele,pela torcida e pelas conversas sobre os estudos, mesmo estando longe ou perto.

À minha orientadora, Profª Daniela Morais Leme, que foi também uma amiga nos momentos difíceis, pela ótima orientação, paciência, apoio e dedicação durante esses dois anos de trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Edvaldo da Silva Trindade, pela ótima coorientação, pela disponibilidade em me ajudar sempre que possível e pelo grupo maravilhoso que me apresentou.

À todos os professores que participaram das bancas, por contribuírem com este trabalho, Profª Marta Margareth Cestari, Carolina Oliveira, Daniel Pacheco Bruschi e Elisa Ferraz Avelino.

Ao Prof. Daniel Pacheco Bruschi, pela amizade, pelas caronas, pelos lanches e principalmente pelas risadas.

Ao Daniel Bellan, por me apresentar o cultivo celular e pela paciência em me ensinar tudo do zero.

Ao Gustavo Rossi, pelas ajudas em experimentos e frases de ânimo quando algo dava errado. Pela teoria do copo meio cheio e meio vazio.

À Taynah Vicari, pela ajuda imprescindível no aprendizado da técnica de *hanging drop* para células RTG2 e ensaios cometa e por me acompanhar em alguns dias de experimento.

À Lisandra Santos Ferreira, pela ajuda na leitura das lâminas do ensaio cometa e pela disponibilidade em me auxiliar sempre que foi preciso.

À todos os amigos do laboratório de polissacarídeos sulfatados e professores do departamento de biologia celular e molecular. Obrigada pela amizade e pelas festinhas.

Aos “meus ICs”, Gustavo, Lucas e Jaqueline pianaro, pelas risadas e alegria.Por tornarem o trabalho mais leve.

À todos do Laboratório de Mutagênese Ambiental que ajudaram na mais simples tarefa que fosse. Que tiraram minhas dúvidas ou mesmo me chamaram a atenção pra que as coisas saíssem melhor.

À todos do Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados, pela ajuda, empréstimo de materiais e apoio ao longo desses anos.

Aos colegas da turma de mestrado de 2016, pelas conversas sobre os projetos, pela ajuda nos finais de semana.

À pós-graduação em Ciências - Genética da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade.

À CAPES, Ciências do mar, pelo apoio financeiro.

“A humildade
é amiga das boas perguntas.
São pequenas coisas, que
aprendemos ao longo da vida.
Nada está pronto,
tudo ainda está por fazer.”
(Autor desconhecido)

RESUMO

O fígado é responsável pela função fisiológica de destoxificação, reduzindo a toxicidade de compostos, porém sendo alvo constante da ação nociva de xenobióticos, requerendo a investigação de compostos com potencial hepatoprotetor. Polissacarídeos sulfatados (PSs) contém diversas propriedades farmacológicas reconhecidas (*e.g.* atividade anticoagulante, antitumoral, antioxidante). Desta forma, buscando maior similaridade com a condição *in vivo,* este trabalho desenvolveu um modelo *in vitro* 3D de hepatosferas de HepG2 para a avaliação do potencial hepatoprotetor (antigenotóxico) da Fucana A e da galactana das algas marinhas *Spatoglossum Schroederi* e *Codium isthomocladum,* respectivamente, contra MMS 0,5 mM e H_2O_2 100 µM, através do ensaio Cometa alcalino usual e modificado (detecção de danos oxidativos pelo emprego de hOOG1). O modelo criado demonstrou que: o período de 3 ou 5 dias em *hanging drop* influencia a morfologia e o diâmetro dos esferoides (melhores em 3 dias); a transferência das hepatoesferas fez necessário recobrimentos com agarose a 1,5% para não adesão celular em placas de 96-poços (mais eficiente que PolyHEMA a 2,5% e BSA a 2%); a quantidade de células iniciais pouco altera o diâmetro das hepatoesferas, porém a redução de SFB no meio de cultivo nas placas de 96-poços (de 10% para 1%) resultou em esferoides de tamanho controlado e morfologicamente mais estáveis. O modelo foi reprodutível com 125 células iniciais e apresentou diâmetro de ~200-250 µm com características saudáveis visualizadas pela marcação de PI e faloidina. Porém, a membrana celular mais resistente à lise prejudicou a realização do ensaio Cometa com células das hepatoesferas. Desta forma, a atividade genotóxica ausente e a forte atividade antigenotóxica contra danos oxidativos da fucana A e CI (Fucana A: 75,61% e CI:72,76%), em pré-tratamento de 72h, e moderada (Fucana A: 42,25%; CI: 49,55%), em tratamento simultâneo, foi observada em modelo 2D. Conclui-se que são necessárias mais adaptações no emprego de culturas organotípicas de HepG2 a testes de genotoxicidade e que a Fucana A e a galactana CI são promissores suplementos alimentares com ação hepatoprotetora através do efeito antigenotóxico.

Palavras-chave: Hepatoproteção; danos no DNA; biomoléculas derivadas algas marinhas; xilofucuglucoranana; galactana; esferoides hepáticos.

ABSTRACT

The liver is responsible for the physiological function of detoxification, reducing the toxicity of compounds, although, is a constant target of the harmful action of xenobiotics, requiring a research of compounds with hepatoprotective potential. Sulphated polysaccharides (SPs) contain several recognized pharmacological properties (eg. anticoagulant, antitumor, antioxidant activities). In this way, searching for greater similarity with an *in vivo* condition, this work developed an in vitro 3D model of HepG2 hepatospheres cells to evaluate the hepatoprotective (antigenotoxic) potential of fucan A and galactan of the Spatoglossum Schroederi and Codium isthomocladum seaweeds, respectively, against 0.5 mM MMS and 100 µM H_2O_2, thru alkaline and alkaline modified versions (detection of oxidative damage using hOOG1) of Comet assay. The hepatosphere model created showed that: the period of 3 or 5 days in hanging drop condition influences the morphology and diameter of spheroids (enhanced in 3 days); Transfer of the formed hepatospheres to 96-well plates required pre coatings of agarose 1.5% to inhibit cell adhesion (more efficient than PolyHEMA 2.5% and BSA 2%); number of initial cells almost don´t influence hepatospheres size, but the reduction of fetal bovine serum (from 10% to 1% in the 96-well plates) resulted in spheroids with stable sizes and morphology. The model was reproducible with 125 initial cells and presented a diameter of 200-250µm with healthy organotypic characteristics visualized by PI and phalloidin staining. However, more resistant cell membrane to lysis impaired the performance of the Comet assay with hepatosphere cells. Thus, absent genotoxic activity and strong antigenotoxic activity against oxidative damages of Fucan A and CI (Fucana A: 75.61% and CI: 72.76%), in pre-treatments of 72h, and moderate (Fucana A: 42.25%, CI: 49.55%), in simultaneous treatments with the genotoxicants, was observed in 2D model. In conclusion, further studies are required to HepG2 organotypic cultures application in genotoxicity assays, and the PSs, fucan A and galactan CI are promising dietary supplements with hepatoprotective action through antigenotoxic effect.

Keywords: Hepatoprotection; DNA damage; biomolecules derived from marine algae; xylofluuclucoranane; galactan; hepatic spheroids.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 11
2. REVISÃO DE LITERATURA 15
2.1. Genotoxicidade e suas implicações aos organismos 15
2.2. Genotoxicantes e vias de exposição humana 16
2.2.1. O Fígado 17
2.2.1.1. Composição e organização celular 17
2.2.1.2. Funções fisiológicas 18
2.2.1.3. Hepatotoxicantes 19
2.3. Modo de ação genotóxico 21
2.4. Polissacarídeos sulfatados e suas propriedades farmacológicas 23
2.4.1. Pot*encial de aplicação dos polissacarídeos sulfatados como hepatoprotetores* 26
2.5. Detecção de danos no DNA 27
2.6. Sistemas-teste *in vitro* 31
2.6.1. Esferoides celulares 33
2.6.2. Modelos de cultivo celular 3D e seus desafios: o que nos dispomos a melhorar? 34
2.6.3. Células HepG2: como utilizar uma linhagem tumoral para mimetizar um órgão saudável? 36
3. OBJETIVOS 37
3.1. Objetivo geral 38
3.2. Objetivos específicos 38
4. MATERIAL E MÉTODOS 39
4.1. Delineamento experimental 39
4.2. Compostos testados 40
4.2.1. Método de obtenção dos PSs 40

4.3. Sistema biológico 41
4.3.1. Cultivo celular 41
4.4. Construção de esferoides de HepG2 42
4.4.1. Padronização 42
4.4.2. Avaliação da qualidade pós padronização, por marcação 43
4.5. Avaliação do potencial antigenotóxico dos polissacarídeos sulfatados 44
4.5.1. Cultivo de hepatoesferoides no modelo padronizado 44
4.5.2. Exposição aos PSs 44
4.5.3. Testes de citotoxicidade 44
4.5.3.1 Exposição aos polissacarídeos sulfatados (HepG2 em monocamada) 44
4.5.3.2. Teste do MTT 45
4.5.3.3. Teste de incorporação do vermelho neutro 45
4.5.3.3.1. Determinação da viabilidade celular 45
4.5.4. Testes de antigenotoxicidade e potencial antioxidante 46
4.5.4.1. Tratamentos 46
4.5.4.2. Ensaio Cometa 47
4.5.4.3. Determinação da antigenotoxicidade 48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 50
CAPÍTULO (1) Desenvolvimento de um modelo *in vitro* 3D hepático: hepatoesferas de HepG2 51
5.1. Trajetória de desenvolvimento das hepatoesferas de HepG2 51
5.2. Adequações no recobrimento da placa para não adesão celular 52
5.3. Tempo de cultivo em *hanging drop* 53
5.4. Densidade de células HepG2 em *hanging drop* 57
5.5. Concentração de soro fetal bovino (SFB) após transferência da condição *hanging drop* para placas de 96-poços 60

5.6. Reprodutibilidade da técnica 65

CAPÍTULO (2) Avaliação da antigenotoxicidade dos PSs Fucana A e CI utilizando HepG2 em monocamadas e como hepatoesferas 69

5.7. Certificação da ausência de citotoxicidade dos PSs em estudo para a avaliação do potencial antigenotóxico 69

5.7.1. Teste do MTT 69

5.7.2. Teste de incorporação do vermelho neutro 70

5.8. Avaliação do potencial antigenotóxico 71

5.8.1. *Adequações do ensaio Cometa conduzido com hepatoesferas de HepG2 e comparação com o protocolo in vitro padrão (células em monocamada)* 71

5.8.2. Certificação da ausência de genotoxicidade dos PSs em estudo para a avaliação do potencial antigenotóxico 76

5.8.3. Avaliação da capacidade protetora contra danos no DNA (atividade antigenotóxica) dos PSs em estudo 78

6. CONCLUSÕES 84

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS 85

REFERÊNCIAS 86

1. INTRODUÇÃO

Uma variedade de agentes endógenos e exógenos apresentam potencial de causar lesões no DNA, comprometendo a integridade do material genético e, consequentemente, impactando negativamente as funções fisiológicas normais do organismo (NAGARATHNA *et al.*, 2013).

Agentes causadores de danos no DNA são denominados de genotoxicantes, sendo categorizados de acordo com seu modo de ação genotóxico, como exemplo temos: agentes oxidantes, alquilantes, intercalantes, entre outros (CADET *et al*., 2013).

Apesar de os indivíduos estarem constantemente expostos à genotoxicantes, mecanismos de defesa celular (*e.g.* controle do ciclo celular, sistemas de reparo de DNA e morte celular programada), impedem a fixação de lesões no DNA. Contudo, apesar dos sofisticados mecanismos de defesa, as lesões nem sempre são reparadas, causando mutações. Atualmente, a associação entre mutações (causadas por compostos DNA-reativos), e diversas doenças humanas, como a carcinogênese, é bem conhecida. (SHAH, 2012). Desta forma, a indentificação de compostos com ação protetora do DNA (antigenotóxicas) tem sido crescente nos últimos anos, a fim de assegurar a funcionalidade dessa macromolécula e minimizar os efeitos promovidos por genotoxicantes (HOSHINA *et al*., 2013, 2014; ROBERTO *et al*., 2016).

O fígado é responsável pela importante função fisiológica de destoxificação de xenobióticos, o que o torna o principal órgão alvo de toxicantes, incluindo os genotóxicos (GU *et al.*, 2013). Adicionalmente, em decorrência de sua natureza altamente metabólica, esse órgão também está constantemente exposto à espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) (CICHOZ-LACH *et al*., 2014). No fígado, ROS são primariamente produzidas nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático dos hepatócitos, via enzimas do citocromo P450 (CICHOŻ-LACH *et al*., 2014). O desequilíbrio entre a formação e a neutralização de pró-oxidantes acarreta na indução de estresse oxidativo (HAZRA, 2008). Desta forma, macromoléculas (proteínas, lipídios e DNA) de células hepáticas estão entre as principais estruturas afetadas pelas ROS e,

como consequência, anormalidades estruturais e funcionais são desencadeadas (CICHOŻ-LACH *et al*., 2014).

Compostos com ação hepatoprotetora podem ser utilizados como terapias preventivas, contribuindo com a adequada funcionalidade do fígado. Enzimas antioxidantes; como a superóxido dismutase, a catalase e a peroxidase; ou compostos com potencial antioxidante; como ácido ascórbico, tocoferol e glutationa; têm importante papel na redução de radicais deletérios, prevenindo disfunções hepáticas (KALIM, 2010). Desta forma, ativos antioxidantes podem ser empregados como uma estratégia hepatoprotetora frente à oxidantes endógenos/exógenos (HRYB, 2010; VARGAS-MENDOZA *et al.*, 2014).

Recentemente, grande interesse tem sido destinado ao isolamento de compostos bioativos de recursos marinhos, como os polissacarídeos sulfatados (PSs) provenientes de algas marinhas, devido a seus inúmeros efeitos benéficos já relatados à saúde humana (WIJESEKARA et al., 2011; ZONG *et al*., 2012). Dentre as propriedades farmacológicas atribuídas aos PSs até o momento, a atividade antioxidante (WIJESEKARA *et al*., 2011; NGO *et al.*, 2013; VASCONCELOS *et al*., 2015; WANG *et al.*, 2014; WILL CASTRO *et al.*, 2016) é a mais relevante quanto ao potencial de proteção à danos no DNA.

A toxicologia genética é uma abordagem de peso que tem como evidencia a detecção de potenciais carcinógenos humanos (ELLIS *et al.,* 2013). Neste contexto, uma variedade de testes genotoxicológicos, englobam *endpoints* que vão de lesões primárias à mutações gênicas/cromossômicas e são empregados para predizer a capacidade genotóxica de agentes químicos (CORVI, 2017; ZEIGER, 2017). Esses testes são prioritariamente utilizados na avaliação de perigo toxicológico, contudo, modificações no delineamento experimental (*e.g.* co-exposição antioxidantes/mutágenos oxidantes) permitem o seu uso em avaliações de eficácia de compostos com potencial de proteção do DNA (atividade antigenotóxica) (HOSHINA *et al.,* 2013, 2014; ROBERTO *et al.,* 2016).

O ensaio Cometa é uma metodologia utilizada para a quantificação de lesões primárias no DNA em células individualizadas (KOPPEN *et al.,* 2017). Essa técnica baseia-se na eletroforese de nucleoides (*i.e.* DNA ligado à matriz nuclear após lise celular e com ausência de histonas) individualizados,

promovendo uma imagem semelhante a um cometa, na qual a intensidade de fluorescência da cauda reflete a quantidade de quebras de fita de DNA (AZQUETA *et al.,* 2017). A versão alcalina pH>13 (versão padrão) possibilita a detecção de quebras de fita de DNA, sítios álcali-lábeis, crosslinks DNA-DNA/DNA-proteína e quebras associadas à sítios incompletos de reparo por excisão (TICE *et al*., 2000). Modificações do protocolo padrão permitem a detecção de outros tipos de lesões no material genético, como bases oxidadas (COLLINS, 2014). Adicionalmente, o ensaio cometa apresenta uma versatilidade quanto ao sistema biológico, podendo ser aplicado em sistemas-teste *in vitro* e *in vivo* (AZQUETA *et al.,* 2017; KOPPEN *et al.,* 2017).

Crescentes pressões sociais e, posteriormente, aspectos científicos (*e.g.* extrapolação de dados entre espécies) promoveram o desenvolvimento e uso de metodologias alternativas à testes com animais (*in vivo*) (HARTUNG, 2011). Contudo, o desenvolvimento de modelos *in vitro* relevantes na predição de efeitos ao homem é ainda um desafio na toxicologia. O cultivo celular tri-dimensional (3D) proporciona a organização de células em estruturas mais semelhantes à condição *in vivo* (LELIÈVRE *et al*., 2017) e, consequentemente, pode fornecer dados mais precisos quanto à ação de compostos aos sistemas biológicos (RAMAIAHGARI *et al*., 2014; FISCHBACH *et al.,* 2007; FENEMMA *et al.,* 2013; PAMPALONI *et al*., 2007; FRIEDRICH *et al*., 2007; KNASMULLER *et al*., 1998; JIANG *et al*., 2007; NIKLAS *et al.,* 2009).

Em relação aos modelos hepáticos *in vitro* existentes, há uma grande discussão acerca do que melhor representa a condição *in vivo*, principalmente no que se refere à capacidade de metabolização de xenobióticos. Nesses modelos, ao utilizar hepatócitos primários humanos, retêm-se as principais condições *in vivo*, mas estes são de difícil obtenção e cultivo, limitando a realização de testes de alto rendimento. Na utilização de hepatócitos imortalizados e linhagens celulares transformadas cultivadas em monocamada, a facilidade de cultivo está entre as principais vantagens, mas podem haver falhas quanto a manutenção da atividade metabólica de lote a lote (RAMAIAHGARI *et al*., 2014; CHITRANGI *et al*., 2017; SHAH *et al.,* 2018). Modelos 3D de fígado (esferoides celulares) são alternativas atrativas (SHAH et al., 2018), porém, adequações metodológicas quanto ao custo, facilidade de

execução e reprodutibilidade ainda requerem estudos (MEHTA *et al.*, 2012; ROTH *et al*., 2014).

A função de destoxificação gerada pela metabolização de xenobióticos é responsável pela alta suscetibilidade do fígado à efeitos tóxicos e reflete a importância da investigação de compostos com ação hepatoprotetora. Desta forma, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de um modelo 3D de fígado, construído com células HepG2 (linhagem celular de hepatocarcinoma), para posterior avaliação do potencial antigenotóxico da Fucana A (xilofucuglucoranana, extraída da alga marrom *Spatoglossum schroederi*) e CI (galactana, extraída da alga verde *Codium isthmocladum*), ambos PSs de algas marinhas

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Genotoxicidade e suas implicações aos organismos

Genotoxicidade é a palavra que descreve a capacidade de agentes químicos de danificar o material genético (DNA), afetando sua integridade (NAGARATHNA *et al*., 2013). Uma substância que tem a propriedade de genotoxicidade é conhecida como genotoxicante ou agente genotóxico. Portanto, genotoxicantes são drogas ou produtos químicos ou radioativos que causam alterações ou aberrações e mutações na estrutura do DNA (NAGARATHNA *et al.,* 2013).

Genotoxicantes podem atuar por diferentes modos de ação, podendo induzir lesões no DNA de forma direta, como pela indução substituição de base; ou indireta, como pela interação com componentes celulares (*e.g.* aparato do fuso celular) ou enzimas (*e.g.* topoisomerases) associadas (DEARFIELD *et al.,* 2002; ROBINSON, 2010; JOUYBAN *et al*., 2012).

As células podem impedir a fixação da lesão genotóxica por meio dos sistemas de reparo de DNA, controle do ciclo celular e morte celular programada (apoptose). No entanto, o reparo da lesão ou da célula danificada nem sempre é eficaz, levando à mutagênese e há uma série de consequências, já que as informações genéticas podem ser duplicadas, excluídas ou inseridas (SHAH, 2012).

As consequências aos organismos variam de acordo com o tipo celular ao qual o DNA foi danificado. Danos no DNA de uma célula germinativa (mutação germinativa), por exemplo, têm um caráter hereditário e as consequências se estendem às gerações futuras, enquanto danos no DNA de células somáticas (mutação somática) podem resultar em uma transformação maligna (câncer) (PHILLIPS *et al*., 2007) e também desempenham um papel importante na patogênese de outras doenças crônicas degenerativas, como a aterosclerose e as doenças cardíacas, que são as principais causas de morte na população humana (DE FLORA *et al*., 2007). Danos ao DNA também são provavelmente a causa fundamental das doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson e da síndrome metabólica (DALLEAU *et al.*, 2013)

Dentre os efeitos genotóxicos citados, a carcinogênese é sem dúvida um dos mais importantes, já que é a principal causa de morte em todo o mundo, representando 8,8 milhões de mortes por ano, de acordo com dados divulgados em 2017 pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016). Este número representa um aumento frente à média anual registrada em 2012, quando houve 8,2 milhões de mortes. O câncer é atualmente responsável por uma em cada seis mortes no mundo e estima-se que mais de 14 milhões de pessoas desenvolvam câncer todos os anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014), e esse número deve subir para mais de 21 milhões de pessoas em 2030 (OMS, 2017). Em relação a doenças hepáticas causas por genotoxicantes, o hepatocarcinoma celular (CHC) é o câncer de fígado mais comum e um dos que mais leva ao óbito no mundo (SCHWARTZ *et al*., 2016).

O câncer de fígado e outras doenças hepáticas, tais como esteatose hepática não alcoolica (PIROLA *et al.*, 2013), estão relacionadas ao fato de o fígado ser um dos principais órgãos afetados por xenobióticos e suscetível a danos no DNA (SCHWARTZ *et al*., 2016).

2.2. Genotoxicantes **e vias de exposição humana**

Agentes genotóxicos podem ser classificados em: endógenos (reativos de produtos de processos como o metabolismo ou a inflamação (HOEIJMAKERS, 2001) e exógenos (agentes presentes em alimentos, água ou no ar (JACKSON *et al*., 2009). Quanto à sua natureza, estes podem ser físicos, como a radiação ultravioleta (UV) e radiações ionizantes; ou químicos, como praguicidas, corantes têxteis, derivados de petróleo, entre outros (GUNAHWAN *et al*., 2004). Dentre os agentes genotóxicos, os xenobióticos são de grande relevância. Xenobióticos são substâncias estranhas que normalmente não são produzidos ou que não se espera que estejam presentes no organismo (GU *et al.*, 2013)

A exposição à xenobióticos resulta na maioria das vezes da absorção pelo trato gastrointestinal após ingestão oral, tornando o fígado o sítio inicial de contato para muitos tipos de drogas orais ingeridas e outros xenobióticos, o que torna este órgão particularmente interessante quando se refere à susceptibilidade à danos induzidos por produtos químicos (GUNAHWAN *et al*.,

2004). Além do mais, os seres humanos são expostos a muitos xenobióticos, e a maioria deles é conhecida por ter potencial hepatotóxico e genotóxico (GUNAHWAN *et al*., 2004).

Para entendermos melhor porque o fígado é tão suscetível a danos causados por esses agentes, é importante saber como esse órgão se organiza, qual o seu papel frente à eventos de intoxicação e, finalmente, de que forma os danos são gerados às células hepáticas.

2.2.1. O Fígado

2.2.1.1. ***Composição e organização celular***

Este é um órgão complexo composto por células parenquimatosas, células sinusoidais e perisinusoidais. As células parenquimatosas incluem hepatócitos, que representam 60% da população adulta de células hepáticas e cerca de 78% da massa hepática total, e epitélios do ducto biliar (colangiócitos) (GU *et al.*, 2013). As células sinusoidais são compostas por células endoteliais sinusoidais hepáticas, que representam 20% das células hepáticas totais, e as células de Kupffer (macrófagos hepáticos), que representam 80-90% da população total de macrófagos fixos no organismo (MISDRAJI, 2004). Células perisinusoidais consistem em células estreladas hepáticas (também conhecidas como células Ito, células que armazenam vitamina A, células que armazenam gordura ou lipócitos), que representam 5-8% de todas as células hepáticas, e células pit, que são as células NK do fígado (GU *et al.*, 2013).

As funções das várias classes de células hepáticas são integradas na matriz extracelular (MEC) por comunicação direta célula-célula, secreção parácrina, sinalização intracelular, interação com a MEC e resposta generalizada aos fluxos endócrinos e metabólicos (CARITHERS *et al*., 2010). As células localizadas na região periportal diferem daquelas da região perivenosa em conteúdo de oxigênio, hormônios e interações célula-célula e célula-MEC e embora histologicamente o fígado pareça ser uma massa uniforme de tecido, este é morfo, histoquimicamente e funcionalmente heterogêneo (CARITHERS *et al*., 2010).

2.2.1.2. Funções fisiológicas

O fígado é extremamente necessário para a sobrevivência, pois é essencial para a coordenação do metabolismo, incluindo a homeostase de glicose, o metabolismo de xenobióticos e a desintoxicação (CARITHERS *et al*., 2010). O fígado também é um órgão importante na síntese e degradação de hormônios esteroides e na síntese de proteínas plasmáticas, fornecendo energia para todo o corpo de forma contínua, gerenciando o suprimento sistêmico de nutrientes, sendo um mediador da imunidade sistêmica, um sítio de imunidade inata e um importante regulador da imunidade (CARITHERS *et al*., 2010). Sua localização estratégica, fluxo sanguíneo (a concentração de sangue que entra no fígado é maior do que a encontrada em qualquer outro órgão (POND, 1982)) e papel proeminente no metabolismo de xenobióticos, tornam este órgão particularmente suscetível a lesões por químicos os quais estamos inevitavelmente expostos (GU *et al.*, 2013). A maioria dessas substâncias é lipofílica (solúvel em gordura), permitindo a fácil absorção pelas membranas celulares (POND, 1982).

A conversão de xenobióticos de suas formas lipofílicas para formas hidrofílicas mais estáveis favorece sua excreção pelo organismo e geralmente resulta na perda de sua atividade biológica (POND, 1982).

A biotransformação pode ser categorizada em reações de:

(a) Hidrólise – reação de decomposição ou alteração de uma substância pela água (*e.g.* de um cátion com água para formar uma base fraca e de uma base para formar um ácido fraco). A hidrólise enzimática tanto produz duas moléculas ou conduz à abertura de um anel na molécula;

(b) Redução – reação em que um átomo particular, como o oxigênio, ganha elétrons. A redução de um xenobiótico prossegue tanto enzimaticamente quanto não enzimaticamente, ao interagir com agentes redutores como a glutationa (GSH), FADH, FMNH e NAD [P] H;

(c) Oxidação – é uma reação que transfere elétrons para longe de um átomo particular (PARKINSON *et al.,* 2008); O sistema enzimático mais importante para reações oxidativas é o citocromo P450 (CYP). As enzimas CYP são hemoproteínas localizadas no retículo endoplasmático liso do fígado

e são monooxigenases com função mista que catalisam reações redox e de isomerização na presença de oxigênio molecular (MEHTA *et al*., 2012);

(d) Conjugação – reações que envolvem a ligação covalente de uma molécula endógena polar para formar compostos solúveis em água). Os compostos finais têm um peso molecular maior. As reações conjugativas evoluíram a partir de suas funções fisiológicas normais para preencher uma variedade de funções citoprotetoras contra xenobióticos potencialmente nocivos (MACCAVER *et al*., 2002).

Essas reações são divididas em reações de fase 1 e fase 2 (MEHTA, 2012). Na fase 1 de reação, o agente químico é transformado em polar por oxidação, redução e hidroxilação. Nem todas as drogas devem passar por essa fase, e algumas podem passar diretamente pela reação de fase 2. Reações de fase 2 podem ocorrer dentro ou fora do fígado. Elas envolvem conjugação com uma fração (*e.g.*, acetato, aminoácido, sulfato, glutationa, ácido glucorônico), que mais tarde aumenta a solubilidade do químico. Subsequentemente, drogas com alto peso molecular podem ser excretadas na bile, enquanto os rins excretam as moléculas menores (MEHTA, 2012).

Nas reações de fase 1, as enzimas P450 são responsáveis por catalisar a biotransformação dos xenobióticos, que geralmente se iniciam com reações redox (GU *et al.*, 2013). Mais de 90% dos medicamentos são substratos para diferentes enzimas da família P450 e cada uma delas pode metabolizar muitos químicos, sendo essencial na desintoxicação do organismo (GU *et al.*, 2013).

2.2.1.3. Hepatotoxicantes

O fígado pode eliminar uma diversidade de agentes químicos, que variam de elementos como o fósforo e o arsênio, à moléculas complexas poli-halogenadas, como o praguicida clordecone, ou contaminantes ambientais amplamente difundidos como difenilos poli-halogenados (POND, 1982).

Apesar dessa função vital para o organismo, existem centenas de produtos químicos industriais que foram identificados como hepatotoxicantes. Exemplos incluem: N-nitrosodimetilamina (composto químico cancerígeno produzido em pequenas quantidades pela indústria, mas que pode se formar

no meio ambiente por reações químicas); hidrazina e dissulfureto de carbono (POND, 1982) .

Hepatotoxicantes também podem vir diretamente dos alimentos, em cogumelos hepatotóxicos e frutas, ou podem ser geradas durante o processamento de alimentos, sob, por exemplo, a forma de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HOCHSTEIN *et al*., 2007). As micotoxinas fúngicas (*e.g.* aflatoxina B1) podem ser encontradas em grãos e nozes contaminados (KENSLER *et al*., 2007) e o consumo de álcool e a exposição ambiental à elementos inorgânicos, como por exemplo o berílio, também podem afetar o fígado.

Muitos agentes químicos ocupacionais também fazem parte da lista de hepatotoxicantes. O álcool alílico, por exemplo, é usado por manufatores de acroleína, alilo, drogas, fungicidas, glicerina, herbicidas, químicos orgânicos, plastificantes e resinas. Xileno é usado em várias ocupações, como por técnicos de laboratório, fabricantes de fluidos de limpeza ou pessoas que trabalham com gasolina de aviação, couro e químicos orgânicos, pintura, colagem, etc. (POND, 1982). Apesar disso, os trabalhadores nessas ocupações não apenas usam xileno, mas também uma variedade de outros químicos que são potencialmente hepatotóxicos ou podem interagir uns com os outros para produzir danos ao fígado (POND, 1982). Como se não bastasse, mais de 900 drogas, toxinas e ervas têm sido reportadas como causadoras de danos ao fígado. Sendo as drogas medicamentosas responsáveis por 20-40% de todos os casos de falha hepática fulminante (MEHTA *et al.,* 2012).

Além do mais, como dito anteriormente, a própria função que o fígado exerce na biotransformação de xenobióticos o predispõe aos efeitos de agentes genotóxicos. As enzimas do citocromo P450 podem produzir espécies químicas altamente reativas, de curta duração e instáveis, resultando na formação de metabólitos que são muito mais tóxicos que o substrato parental. Os grupos funcionais ou estruturais em xenobióticos que podem produzir reativos intermediários prejudiciais foram definidos como 'toxicóforos' (WILLIAMS *et al*., 2002). As espécies químicas reativas, como eletrófilos, nucleófilos, radicais livres e reagentes redoxativos, gerados durante a biotransformação dos

toxicóforos podem interagir com biomoléculas e/ou gerar estresse oxidativo (GU *et al*., 2013).

A homeostase redox adequada é crucial para a sobrevivência celular, pois sob estresse oxidativo, proteínas redox-dependentes são modificadas, vias de sinalização redox são interrompidas e os peróxidos e os radicais livres são produzidos, levando a danos aos componentes celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA (dano genotóxico) (FARBER, 1994).

2.3. Modo de ação genotóxico

As alterações no DNA vão desde mutações pontuais, como substituição, inserção e deleção de pares de bases, à mutações cromossômicas, como alteração no número e estrutura dos cromossomos (RUSSEL, 2002).

Os mecanismos genotóxicos responsáveis pelas alterações no DNA dependem do tipo de agente químico e são bastante diversos. Os modos de ação genotóxicos que trataremos aqui são os que conferem efeito genotoxicante aos compostos utilizados como controle positivo em nosso estudo.

Agentes alquilantes: Agentes alquilantes, como o metil metanosulfonato (MMS), têm a capacidade de alterar bases de DNA pela adição de grupos alquila, levando ao pareamento incorreto de bases (GRIFFITHS *et al*, 2008).

A alquilação ou metilação ocorre quando o metil (CH3) ou grupos alquila (C) são adicionados à uma base no DNA (LINDAHL, 1993). A alquilação de bases pode ser mutagênica ou citotóxica e as bases podem ser alquiladas em qualquer átomo O- e N- presente tanto nas fitas de DNA quanto nas bases, dependendo do agente de alquilação e se o DNA é de cadeia simples ou dupla (DRABLOS *et al.,* 2004).

Produtos de alquilação como O6-metilguanina são altamente mutagênicos e citotóxicos porque as DNA polimerases frequentemente adicionam incorretamente uma timina para emparelhar com O6nH2n + 1-metilguanina (WARREN *et al.,* 2006). Desta forma, a base da genotoxicidade de O6- metilguanina é o mal pareamento com timina na cadeia oposta. O

mecanismo de reparo de mal pareamento de DNA remove a timina mal emparelhada, mas não a base danificada. Isso leva a ciclos inúteis de reparo e replicação de DNA que eventualmente causam quebras de simples fita (SSBs) e de dupla fita (DSBs) (MOJAS *et al*., 2007). Por este motivo, os organismos sintetizam a enzima O 6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) especificamente para reparar O6-metilguanina (YAROSH *et al*., 1983).

O efeito da alquilação de bases depende das bases que o agente de alquilação modifica. Agentes de alquilação monofuncionais modificam bases simples (geralmente o N7 das purinas adenina e guanina), gerando adutos de DNA volumosos, enquanto agentes alquilantes bifuncionais reagem com duas bases de DNA diferentes, o que leva à crosslinks (HELLEDAY *et al*., 2008).

O MMS é responsável por modificar tanto a guanina (para 7-metilguanina) quanto a adenina (para 3- metiladenina) causando erros de pareamento e bloqueios na replicação, respectivamente (BERANEK, 1990).

Danos oxidativos: A reatividade do oxigênio permite a sua participação em transferências de elétrons de alta energia e, portanto, este suporta a geração de grandes quantidades de adenosina-5-trifosfato (ATP) através da fosforilação oxidativa (BURTON *et al*., 2011). Essa propriedade foi necessária para permitir a evolução dos organismos multicelulares complexos, porém, ROS produzidos como subprodutos do metabolismo aeróbico normal, como radicais superóxido (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH), são responsáveis por atacar qualquer molécula biológica, seja uma proteína, lipídios ou DNA, causando dano oxidativo ao DNA e à precursores do DNA (BURTON *et al*., 2011). Consequentemente, nosso organismo está sob ataque oxidativo constante, gerado por ROS.

Os danos oxidativos são promovidos pela geração de ROS excessiva, por isso, um sistema complexo de defesas antioxidantes evoluiu de forma que esta esteja geralmente em equilíbrio. Ocasionalmente, esse equilíbrio pode ser perturbado, levando ao estresse oxidativo (BURTON *et al.,* 2011).

Na geração de estresse oxidativo, as bases de DNA podem ser oxidadas por ROS, causando dezenas de principais mudanças, como a timina glicol (DIZDAROGLU *et al*., 2002) e 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (hmdUrd) (CHAUNG *et al*., 1997).

HmdUrd podem causar deleções que foram relacionadas ao seu processamento pela via de reparação de excisão base (CHAUNG *et al*., 1997). A adição de grupos hidroxila em C5 e C6 de timina geram timidina, a lesão de DNA mais comum induzida pela interação de timina com ROS (YOON *et al.,* 2010). A timina glicol não é planar; O C5 metil sobrescreve e evita o empilhamento da base acima da lesão, bloqueando a DNA polimerase durante a replicação do DNA (YOON *et al*., 2010).

O produto 8-oxo-7-hidrodesoxiguanosina (8-oxo dG ou GO) é uma das lesões de DNA resultantes de espécies reativas de oxigênio mais comuns, e produz pareamentos errados com adenina, resultando em alto nível de transversões G→T (GRIFFTHS, 2008) As lesões 8-oxoGua são altamente mutagênicas e afetam a estabilidade genômica (BERTIN *et al.*, 2006).

A maioria dos produtos de base do DNA produzidos por oxidação causam desajustes durante a replicação do DNA, levando à mutagênese (COOKE *et al*., 2003).

No fígado, como forma de driblar o estresse oxidativo, existe uma alta concentração de GSH, um antioxidante hidrossolúvel, indicando um ambiente redutivo que funciona como mecanismo de proteção (CICHOZ-LACH *et al.*, 2014). Além do mais, as espécies químicas podem ser extintas ou descartadas por mecanismos citoprotetores endógenos, incluindo enzimas de conjugação de fase II e seus cofatores, efluxo de transportadores, enzimas e pequenas moléculas antioxidantes, como a vitamina C (GREGUS, 2008).

2.4. Polissacarídeos sulfatados e suas propriedades farmacológicas

Recentemente, um grande número de estudos têm sido desenvolvidos para isolar novos compostos de fontes marinhas, como os polissacarídeos sulfatados (PSs), devido aos seus efeitos benéficos à saúde humana (ZONG *et al*., 2012)

Existem diversos tipos de PSs. Os encontrados nas algas vermelhas são as galactanas sulfatadas; nas algas marrons encontram-se as fucanas (homofucanas) e os fucoidanos (heterofucanas); as algas verdes apresentam

polissacarídeos sulfatados mais heterogêneos que são ricos em galactose, manose, xilose, arabinose, glicose e/ou ácidos urônicos (ROCHA *et al*., 2004).

Neste trabalho foram avaliados o potencial hepatoprotetor da Fucana A, uma xilofucuglucoronana extraída da alga marrom *Spatoglossum schroederi* (VASCONCELOS *et al*., 2015), e uma galactana extraída da alga verde *Codium isthmocladum*.

As fucanas pertencem à uma classe de PSs negativamente carregados, hidrossolúveis, estruturados com L-fucose (Fig. 1), mas que frequentemente podem apresentar em sua estrutura outros açúcares, a saber, D-xilose, D-galactose e ácido D-glucurônico (VASCONCELOS *et al*. ,2015).

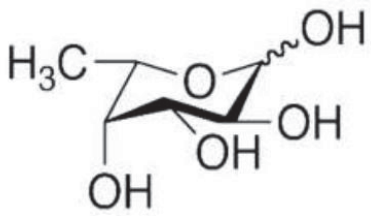


Figura 1. Estrutura da L-fucose. Fonte: Toronto Research Chemicals. Disponível em: http://www.trc-canada.com/product detail/?CatNum=F836100&CAS=2438804&Chemical_Name=LFucose&Mol

Cada fucana apresenta características que lhes são únicas devido à fatores como tipo de ligações glicosídicas, presença ou não de ramificações, posições de sulfato e composição monossacarídica (HOLTKAMP *et al*., 2009). Desta maneira, cada fucana obtida traz consigo perspectivas de descoberta de um novo fármaco ou de um composto promissor (COSTA *et al*., 2010).

A fucana A da alga marinhas *Spatoglossum schroederi* é constituída por um núcleo de oligossacarídeo de 4,5 kDa contendo ácido *β* (1-3) com ramificações em C-4 de cadeias de fucose ligadas a (1-3). Fucose é substituída em C-4 e C-2 (menor) com grupos sulfato. Além disso, alguns resíduos de fucose são substituídos em C-2 com cadeias de *β* (1-4) xilose, que, por sua vez, também é parcialmente sulfatada (ROCHA, 2002).

Quanto aos PSs extraídos de algas verdes, estes são de longe os menos estudados, tanto estruturalmente como farmacologicamente (VASCONCELOS *et al*., 2015).

As galactanas apresentam como principal monossacarídeo em sua composição, a galactose sulfatada (Fig. 2). Estes compostos podem se apresentar na forma de heterogalactanas, as quais contêm outros monossacarídeos tais como, xilose, arabinose, glicose, manose, além de galactose em sua composição, e na forma de homogalactanas (homopolímeros de galactose) (FARIAS, 2011).

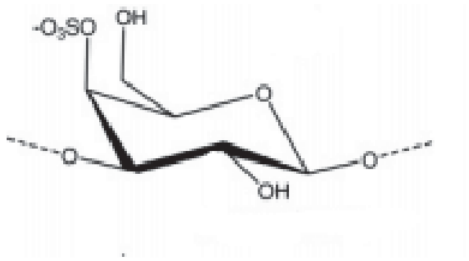


Figura 2. 3-ß-D-Galactopiranosil-4(SO4)-1, componente preponderantemente encontrado na galactana sulfatada da alga verde *C. isthmocladum*. Fonte: FARIAS *et al*., 2008.

A galactana sulfatada da alga marinha *Codium isthmocladum* é composto predominantemente de resíduos de β-D-galactopiranose ligados a 3 que são extensivamente 4-sulfatados e ocasionalmente 6-sulfatados. Em pequenas quantidades, as unidades de β-D-galactopiranosilo estão ligadas a 6. Além disso, os galactanos sulfatados de Codium isthmocladum contêm grupos de piruvato que formam cetalos cíclicos de cinco membros localizados em unidades 3,4-O- (1'carboxi) -etilideno-p-D-galactose (FARIAS *et al.,* 2007).

Como as galactanas encontradas em algas verdes são mais heterogêneas, quanto a composição e estrutura, do que os PSs encontrados em outras algas, é muito difícil relacionar a estrutura dos PSs às suas atividades farmacológicas (MATSUBARA, 2004), de qualquer forma, estes exibem muitas atividades biológicas benéficas, como anticoagulante, antiviral, antioxidante, imunomoduladora, antiinflamatória e antitumoral (WIJESEKARA *et al*., 2011).

Abaixo serão abordados o potencial de aplicação dos PSs como hepatoprotetores.

2.4.1. Pot*encial de aplicação dos polissacarídeos sulfatados como hepatoprotetores*

Como elucidado anteriormente, radicais livres são subprodutos do metabolismo aeróbico normal. No entanto, em decorrência da peroxidação lipídica (HALLIWELL *et al.*, 1993) dano do DNA (HALLIWELL *et al.*, 1991) e inibição da síntese protéica (MARTIN *et al.*, 1991), o excesso de radicais livres é potencialmente tóxico para várias moléculas biológicas. Tais danos aceleram o processo de envelhecimento e geram muitas doenças, dentre elas as relacionadas com lesão hepática (HALLIWELL *et al., 1999)*. Antioxidantes podem eliminar os radicais livres ativos prejudiciais às células e reduzir as potenciais mutações. Desta forma, radicais danosos são naturalmente eliminados do fígado por enzimas como a superóxido dismutase, catalase e peroxidase, ou compostos como ácido ascórbico, tocoferol e glutationa, todos com propriedades antioxidantes (KALIM, 2010). Muitos estudos demonstram que polissacarídeos marinhos possuem essa propriedade em várias de suas classes são citadas, incluindo fucanas, laminaran e ácido algínico (ROCHA DE SOUZA *et al*., 2007; RUPEREZ *et al*., 2002; WANG *et al*., 2008). De acordo com Kim *et al*. (2007) existem PSs mais potentes do que antioxidantes comerciais como o BHA e o tocoferol.

A atividade antioxidante de PSs já foi relacionada com a hepatoproteção em alguns estudos, sendo responsável pela redução de inflamações hepáticas e até mesmo de fibrose (KAWANO *et al.*, 2007). Já foi relatado que a fibra dietética em algas marrons comestíveis, por exemplo, teve o efeito repressivo contra a hepatopatia induzida por D-galactosamina (D-GalN) e o efeito protetor foi causado pelo menos em parte pela fucana estudada (KAWANO *et al.*, 2007). A administração de fucana em estudos *in vivo* também reduziu a insuficiência hepática aguda e crônica induzida por CCl4 e fibrose hepática (HAYASHI *et al.*, 2008). Em outro estudo fucanas impediram a lesão hepática induzida por concanavalina A, mediando a produção de interleucina endógena (IL) -10 e a inibição de citocinas pró-inflamatórias em camundongos (SAITO *et al.*, 2006) indicando que a fucana pode ser um agente protetor de hepatócitos (HAYASHI *et al.*, 2008).

Quanto às galactanas, sua atividade antioxidante também já foi reconhecida como sendo maior do que a do composto comercial λ carrageenan contra radicais peróxido, porém essa propriedade depende da quantidade de grupos sulfatos presentes na galactana estudada (BARAHONA *et al.*, 2012). Pouco se sabe sobre a atividade hepatoprotetora de PSs de algas verdes.

A atividade hepatoprotetora da fucana A e da galactana CI pode ser prevista através de técnicas na detecção de danos ao DNA ao nível de células eucarióticas individuais (COLLINS *et al.*, 2014) para avaliação do efeito antigenotóxico sobre células HepG2, impedindo danos ao DNA, garantindo a integridade e funcionamento das mesmas.

2.5. Detecção **de danos no DNA**

Uma série de técnicas de detecção de danos no DNA (micronúcleos, mutações, aberrações cromossômicas estruturais, etc), têm sido usadas para identificar substâncias com atividade genotóxica.

Até recentemente, os métodos mais utilizados envolviam tanto a detecção de reparo de síntese de DNA (a chamada síntese de DNA não programada ou UDS) em células individuais, quanto a detecção de quebras de fita simples (SSBs) e sítios álquali lábeis (ALS) em populações de células agrupadas utilizando o ensaio de eluição alcalina (TICE *et al.*, 2000). No entanto, de acordo com Tice (2000) essas técnicas apresentam desvantagens significativas. A técnica UDS é baseada na replicação do DNA durante o reparo de excisão de certos tipos de lesões de DNA, demonstrado pela incorporação de timidina tritiada nos sites de reparo do DNA, ou seja, esta técnica é capaz de fornecer informações ao nível de células individuais, mas requer o uso de radioatividade e é limitada em sensibilidade. O ensaio de eluição alcalina ignora a crítica importância das diferenças intercelulares nos danos genotóxicos e requer um número relativamente grande de células (TICE *et al.*, 2000).

A avaliação de danos genéticos através da eletroforese em gel de célula única ou ensaio cometa, é considerada mais eficiente do que as citadas anteriormente (TICE *et al.*, 2000). O Ensaio Cometa foi introduzido pela

primeira vez em 1984 por Ostling e Johanson como um método utilizado para avaliar quantitativamente danos e reparos de DNA que causaram o relaxamento da hélice de DNA ao nível de células individuais (KOPPEN *et al.*, 2017).

No ensaio cometa, o dano celular é determinado empregando a teoria de que, quando uma carga é aplicada à uma célula, a quantidade de DNA que sai do núcleo é uma indicação da quantidade de dano no DNA (FIELDS, 2017).

No processo, é feita uma solução contendo as células individuais sob investigação e agarose de baixo ponto de fusão. A solução é geralmente posta em uma lâmina de microscópio onde a membrana celular é degradada (lisada) com o uso de um detergente e sal elevado (solução de lise), garantindo a formação de nucleoides (DNA genômico celular super enovelado) na matriz nuclear. Posteriormente, no estágio de eletroforese, uma carga é aplicada às células usando um campo elétrico. O DNA danificado, que tem uma carga negativa, começa a se mover para fora do núcleo em direção ao ânodo carregado positivamente, criando trilhas que se assemelham a caudas de cometas e que podem ser visualizadas através de microscopia de fluorescência. O DNA não danificado permanece onde está. A intensidade, o brilho e o comprimento da cauda do cometa em relação à cabeça indicam a quantidade de quebras de DNA (TICE *et al.*, 2000).

Embora existam métodos igualmente sensíveis na detecção de quebras no DNA, o que tornou esse método atraente (além da possibilidade de quantificar o DNA danificado) foi que: (a) apenas são necessárias mil células; (b) as quebras podem ser marcadas com corantes, ao invés da utilização de marcadores radioisótopos (KOPPEN *et al.*, 2017), fato que permite a medição de danos em qualquer célula nucleada; (c) o ensaio requer nucleoides, mas não células proliferantes, sendo portanto aplicável a qualquer linhagem celular ou tecido a partir do qual uma suspensão de células únicas pode ser obtida, incluindo células diferenciadas; (d) o dano genotóxico é avaliado ao nível de células individuais. Desta forma, células mortas ou ainda em processo de apoptose podem ser identificadas em lâminas microscópicas por sua imagem específica (KOPPEN *et al.*, 2017), resultando em cometas com cabeças pequenas ou inexistentes e grandes caudas difusas comumente descritos como "hedgehogs", "células fantasmas", "nuvens" ou mesmo núcleos celulares

"não detectáveis" (NDCN) (KIRKLAND *et al*., 2000); (e) pode ser usado em uma ampla gama de aplicações *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* (OLIVE *et al.*, 2006); (f) pode ser usado para medir variações em resposta à agentes prejudiciais ao DNA entre células da mesma população exposta (OLIVE *et al.*, 2006).

O uso dessa técnica em toxicologia genética se justifica por: (1) se tratar de um ensaio de rastreio de alto rendimento; (2) ser possível distinguir entre danos cromossômicos induzidos por genotoxicidade ou por citotoxicidade, muito útil em estudos mecanicistas; (3) a possibilidade de distinguir carcinógenos genotóxicos e não genotóxicos; e (4) porque pode fazer parte de uma bateria de ensaios *in vitro* / *in vivo* usados para submissões regulatórias (TICE *et al.*, 2000).

Com todas essas vantagens, o uso prolongado do ensaio cometa e a crescente necessidade de testes de genotoxicidade de produtos químicos levaram ao desenvolvimento de um protocolo de ensaio cometa *in vivo* utilizando condições alcalinas em células de mamíferos, agora recomendado pela Conferência Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH, 2011) e a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) (EFSA, 2011).

O pH elevado provoca o desenovelamento das duas fitas e também a conversão de ALSs em quebras, e esse recurso explica diferenças observadas em resultados de ensaios alcalinos e neutros (KOPPEN *et al.*, 2017). A versão alcalina (pH 13), pode ser usada para detectar danos de quebras simples e duplas nas fitas, ALSs e ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA–proteína (crosslinks) (BRENDLER-SCHWAAB *et al.*, 2005).

Apesar da quantidade de danos que o ensaio cometa alcalino padrão pode detectar, as informações adquiridas sobre o tipo de dano detectado no DNA ainda são consideradas limitadas, pois não é possível determinar se estes são uma consequência de efeitos diretos do agente prejudicial, ou de efeitos indiretos, como dano oxidativo, sítios apurínicos / pirimidínicos (AP) ou reparo do DNA (SMITH *et al.*, 2006).

A sensibilidade e especificidade do ensaio cometa pode ser melhorada por incubação das células lisadas (nucleoides) com endonucleases específicas para a lesão, que reconhecem bases danificadas particulares e

criam pausas adicionais. Em teoria, qualquer lesão, para a qual uma endonuclease específica de reparo existe, pode ser detectada desta forma.

As endonucleases mais utilizadas nos ensaios cometas modificados são as enzimas bacterianas, formamidopirimidina DNA-glicosilase (FPG) e endonuclease III (ENDOIII, também conhecida como Nth), que reconhecem diferentes tipos de dano oxidativo (SMITH *et al.*, 2006).

A FPG é específica para purinas oxidadas, incluindo 8-oxo-7,8-di-hidroguanina (8-oxo-gua), 2,6diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FaPyGua) e 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FaPyAde) e outras purinas com abertura de anel (KARAKAYA *et al*., 1997). A ENDOIII reconhece pirimidinas oxidadas, incluindo timina glicol e uracilo glicol (DIZDAROGLU *et al.,* 2005). Contudo, estudos prévios demonstraram que quando a FPG é usada, além de purinas oxidadas e sítios AP, vários adutos de purina com anel aberto também são detectados (SPEIT *et al*., 2004). FPG e ENDOIII são capazes de reconhecer e cortar danos de alquilação além de danos oxidativos. Portanto, quebras adicionais nas fitas de DNA podem ser induzidas por FPG ou ENDOIII e não são necessariamente atribuídas à danos gerados por oxidação (SMITH *et al*., 2006). Consequentemente, apesar da ampla especificidade de substrato e alta sensibilidade , essas enzimas geram resultados ambíguos (KOPPEN *et al.*, 2017). Portanto, uma endonuclease alternativa para detectar purinas oxidadas, especificamente 8-oxoGua, foi usada. A nuclease selecionada foi 8-oxoguanina-DNA glicosilase-1 humana (hOGG1), a enzima primária para o reparo de 8-oxoGua (SMITH *et al*., 2006).

A proteína hOGG1 é o homólogo mamífero de FPG, mas estruturalmente diferente, com função similar e maior especificidade de substratos. A ação da hOGG1 é o principal sistema de defesa em ambientes oxidativos, como os que contém 8-oxoGua (BERTIN *et al*., 2006).

Em conclusão, o ensaio cometa alcalino é uma das técnicas mais utilizadas e sensíveis na detecção de danos no DNA e a adição de endonucleases específicas da lesão (como a adição de hOGG1 para danos oxidativos) acentua a sensibilidade do teste (SMITH *et al*., 2006).

2.6. Sistemas-teste *in vitro*

Historicamente, para a maioria dos estudos toxicológicos, roedores (geralmente ratos) são utilizados, e, devido aos requisitos regulamentares, espécies de não roedores, como cães beagle ou macacos *cynomolgus* (SHAH, *et al.*, 2018).

No entanto, devido à diferenças fisiológicas, genéticas e metabólicas entre animais e humanos (KNIGHT, 2007), a capacidade preditiva de tais experimentos *in vivo* tem se demonstrado repetidamente limitada, e os dados gerados através de testes com ratos ou cães revelam de forma insuficiente a resposta à compostos químicos (OLSON *et al.*, 2000).

A grande lacuna na possibilidade de prever efeitos biológicos em humanos com base em testes em animais, desencadeou um debate constante sobre a utilização dos mesmos. Além da força preditiva limitada, particularmente questões éticas e o dispêndio de tempo em testes *in vivo* desencadearam uma demanda intensa de ensaios *in vitro* ao longo das últimas décadas (KNIGHT, 2007).

É claramente importante reconhecer as limitações dos modelos *in vitro*. Nenhuma estratégia de células individuais abrangerá todas as situações biológicas-relevantes. No entanto, uma estratégia bem definida, focada em metas estabelecidas e reconhecidas para o rastreio preditivo em órgãos-alvo adequados, permite a geração de dados biológicos sólidos e apropriados, apresentando a melhor perspectiva em análises toxicológicas (ROTH *et al.*, 2014).

Quanto as análises toxicológicas *in vitro*, o ensaio cometa *in vitro* é recomendado como um teste apropriado para o uso em documentos de orientação técnica do REACH (EU *Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals*). Além do mais, pesar de o ensaio cometa *in vitro* não ser formalmente reconhecido na toxicologia regulatória, sugeriu-se durante a oficina do ICAW 2015 (*International Comet Assay Workshops*) que este poderia ser atualizado como uma ferramenta de teste de genotoxicidade, devido ao aumento da faixa de lesões detectadas (usando enzimas específicas e reparo de DNA e inibidores de síntese) (KOPPEN *et al.*, 2017).

Contudo, a maioria dos estudos *in vitro* é feita utilizando as células de interesse em culturas bidimensionais (2D), em um microambiente não adequado à natureza das células (FENEMMA *et al*., 2013). Além da bioquímica diferente e o microambiente não fisiológico, o cultivo 2D apresenta limitações evidentes, como a não reprodução da arquitetura dos tecidos *in vivo* (MAZZOLENI *et al*., 2009). Neste tipo de cultivo, as células rapidamente se proliferam e desdiferenciam (FISCHBACH *et al.*, 2007) (BHADRIRAJU *et al.*, 2002), podendo apresentar perfis de expressão gênica anormais (BIRGERSDOTTER *et al*., 2005), não existem interações célula-matriz extra celular (MEC) e célula-célula, sendo esta última característica devido à maioria destes sistemas serem baseados em um tipo celular geralmente monoclonal em origem (GROEBER *et al*., 2011; HARTUNG, 2006). Adicionalmente, em órgãos metabolicamente ativos, como o fígado, a capacidade de manutenção da atividade de enzimas CYP450 (responsáveis pelo metabolismo de drogas, toxinas e outras substâncias) se mostra comprometida (RAMAIAHGARI *et al*., 2014). Estas limitações podem ser atribuídas ao fato de que o cultivo de células em monocamada proporciona um ambiente não fisiológico, exigindo a adaptação à um ambiente artificial, plano e rígido e dificultando, muitas vezes, a obtenção de informações relevantes quanto às alterações biológicas induzidas por um determinado composto (MAZZOLENI *et al*., 2009).

As funções metabólicas de hepatócitos são rapidamente perdidas em culturas 2D, enquanto atividades hepáticas específicas são mantidas em cultivo 3D (XU *et al.*, 2003). A capacidade metabólica funcional em cultivo 3D de células hepáticas tem sido demonstrada através de testes de toxicidade em alguns estudos (MA *et al*., 2003; XU *et al.*, 2006). Nesses estudos, todos os compostos testados diminuíram significativamente a secreção de glicose, considerado como o *endpoint* mais sensível. Da mesma forma, outro estudo estabeleceu um método de triagem para hepatotoxicidade utilizando esferoides hepáticos onde a galactosamina, o propanol, o diclofenaco e o paracetamol foram analisados quanto ao impacto negativo sobre a dependência de ancoragem, a morfologia celular e a disseminação celular (XU *et al.*, 2003). Interessantemente, a influência xenobiótica nesse aspecto, se correlacionou com o aumento dos níveis de liberação de lactato desidrogenase (LDH) e de gama glutamil transferase

tanto em esferoides hepáticos primários quanto em esferoides derivados de HepG2 (XU *et al.*, 2003).

Em conjunto, esses estudos comprovam que modelos *in vitro* no formato de hepatoesferoides são úteis para testes de hepatotoxicidade, metabolismo energético e biotransformação de xenobióticos, pois a cultura 3D mimetiza aspectos particulares da situação fisiológica.

2.6.1. Esferoides celulares

A tentativa de formar estruturas fisiológicas adequadas *in vitro* é um desafio há décadas. Em 1952, Moscona observou que o co-cultivo em suspensão, de células condrogênicas e miogênicas de um embrião de galinha, formava espontaneamente agregados (MOSCONA, 1952). Vinte anos depois, os agregados 3D foram pela primeira vez nomeados de "esferoides" por Landry, que observou a formação de esferoides em uma superfície plástica não aderente (VAN ZIJL *et al*., 2010).

Esferoides celulares são, portanto, células agregadas (não necessariamente constituindo um formato esférico perfeito) que não se aderem a nenhum substrato de cultura (*e.g.* poliestireno) (FENEMMA *et al.*, 2013). Esferoides exibem estrutura energética e de superfície minimizadas, e, notavelmente, essa automontagem de células imita processos naturais de embriogênese, morfogênese e organogênese (FOTY *et al*., 2005; FOTY *et al.*, 1996; JIA *et al.*, 2007).

O objetivo geral das culturas esferoidais é refletir aspectos importantes da situação fisiológica *in vitro*, mimetizando a situação *in vivo* eficientemente em relação à sua forma celular e ambiente celular, o que influenciará tanto a expressão gênica quanto o comportamento biológico das células (DUGUAY *et al.,* 2003; MOSCONA, 1952).

Estas células secretam a MEC na qual elas residem e podem interagir umas com as outras de forma semelhante à como ocorre em seu microambiente original (FENEMMA *et al.,* 2013). Desta forma, interações célula-célula e célula-MEC são reestabelecidas, formando uma rede de comunicação 3D responsável pela homeostase tecidual e mimetizando a especificidade de tecidos reais através da expressão de um fenótipo tecidual (PAMPALONI *et al*., 2007).

Em resumo, esferoides celulares apresentam uma alternativa de condição fisiológica melhorada devido às seguintes razões:

1. Esferoides modelam a arquitetura 3D de tecidos, incluindo os arranjos multicelulares e a deposição de MEC, encontrados *in vivo*. Tais arranjos, que estão ausentes nos formatos de cultivo convencionais, reproduzem melhor como a absorção de produtos químicos pode ocorrer *in vivo* (MEHTA *et al.*, 2012).
2. Por serem estruturas 3D bem "compactadas", os esferoides possuem estreitas interações célula-célula, incluindo junções comunicantes, comparáveis às de tecidos *in vivo*, influenciando as respostas celulares à exposição à fármacos (OLOUMI *et al.*, 2002).
3. Os esferoides têm limites de difusão para a transferência de massa de drogas, nutrientes e outros fatores, semelhante aos tecidos *in vivo*. Devido à capacidade de mimetizar as barreiras fisiológicas para a absorção de drogas *in vivo*, esferoides podem servir como um formato de ensaio melhorado para o teste de drogas e compostos químicos (MEHTA *et al.*, 2012).

2.6.2. Modelos de cultivo celular 3D e seus desafios: o que nos dispomos a melhorar?

Com tantas vantagens a oferecer, modelos de esferoides ainda não são amplamente utilizados porque a comunidade biológica/científica ainda tem dificuldade em se adaptar aos modelos de tecido esferoidal existentes até o momento.

A maioria das técnicas empregadas atualmente para a construção de esferoides são dispendiosas, além de enfrentarem desafios, tais como: (1) dificuldade na formação e manutenção de esferoides de tamanho uniforme; (2) formação de esferoides com pequeno número de células; (3) alto custo das técnicas; (4) dificuldade na análise de esferoides semelhantes a tecidos (existem ensaios quantitativos incompatíveis com o modelo) (MEHTA *et al.*, 2012).

Os métodos de formação de esferoides mais avançados desenvolvidos recentemente utilizam frequentemente micro e nanotecnologias, placas com micropoços, substratos modificados em superfície, arcabouços 3D porosos

(scaffolds) ou arcabouços nano-impressos para induzir a formação de esferoides. Tais técnicas geralmente oferecem grandes melhorias em relação ao controle do tamanho do esferoide e da organização celular. No entanto, muitas dessas plataformas sofisticadas não são de fácil manuseio e, portanto, requerem usuários especialmente treinados para a fabricação e manipulação dos dispositivos, além de falharem quanto a possibilidade de cultivo a longo prazo – importantes para avaliações subcrônicas/crônicas. Além disso, muitos desses dispositivos apresentam problemas de compatibilidade dos materiais com muitos compostos hidrofóbicos, o que limita a aplicabilidade destes dispositivos à componentes químicos variados (MEHTA *et al.*, 2012).

Dentre as metodologias mais usuais para a construção de esferoides celulares, temos as baseadas em MEC, hidrogéis, e microfluidos (LONG, 2007), porém, como já mencionado, estas apresentam custo elevado e podem requerer o uso de equipamentos especializados (SHAH *et al.*, 2018).

Em modelos baseados em hidrogel, (onde as células são cultivadas em estruturas 3D baseadas em gel), além de alguns materiais usados para mimetizar a matriz extracelular serem caros (por ex, colágeno) (TIBBITT *et al.*, 2009), estes podem acarretar a problemas na reprodutibilidade dos dados (COSTA *et al.*, 2016). Em técnicas que utilizam insertos (estruturas constituídas de diferentes materiais),o custo é elevado, o manuseio é intensivo, são necessários equipamentos específicos e a reprodutibilidade é altamente dependente das técnicas usadas para a produção dos arcabouços onde se formarão os esferoides (COSTA *et al.*, 2016; FISCHBACH *et al.*, 2007).

Dentre as técnicas para geração de esferoides que não requerem o emprego de matrizes artificais ou suportes, temos a metodologia de *hanging drop*, cultura em substratos não aderentes e culturas em frascos *spinner* rotativas (FENNEMA *et al.,* 2013).

A técnica do *hanging drop* consiste em submeter um determinado número de células à força da gravidade para a indução de agregados celulares. Para isso, gotas de suspensão celular são dispostas na tampa de uma placa de cultivo, sendo esta posteriormente vertida sobre a parte inferior da placa, reduzindo a afinidade das células pelo substrato e aumentando a interação entre elas. Essa metodologia, embora simples, possibilita um preciso controle de tamanho dos esferoides gerados, porém, ainda requer intenso

manuseio. A manutenção dos esferoides em gotas suspensas e a troca regular de meio de cultura nas gotas (onde os esferoides se encontram) demanda muito tempo (COSTA *et al.*, 2016; MEHTA *et al.*, 2012). Contudo, as demais técnicas de construção de esferoides celulares, falham quanto ao controle do tamanho dos esferoides gerados – parâmetro crítico na reprodutibilidade dos resultados experimentais, uma vez que o tamanho afeta o comportamento, função celular e absorção/transporte do agente testado (MEHTA *et al.*, 2012).

Desta forma, para usufruir do baixo custo e da uniformidade dos esferoides formados na metodologia de *hanging drop*, buscamos maneiras de atenuar dificuldades encontradas particularmente nesta técnica, levando em consideração o tipo celular utilizado na formação dos esferoides.

2.6.3. Células HepG2: como utilizar uma linhagem tumoral para mimetizar um órgão saudável?

Células de fígado são de sumo interesse na investigação de efeitos induzidos por agentes químicos (MANDENIUS *et al*., 2011) e, atualmente, são empregadas para essa finalidade em diversos modelos *in vitro*.

Hepatócitos primários têm funções hepáticas específicas (especialmente a expressão de enzimas P450) porém, são de difícil obtenção e cultivo (período de vida limitado) e de alto custo. Por conseguinte, linhagens celulares imortalizadas, como a linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), são mais rentáveis (GUO *et al.*, 2011).

As células HepG2 retêm muitas características dos hepatócitos primários, como atividades de enzimas de fase I e fase II, e refletem o metabolismo de xenobióticos no corpo humano melhor do que outras células metabolicamente incompetentes (KNASMULLER *et al*., 1998). No entanto, em comparação com células hepáticas normais, células HepG2 possuem baixos níveis de enzimas P450 e de receptores xenobióticos quando cultivadas em monocamada (2D) (SHAH *et al.*, 2018). O cultivo de células HepG2 em 3D é uma alternativa a essa problemática.

Ramaiahgari *et al*., (2014) mostra que células HepG2, cultivadas em 3D, formam esferoides com canaulículo biliar funcional e com significativo aumento da expressão de albumina, genes codificantes de enzimas de fase I e II do

metabolismo de xenobióticos, transportadores de fármacos e receptores xenobióticos. Desta forma, os autores demonstram que esferoides de HepG2 apresentam transporte de ácido biliar, maior capacidade metabólica, atividade transportadora e sensibilidade à hepatotoxinas (JIANG *et al.,* 2007).

Adicionalmente, quando cultivadas em sistemas de cultivo celular 3D, células HepG2 apresentam viabilidade e funcionalidade melhorada (NAKAMURA *et al*., 2011), o que possibilita o cultivo por períodos prolongados (>28 dias) em microplaca e, consequentemente, testes com exposição repetida. Hepatócitos primários, por sua vez, quando cultivados em monocamada perdem a polaridade específica dos tecidos e a função, eventualmente morrendo (RAMAIAHGARI *et al*., 2014).

Células HepG2 em culturas 3D já foram aplicadas com sucesso na investigação toxicológica do efeito de drogas na respiração e no metabolismo celular (NIKLAS *et al.,* 2009) e podem efetivamente ser utilizadas como uma alternativa confiável e de baixo custo à hepatócitos primários. O desenvolvimento de ensaios 3D utilizando HepG2, com maior expressão de enzimas do metabolismo hepático, é comprovado e aplicável à testes de genotoxicidade, como demonstrado por Shah *et al.* (2018), além de oferecer uma alternativa de modelo *in vitro* de ótimo custo-benefício.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral, o desenvolvimento de um modelo hepático 3D, baseado na metodologia de esferoides celulares de HepG2, e a posterior aplicação deste modelo em testes de genotoxicidade, visando avaliar o potencial antigenotóxico de dois PSs (Fucana A e galactana CI).

3.2. Objetivos específicos

O presente trabalho tem como objetivos específicos:

(1) Padronizar a metodologia de *hanging drop* com células HepG2, construindo hepatoesferas;
(2) Avaliar a metodologia criada quanto a eficiência em ensaios genotoxicológicos, através da comparação com métodos 2D usais;
(3) Avaliar o potencial genotóxico dos PSs (fucana A e galactana CI), através do ensaio cometa (versões alcalina e oxidativa);
(4) Avaliar o potencial antigenotóxico da fucana A e da galactana CI, contra danos oxidativos e alquilantes no DNA;
(5) Ampliar o conhecimento sobre PSs e suas propriedades farmacológicas;
(6) Contribuir na melhoria de avaliações anti- e genotoxicológicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

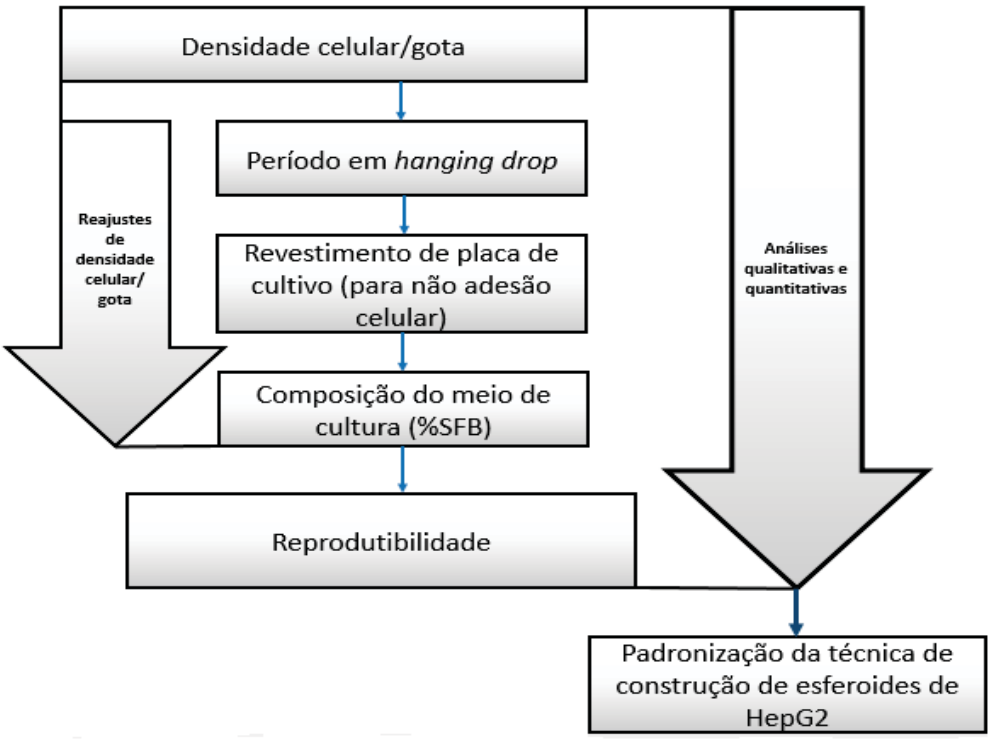


Figura 3. Delineamento experimental da padronização da técnica de construção de esferoides de HepG2. *A densidade celular/gota foi ajustada até experimentos de definição da composição do meio. Análises qualitativas e quantitativas foram realizadas ao longo de todos os experimentos de padronização da técnica.

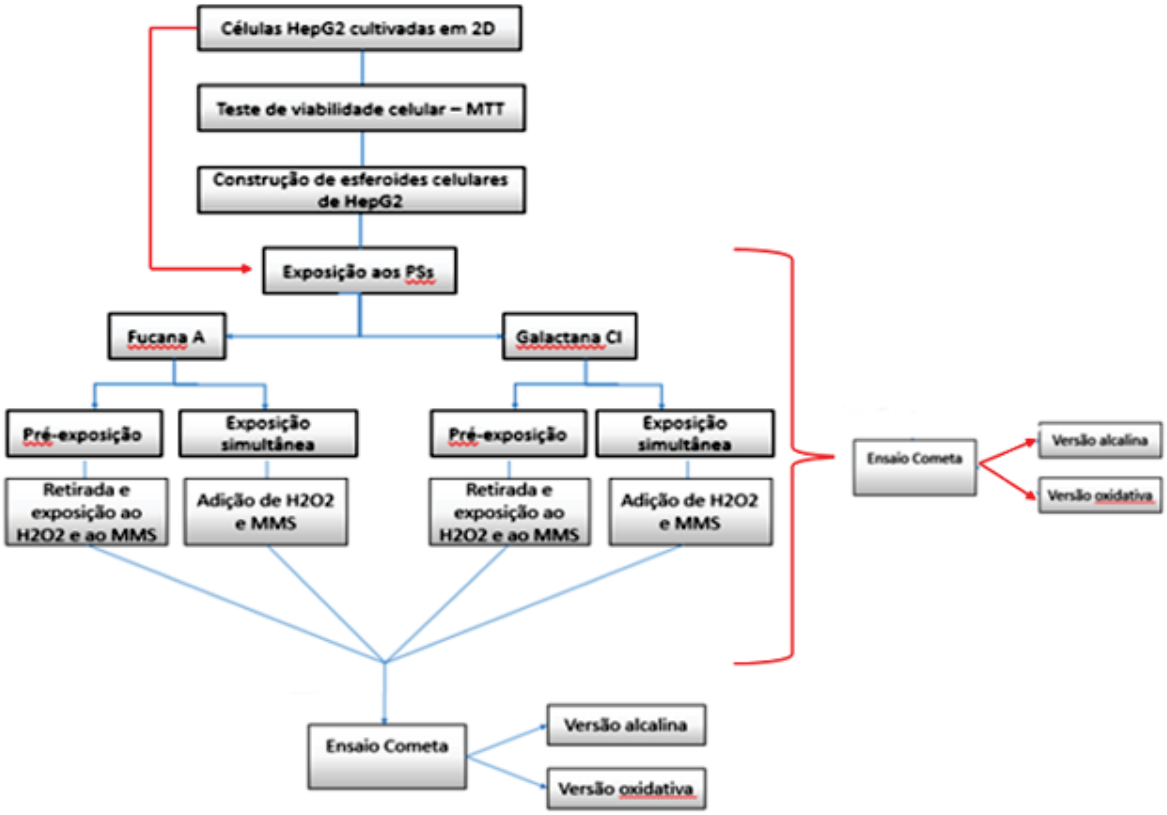


Figura 4. Delineamento experimental da avaliação genotoxicológica dos PSs. * Setas em azul indicam experimentos realizados com células cultivadas em modelo *in vitro* 3D. Setas em vermelho indicam experimentos com células cultivadas em 2D.

4.2. Compostos testados

A fucana A e a galactana obtidas, respectivamente, da alga marrom *Spatoglossum schröederi* e da alga verde *Codium isthmocladum,* foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

4.2.1. Método de obtenção ***dos PSs***

Para a obtenção dos polissacarídeos, a alga marrom *Spatoglossum schroederi* e a alga verde *Codium isthmocladum* foram coletadas da costa sublitoral de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. Imediatamente após a coleta, a

alga foi seca ao ar a 50 ° C (sob ventilação) e moída no liquidificador. As algas foram então tratadas com etanol e acetona para remover pigmentos e lipídios, respectivamente. Cem gramas de alga em pó seco e delipidado foram ressuspendidos em 500 mL de uma solução aquosa de NaCl 0,25 M e ajustados para pH 8,0 com NaOH. Cerca de 20 mg de maxatase foram adicionadas, uma protease alcalina de *Esporobacillus* (Biobras, 'Montes Claros, Minas Gerais, Brasil), à solução para digestão proteolítica. Após incubação durante 18 h a 60 ° C sob agitação, a mistura foi filtrada através de um pano morim. O filtrado foi fracionado através de uma precipitação em série com volumes crescentes de acetona (1: 0,3, 1: 0,5, 1: 0,7, 1: 0,9 e 1: 1,2, v / v). Para cada precipitação, o volume de acetona gelada foi adicionado sob agitação suave e mantido a 4 ° C durante 24 h. Os grânulos formados em cada suspensão foram recolhidos por centrifugação separadamente (10 000 x g durante 20 min) e secos sob vácuo. Os extratos brutos foram diluídos em meio DMEM sem soro, que depois foi filtrado através de uma membrana de seringa com poros de 22 µm de diâmetro, para evitar a contaminação por microorganismos. Ambos os polissacarídeos foram usados na concentração final de 100 µg/mL, em triplicata.

4.3. Sistema biológico

Como sistema biológico utilizou-se a linhagem celular de hepatocarcinoma humano HepG2 (*American Type Culture Collection* HB 8065) doada pela Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira, do Laboratório de Toxicologia Ambiental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP).

4.3.1. Cultivo celular

Células HepG2 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), contendo antibióticos (penicilina 1 U/mL e estreptomicina 1 µg/mL), em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO_2. Subculturas celulares foram realizadas quando as garrafas atingiam ~ 80% de confluência.

4.4. Construção de esferoides **de HepG2**

4.4.1. Padronização

Esferoides de HepG2 foram construídos baseados no protocolo de Foty (2011), com modificações.

Ao atingirem 80% de confluência, células HepG2 foram tripsinizadas para obtenção de uma suspensão celular. As células foram contadas em câmara de Neubauer e as suspensões celulares ajustadas para diferentes densidades celulares/gota, como segue: 3125; 1562; 781; 500; 300; 125 e 13 células/gota (as densidades foram reduzindo ao longo de toda a padronização, de acordo com resultados obtidos nos testes de aperfeiçoamento da técnica empregada). Gotas de 25 µl da suspensão celular foram dispostas na tampa da placa de cultivo celular (60 mm), sendo posteriormente vertida sobre a parte inferior da placa previamente preenchida com tampão fosfato salino (PBS) (condição de *hanging drop*).

Placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO_2 por períodos de 3 e 5 dias, e agregados celulares formados (um por gota) foram então transferidos para poços da placa de 96-poços (um por poço). Os poços foram previamente tratados para a não adesão celular com os seguintes revestimentos: PolyHEMA [*Poly (2-hydroxyethyl methacrylate*] a 2,5%; BSA (*Bovine Serum Albumin*) a 2%; BSA 2%+PolyHEMA 2,5%; e agarose 1,5%-v/v (água ultrapura). Os agregados também foram incubados em placas de 96-poços contendo meio DMEM com variações de suplementação de SFB (1; 5 e 10%) por mais 5 dias em poços com o melhor revestimento testado, a 37°C e 5% de CO_2, em atmosfera úmida, até a formação final dos esferoides celulares.

Os esferoides de HepG2 gerados nas diferentes condições de construção foram analisados quanto ao formato, tamanho e estabilidade. Para as análises de formato e tamanho, foram adquiras imagens dos esferoides celulares (n=6 em experimentos de recobrimento da placa; n=30 nos demais experimentos), no período de 0 até 15 dias, com auxílio de microscópio de luz (Olympus CKX41), em aumento de 10x. A escala de imagens foi determinada usando uma placa de calibração.

As imagens foram analisadas usando o software ImageJ (pacote Fiji) pela delimitação manual do contorno de cada esferoide. A área medida (S) da projeção bidimensional dos esferoides foi utilizada para calcular o diâmetro de uma esfera equivalente (IVANOV et al., 2014), pela fórmula:

$$(R = \sqrt{\frac{S}{\pi}}) \times 2$$

O perímetro utilizado em alguns experimentos, foi obtido através dos resultados obtidos com o mesmo programa, após delimitação manual do contorno de cada esferoide.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4.2. Avaliação da qualidade pós padronização

Após a padronização da técnica, foram avaliadas a integridade da membrana e a integridade do núcleo por marcação com iodeto de propídeo e faloidina. Esferoides mantidos por 5 dias na placa e por 8 dias foram os analisados, já que o dia 5 determina o dia de formação completa dos esferoides e no dia 8 seria realizado o ensaio cometa após exposição aos PSs.

Assim, os esferoides foram coletados após o período de 5 e 8 dias, lavados 3 vezes com PBS; fixados com paraformaldeído a 2%; permeabilizados com saponina 0,1% por 20 minutos; incubados com 0,1M de Glicina em PBS e saponina 0,1%, para bloqueio dos radicais aldeídicos livres e incubados com Phalloidin Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific - A22287) diluída em PBS (1:200) por uma hora. Logo após, foram lavados 3 vezes com PBS e incubados com iodeto de propídeo (PI/RNAse – BD 550825) por 30 minutos e transferidos para uma lâmina escavada. As lâminas foram montadas usando Fluoromount G e imagens foram obtidas através do microscópio de varredura a laser confocal Nikon A1RMP+. As imagens foram processadas usando o software Fiji.

4.5. Avaliação do potencial antigenotóxico **dos polissacarídeos sulfatados**

4.5.1. Cultivo de hepatoesferoides no modelo padronizado

Cultivamos esferoides de acordo com o protocolo de hepatoesferoides estabelecido para a avaliação da antigenotoxicidade dos PSs em estudo. Desta forma, após a obtenção da suspensão de células HepG2, a mesma foi ajusta para a densidade de 125 células/gota e gotas (25 µl) foram dispostas em uma tampa de uma placa de cultivo celular (60 mm). A tampa foi então vertida sobre a parte inferior da placa de cultivo contendo PBS, sendo incubada por 3 dias na condição de *hanging drop* e mais 5 dias em placas de 96-poços recobertas com agarose 1,5% contendo DMEM+1%SBF, a 37°C, 5% de CO_2, em atmosfera úmida.

4.5.2. Exposição aos PSs

A concentração de 100 µg/mL e o tempo de exposição (72 h) para a avaliação do potencial antigenotóxico dos PSs, fucana A e galactana CI, foram estabelecidos de acordo com estudos prévios do Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados (LIPS)/UFPR. Esses estudos mostraram resultados mais significativos em relação às propriedades benéficas dos PSs na concentração e tempo de citados (BELLAN *et al*. 2015).

4.5.3. Testes de citotoxicidade

Para se certificar de que a concentração de PSs definida não apresentava efeitos citotóxicos às células HepG2 e proporcionar confiabilidade nos resultados obtidos nos testes de genotoxicidade/antigenotoxicidade, foram aplicados testes de citotoxicidade.

4.5.3.1 Exposição aos polissacarídeos sulfatados (HepG2 em monocamada)

As células HepG2 foram plaqueadas na densidade de $1x10^4$ células/ poço em placas 96-poços. Após 24 h de estabilização, as células foram expostas aos PSs (100 µg/mL) e incubadas por 72 h à 37°C, 5% CO_2, em atmosfera úmida.

Como controles negativo e positivo, utilizou-se, respectivamente, meio de cultivo com 5% de SFB e Triton X-100 1%-v/v. Poços do branco continham apenas meio de cultivo sem células.

4.5.3.2. Teste do MTT

Decorridas as 72 h de exposição, os tratamentos foram removidos, os poços foram lavados com PBS e a placa foi incubada com o corante MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, CAS 298-93-1, Sigma) a 0,5 mg/mL por 2 h. Após a incubação, o corante foi descartado e dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado em cada poço da placa de cultura, para a dissolução dos cristais de formazan. Os cristais de formazan resultam da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase presente somente em células vivas (MOSMANN, 1983). Após breve agitação, as placas foram submetidas ao leitor EpochTM Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc) (filtro de 540 nm), para a realização das medidas espectrofotométricas que definiram o potencial citotóxico dos PSs testados (MOSMANN, 1983).

4.***5.3***.3. Teste de incorporação ***do vermelho neutro***

Decorridas as 72 h de exposição aos PSs, os tratamentos foram removidos, os poços foram lavados com PBS e a placa foi incubada com o corante Vermelho Neutro (VN, 3-amino-7-dimethylamino-2-methyl-phenazine hydrochloride, Sigma) a 40 $\mu g/ml^{-1}$ por 2 horas. Após este período, o corante foi descartado e, em seguida, adicionou-se em cada poço solução de extração (1% de ácido acético em solução aquosa contendo 50% de etanol). Após breve agitação, as placas foram submetidas ao leitor de ELISA (filtro de 540 nm), para a realização das medidas espectrofotométricas. Células não viáveis não apresentam acúmulo de VN nos lisossomos e, por isso, a quantidade de corante retido é proporcional ao número de células viáveis (REPETTO *et al.,* 2008).

4.***5.3***.3.***1. Determinação da viabilidade celular***

A viabilidade celular foi calculada para ambos os testes (MTT e VN), como segue:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(\text{absorbância da amostra - absorbância branco})}{(\text{absorbância do controle negativo-absorbância branco})} \times 100$$

Os dados obtidos foram analisados com teste estatístico ANOVA de 1 via e as diferenças foram avaliadas pelo pós-teste de Duncan ($p < 0,05$). Os dados são representativos de três experimentos independentes.

4.5.4. Testes de antigenotoxicidade e potencial antioxidante

4.5.4.1. Tratamentos

Esferoides de HepG2 (n= 30) foram expostos aos PSs Fucana A e CI nas condições determinadas pelo teste de citotoxicidade (100 µg/mL, 72 h exposição).

Dois protocolos de tratamentos foram empregados, a fim de estabelecer se a ação de genotoxicantes (MMS e H_2O_2) foi reduzida ou inibida pela exposição prévia ou simultânea aos PSs em estudo, o que lhes conferiria ação antigenotóxica:

a) **Pré-tratamento:** os esferoides foram inicialmente expostos aos PSs pelo período de 72 horas e, em seguida, o meio foi removido e as células foram expostas aos agentes genotoxicantes [MMS, agente alquilante (*N7-Alkylation*) – 3 h exposição; H_2O_2, agente oxidante – 1 h de exposição;
b) **Tratamento simultâneo:** os esferoides foram expostos simultaneamente aos PSs e aos genotoxicantes por 3 horas em coexposição com o MMS e 1 hora com o H_2O_2.

Os esferoides de HepG2 também foram expostos apenas aos PSs (3 h) para confirmar a ausência de genotoxicidade dos PSs, já reportada na literatura (MORI *et al.*, 1984).

Esferoides de HepG2 expostos apenas ao meio de cultivo e à MMS a 5 mM e H_2O_2 a 500 µM foram utilizados, respectivamente como controles negativo, positivo ensaio Cometa alcalino e positivo ensaio Cometa oxidativo/quantificação potencial antioxidante.

As mesmas formas de tratamento foram realizadas também com células HepG2 cultivadas em monocamada (2D), afim de comparar os sistemas de cultivo celular 2D e 3D.

4.5.4.2. Ensaio Cometa

A avaliação da genotoxicidade/antigenotoxicidade foi realizada empregando dois protocolos de ensaio cometa: versão alcalina (TICE *et al.*, 2000; LEME *et al.*, 2014) e versão alcalina modificada pelo emprego de endonucleases de reparo (enzima hOGG1) para detecção de bases oxidadas (versão oxidativa).

100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0.5%-w/v em água ultrapura) a 37°C foram adicionados às suspensões celulares obtidas a partir dos esferoides e também de cultura 2D (para posterior comparação da resposta nos dois modelos). Na sequência, esta suspensão foi disposta em duas lâminas previamente revestidas com agarose (1,5%-w/v em água ultrapura) e recobertas por lamínula. Após breve solidificação da agarose a 4°C, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram incubadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, tampão Tris-HCl 10 mM, 1% sarcosinato de sódio, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) por 24 h. Após a lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese contendo tampão alcalino (EDTA 200 mM, NaOH a 10 M, pH>13) por 25 minutos e, em seguida, submetidas à eletroforese por mais 25 min (1 V/cm, 300 mA). Decorrido o tempo da corrida de eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em tampão Tris-HCl a 4,85% (pH 7,5), fixadas em etanol absoluto por 5 minutos e guardadas a 4°C, até a realização das análises.

Para as lâminas da versão oxidativa, uma etapa anterior à corrida de eletroforese foi realizada pela incubação das mesmas com a enzima hOGG1 (0,08 U em tampão HEPES 40 mmol/L, KCl mol/L, EDTA 0,5 mmol/L, BSA 0,2 mg/mL, pH 8) por 30 min, a 37°C, em câmera úmida.

As lâminas foram coradas com solução de brometo de etídio (20 µg/mL, Sigma- Aldrich) e examinadas em microscópio motorizado de epifluorescência (Axio Imager Z2, Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com a digitalização automatizada Vslide (Metasystems, Altlussheim, DE). As lesões no DNA foram quantificadas quanto ao parâmetro intensidade de DNA na cauda (% Tail DNA) (KUMARAVEL *et al*., 2009), utilizando o *software* de análise de imagem MetaSystems Images. Um número de 100 nucleoides selecionados ao acaso foram quantificados por tratamento.

Os resultados foram estatisticamente avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste Dunnett de comparações múltiplas segundo Tsuboy *et al*. (2007). As diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

Para a obtenção da suspensão celular dos esferoides foram testadas diferentes concentrações de tripsina (0,05% e 0,1%) e tempos de tripsinização (3, 5 e 7 minutos). A ação da tripsina a 0,1% por 5 minutos foi mais eficiente na dissociação dos esferoides.

A concentração de MMS e H_2O_2 para um controle positivo adequado, foi definida a partir de diversas concentrações e tempos de exposição ao MMS (5,0; 2,5 e 1,25mM por 3 horas de exposição) e de H_2O_2 (1000µM e 500µM por 1 hora de exposição e 250 uM por 3 horas de exposição) e posterior análise de microscopia das lâminas coradas com brometo de etídio. Foi observada um padrão de cauda do cometa com dano característico de controle positivo (caudas com danos de nível 3 a 4). Assim, a concentração de 5 mM para o MMS e 500 µM de H_2O_2, em tempos de exposição de 3 horas e 1 hora foram utilizadas, respectivamente.

4.5.4.3. Determinação da antigenotoxicidade

As atividades antigenotóxicas e antimutagênicas foram avaliadas através da análise da redução de danos em cada tratamento induzido pela fucana A e

galactana CI. Para calcular a porcentagem de redução, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\textbf{Redução de danos (\%)} = [(a)/(a - c)] \times 100$$

(onde: a = número de danos induzidos pela CP; b = número de danos induzidos por cada tratamento; c = número danos induzidos pelo CN).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Frente aos dois objetivos gerais do trabalho, essa seção foi dividida em dois capítulos, como segue:

(1) CAPÍTULO 1 - Desenvolvimento de um modelo *in vitro* 3D hepático: hepatoesferas de HepG2;

(2) CAPÍTULO 2 - Avaliação da antigenotoxicidade dos PSs Fucana A e CI utilizando HepG2 em monocamadas e como hepatoesferas.

CAPÍTULO 1

Desenvolvimento de um modelo *in vitro* 3D hepático: hepatoesferas de HepG2

5.1. Trajetória de **desenvolvimento das hepatoesferas de HepG2**

Como abordado na revisão da literatura, existe uma carência de modelos *in vitro* de fígado que, além de mimetizar a condição *in vivo*, sejam de fácil reprodutibilidade e apresentem uma boa relação custo-benefício. O cultivo celular 3D de esferoides celulares tem sido amplamente empregado no desenvolvimento de modelos hepáticos *in vitro*.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas na construção de esferoides e a eficiência das mesmas é determinada pela avaliação de características específicas, como: morfologia; topografia; tamanho; organização celular; níveis de expressão gênica (COSTA *et al*., 2016). Dentre as técnicas conhecidas, a metodologia de *hanging drop* se mostra uma alternativa de fácil manuseio, reprodutibilidade e baixo custo. Frente a isso, propusemos o desenvolvimento de um modelo *in vitro* de hepatoesferas construído pela metodologia de *hanging drop* e aperfeiçoado para a linhagem celular HepG2.

Inicialmente, o desenvolvimento desse modelo baseou-se no protocolo de construção de esferoides de células de gônada de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (RTG-2, célula imortalizada), estabelecido no Laboratório de Mutagênese Ambiental/UFPR pela Dra. Taynah Vicari (dados em publicação). No entanto, inúmeras dificuldades foram enfrentadas, pois células HepG2 têm como origem tecido tumoral humano (hepatocarcinoma celular) e, por isso, apresentam diferentes padrões de crescimento/adesão celular e afinidade à substratos em relação à células imortalizadas, como as RTG-2. Desta maneira, várias etapas do protocolo de esferoides de células de peixe tiveram que ser redefinidas para se adequar às características das células HepG2, como será discutido a seguir.

5.2. Adequações no recobrimento da placa para não adesão celular

Após o período de formação dos esferoides em *hanging drop*, os mesmos foram transferidos para placas de 96 poços e mantidos na condição de cultivo padrão (imerso no meio), gerando a possibilidade de cultivo a longo prazo com reduzida demanda de manuseio (Fig. 5A). Para isso, se fez necessário o uso de placas tratadas que impossibilitassem a adesão celular e, consequentemente, mantivessem as células organizadas em esferoides. Placas tratadas para a não adesão celular estão disponíveis no mercado, porém, são de alto custo e, geralmente, apresentam baixa eficiência no cultivo de esferoides celulares (MEHTA, 2012). Como alternativa a essas placas, alguns materiais podem ser empregados no revestimento de placas normais de cultivo, impedindo a adesão celular na placa.

O PolyHEMA é um material termoplástico rígido, transparente e incolor que pode ser usado para recobrir superfícies de poliestireno e é geralmente utilizado em placas de cultivo como uma superfície de não adesão celular (KIM *et al.*, 2012). Foi relatado que a adesão celular também pode ser completamente bloqueada por pré-revestimento do substrato com BSA (GRINNELL *et al.,* 1977). A agarose é um material inerte, no qual as células geralmente não têm afinidade, não se aderindo adequadamente, e por isso também é usada em ensaios de crescimento independente de ancoragem.

Em nossos experimentos, placas de 96 poços foram recobertas com PolyHEMA a 2,5%; BSA a 2%; PolyHEMA 2,5%+BSA 2% e agarose a 1,5%, com o intuito de verificar qual recobrimento proporcionaria a melhor condição para a não adesão celular durante a manutenção dos esferoides em poços de cultivo padrão.

De acordo com os resultados obtidos, a agarose proporcionou a melhor eficiência de recobrimento para não a adesão celular, mantendo a estrutura 3D das hepatoesferas de HepG2 ao longo de dez dias de cultivo na placa (Fig. 5B-C). Já as placas recobertas com PolyHEMA – recobrimento mais indicado para cultivo de esferoides celulares 3D (FOLKMAN, 1978) – se mostraram inadequadas na manutenção das hepatoesferas, pois a maioria dos esferoides apresentou adesão à placa (Fig. 5D).

Ao contrário do que Grinnell *et al.* (1977) relata, o BSA foi totalmente ineficaz em impedir a adesão das hepatoesferas às placas, mesmo quando associado ao PolyHEMA. Em ambas condições, as células aderiram à placa desde o primeiro dia de experimento, alterando inclusive o comportamento das mesmas e resultando na formação de aglomerados de células dispersos ao redor dos poços (Fig. 5E-F).

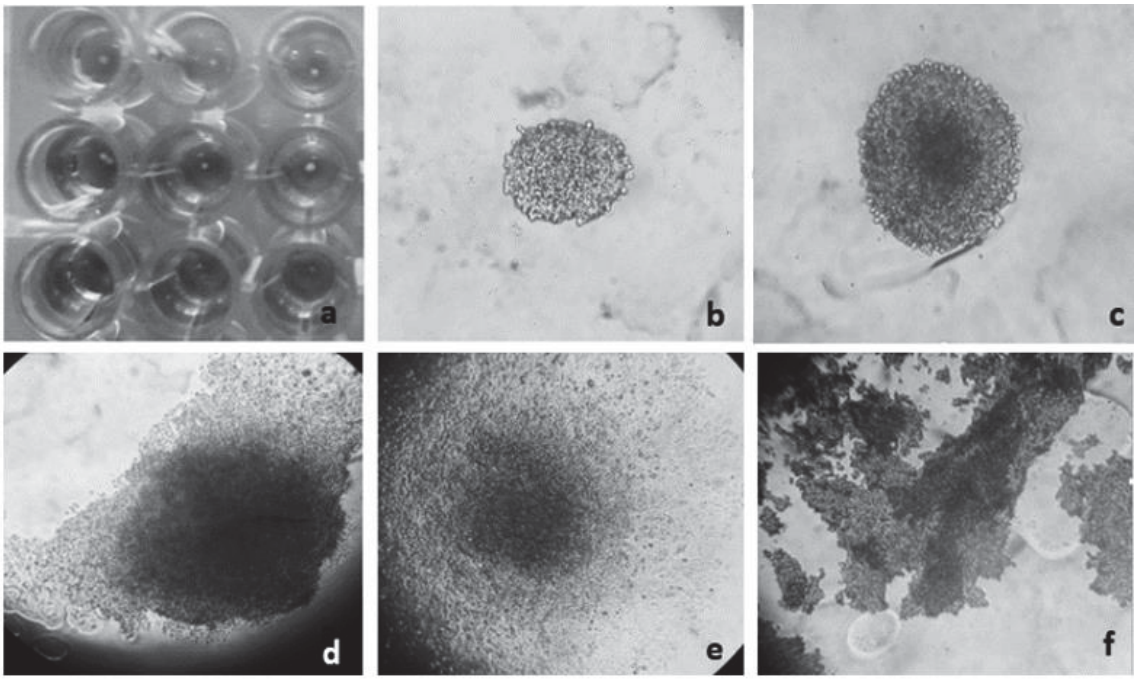


Figura 5. Avaliação da eficiência do material de recobrimento para não adesão celular na placa de cultivo de 96-poços e da manutenção da qualidade das hepatoesferas de HepG2 ao longo de 10 dias. **A.** Hepatoesferas em poços da placa de 96 poços; **B-C.** Hepatoesferas nos dias 0 (último dia de *hanging drop*) e 10, respectivamente, em poços recobertos com agarose 1,5%; **D.** Hepatoesferas em poço recoberto com PolyHEMA 2,5% no quinto dia após a retirada da condição de *hanging drop*; **E.** Hepatoesferas em poço recoberto com BSA 2%, no primeiro dia após a transferência da condição de *hanging drop* para o cultivo padrão; **F.** Aglomerados de células dispersos ao redor do poço recoberto com PolyHEMA 2,5%+BSA 2% no quinto dia na placa de 96 poços.

5.3. Tempo de cultivo em *hanging drop*

Células tumorais tendem a ter menor afinidade entre si, devido à carência de junções comunicantes (YANG *et al*., 2006). Essa característica poderia influenciar a agregação das células HepG2, exigindo maior tempo de cultivo em *hanging drop* para a formação das hepatoesferas.

Para definir as condições adequadas para a formação dos agregados celulares de HepG2, suspensões celulares de diferentes densidades, foram mantidas em *hanging drop* por períodos de 3 e 5 dias, sendo posteriormente analisados quanto a formação, tamanho (diâmetro) e estabilidade.

O tamanho e a estabilidade das hepatoesferas foram avaliados no dia da transferência para os poços da placa de 96-poços (dia 0) até o quinto dia de cultivo nos poços (dia 5 – finalização do período de estabilização das hepatoesferas).

A formação de esferoides de HepG2 foi observada tanto em *hanging drop* de 3 dias quanto no de 5 dias, indicando que células HepG2, mesmo que reconhecidas pelas suas deficiências nas interações célula-célula, como baixa expressão de E-caderina (FRANZISKA *et al*., 2010), são capazes de formar esferoides celulares em curto tempo de cultivo em *hanging drop*. No entanto, os esferoides formados em 3 dias de *hanging drop* foram menores, como pode ser notado pelas análises visual (Fig. 6-7) e estatística (Fig. 8).

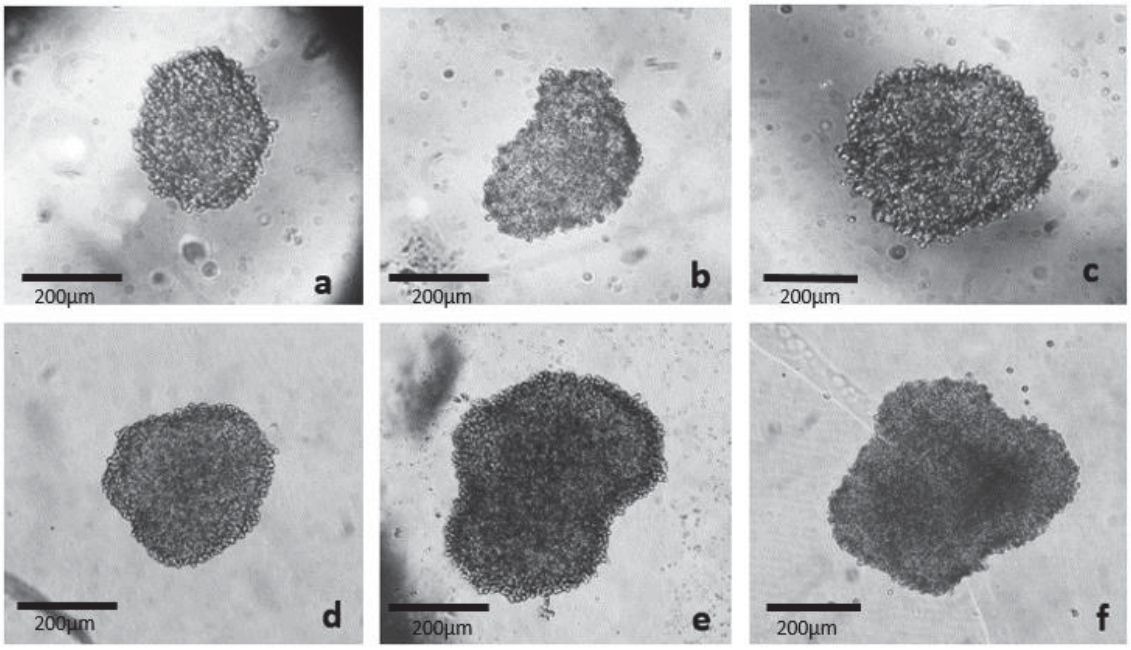


Figura 6. Esferoides de células HepG2 no dia 0, formados em períodos de 3 e 5 dias em *hanging drop*. **A-C.** Hepatoesferas formadas a partir de 3 dias em cultivo *hanging drop* com, respectivamente, 781, 1562 e 3125 células/gota; **D-F.** Hepatoesferas formadas a partir do cultivo de 5 dias em *hanging drop* com, respectivamente, 781, 1562 e 3125 células/gota.

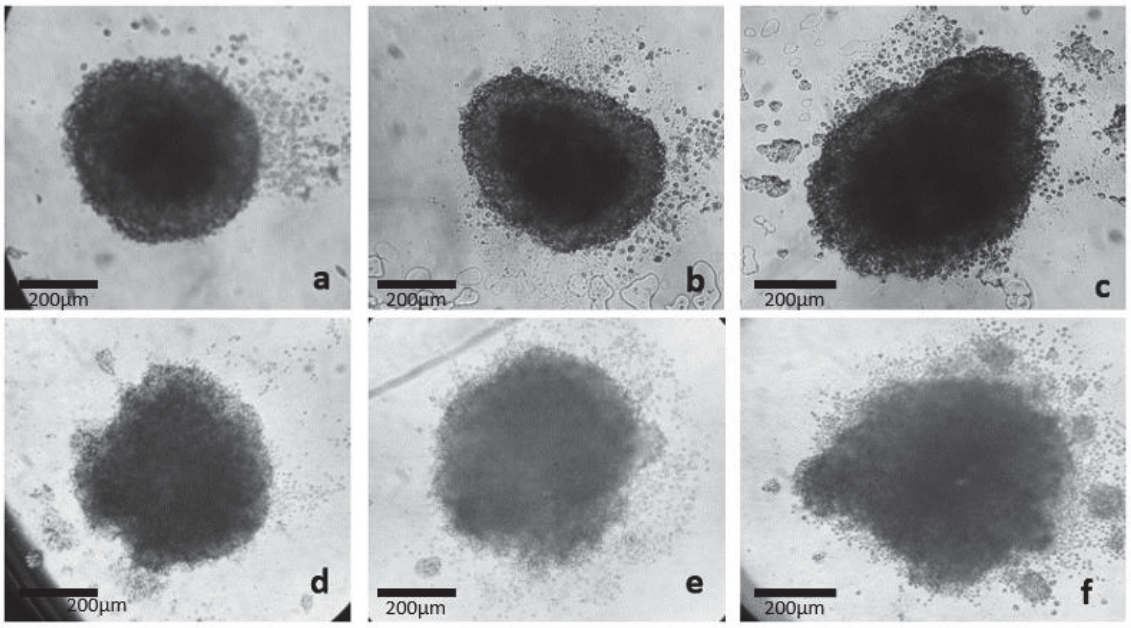


Figura 7. Hepatoesferas de HepG2, formados em períodos de 3 e 5 dias em *hanging drop*, após 5 dias de transferência para placa de 96-poços. **A-C.** Hepatoesferas formadas em 3 dias de *hanging drop* e com, respectivamente, 781, 1562 e 3125 células/gota; **D-F.** Hepatoesferas formadas em 5 dias de *hanging drop* e com, respectivamente, 781, 1562 e 3125 células/gota.

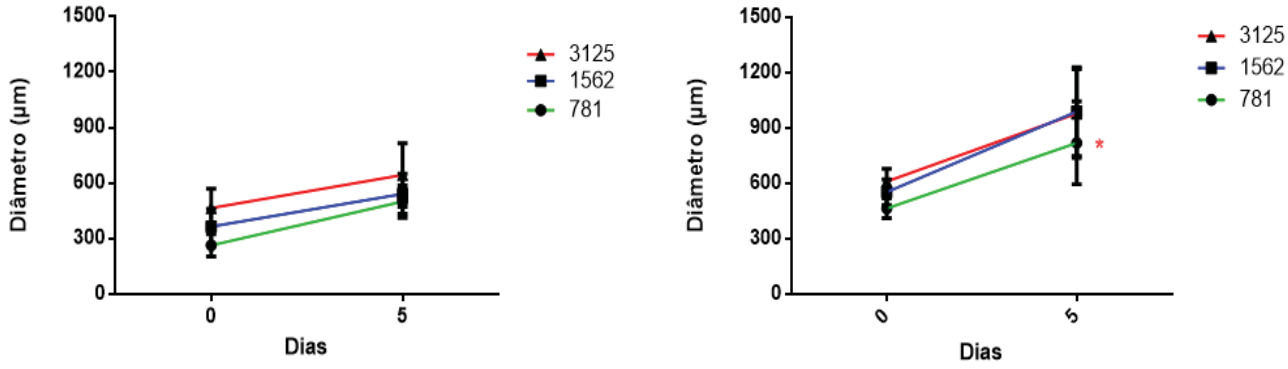


Figura 8. Comparação dos diâmetros das hepatoesferas de HepG2 formadas em diferentes tempos de *hanging drop* e densidade celular (781, 1562 e 3125 células/gota), nos dias 0 e 5 após transferência para placas de 96-poços. **A.** Hepatoesferas formadas em 3 dias de cultivo em *hanging drop*. **B.** Hepatoesferas formadas em 5 dias de cultivo em em *hanging drop*. * Diferença significativa ($p<0.05$) comparada aos grupos de 3125 e 1562 células.

De acordo com análises de perímetro das hepatoesferas de HepG2 (Fig. 9), e com as imagens representativas (Fig. 6 e 7), esferoides formados em 5 dias de *hanging drop* tendem a ser mais disformes do que os formados em 3 dias. O aumento do perímetro verificado nas hepatoesferas de 5 dias em

hanging drop deve-se não só ao tamanho dos esferoides, mas às diversas ondulações presentes nas bordas.

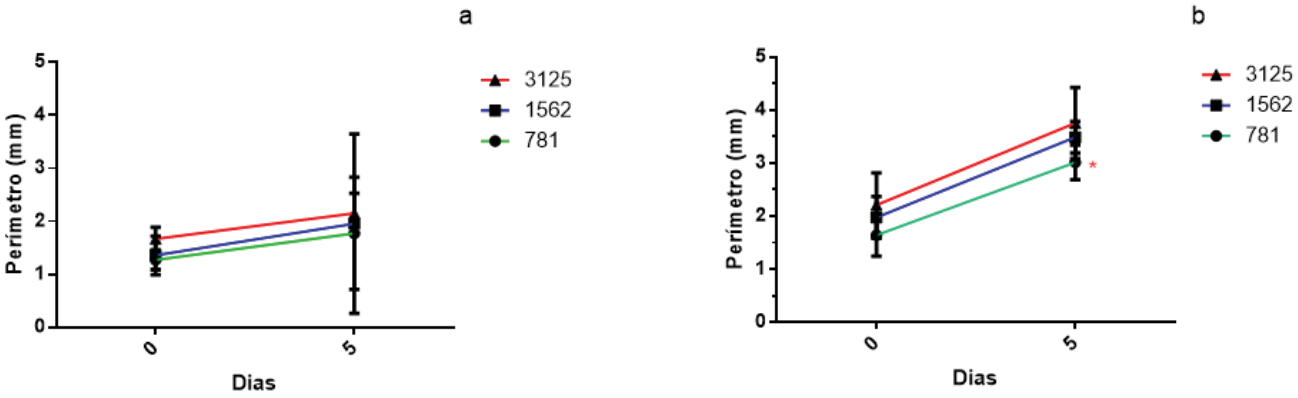


Figura 9. Comparação entre os perímetros das hepatoesferas de HepG2 formadas em diferentes tempos de *hanging drop* e densidade celular (781, 1562 e 3125 células/gota), nos dias 0 e 5 após transferência para placas de 96-poços. Hepatoesferas geradas em 3 dias **(A)** e 5 dias **(B)** de cultivo em *hanging drop*.

Dentre as hepatoesferas formadas em 5 dias de *hanging drop*, as construídas com menor número de células por gota (781 células), apresentaram menos ondulações após o período de 5 dias na placa e, consequentemente, menor perímetro (Fig. 7D-F). Tais deformidades também foram observadas na periferia dos esferoides formados em 3 dias de *hanging drop* e a partir de 1562 e 3125 células/gota (Fig. 7B-C), porém estas foram menores do que as observadas em hepatoesferas formadas em 5 dias de *hanging drop* (Fig. 7D-F).

De forma geral, esferoides formados no *hanging drop* de 3 dias foram mais estáveis do que os formados em 5 dias. Nota-se, também, que não foram observadas deformidades nas hepatoesferas formadas a partir de 781 células em 3 dias de *hanging drop* (Fig. 7A), indicando que hepatoesferas com menor quantidade de células/gota são mais estáveis quanto à manutenção do formato esferoidal, enquanto maiores quantidades de células/gota aumentam a irregularidade do formato esferoidal (Fig. 7B e C).

Dessa forma, o período de 3 dias foi definido como o melhor para a condição em *hanging drop*, uma vez que as hepatoesferas apresentaram maior estabilidade em relação ao formato esferoidal e menor tamanho – ponto relevante para a nutrição, oxigenação e exposição à toxicantes de modelos *in vitro* 3D (SAKAI *et al*., 2007).

5.4. Densidade de células HepG2 em *hanging drop*

O tamanho é um dos pontos cruciais na padronização de modelos esferoidais, pois está estritamente relacionado com a nutrição/oxigenação requeridas para a manutenção da viabilidade celular dos esferoides (principalmente os de cultivo estático).

Estudos apontam que a difusão de oxigênio ocorre em tecidos com faixa de espessura entre 100 a 200 µm. Para evitar regiões de hipóxia - ideal para modelos tumorais, porém indesejada para a reprodução da condição fisiológica normal de órgãos – o tamanho ideal do agregado deve se manter em aproximadamente 250 µm (ASTHANA *et al.*, 2012; MUELLER *et al.*, 2011). No entanto, também se afirma que apenas esferoides de até 100 µm não são suscetíveis a formação de regiões de hipóxia, podendo certamente ser empregados como modelos de órgãos fisiologicamente normais (RAMAIAHGARI *et al*., 2014).

Em nosso estudo, hepatoesferas de HepG2 foram construídas com diferentes densidades celulares, sendo posteriormente avaliadas quanto ao tamanho. A definição inicial do número de células empregadas em nosso modelo teve como base protocolos estabelecidos para as células de peixe RTG-2 (20.000 células/esferoide) e a literatura (faixa variando de 8000 a 250) (RAMAIAHGARI et al., 2014; MULLER *et al.*, 2011).

Nossos experimentos iniciais utilizando elevadas concentrações de células HepG2/esferoide (6250 células) não foram bem sucedidos na nossa metodologia de *hanging drop*, resultando em hepatoesferas de morfologia disforme e tamanho elevado. A redução do número de células por esferoide (781, 1562 e 3125) proporcionou a obtenção de esferoides morfologicamente estáveis quanto ao formato esferoidal (Fig. 6A-C e 7A-C), principalmente na menor densidade celular (781 células/esferoide) (Fig. 6A e 7A), quando formados em *hanging drop* de 3 dias. No entanto, o diâmetro ainda se mostrou elevado em relação ao recomendado pela literatura para ausência de hipóxia (diâmetro mínimo de 552 µm no dia 5) (Fig. 8A). Dessa forma, buscamos reduzir ainda mais o número de células por gota, buscando obter menor diâmetro.

Os diâmetros das hepatoesferas de HepG2, gerados a partir de diferentes densidades celulares, pode ser visualizadas nas figuras 10-12.

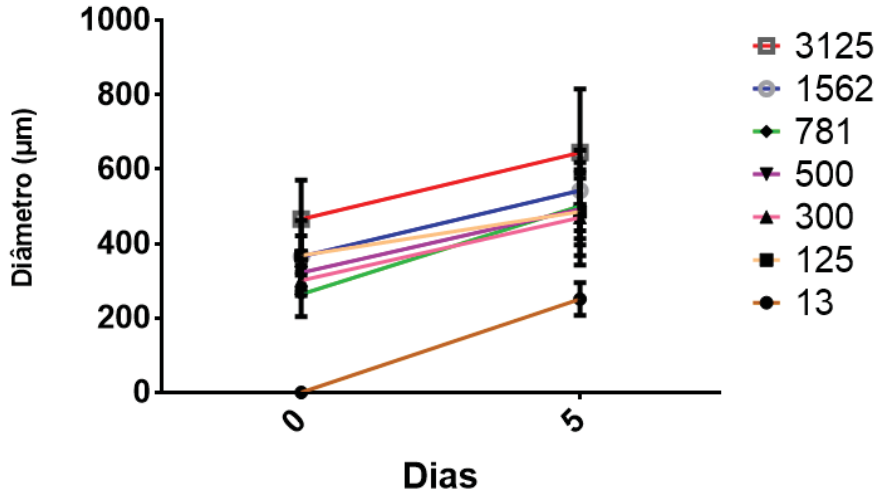


Figura 10. Avaliação da relação entre densidade celular (13 a 3125 células iniciais/esferoide) e o diâmetro das hepatoesfera, nos dias 0 e 5 após transferência para placas de 96-poços.

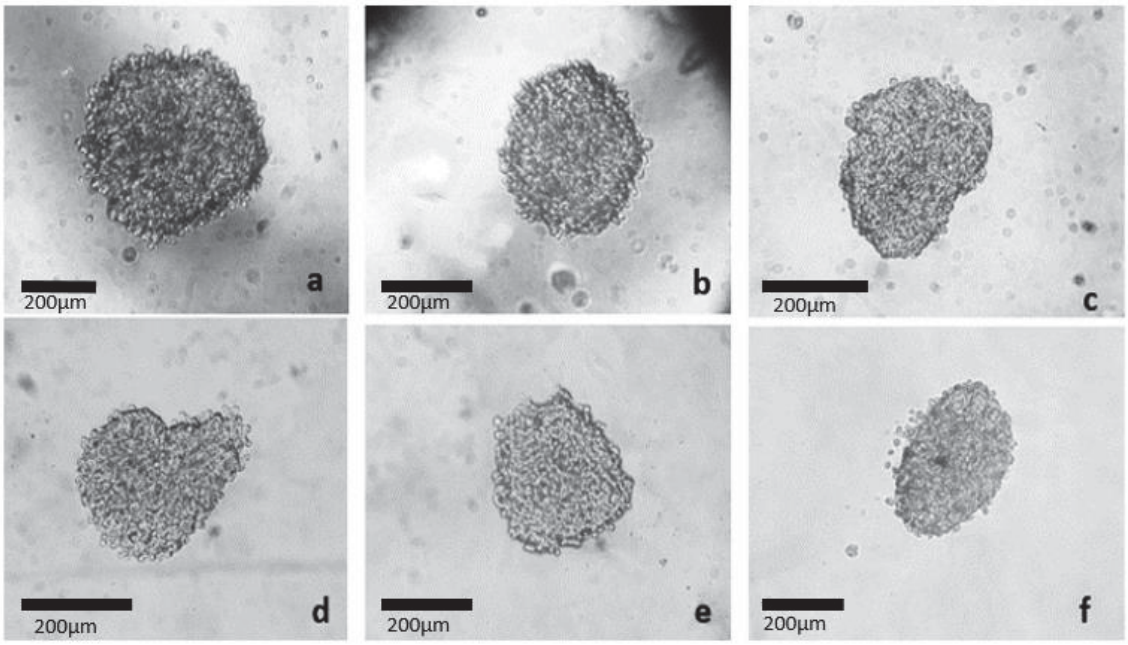


Figura 11: Esferoides de HepG2 formados a partir de quantidades diferentes células/gota e fotografados no dia 0 após passagem para placa de 96 poços. **A.** Esferoide 3125 células iniciais**; B.** Esferoide 1562 células iniciais; **C.** Esferoide 781 células iniciais; **D.** Esferoide de 500 células iniciais; **E.** Esferoide de 300 células iniciais; **F.** Esferoide de 125 células iniciais.

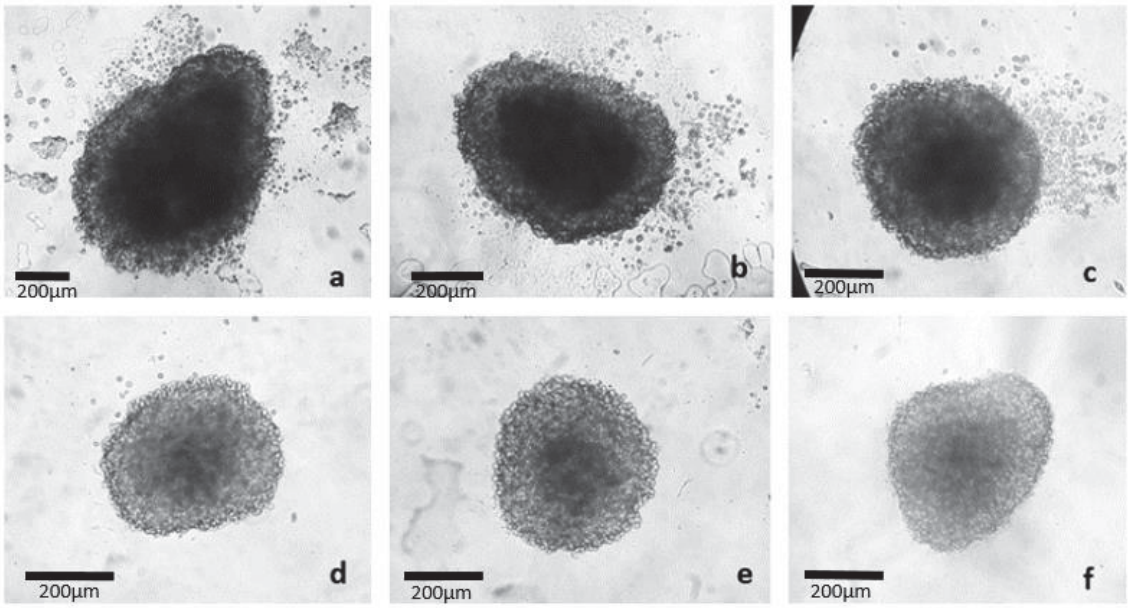


Figura 12. Esferoides de HepG2 formados a partir de quantidades diferentes células/gota e fotografados no dia 5 após passagem para placa de 96 poços. **A.** Esferoide 3125 células iniciais**; B.** Esferoide 1562 células iniciais; **C.** Esferoide 781 células iniciais; **D.** Esferoide de 500 células iniciais; **E.** Esferoide de 300 células iniciais; **F.** Esferoide de 125 células iniciais.

Hepatoesferas formadas a partir de 13 células são notavelmente menores (251 µm no dia 5) do que hepatoesferas das demais densidades celulares testadas. No entanto, devido ao seu tamanho, estas somente puderam ser observadas a partir do segundo dia após a transferência para a placa de 96-poços, o que comprometeria a reprodutibilidade da técnica (Fig. 13A e C).

Mesmo reduzindo drasticamente a quantidade de células por esferoide, inclusive em relação ao recomendado na literatura (RAMAIAHGARI *et al.*, 2014; SHAH *et al*., 2018; MUELLER *et al.*, 2011), não obtivemos sucesso quanto a redução do diâmetro de hepatoesferas das demais densidades celulares nas condições testadas. Tal resultado sugere que, na metodologia de *hanging drop*, a limitação do tamanho dos esferoides gerados não é estritamente dependente da densidade inicial de células por gota. Dessa forma, outros parâmetros foram avaliados na tentativa de obter esferoides com diâmetro que, de acordo com a literatura, conferissem ausência de regiões de hipóxia (100 µm).

5.5. Concentração de soro fetal bovino (SFB) após transferência da condição *hanging drop* para placas de 96-poços

O SFB é um suplemento universal de crescimento celular utilizado na preparação final de meios de cultivo por conter a maioria dos fatores necessários para a aderência, crescimento e proliferação das células *in vitro*. Estes fatores são eficazes para a maioria dos tipos de células animais. No entanto, embora o SBF tenha papel fundamental na eficiência de muitas culturas, se trata de um suplemento de composição indefinida, onde a maioria das funções que exerce sob as células cultivadas é desconhecida (JOCHEMS *et al*., 2002). Mesmo sendo utilizado há mais de 50 anos, o SFB nunca foi totalmente caracterizado. Estudos proteômicos e metabolômicos recentes revelaram que este é composto de aproximadamente 1800 proteínas (ANDERSON *et al.*, 2004; ANDERSON et al., 2002) e mais de 4000 metabólitos (PSYCHOGIOS *et al.*, 2011). Do ponto de vista científico, essa é uma grande desvantagem, uma vez que o soro em geral é uma mistura mal definida de componentes em meios de cultura, com variações qualitativas e quantitativas, geográficas e sazonais de lote a lote, que podem gerar problemas como interferência nos resultados experimentais (ACIKGÖZ *et al.,* 2013).

Além do mais, em relação à biossegurança, o SFB pode conter fatores adversos, como endotoxina, micoplasma, contaminantes virais ou proteínas priônicas (GSTRAUNTHALER *et al.*, 2013). Wessman e Levings (1999), relataram que 20-50% do SFB comercial é positivo para alguns vírus, como o da diarreia bovina (BVDV, gênero *Pestivirus*, família Flaviviridae) e para a contaminação por micoplasma.

O efeito exato do SFB na cultura de células hepáticas não é totalmente esclarecido (ACIKGÖZ *et al.,* 2013), principalmente quanto aos efeitos sob modelos esferoidais de hepatócitos. No entanto, enquanto a maioria dos estudos ignora este fato e mantém a suplementação com SFB no meio de cultivo, outros relatam os efeitos negativos desse componente no cultivo 3D de esferoides hepáticos. Tais efeitos incluem: impacto na viabilidade celular dos modelos esferoidais, devido, provavelmente, à presença de substâncias que diminuem a eficiência de formação dos esferoides; presença de aglomerados de células não viáveis (mortas) no interior dos esferoides;

indução de danos às membranas celulares em culturas de esferoides hepáticos, perturbando a estabilidade da membrana celular. A presença de SFB ainda impacta negativamente o metabolismo de ureia (parâmetro hepático específico de hepatócitos funcionais, característico do seu desempenho de desintoxicação o) (ACIKGÖZ *et al.,* 2013).

Desta forma, de acordo com ACIKGÖZ *et al.* (2013) esferoides hepáticos mantidos em meio sem SBF são mais consistentes, não apresentam regiões de células mortas no interior, se formam mais rapidamente e têm tamanhos mais concisos, além de metabolismo melhorado. A manutenção das características de metabolização são confirmadas também por Mueller *et al.* (2011) que investiga a metabolização de culturas organotópicas de HepG2 mantidas em *hanging drop* com quantidade de SFB reduzida e avaliou a viabilidade celular, a produção de albumina e o metabolismo da cultura 3D, testando com sucesso os efeitos do tamoxifeno nos esferóides de células HepG2.

Apesar de não realizarmos experimentos de metabolismo, os resultados dos experimentos realizados no processo de definição deste protocolo, concordam com as afirmações de ACIKGÖZ *et al.* (2013) de que a utilização de SFB não é necessária para a formação de esferoides hepáticos, pelo contrário, influencia negativamente a técnica.

Inicialmente, apenas para garantir que a ausência de SFB não influenciaria a viabilidade e formação das hepatoesferas, realizamos um experimento onde a menor quantidade de células já testada em nossos experimentos (suspensão celular de 13 células cultivadas em meio com SFB 10%), foi cultivada em *hanging drop* com meio sem SFB. Desta forma, fomos capazes de produzir esferoides sem a utilização de SFB desde o *hanging drop*, com uma quantidade inicial de apenas 13 células, que se multiplicaram em uma gota sem SFB. Esse resultado está de acordo com as afirmações de ACIKGÖZ *et al.* (2013), de que a ausência de SFB não prejudica a viabilidade e nem a formação dos esferoides (Fig. 13). Hepatoesferas de HepG2 formados desde a condição de *hanging drop* (gota) com e sem SFB não apresentaram diferenças significativas em relação ao diâmetro (Fig. 14).

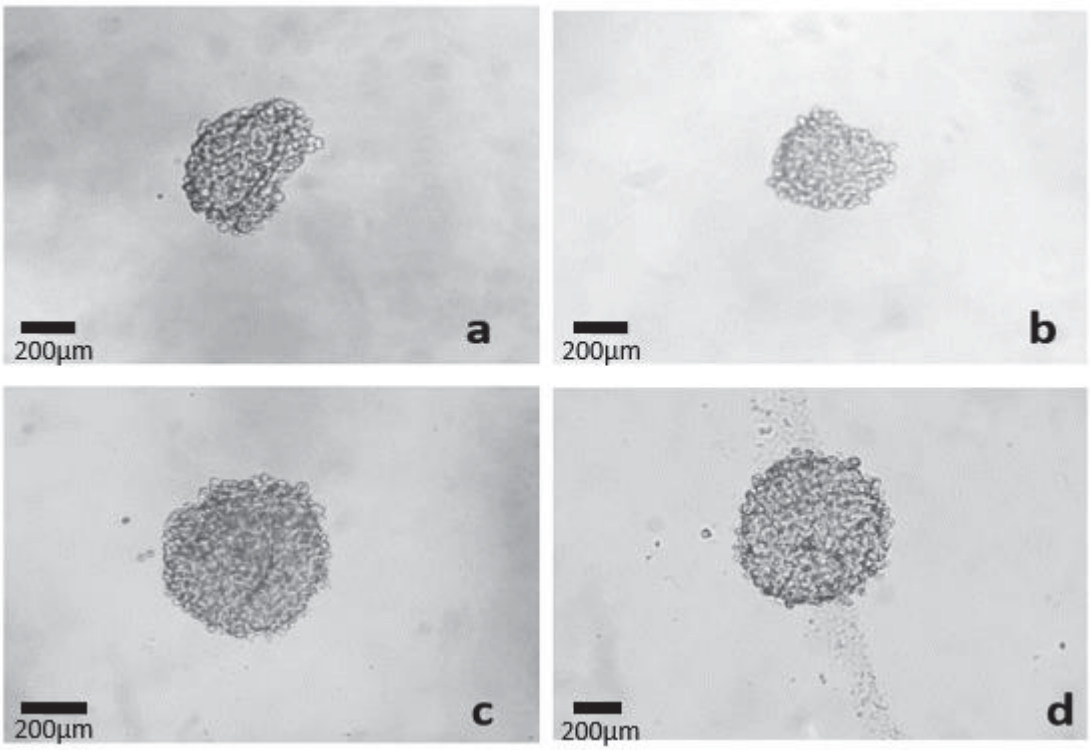


Figura 13. Imagens representativas de hepatoesferas de HepG2 em poços da placa de 96-poços, formados a partir de 13 células em gotas com SFB ausente e na presença SBF 10%. **A-B.** Hepatoesferas no dia 2, formadas em *hanging drop* com e sem SBF, respectivamente**; C-D.** Hepatoesferas no dia 5, formadas em *hanging drop* com e sem SBF, respectivamente**.**

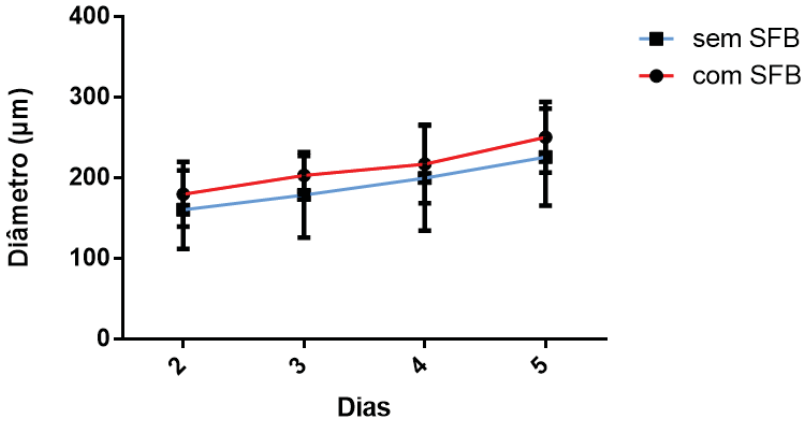


Figura 14. Comparação entre as medidas de diâmetro de hepatoesferas de HepG2 formadas a partir de 13 células em gotas na ausência e presença de soro bovino fetal (SFB) no meio de cultivo final.

Mueller *et al.* (2011), reconhecendo os impactos negativos do SFB na formação de esferoides de HepG2, sugere a utilização de concentrações mais elevadas de SFB (10%) na gota até a formação dos agregados, com posterior redução gradual da porcentagem de soro até 1% ainda na condição de *hanging*

drop. No entanto, a troca de meio em gotas gera elevado estresse celular, devido ao tempo de manuseio requerido, no qual as células são privadas de algumas condições ideais de cultivo (5% CO_2, 37°C). Portanto, para evitar o estresse celular, optamos por manter uma concentração inicial de 10% de SFB no tempo de *hanging drop* e posteriormente avaliar a influência da variação da concentração de SFB (1, 5 e 10%) após a transferência para as placas de 96-poços. Desta vez, as avaliações incluíram esferoides de 500 células, levando-se em consideração a possibilidade de observação na placa de 96- poços desde o dia 0 e uma quantidade adequada de células para posterior utilização no ensaio cometa.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível notar que as hepatoesferas de HepG2 mantidas em meio com diferentes concentrações de suplementação de SFB (1, 5 e 10%) apresentaram praticamente o mesmo tamanho até quinto dia (Fig. 15). Tal resultado reafirma que a redução de SFB não prejudica a viabilidade das células HepG2.

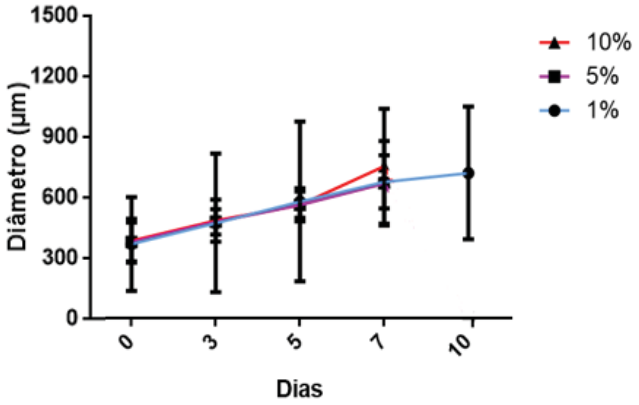


Figura 15. Comparação entre medidas de diâmetro de hepatoesferas de HepG2 formadas a partir de 500 células em gotas mantidas em placas de 96-poços em diferentes concentrações de suplementação do meio de cultivo com soro fetal bovino (SFB).

Contudo, apesar de não ser observado variações quanto ao tamanho das hepatoesferas cultivadas em meio suplementado com diferentes concentrações de SFB, nossos dados mostraram que a redução de soro influencia na manutenção dos esferoides a longo prazo em placas de 96-poços. Hepatoesferas cultivadas em meio suplementado com apenas 1% de SFB são mais consistentes e estáveis, permanecendo na placa até o dia 10 (Fig. 16), e podendo ser cultivadas até 30 dias em condição estática. Por outro

lado, hepatoesferas mantidas nas maiores concentrações de SFB (5 e 10%) se dissociam a partir do sétimo dia (Fig. 10).

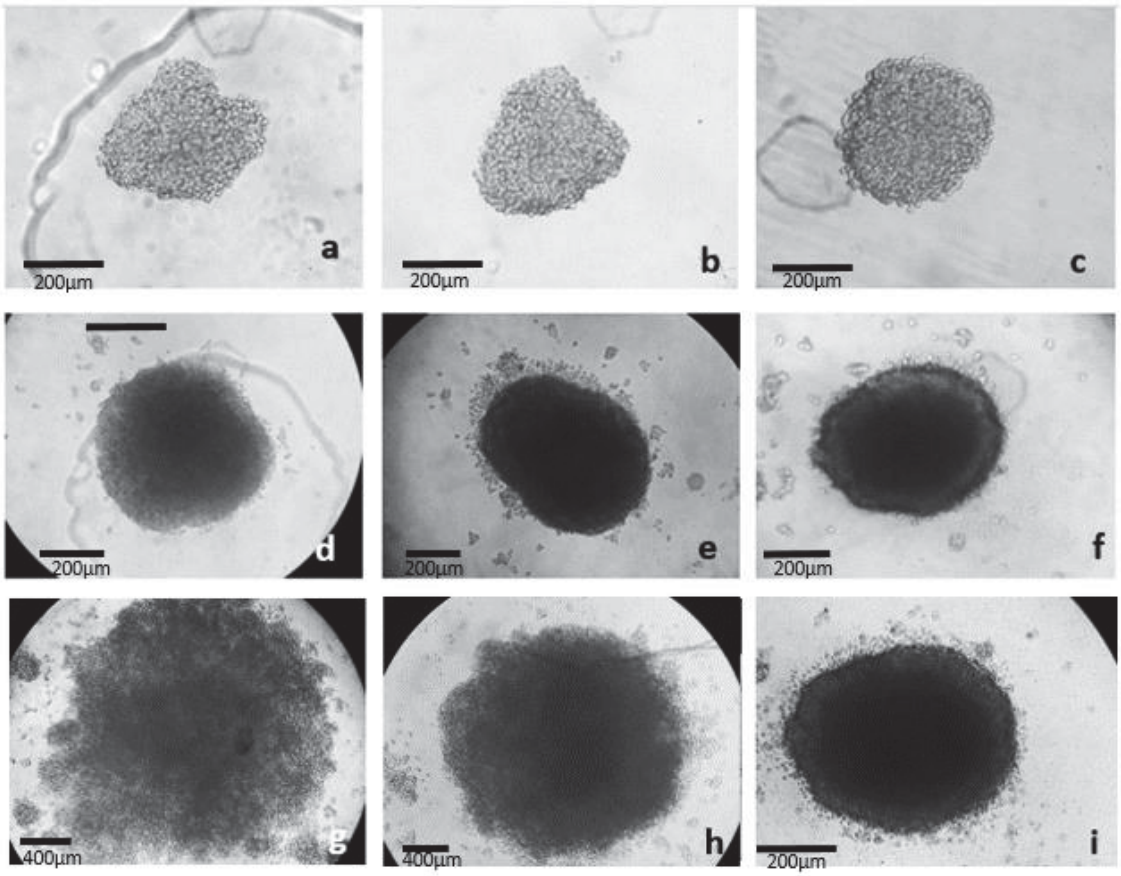


Figura 16. Avaliação do cultivo a longo prazo de hepatoesferas de HepG2 em meio suplementado com diferentes concentrações de soro bovino fetal (SBF) em placas de 96-poços. **A-C.** Hepatoesferas no dia 0 após transferência para placas de 96-poços contendo, respectivamente, 10, 5 e 1% de SFB; **D-F.** Hepatoesferas no dia 7 após transferência para placas de 96-poços contendo, respectivamente, 10, 5 e 1% de SFB; **G-I.** Hepatoesferas no dia 10 após transferência para placas de 96-poços contendo, respectivamente, 10, 5 e 1% de SFB.

A redução ou substituição do SFB em meios de cultura é uma prática recentemente muito incentivada, a partir do ponto de vista ético, com foco na proteção animal, quanto à colheita e coleta de SFB de fetos bovinos, além de gerar preocupações recentes sobre a oferta global versus demanda de SFB (GSTRAUNTHALER *et al.*, 2013).

Em 2003 e 2009, especialistas em cultura celular de toda a Europa reuniram-se em dois Workshops que discutiram opções e metodologias de cultura celular sem soro. Foram publicados dois relatórios completos da oficina (VAN DER VALK *et al.*, 2004; 2010), nos quais são fornecidas recomendações claras para a substituição do SFB e o desenho de meios sem soro, respectivamente. Considera-se que seguir essas recomendações resultam em dados cientificamente mais confiáveis e produtos mais seguros. Além de contribuir com pesquisas mais éticas, reduzindo danos gerados aos animais, e com a utilização de meios e componentes de cultura de células e tecidos com composição transparente e rastreável.

Desta forma, perante os resultados satisfatórios que obtivemos no cultivo das hepatoesferas de HepG2 em condição reduzida de SFB, e com o intuito de se adequar a tais recomendações, optamos por manter a concentração de 10% de SFB em *hanging drop* (formação agregados celulares) e posteriormente, após a transferência para placas de 96-poços, reduzir para 1% de SFB, onde as hepatoesferas são mantidas por mais 5 dias, até sua completa formação. Não optamos por utilizar meios de cultura livres de SFB, a fim de evitar a carência total de quaisquer componentes que gerem benefícios à cultura.

5.6. Reprodutibilidade da técnica

Apesar de hepatoesferas de células HepG2 demonstrarem potencial no rastreio de toxicidade (MUELLER *et al.,* 2011), sistemas bem definidos de triagem de toxicidade requerem a capacidade de se reproduzir de forma confiável. Uma das vantagens da utilização da metodologia de *hanging drop* nesse intuito é a sedimentação gravitacional que leva à formação de agregados celulares com matriz extracelular, conhecida por aumentar a estabilidade morfológica. No entanto, linhagens de células imortalizadas produzidas nesse

modelo, geralmente não produzem esferoides com características homogêneas. Isto se deve ao fato de que em linhagens tumorais imortalizadas, como a HepG2, uma das características existentes é a expressão aberrante de moléculas de adesão, que acarreta a diferenças na agregação e compactação das hepatoesferas de acordo com a origem e o número da passagem da linhagem celular. As diferenças na agregação e compactação implicam em diferenças fenotípicas das hepatoesferas de HepG2 e em perturbações nas respostas experimentais (HURREL *et al*., 2018).

Desta forma, após a definição do recobrimento da placa (agarose 1,5%), quantidade de dias em *hanging drop*, concentração de SFB (10% SBF – *hanging drop* e 1% SFB – placa de 96-poços), verificou-se a reprodutibilidade do protocolo final a partira dos valores do diâmetro de hepatoesferas (n=30) formadas com células HegG2 de 3 lotes diferentes, já que o diâmetro esferoidal tende a variar de acordo com a compactação e agregação das células nos esferoides (HURREL *et al*., 2018)

Como observado na Figura 17, não houve diferenças estatísticas entre os diferentes lotes de células quanto as medidas de diâmetro. Ambas as hepatoesferas, de 125 e 500 células iniciais, se mostraram adequadas quanto a reprodutibilidade do protocolo nas triplicatas biológicas, porém, por apresentarem diâmetro menor (~200-250 µm no dia 5), as hepatoesferas de 125 células foram definidas como a melhor condição para o protocolo final.

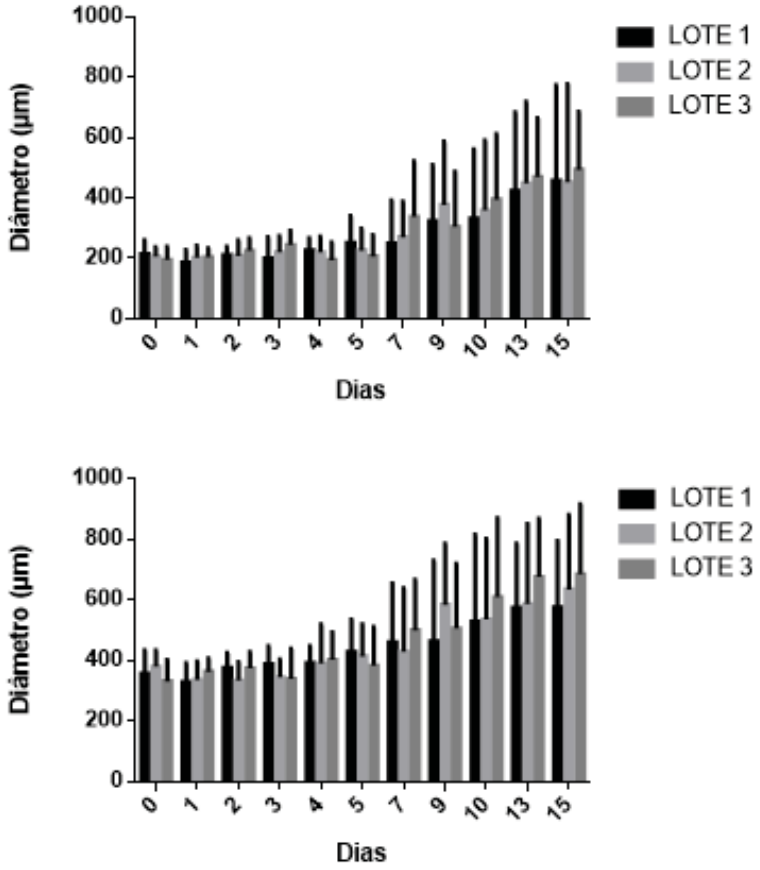


Figura 17. Análise da reprodutibilidade do protocolo final de *hanging drop* aplicado para a construção de hepatoesferas de HepG2. Experimentos de reprodutibilidade realizados com 3 lotes diferentes de células. **A.** Hepatoesferas formadas a partir de 125 células; **B.** Hepatoesferas formadas a partir de 500 células.

Contudo, apesar de apresentarem diâmetro reduzido em relação às demais condições aqui testadas, o tamanho de nossas hepatoesferas de 125 células iniciais ainda não estão de acordo com o recomendado na literatura para não criação de áreas de hipóxia em esferoides (~ 100 µm de diâmetro), mas se enquadram no que é descrito para artigos que usam hepatoesferas de aproximadamente 250 µm, o lote com maior média de diâmetro no dia 5 apresentou 252 µm de média (lote 1).

Para certificar que nossas hepatoesferas não apresentavam regiões de células não viáveis em seu interior, realizamos marcações para verificar a integridade do núcleo (Iodeto de Propídeo) e membrana (Faloidina), sendo analisados por microscocopia confocal. Não foram observados a presença de

núcleos picnóticos e nem comprometimento de membrana celular ao longo da extensão das hepatoesferas de 125 células (Fig. 18).

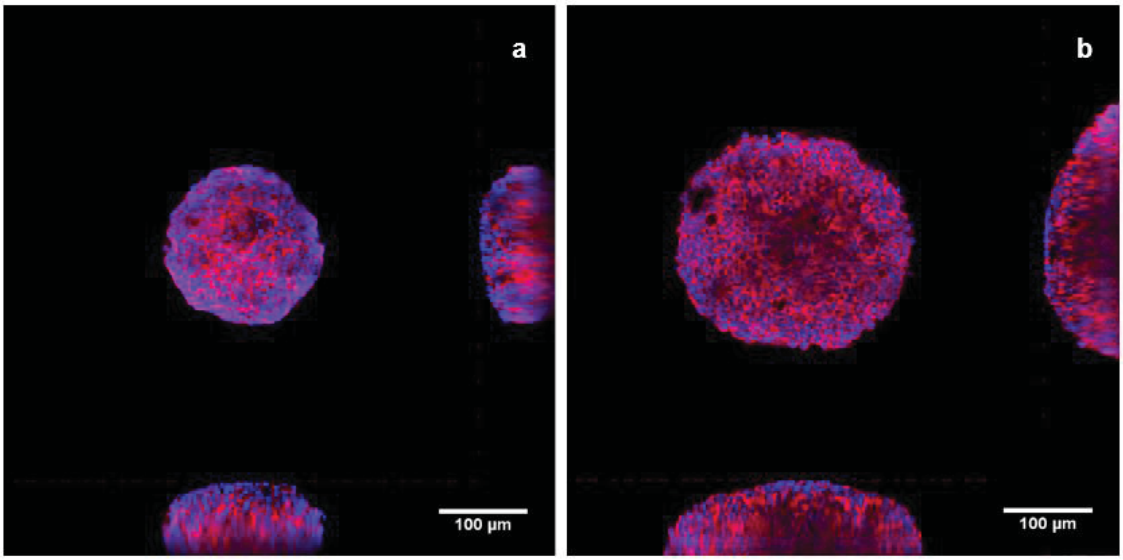


Figura 18. Imagem ortogonal das hepatoesferas marcadas com iodeto de propídeo (núcleos azuis) e faloidina (vermelho) após 5 dias (A) e 8 dias(B) de cultivo na placa.

Esse resultado, associado com a capacidade de manutenção dessas hepatoesferas em cultivo a longo prazo sem redução de diâmetro, indica a viabilidade das células HepG2 em todas as regiões desse modelo. Ao que parece, os padrões de hipóxia citados, não são verdadeiros para hepatosferas de HepG2 cultivadas neste modelo. Além do mais, hepatoesferas de HepG2 cultivas em meio sem soro, com diâmetro de até 500 – 600 µm já foram utilizadas com sucesso por Mueller et al. (2014) em estudos de toxicidade, onde se investiga os efeitos tóxicos da clorpromazina.

Os resultados dos nossos mostram que as hepatoesferas de HepG2 formadas com diâmetro em torno de ~200-250 µm podem ser empregadas em modelos de cultura organotípica.

CAPÍTULO 2

Avaliação da antigenotoxicidade dos PSs Fucana A e CI utilizando HepG2 em monocamadas e como hepatoesferas

5.7. Certificação da ausência de citotoxicidade dos PSs em estudo para a avaliação do potencial antigenotóxico

5.7.1. Teste do MTT

O teste do MTT quantifica o dano induzido por um agente no metabolismo celular de glicídeos pela avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial e, consequentemente, a viabilidade celular, é então quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) pela atividade das enzimas deisdrogenases. Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Como mostrado na figura 19, a viabilidade celular das células HepG2 (monocamada) expostas à fucana A foi semelhante ao CN, enquanto que para a galactana CI, a redução de 30% em relação ao CN foi observada. Contudo, apesar da “leve” citotoxicidade observada para a galactana CI, esse resultado não impede o prosseguimento da avaliação da antigenotoxicidade pelo ensaio Cometa. Tice e colaboradores (2000), recomendam que o ensaio do Cometa seja conduzido com concentrações que não apresentem redução da viabilidade superior a 30% em relação ao controle. Contudo, um teste adicional de viabilidade celular, incorporação do vermelho neutro, foi empregado para certificação de ausência de citotoxicidade dos PSs em estudo na concentração definida (100 µg/mL) para os testes de antigenotoxicidade.

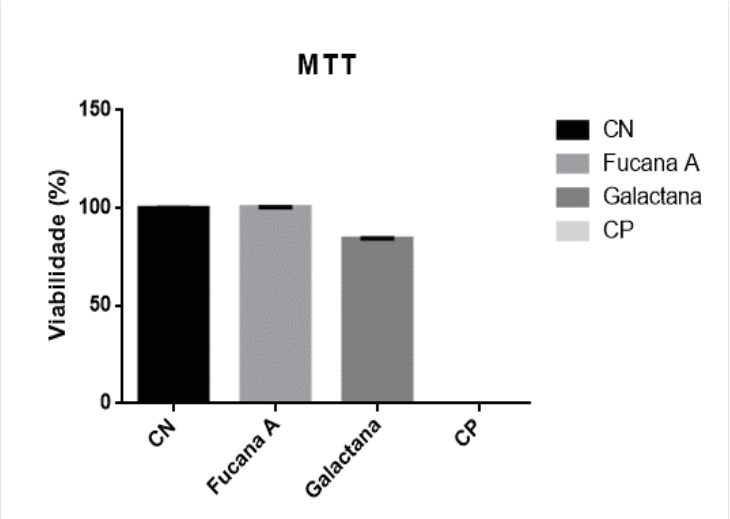


Figura 19. Avaliação da citotoxicidade dos polissacarideos sulfatados (PSs) Fucana A (xilofucuglucoranana) e CI (galactana) na concentração de 100 µg/mL em células HepG2 cultivadas em monocamadas (2D) pelo teste do MTT (atividade mitocondrial).

5.7.2. Teste de incorporação ***do vermelho neutro***

O vermelho neutro (VN) é um corante fracamente catiônico, que penetra nas membranas celulares por difusão passiva não iônica, concentrando-se posteriormente nos lisossomos. A absorção do VN depende da capacidade da célula em manter gradientes de pH pela produção de ATP. Em pH fisiológico, o corante apresenta uma carga líquida próxima a zero, permitindo que ele ultrapasse as membranas celulares. Dentro dos lisossomos, há um gradiente de prótons que mantem um pH menor do que o do citoplasma. Assim, o corante é carregado e é mantido dentro dos lisossomos (REPETTO *et al.*, 2008). Quando as células morrem ou o gradiente de pH é reduzido, o corante não pode mais ser retido nos lisossomos. Desta maneira, a quantidade de VN retida nos lisossomos é proporcional ao número de células viáveis (FILMAN *et al.*, 1975).

De acordo com os resultados obtidos, a fucana A e a galactana CI, na concentração de 100 µg/mL, também não mostraram citotoxicidade significativa nas células HepG2 cultivadas em modelo 2D (monocamada), com valores de viabilidade celular superiores a 70% em relação ao CN (Fig. 20).

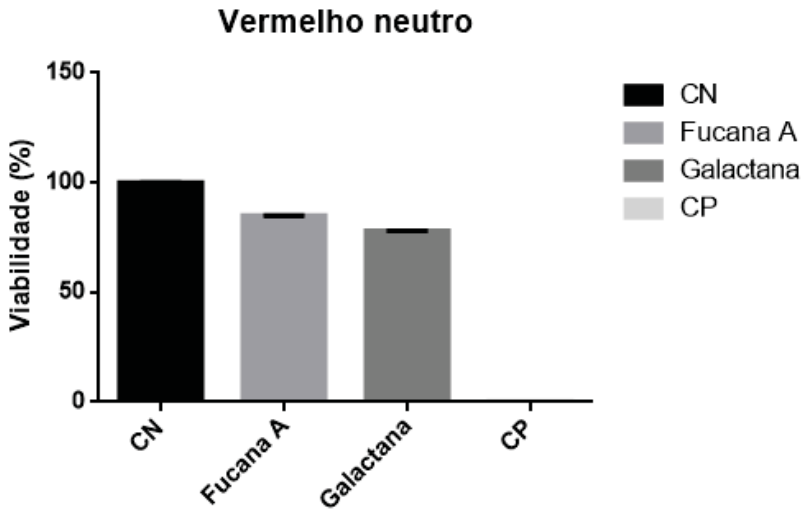


Figura 20. Avaliação da citotoxicidade dos polissacarideos sulfatados (PSs) Fucana A (xilofucuglucoranana) e CI (galactana) na concentração de 100 µg/mL em células HepG2 cultivadas em monocamadas (2D) pelo teste de incorporação do vermelho neutro.

Apesar de a viabilidade celular não ser avaliada nas hepatoesferas de HepG2 (sistema de cultivo celular 3D), os resultados de citotoxicidade obtidos por ambos métodos (MTT e VN) indicam que a concentração pode ser empregada com segurança no modelo *in vitro* 3D, visto que esferoides celulares de HepG2 possuem viabilidade aumentada em relação às células mantidas em monocamada (LI *et al.,* 2008).

5.8. Avaliação do potencial antigenotóxico

5.8.1. Adequações do ensaio Cometa conduzido com hepatoesferas de HepG2 e comparação com o protocolo in vitro padrão (células em monocamada*)*

Uma das principais razões pelas quais os esferoides normalmente não entram nos processos convencionais de avaliação da toxicidade é devido à falta de protocolos simples e padronizados que possibilitem avaliações rápidas das respostas celulares *in vitro* para a predição dos efeitos *in vivo* (MEHTA *et al.*, 2012). Desta forma, apesar do aumento atual da propagação desses modelos em diversas áreas das ciências biológicas, a viabilidade de uso dos modelos esferoidais deve ser cuidadosamente considerada de acordo com o objetivo do

estudo. Tal fato refere-se à compatibilidade de modelos esferoidais com metodologias padrões de detecção de biomarcadores toxicológicos, como danos no DNA (testes de genotoxicidade), tornando ainda desafiador adaptar os protocolos existentes de triagem genotoxicológica aos sistemas de cultivo celular 3D (MEHTA *et al.*, 2012).

Os objetivos iniciais desse trabalho compreendiam avaliar o potencial antigenotóxico dos PSs apenas empregando hepatoesferas de HepG2, devido as vantagens já relatados na literatura, dos modelos *in vitro* 3D quanto à maior acuracidade na predição dos efeitos *in vivo* em relação ao cultivo tradicional (2D). No entanto, além dos grandes esforços destinados à padronização das hepatoesferas de HepG2 (Capitulo 1), diversos problemas foram enfrentados na adequação do protocolo do ensaio Cometa para os esferoides de HepG2, sendo algumas problemáticas ainda não sanadas, como apresentado a seguir.

As adequações do ensaio Cometa para as nossas hepatoesferas de HepG2 compreenderam: (1) determinação da quantidade de esferoides por tratamento, buscando possibilitar a quantificação posterior de 100 nucleoides/lâmina; (2) determinação da concentração e tempo de tripsina necessários para a obtenção da suspensão de células isoladas; (3) definição da composição da solução de lise para obtenção de nucleoides; (4) definição das concentrações dos genotoxicantes (MMS e H_2O_2).

Quanto ao número de esferoides por tratamento, foram analisadas lâminas obtidas a partir da tripsinização de 10 e 15 esferoides. Como se observa na figura 21, 10 esferoides se mostraram o suficiente para a contagem de 100 nucleoides/lâmina. Além do mais, um número de esferoides maior, tornaria o processo mais laboroso. Desta forma, 10 hepatoesferas por tratamento foram definidas para o protocolo final.

Em relação a obtenção de células isoladas, duas concentrações de tripsina, 0,05 e 0,1%, foram avaliadas no tempo de 5 minutos. A concentração de 0,1%, que é 2 vezes maior que a concentração empregada nas células HepG2 em monocamadas, se mostrou mais eficiente quanto a obtenção da suspensão celular. Tal fato deve-se à maior resistência à dissociação das células no formato esferoidal do que em monocamada, provavelmente, devido ao aumento da interação célula-célula e MEC existente em sistemas esferoidais (FENEMMA *et al.,* 2013).

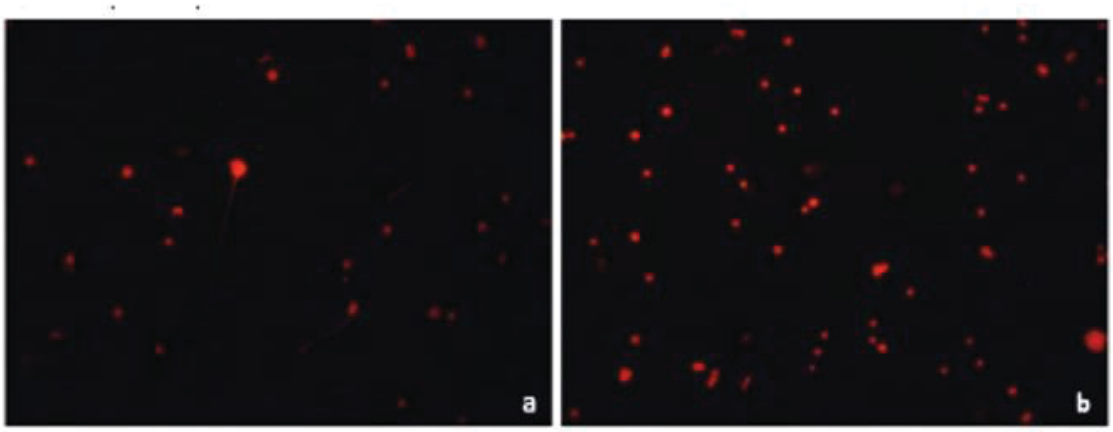


Figura 21. Imagem representativa dos nucleóides de uma suspensão celular obtida a partir de 10 hepatoesferas de HepG2 **(A)**, e 15 hepatoesferas de HepG2 **(B)** não expostas à genotoxicantes, por 5 minutos de tratamento enzimático com tripsina a 0,1% e coradas com brometo de etídio.

Curiosamente, a grande dificuldade enfrentada nas adequações do protocolo de ensaio cometa às hepatoesferas de HepG2 foi referente à etapa de lise celular. Diferente de células epiteliais (*e.g.* bucais e queratinócitos), que requerem tratamentos adicionais enzimáticos (*e.g.* proteinase K) para obtenção de nucleoides (ROJAS *et al*., 2014), HepG2 é reconhecida como uma célula fácil de lisar, sendo este um dos motivos pela qual é amplamente empregada no ensaio cometa.

Contudo, sucessivos experimentos de ensaio Cometa com a solução de lise padrão (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, tampão Tris-HCl 10 mM, 1% sarcosinato de sódio, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10 – 24 h) foram realizados, porém, obtivemos sucesso apenas em um experimento da versão oxidativa do ensaio cometa. Não conseguimos obter nenhum resultado confiável da versão alcalina (Fig. 22).

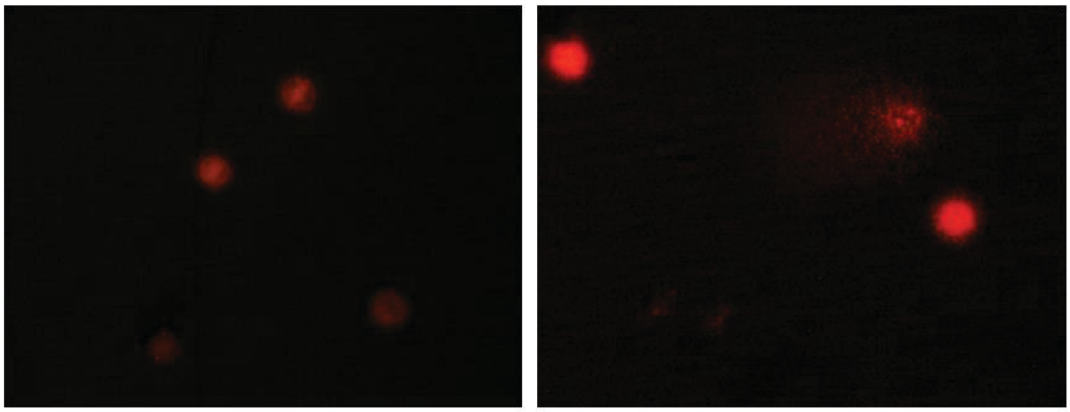


Figura 22. Imagens representativas de células não lisadas **(A)** e nucleoides **(B)** obtidas a partir de hepatoesferas de HepG2 e submetidas à solução de lise padrão do ensaio cometa, por 24 horas e coradas com brometo de etídio.

Frente à problemática da lise celular, de suspensões obtidas a partir de hepatoesferas de HepG2, avaliações do potencial antigenotóxico dos PSs foram também realizados em HepG2 cultivadas em monocamada. Nesses experimentos, não enfrentamos problemas na etapa de lise celular.

Uma das diferenças entre os modelos *in vitro* 2D e 3D aqui empregados, e que pode ser responsável pela resistência à lise das células HepG2 provenientes das hepatoesferas, é a concentração de SFB no meio de cultivo (10% - 2D e 1% - 3D). Como mencionado no Capitulo 1, a manutenção das hepatoesferas de HepG2 em meio com soro reduzido resulta na maior integridade e estabilidade das membranas celulares (ACIKGÖZ *et al.,* 2013). Apesar de não haver estudos específicos sobre a influência da organização celular de modelos esferoidais em modificações de membranas de células HepG2, Abu-Absi *et al.* (2002) mostraram alterações no padrão de distribuição de proteínas em membranas de células hepáticas cultivadas na forma de esferoides celulares, como aumento na concentração proteica e da integridade. Desta forma, acreditamos que o sistema de cultivo 3D aqui empregado promova alterações na membrana das células HepG2 tornando-as mais “resistentes” e, consequentemente, dificultando o processo de lise celular requerido para a execução da técnica do ensaio cometa. Contudo, estudos adicionais são necessários para a verificação da hipótese levantada e modificações na lise padrão ainda são requeridas para a obtenção de nucleoides, de forma que permitam a quantificação de danos no DNA através do ensaio Cometa.

Quanto à concentração dos genotoxicantes MMS e H_2O_2 a serem empregados como controles positivos (CPs) e indutores nos testes de genotoxicidade e antigenotoxicidade, estas foram definidas em 500 mM MMS e 1000 µM H_2O_2, 10 x maiores do que as empregadas nas células HepG2 em monocamadas, por se mostrarem mais adequadas como CP/indutor.

Mesmo frente à problemática da lise, a única repetição do ensaio cometa (versão oxidativa) obtida para as hepatoesferas nos permitiu observar e comparar os efeitos do mesmo teste realizado com HepG2 em monocamada. Não observamos diferenças significativas entre os níveis de danos no DNA detectados nos dois modelos *in vitro* (fig. 23).

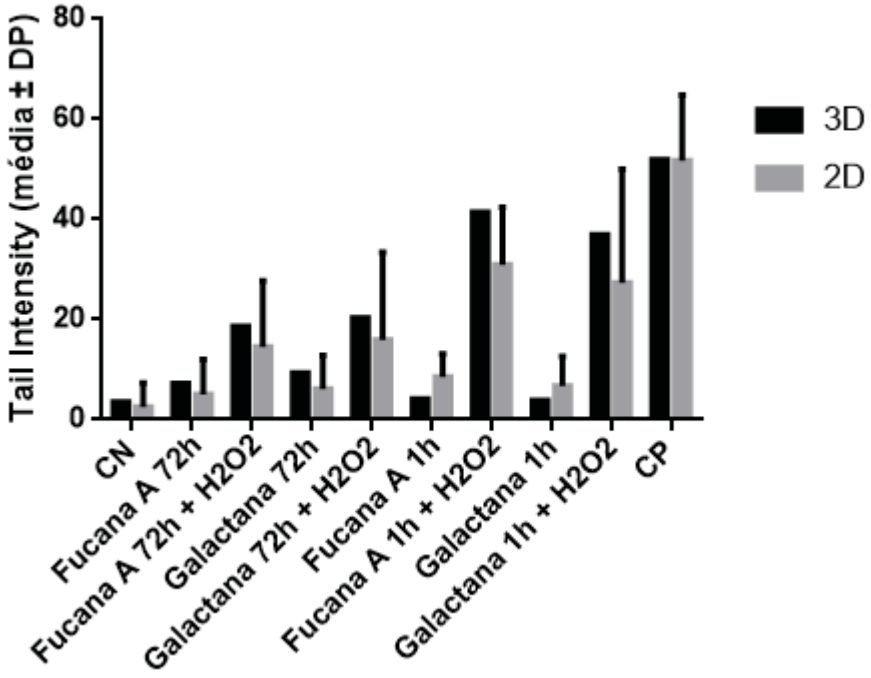


Figura 23. Comparação dos níveis de dano oxidativo no DNA (*Tail Intensity*), detectados pelo ensaio Cometa com emprego de hOGG1, em células HepG2 cultivadas em esferoides celulares (3D) e em monocamada (2D). CN: controle negativo; CP: controle positivo, H_2O_2 a 1000 µM .

Além do mais, os resultados desafiaram uma problemática bastante discutida em relação a modelos *in vitro* 2D e 3D, que é a resposta diferenciada de compostos que são testados nos sistemas de cultivo tradicional (2D), 3D e *in vivo* (MAZZOLENI *et al*., 2009; OLOUMI *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2003).

O gradiente de absorção formado em esferoides é uma característica que difere entre modelos *in vitro* 3D e 2D. Este gradiente e as interação célula-célula,

incluindo junções comunicantes e a MEC formada, comparáveis a orgãos *in vivo*, influenciam as respostas celulares e, provavelmente, são responsáveis pela resistência aos genotoxicantes (MMS e H_2O_2) utilizados neste estudo (MEHTA *et al.*, 2012; OLOUMI *et al.*, 2002). Em nosso estudo, a concentração de MMS e H_2O_2 teve que ser 10x maior nas hepatoesferas para que apresentasse um efeito semelhante ao observado no sistema 2D. Sendo assim, seria de se esperar que a utilização da mesma concentração de PSs empregada no modelo 2D (100 µg/mL) resultasse em um efeito reduzido de proteção contra danos genéticos nas células HepG2 cultivadas como esferoides. No resultado da figura 13, observamos que o gradiente formado e a resistência a fármacos, já reportada para modelos esferoidais (FRIEDRICH *et al*., 2007), afetou a concentração de MMS e H_2O_2, porém, não a ação antigenotóxica dos PSs em estudo. A partir disso, as seguintes hipóteses foram levantadas: (1) a absorção reduzida dos PSs pelas células localizadas na região mais interna das hepatoesferas (gradiente de absorção) ou mesmo a resistência à ação dos fármacos que pode ser adquirida a partir do modelo, não é capaz de afetar o efeito protetor da fucana A e da galactana CI; (2) a absorção dos PSs pode não diferir nos dois modelos *in vitro* utilizados; (3) o metabolismo melhorado de fármacos em esferoides de HepG2 compensa o efeito reduzido que deveria ser causado pelo gradiente de absorção, em relação à cultura 2D . No entanto, os dados obtidos pelo modelo *in vitro* 3D são insuficientes para que seja feita qualquer tipo de conclusão em relação à sensibilidade da técnica e o esclarecimento das hipóteses apresentadas requer adaptações à etapa de lise do ensaio cometa e avaliações adicionais quanto ao perfil de absorção dos PSs (biotinilação) e o mecanismo pelo qual esses compostos atuam nas hepatoesferas de HepG2. Desta maneira, as avaliações genotóxica/antigenotóxica da Fucana A e da galactana CI foram realizadas pelo ensaio cometa (versões alcalina e oxidativa) com células HepG2 cultivadas em monocamada.

5.8.2. Certificação da ausência de genotoxicidade dos PSs em estudo para a avaliação do potencial antigenotóxico

Dados biológicos sobre a ação genotóxico/mutagênica de PSs provenientes de algas marinhas são relativamente escassos. Contudo, apesar da excassez de dados nessa temática, Almeida-Lima *et al.* (2010) mostraram que PSs das algas marinhas *Fucus vesiculosus* (extrato aquoso) não foram capazes de induzir efeitos genotóxicos em linfócitos humanos. Semelhantemente, outros artigos mostram ausência de ação genotóxica/mutagênica para PSs de outras fontes, como glucanas (ANGELI *et al.,* 2006, 2009; MANTOVANI *et al.,* 2008) e mannan de *Saccharomyces cerevisiae* (KRIZKOVA *et al.,* 2006) e glucomanano de *Candida utilis*. No entanto, embora seja reportada a ausência de toxicidade para a maioria dos PSs de fontes variadas (LI *et al*., 2005; GIDEON *et al.*, 2008; ZARAGOZÁ *et al*., 2008), toxicidade, mesmo em baixas concentrações, já foi observada para uma galactana sulfatada derivada das algas vermelhas *Champia feldmannii* (ALMEIDA-LIMA *et al.* 2010). Apesar de a ausência de genotoxicidade/mutagenicidade da fucana A ter sido relatada por Almeida-Lima *et al.* (2010), através do ensaio Cometa e do teste de Ames, em células de ovário de hamster chinês (CHO), ao avaliar o potencial hepatoprotetor da mesma fucana e da galactana CI, realizamos uma investigação prévia de seus efeitos adversos, como o potencial de indução de danos no DNA (genotoxicidade). Desta forma, células HepG2 foram expostas à fucana A e à galactana CI (100 µg/mL) por 3 e 72 horas, para verificar o potencial como mutágenos diretos ou pró-mutágenos, respectivamente. O período de exposição de 72 horas também foi incluído nesse estudo para assegurar se o período sugerido para a aplicação dos PSs como hepatoprotetores não promoveria efeitos adversos.

Com os resultados obtidos, verificamos que não houve aumento significativo dos níveis de danos no DNA (quebras de fita de DNA e bases oxidadas) nas células HepG2 expostas à ambos os PSs (Fig. 24). Dessa forma, a Fucana A e a galactana CI podem ser consideradas não genotóxicas para células hepáticas nas condições testadas, o que nos permitiu prosseguir com a avaliação da ação protetora contra danos no DNA (antigenotoxicidade).

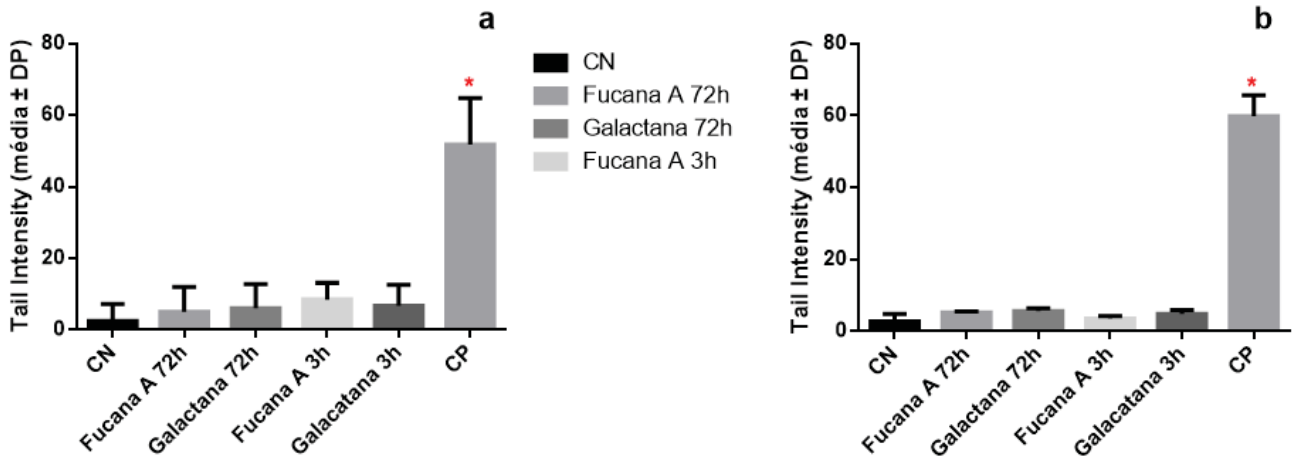


Figura 24. Avaliação da genotoxicidade dos polissacarídeos sulfatados (PSs) Fucana A (xilofucuglucoranana) e CI (galactana) pelo ensaio Cometa com células HepG2. **(A)** Versão alcalina; **(B)** Versão alcalina modificada com hOGG1 (danos oxidativos no DNA). Tempos de exposição: 3 e 72 h. Concentração PSs: 100 µg/mL. CN: controle negativo; CP: Metil metanosulfonato à 500 mM (A) e peróxido de hidrogênio à 1000 µM (B). Os dados são representativos de triplicatas biológicas. *Significativo em relação ao CN ($p < 0,05$).

5.8.3. Avaliação da capacidade protetora contra danos no DNA (atividade antigenotóxica) dos PSs em estudo

Como sabemos, as células vivas estão constantemente expostas a agentes químicos e/ou físicos que podem causar efeitos adversos, seja diretamente ou indiretamente, pela geração, por exemplo, de espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS são consideradas potentes indutores de danos a macromoléculas, incluindo o DNA. Sistemas de defesa antioxidantes e de reparo no DNA agem no sentido de impedir a ação deletéria de ROS sob o material genético. Contudo, muitas vezes, esses sistemas de defesa não são suficientes para evitar os danos no DNA promovidos por ROS e/ou outros agentes químicos, desta forma o uso de compostos exógenos antigenotóxicos é indicado na proteção do DNA. Compostos naturais, como os PSs, podem ter efeito antigenotóxico por meio de melhoria das defesas celulares, atuando diretamente em ROS ou estimulando sistemas de defesa endógenos (CHOBOTOVA, 2009; SCALBERT *et al.* 2005; VALKO *et al.* 2006).

A atividade antigenotóxica da Fucana A e CI foi avaliada pela pré-exposição das células HepG2 aos PSs por 72 h seguida de exposição aos genotoxicantes MMS e H_2O_2 (pré-tratamento). Além disso, avaliamos a

antigenotoxicidade desses PSs pela co-exposiçao (3 h) dos mesmos aos genotoxicantes MMS e H_2O_2 (tratamento simultâneo).

A ação antigenotóxica pode ser avaliada pela porcentagem de redução de danos (% RD), sendo classificada dentre as categorias: forte (% RD>70%;) moderada (40< % RD <70); neutra (% RD<40%) (ROBERTO *et al.,* 2016).

Dos resultados obtidos, observamos que ambos os PSs não apresentam efeito protetor contra danos no DNA causados por agentes alquilantes (Fig. 25A, mas protegem contra danos oxidativos no DNA, *i.e.* redução significativa na intensidade de DNA na cauda em relação ao H_2O_2 (indutor) (Fig. 25B). De acordo com a avaliação da % RD, podemos classificar a ação antigenotóxica tanto da Fucana A (75,61%) como CI (72,76%) como forte na condição de pré-tratamento e moderada, para ambos PSs, no tratamento simultâneo (Fucana A: 42,25%; CI: 49,55%). Além disso, a análise da %RD mostrou que não há diferenças na magnitude da ação protetora contra danos no DNA entre os PSs estudados, nas duas condições de tratamento avaliadas.

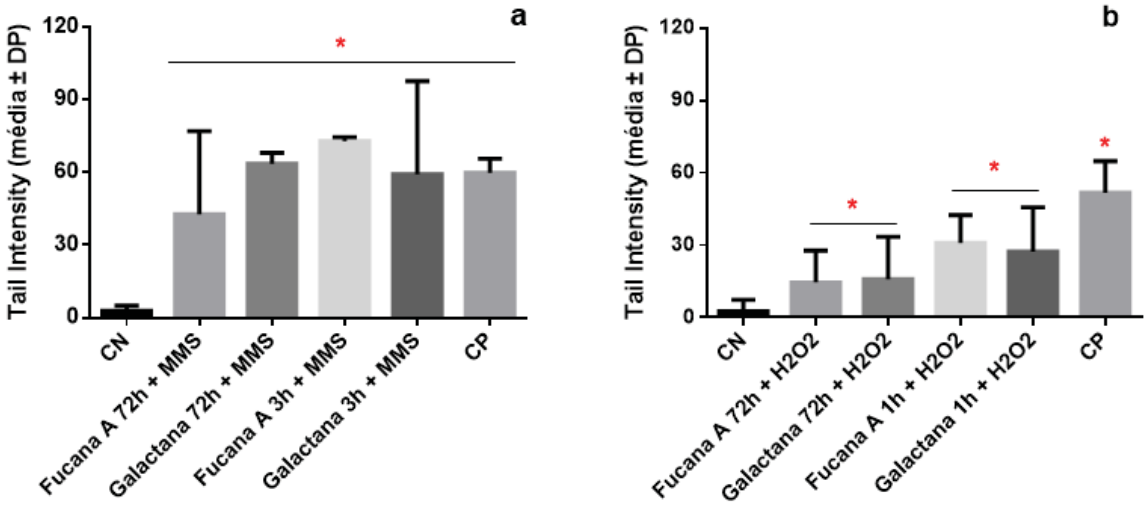


Figura 25. Avaliação da capacidade protetora contra danos no DNA (antigenotoxiciade) dos polissacarideos sulfatados (PSs) Fucana A (xilofucuglucoranana) e CI (galactana) por meio do ensaio Cometa com células HepG2. **(A)** Versão alcalina. (**B**) Versão alcalina modificada-hOOG1 (danos oxidativos no DNA). CN: controle negativo; CP: Metil metanosulfonato à 500 mM (A) e peróxido de hidrogênio à 1000 µM (B). Os dados são representativos de triplicatas biológicas. *Significativo em relação ao CN (p< 0,05).

Atualmente, muitos antigenotoxicantes naturais estão sendo descobertos, porém, o conhecimento dos mecanismos de ação por trás dessa atividade ainda requer muitos estudos para serem elucidados (GUPTA *et al.* 2014). O sequestro de radicais livres, a inativação enzimática ou química e a prevenção de ROS são tidos como os principais mecanismos de ação dos compostos antigenotóxicos (SILVA, 2015; GONÇALVES, 2018).

Mecanismos de proteção contra alquilação do DNA podem estar relacionados com o processo de transferência de grupos alquila ao antigenotoxicante ou por modulação de mecanismos de proteção celular induzidos por estes agentes protetores (RAMOS, 2010). Como apresentado acima, a fucana A e a galactana CI não possuem a capacidade de reduzir danos no DNA causados por agentes alquilantes. Por outro lado, a fucana A e a galactana CI se mostraram eficientes na proteção contra danos oxidativos no DNA, o que provavelmente está relacionado à atividade antioxidante já relatada na literatura para PSs.

Apesar da capacidade antioxidante da Fucana A e CI não ter sido avaliada nesse trabalho, essa atividade é descrita para várias outras classes de PSs de algas marinha, como fucoidan, laminaran e ácido algínico – reconhecidos como potentes antioxidantes (ROCHA DE SOUZA *et al*., 2007; RUPEREZ *et al*., 2002; WANG et al., 2008). A atividade antioxidante de galactanas sulfatas como as das algas vermelhas *Gigartina skottsbergii* e *Schizymenia binderi* também já foi reconhecida como sendo maior do que a do composto comercial λ carrageenan contra radicais peróxido, porém, essa propriedade é dependente da quantidade de grupos sulfato presentes neste PS (BARAHONA *et al.*, 2012; 2011).

Assim, de acordo com a literatura, quatro hipóteses de mecanimos pelos quais os PSs aqui testados podem atuar para a ação antigenotoxicante são tratados abaixo.

(1) Promovendo quebra da cadeia oxidativa, atuando como antioxidante de cadeia: como compostos com atividade antioxidante, a fucana A e a galactana CI provavelmente contêm componentes que são capazes de eliminar radicais livres e se tornam oxidados. No processo de oxidação, quando um radical libera ou rouba um elétron, um segundo radical é formado. O último

exerce a mesma ação em outra molécula e continua até que o radical livre formado seja estabilizado por um antioxidante de cadeia, que pode estar contido na Fucana A e na galactana CI, que neste caso atuariam como agentes que promovem uma quebra de cadeia oxidativa. Esse mecanismo ocorre através da reação direta com uma variedade de oxiradicais (como o superóxido, a hidroxila, etc.), e também com o oxigênio singlet (MACHLIN *et al.,* 1987), participando na neutralização do estresse oxidativo pela desintoxicação de ROS (GUPTA *et al.,* 2013) através do ataque direto aos radicais de oxigênio. A vitamina E (alfa-tocoferol), melatonina, carotenoides, flavonoides, e outros compostos fenólicos de origem vegetal (HALLIWELL, 1990; SIES, 1991) estão entre esses antioxidantes;

*(2) Promovendo a reparação enzimática espontânea: n*este mecanismo, os PSs participariam do processo antioxidante em associação com enzimas, atuando na melhora da atividade de enzimas envolvidas na prevenção da oxidação e, consequentemente, reduzindo a velocidade de iniciação da cadeia de oxidação e prevenindo danos no DNA (YOUNG e WOODSIDE, 2001). A fucana A e a galactana CI, poderiam promover a atividade de enzimais antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e glutationa, geralmente abundantes em células hepáticas. Assim, o H_2O_2 seria transformado em água e oxigênio (O_2) pela catalase ou pela glutationa peroxidase (GUPTA *et al.* 2014) de forma mais eficiente quando em presença dos PSs testados.

(3) Através de reparo não-enzimático, em que os PSs reparam rapidamente lesões no DNA resultantes do ataque de H_2O_2 antes do início do reparo enzimático: além do sistema de reparo enzimático, existe um tipo de reparo um pouco diferente e que foi estudado extensivamente *in vitro*. O reparo não enzimático refere-se à remoção de produtos danificados e transitórios no DNA, "radicais de DNA", com uma taxa de reação muito alta. A rápida reação de transferência de elétrons entre o ânion timidina e ácido cafeico foi relatado por Zou *et al.* (1995). Estudos químicos (LI *et al*., 1997; SHI *et al.,* 1999; 2000; ZHAO *et al*., 2001, 2003; GAO *et al.,* 2003; SPERANDIO *et al.,* 2002) mostraram que muitos polifenóis naturais podem sofrer transferência de elétrons para sítios de DNA danificados por ROS, reparando-os e, assim, reduzindo a quantidade de dano de base e quebras de cadeia. Como a reação de reparo não enzimático pode ser iniciada e concluída em questão de microssegundos (SIMIC *et al.,*

1989) enquanto que o sistema de reparo enzimático requer horas, esta hipótese está de acordo com os resultados encontrados na exposição simultânea (PSs e H_2O_2), onde os PSs apresentaram um efeito genotóxico forte, o que requer uma reparo instântaneo.

(4) Através da regulação da expressão gênica: uma das mais notáveis recentes decobertas, surgiu do estudo sobre os efeitos que antioxidantes nutricionais fitoquímicos exercem na modulação do epigenoma de mamíferos (DUTHIE, 2011). Como sabemos, enzimas antioxidantes desempenham um papel importante na redução de níveis de ROS; portanto, a regulação redox de fatores de transcrição é significativa na determinação do perfil de expressão gênica das células e na resposta celular ao estresse oxidativo. A regulação da expressão gênica por polifenóis dietéticos já foi relatada em células vasculares endoteliais (NICHOLSON *et al.*, 2010) e correlacionada com a capacidade antioxidante aumentada. Portanto, não podemos descartar que os PSs também poderiam modificar o perfil de expressão gênica das células, através da regulação de fatores de transcrição ativados por reações redox. Desta forma, disciplinas totalmente novas, como nutrigenética e nutrigenômica têm emergido com um foco em interações gene-nutriente, onde diversos mecanismos de interação com o DNA são investigados, inclusive os que atuam na redução do estresse oxidativo (FERGUSON *et al.,* 2012).

Em suma, nossos dados não permitem definir o mecanismos de ação pelo qual Fucana A e a galactana CI estão exercendo a capacidade protetora contra danos oxidativos no DNA, porém, eles mostram que ambos os PSs atuam como potentes antigenotoxicantes. Adicionalmente, como ambos os PSs apresentaram maior ação antigenotóxica na condição de pré-tratamento, acredita-se que esta condição possa conferir maior facilidade de interação com as ROS geradas pelo indutor e, consequente, inativação das mesmas, e/ou a modulação de defesas antioxidantes celulares. Dessa forma, a fucana A e a galactana CI se mostraram compostos promissores na suplementação alimentar com função hepatoprotetora.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, concluímos que:

- As adequações realizadas na técnica de *hanging drop* permitiram a obtenção de um modelo *in vitro* de fígado (hepatoesferas de HepG2), com características de um órgão normal (ausência de região necrótica no interior do modelo esferoidal), reprodutível quanto à morfologia, topografia, tamanho e organização celular;
- Adequações no ensaio cometa ainda são necessárias para a aplicação dessa metodologia em nosso modelo *in vitro* 3D, principalmente, quanto a resistência das células HepG2 isoladas das hepatoesferas à lise celular;
- A fucana A e a galactana CI não induzem efeitos citotóxicos, nem genotóxicos, em células HepG2;
- A fucana A e a galactana CI atuam como antigenotoxicantes, evitando danos oxidativos no DNA, porém, não atuam sobre eventos de alquilação no DNA. Contudo os mecanismos por trás da atividade protetora contra danos oxidativos no DNA ainda devem ser elucidados;
- Ambos os PSs estudados mostraram maior eficiência de proteção contra danos oxidativos no DNA na condição de pré-tratamento, sendo considerados “fortes” antigenotoxicantes, o que pode estar relacionado à maior eficiência de interação com as ROS geradas pelo indutor ou maior modulação das defesas celulares;
- São necessárias mais investigações para avaliar os mecanismos pelos quais esses PSs atuam;
- A fucana A e a galactana CI são promissores suplementos alimentares com ação hepatoprotetora.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento do modelo de esferoides de HepG2 apresentado neste trabalho apresenta uma oportunidade para avaliar compostos e sistemas de administração de medicamentos *in vitro* em um formato que mais assemelha-se a condições *in vivo*. Porém, neste estudo enfrentamos uma das dificuldades mais citadas em estudos sobre modelos esferoidais *in vitro*, que é a compatibilidade de modelos esferoidais com metodologias padrões de detecção de biomarcadores toxicológicos, como danos no DNA.

Apesar dos desafios enfrentados em relação à testes toxicológicos, vencemos desafios também bastante citados na comunidade científica, principalmente para hepatoesferas de HepG2. A técnica de *hanging drop*, é conhecida por formar esferoides com tamanho mais estável, porém a necessidade de manutenção dos esferoides em gotas, para observar este efeito a torna uma técnica de mão de obra bastante intensa. Através da transferência das hepatosferas formadas para placas de cultivo de 96-poços, reduzimos a mão de obra intensiva constantemente citada na técnica. Na resolução deste problema, acabamos acentuando outras dificuldades, como problemas com a aderência das células na placa, e dificuldades relacionadas à esferoides de células tumorais, como o crescimento descontrolado e a dificuldade na manutenção morfológica, o que acarretaria na falta de reprodutibilidade da técnica. Resolvemos todos esses efeitos através da redução da concentração de SFB no meio de cultivo, tornando a técnica ainda mais barata e trazendo uma alternativa viável a métodos *in vitro* 3D esferoidais de mão de obra mais intensiva e custosa. A reprodutibilidade da técnica e os resultados de marcação de núcleo e membrana (PI e faloidina) reforçam a qualidade do método. Além do mais, este trabalho apresenta a primeira avaliação do potencial genotóxico/mutagênico da galactana CI, proveniente da alga marinha *C. sthomocladum* e do potencial antigenotóxico da fucana A da alga *S. schroederi* e da galactana CI. A forte atividade antigenotóxica dos dois PSs de algas estudados aqui, revela novos compostos com pontencial para a utilização como agentes protetores e preventivos comerciais de várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo em células de fígado.

8. REFERÊNCIAS

ABU-ABSI, S. F. et al. Structural polarity and functional bile canaliculi in rat hepatocyte spheroids. *Experimental Cell Research*, [s. l.], v. 274, n. 1, p. 56–67, 2002;

ACIKGOZ, A.; GIRI, S.; CHO, M.; BADER, A. Morphological and Functional Analysis of Hepatocyte Spheroids Generated on Poly-HEMA-Treated Surfaces under the Influence of Fetal Calf Serum and Nonparenchymal Cells. *Biomolecules.* v.3, p. 242-269, 2013;

ALMEIDA-LIMA, J. et al. 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;

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2014. **Cancer Facts and Figures**, [s. l.], p. 1–72, 2014. Disponível em: http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf;

ASTHANA, A.; KISAALITA, W. S. **Microtissue size and hypoxia in HTS with 3D cultures**, 2012;

ANDERSEN, M. E.; KREWSKI, D. The vision of toxicity testing in the 21st century: Moving from discussion to action. *Toxicological Sciences*, v. 117, n. 1, p. 17–24, 2010;

ANDERSON, N. L. *et al.* The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics*, v. 3, n. 4, p. 311–26., 2004. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14718574;

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 1, n. 11, p. 845–867, 2002. Disponível em: http://www.mcponline.org/content/1/11/845.abstract%5Cnhttp://www.mcponline.org/content/1/11/845.full.pdf;

BARAHONA, T. *et al.* A sulfated galactan with antioxidant capacity from the green variant of tetrasporic Gigartina skottsbergii (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydrate Research*, v. 347, n. 1, p. 114–120, 2012.

BARAHONA, T. et al. Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds. A kinetic approach. *Food Hydrocolloids*, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 529–535, 2011;

BERANEK, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 231, n. 1, p. 11–30, 1990.

BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, v. 88, n. 11, p. 1549–1559, 2006. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908406002343;

BIERWOLF, J.; LUTGEHETMANN, M.; DEICHMANN, S.; ERBES, J.; VOLZ, T.; DANDRI, M.; COHEN, S.; NASHAN, B.; POLLOK, J.M. Primary human hepatocytes from metabolic-disordered children recreate highly differentiated liver-tissue-like spheroids on alginate scaffolds. Tissue Eng. Part A, 18, 1443–1453, 2006;

BOLT, H.M., DEGEN, G.H. Human carcinogenic risk evaluation, part II: contri- butions of the EUROTOX specialty section for carcinogenesis. *Toxicol. Sci*. v. 81, p. 3–6, 2004;

BRENDLER-SCHWAAB, S. *et al.* The in vivo comet assay: Use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, v. 20, n. 4, p. 245–254, 2005;

BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. *Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery*. *Drug Discovery Today*. [S.l: s.n.]. , 2013;

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 25, n. 3, p. 287–299, 2011. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521693410001392>.

CADET, J.; WAGNER, J.R. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. *Cold Spring Perspect Biology*, v.5, n. 2, 2013;

CARITHERS, RL., JR; MCCLAIN, CJ. Alcoholic liver disease. In: Sleisenger, MH.; Feldman, M., et al., editors. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management. 9. Saunders/Elsevier; Philadelphia, PA: p. 1383-1400, 2010;

CAVALIERI, E.; SAEED, M.; ZAHID, M.; CASSADA, D.; SNOW, D.; MILJKOVIC, M.; ROGAN, E. Mechanism of DNA depurination by carcinogens in relation to cancer initiation. *IUBMB Life*. 64, 169–179, 2012;

CHAKRAVARTI, D.; PELLING, J.C.; CAVALIERI, E.L.; ROGAN, E.G. Relating aromatic hydrocarbon-induced DNA adducts and c-H-ras mutations in mouse skin papillomas: The role of apurinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci*., 92, 10422–10426, 1995;

CHAUNG, W.; BOORSTEIN, R.J. Molecular spectrum of mutations induced by 5-hydroxymethyl-2'- deoxyuridine in (CHO)-PL61 cells. *Mutat. Res*. v.373, p.125–137, 1997;

CHITRANGI, S.; NAIR, P.; KHANNA, A. 3D engineered In vitro hepatospheroids for studying drug toxicity and metabolism. *Toxicology in Vitro,* [s. l.], v. 38, p. 8–18, 2017;

CHOBOTOVA, K. Aging and cancer: Converging routes to disease prevention. *Integrative Cancer Therapies*, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 115–122, 2009;

CICHOŻ-LACH, H·, MICHALAK, A., Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*. V.20, n. 25, p. 8082-8091, 2014;

COLLINS, A. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, n.1840. n. 2, p. 794-800, 2014;

COOKE, M.S.; EVANS, M.D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* v.17, p. 1195–1214, 2003;

CORVI, R.; MADIA, F. In vitro genotoxicity testing–Can the performance be enhanced? *Food and Chemical Toxicology*, [s. l.], v. 106, p. 600–608, 2017;

COSTA, L.S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S.L. ; OLIVEIRA, R.M.; SABRY, D.A.; CAMARA, R.B.G.; NOBRE, L.T.D.B.; COSTA, M.S.S.P.; LIMA, J.A.; FARIAS, E.H.C.; LEITE, E.L.; ROCHA, H.A.O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine e Pharmacotherapy*, v. 64, p. 21-28, 2010;

DALLEAU, S. *et al.* Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell death and differentiation*, v. 20, n. 12, p. 1615–30, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2013.138>.

DE FLORA S, IZZOTTI A. Mutagenesis and Cardiovascular diseases: molecular mechanisms, risk factors, and protective factors. *Spano MA,Mut. Res*., v.621, p. 5-17, 2007;

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL, N.E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed clas- sification strategy. *Mutat Res.* v.521, p.121–135, 2002;

DIZDAROGLU M, et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*. v.32, p.1102–1115, 2002;

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic. Res*. 46, 382–419, 2012;

DIZDAROGLU,M. Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat. Res*., v.591, p. 45–59, 2005;

DRABLOS, F.; FEYZI, E.; AAS, P.A.; VAAGBO, C.B.; KAVLI, B.; BRATLIE, M.S.; PENA-DIAZ, J.; OTTERLEI, M.; SLUPPHAUG, G.; KROKAN, H.E. Alkylation damage in DNA and RNA—Repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst.)* v. 3, p. 1389–1407, 2004;

DUGUAY, D.; FOTY, R. A.; STEINBERG, M. S. Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: Qualitative and quantitative determinants. *Developmental Biology*, v. 253, n. 2, p. 309–323, 2003;

DUTHIE, S. J. Epigenetic modifications and human pathologies: Cancer and CVD. In: PROCEEDINGS OF THE NUTRITION SOCIETY 2011, *Anais...* [s.l: s.n.];

EFSA. How much aspartame is it safe to con- sume? http://www.efsa.europa.eu/en/faqs/faqaspartame. htm#4. 04 Nov, 2013;

ELLIS, P. et al. Where will genetic toxicology testing be in 30 years' time? Summary report of the 25th Industrial Genotoxicity Group Meeting, Royal Society of Medicine, London, November 9, 2011. **Mutagenesis**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 73–77, 2014;

FARBER JL. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environmental Health Perspectives.*v.102, p.17–24, 1994;

FARIAS, E.H.C. **Homogalactanas sulfatas da macroalga verde Codium isthmocladum: aspectos estruturais e farmacológicos.** 2011. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, São Paulo/SP;

FARIAS, E.H.C.; POMIN, V.H.; VALENTE, A., NADER, H.B.; ROCHA, H.A.; MOURÃO, P.A.S. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. *Glycobiology.* v.18, n.3, p. 250-259, 2008;

FENNEMA, E.; RIVRON, N.;ROUWKEMA, J.; BLITTERSWIJK, C.; BOER, J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology*. v. 31, n. 2, p. 108-116, 2013;

FERGUSON, L. R.; SCHLOTHAUER, R. C. **The potential role of nutritional genomics tools in validating high health foods for cancer control: Broccoli as example**, 2012;

FRIEDRICH, J.; EBNER, R. & LEONI, A.; KUNZ-SCHUGHART. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge?, *International Journal of Radiation Biology*, v.83,p.11-12, 2007;

FILMAN, D. J.; BRAWN, R. J.; DANDLIKER, W. B. Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody-dependent complement-mediated cell damage. *Journal of Immunological Methods*, v. 6, n. 3, p. 189–207, 1975;

FISCHBACH, C.; CHEN, R.; MATSUMOTO, T.; SCHMELZLE, T.; BRUGGE, J. S.; POLVERINI, P. J.; MOONEY, D. J. Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nat. Methods*. v.4, n.10, p. 855-60, 2007;

FRIEDRICH, J.; EBNER, R. & LEONI, A.; KUNZ-SCHUGHART. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge?, *International Journal of Radiation Biology*, v.83,p.11-12, 2007;

GAO, K.; FAN, B.T.; FASSI NADIA, E.I.; ZAKRZEWSKA, K.; JIA, Z.J.; ZHENG, R.L. Comparative study of activities between verbascoside and rutin by docking method. *Quart Struct Act Relat*, v.22, p. 1-10, 2003;

GIDEON, T. P.; RENGASAMY, R. Toxicological evaluation of fucoidan from Cladosiphon okamuranus. *Journal of medicinal food*, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 638–42, 2008. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19053854;

GONÇALVEZ, L.C. **Avaliação do potencial antigenotóxico e antimutagênico de *Lycium barbarum* (Goji Berry), nutracêutico usado como citoprotetor e antioxidante.** 152F. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2018;

GREGUS, Z. Mechenism of toxicity. In: Casarett, LJ.; Doull, J., et al., editors. Casarett and Doull's Toxicology: *The Basic Science of Poisons*. v.7. p. 45-106, 2008;

GRIFFITHS, A.J.F. et al. Introdução à Genética. 7ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2002. - Thompson MW, McInnes RR & Willard HF. 2003. GENÉTICA MÉDICA. 6a ed., Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ;

GRINNELL, F.; HAYS, D.G.; MINTER,D. Cell Adhesion and Spreading fator. Experimental Cell Research, v.110, p. 175-190, 1997;

GROEBE K, ERZ S, MUELLER-KLIESER W: Glucose diffusion coefficients deter- mined from concentration profiles inEMT6tumor spheroids

incubated in ra- dioactively labeled L-glucose. *Adv ExpMed Biol*.361:619-625, 1994;

GSTRAUNTHALER, G.; LINDL, T.; VAN DER VALK, J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology*, v. 65, n. 5, p. 791–793, 2013;

GU, X.; MANAUTOU, J.E. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert ver. Mol. Med.* v. 14, n. 4, 2013;

GUNAWAN B, KAPLOWITZ N. Clinical perspectives on xenobiotic-induced hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews*. v.36, p.301–312, 2004;

GUO, L. *et al.* Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, v. 39, n. 3, p. 528–538, 2011. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21149542;

GUPTA, R. K. et al. Interactions between oxidative stress, lipid profile and antioxidants in breast cancer: a case control study. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 6295–8, 2012. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23464448;

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. *DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems*. *FEBS Letters*. [S.l: s.n.]. , 1991;

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation : and significanc & 3 its mechanism ,. *the American Journal of Clinical Nutrition*, v. 57, p. 715S–725S, 1993. Disponível em: http://ajcn.nutrition.org/content/57/5/715S.full.pdf+html;

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res. Commun.,* v.9, p.1-32, 1990;

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medecine.* [S.l: s.n.], 1999;

HARTUNG, T. **From alternative methods to a new toxicology**, 2011;

HAYASHI, M.T.; KARLSEDER, J. DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure. *Oncogene.* v.32, p.4593–4601, 2013;

HAZRA, B.; BISWAS, S. Antioxidant and free radical scavenging activity of Spondias pinnata. *BMC Complement Alternative Medicine*. v. 8, n. 63, 2008;

HELLEDAY, T.; PETERMANN, E.; LUNDIN, C.; HODGSON, B.; SHARMA, R.A. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* .v.8, p.193–204, 2008;

HOCHSTEIN C, ARNESEN S, GOSHORN J. Environmental health and toxicology resources of the United States National Library of Medicine. *Medical Reference Services Quarterly*. v.26, p.21–45, 2007;

HOEIJMAKERS, J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature,* v. 411, p.366–374, 2001;

HOFFMANN, S., HARTUNG, T. Toward an evidence-based toxicology. Hum. Exp. Toxicol, 2006;

HOLTKAMP, A.D.; KELLY, S.; ULBER, R.; LANG S. Fucoidans and fucoidanases: focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol v.*82, p. 1, 2009;

HOSHINA, M.M., MARIN-MORALES, M.A. Anti-genotoxicity and anti-mutagenicity of Apis mellifera venom. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. v.762, p. 43–48, 2014;

HOSHINA,M.M., SANTOS, L.D., PALMA, M.S., MARIN-MORALES, M.A. Cytotoxic, genotoxic/ antigenotoxic andmutagenic/antimutagenic effects of the venomof thewasp Polybia paulista. *Toxicon*. v.72, p.64–70, 2013;

HRYB, V. A. [Combination of antioxidants and a hepatoprotector in the treatment of patients with diabetic distal symmetric polyneuropathy]. *Lik Sprava*, n. 3–4, p. 68–79, 2010.

JACKSON SP AND BARTEK J.The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* v.461, p.1071–1078, 2009;

JIANG, L.; CAO, J.; AN, Y.; GENG, C.; QU, S.; JIANG, L.; ZHONG, L. Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. *Toxicology in Vitro*. v.21, p.1486–1492, 2007;

JOCHEMS, C.E.; VAN DER VALKM, J.B.; STAFLEU, F.R.; BAUMANS, V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern. Lab Anim*. v. *30*, p.219–227, 2002;

JOUYBAN A, PARSA H.Genotoxic impurities in pharmaceuticals, toxicity and drug testing. *BillAcree* (ed), ISBN.v. 51, p. 978-953, 2012;

KALIM, M.D.; BHATTACHARYYA, D.; BANERJEE, A.; CHATTOPADHYAY, S. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of plants used in Unani system of medicine. *BMC Complement Altern Med*.v.10, n. 77, 2010;

KARAKAYA, A., JARUGA,P., BOHR,V.A., GROLLMAN,A.P. AND DIZDAROGLU,M. Kinetics of excision of purine lesions from DNA by Escherichia coli, 1997;

KENSLER, T.W. Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. Toxicological Sciences. v.120, p.S28–S48, 2011;

KIM, H.J. ET AL. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip* 12, 2165–2174, 2012;

KIRKLAND, D.J., MULLER, L., Interpretation of the biological relevance of genotox- icity test results: the importance of thresholds. Mutat. Res. v.464, p.137–147, 2000;

KNASMULLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.;HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B.J. Use of humanderived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*. v. 198, p. 315–328, 2004;

KRIŽKOVÁ, L. et al. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycoconjugates: Mannan-human serum albumine and mannan-penicillin G acylase. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* [s. l.], v. 606, n. 1–2, p. 72–79, 2006;

LAN, S-F. AND STARLY, B. Alginate based 3D hydrogels as an in vitro co-culture model platform for the toxicity screening of new chemical entities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256, 62–72, 2011;

LELIÈVRE, S. A.; KWOK, T.; CHITTIBOYINA, S. Architecture in 3D cell culture: An essential feature for in vitro toxicology. *Toxicology in Vitro*, [s. l.], v. 45, p. 287–295, 2017;

LI, W. *et al.* Repair effect of phenylpropanoid glycosides on thymine radical anion induced by pulse radiolysis. *Biophysical Chemistry*, v. 67, n. 1–3, p. 281–286, 1997;

LI, N.; ZHANG, Q.; SONG, J. Toxicological evaluation of fucoidan extracted from Laminaria japonica in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 421–426, 2005;

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709−715, 1993;

LORD, Christopher J.; ASHWORTH, Alan. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, v. 481, n. 7381, p. 287–294, 2012;

LUTZ,W.K. Susceptibility differences in chemical carcino- genesis linearize the dose-response relationship: threshold doses can be defined only for individuals, *Mutat. Res.* v.482, p.71–76, 2001;

MA, M.; XU, J.; PURCELL, W. M. Biochemical and Functional Changes of Rat Liver Spheroids during Spheroid Formation and Maintenance in Culture: I. Morphological Maturation and Kinetic Changes of Energy Metabolism, Albumin Synthesis, and Activities of Some Enzymes. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 90, n. 6, p. 1166–1175, 2003;

MACHLIN, L.J. & BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB* J. 1 ed., p. 441-445, 1987;

MANDENIUS, C.F.; ANDERSSON, T.B.; ALVES, P.M.; BATZL-HARTMANN, C.; BJÖRQUIST, P. Toward preclinical predictive drug testing for metabolism and hepatotoxicity by using in vitro models derived from human embryonic stemcells and human cell lines - a report on the Vitrocellomics EU-project. *Altern Lab Anim***.** v.39, p. 147-171, 2011;

MANTOVANI, M. S. et al. b-Glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer. *Mutat Res*, [s. l.], v. 658, n. 3, p. 154–161, 2008. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17827055;

MATSUBARA, K. Recent advances in marine algal anticoagulants. *Current Medicinal Chemistry*, v. 2, n.1 p. 13–19, 2004;

MEHTA, G.A.Y. HSIAO, M. INGRAM, G.D. LUKER, S. Takayama, Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy, *J. Control. Release* v.164, n. 2, p.192–204, 2012;

MISDRAJI, J. Embryology, anatomy, histology, and developmental anomalies of the liver. Sleisenger, MH.; Feldman, M., et al., editors. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management. 9. Saunders/Elsevier; Philadelphia, PA p. 1201-1206, 2010;

MOJAS, N.; LOPES, M.; JIRICNY, J. Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes Dev.* v.21, 3342–3355, 2007;

MORI, H. *et al.* Absence of Genotoxicity of the Carcinogenic Sulfated Polysaccharides Carrageenan and Dextran Sulfate in Mammalian DNA Repair and Bacterial Mutagenicity Assays. *Nutrition and Cancer*, v. 6, n. 2, p. 92–97, 1984;

MOSCONA, A. Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. *Experimental Cell Research*, v. 3, n. 3, p. 535–539, 1952;

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*. v. 65. n. 1-2. p. 55-63, 1983;

MULLER, L., KIKUCHI, Y., PROBST, G., SCHECHTMAN, L.,

SHIMADA, H., SOFUNI, T., TWEATS, D. ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutat. Res.* v.436, p.195–225, 1999;

MUELLER, D.; KOETEMANN, A.; NOOR, F. Organotypic Cultures of Hepg2 Cells for In Vitro Toxicity Studies. *Journal of Bioengineering and Biomedical Sciences*, [s. l.], v. 1, n. S2, 2011. Disponível em: https://www.omicsonline.org/2155-9538/2155-9538-S2-002.digital/2155-9538-S2-002.html;

MUELLER, D.; KRÄMER, L.; HOFFMANN, E.; KLEIN, S.; NOOR, F. 3D organotypic HepaRG cultures as in vitro model for acute and repeated dose toxicity studies. *Toxicology in Vitro*, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 104–112, 2014;

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;

NAKAMURA, K.; MIZUTANI, R.; SANBE, A.; ENOSAWA, S.; KASAHARA,M. Evaluation of drug toxicity with hepatocytes cultured in a micro-space cell culture system. *J Biosci Bioeng.* v.111, p.78-84, 2011;

NGO, D. H.; KIM, S. K. Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 62, p. 70–75, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.036>.

NICHOLSON, S. K.; TUCKER, G. a; BRAMELD, J. M. Physiological concentrations of dietary polyphenols regulate vascular endothelial cell expression of genes important in cardiovascular health. *The British journal of nutrition*, [s. l.], v. 103, n. 10, p. 1398–403, 2010. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20021702;

NIKLAS, J.; NOOR, F.; HEINZLE, E. Effects of drugs in subtoxic concentrations on the metabolic fluxes in human hepatoma cell line Hep G2. *Toxicol Appl Pharmaco*l, v**.** 240, p. 327-336, 2009;

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, v. 1, n. 1, p. 23–29, 2006. Disponível em: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2006.5;

OLOUMI, A. *et al.* Identification of genes differentially expressed in V79 cells grown as multicell spheroids. *Int J Radiat Biol*, v. 78, p. 483–492, 2002. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12065053;

OLSON, H. *et al.* Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 32, n. 1,

p. 56–67, 2000;

OMS; Cancer, 2016. Disponível em: http://www.who.int/topics/cancer/fr/;

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E.G; STELZER, E.H.K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue.*Nature Reviews*,v. 8, p. 839- 846, 2007;

PARKINSON, A.; OGILVIE, BW. Biotransformation of xenobiotics. In: Casarett, LJ.; Doull, J., et al., editors. Casarett and Doull's Toxicology: *The Basic Science of Poisons*. v.7, p. 161-304, 2008;

PHILLIPS, T.M., KIM, K., VLASHI, E., MCBRIDE, W.H., PAJONK, F. Effects of recom- binant erythropoietin on breast cancer-initiating cells. *Neoplasia.* v.9, p.1122– 1129, 2007;

PIROLA, C. J. *et al.* Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gut*, v. 62, n. 9, p. 1356–1363, 2013.

POMIN, V.H. **Fucanas e Galactanas Sulfatadas: estrutura, biologia e filogenia.** 2008. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ;

POND, S. M. Effects on the liver of chemicals encountered in the workplace. *The Western journal of medicine*, v. 137, n. December, p. 506–514, 1982;

PSYCHOGIOS, N. *et al.* The human serum metabolome. *PLoS ONE*, v. 6, n. 2, 2011;

KAWANO, N.; EGASHIRA, Y.; SANADA, H. Effects of various kinds of edible seaweeds in diets on the development of D-galactosamine-induced hepatopathy in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 53, n. 4, p. 315–323, 2007. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18418557;

KNIGHT, A. *Systematic reviews of animal experiments demonstrate poor human clinical and toxicological utility*. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*. [S.l: s.n.]. , 2007

KOPPEN, G. *et al.* The next three decades of the comet assay: A report of the 11th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, v. 32, n. 3, p. 397–408, 2017.

RAMAIAHGARI, S.C.; BRAVER, W.M.; HERPERS, B.; TERPSTRA, V.; COMMANDEUR, J.N.M.; WATER, B.; PRICE, S.L. A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. *Arch Toxicol*. v. 88, p.1083-1095. 2014;

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nature Protocols*, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.

ROBERTO, M.M., JAMAL, C.M., MALASPINA, O., MARIN-MORALES, M.A. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source using Allium cepa test system. *Genet. Mol. Biol.,* 2016;

ROBERTO, M. M. et al. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and Baccharis dracunculifolia, by in vitro study with HTC cells. *Toxicology in Vitro*, [s. l.], v. 33, p. 9–15, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.005;

ROBINSON, D.I. Control of genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients: a review and perspective. *Org Process* Res Dev v.14, p. 946–959, 2010;

ROCHA DE SOUZA, C.T. MARQUES, C.M.G. DORE, F.R. FERREIRA DA SILVA, H.A.O. ROCHA, E.L. LEITE, J. *Appl. Phycol*. v.19, p.153–160, 2007;

ROCHA, H. A. O.; FARIAS, E. H. C.; BEZERRA, L. C. L. M.; ALBUQUERQUE, I. R. L.; MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C. S.; LEITE, E. L. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. *Infarma*. v. 16, n. 1-2, p. 82-87, 2004;

ROTH, A.; SINGER, T. The application of 3D cell models to support drug safety assessment: Opportunities & challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 69–70, p. 179–189, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.005;

RUPEREZ, O. AHRAZEM, J.A. LEAL, J. Agric. Food Chem. V.50, p. 840–845, 2002;

RUSSELL PJ. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid. *J Magn Magn Mater* 289: 466–468, 2002;

SAKAI, Y., NAKAZAWA, K. Technique for the control of spheroid diameter using microfabricated chips. *Acta Biomater*. v.3, p.1033–1040, 2007;

SCALBERT, A. et al. **Dietary polyphenols and the prevention of diseases**, 2005;

SCHWARTZ, J. M.; CARITHERS Jr., R. L. Epidemiology and etiologic associations of hepatocelular carcinoma. *Wolters Kluwer Health*., 2016;

SHAH, S. Importance of Genotoxicity and S Aguidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals: Cardiovascular disease. *Cancer Genetic diseases*. v. 1. n. 2, p. 43-54, 2012;

SHAH, U. K. *et al.* A three-dimensional in vitro HepG2 cells liver spheroid model for genotoxicity studies. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 825, n. December 2017, p. 51–58, 2018;

SHI, Y. *et al.* Fast repair of hydroxy radical purine deoxynucleotide adducts by phenylpropanoid glycosides and their derivatives from Chinese herbs. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1472, n. 1–2, p. 115–127, 1999;

SHI, Y. *et al.* Fast repair of dAMP radical anions by phenylpropanoid glycosides and their analogs. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1474, n. 3, p. 383–389, 2000;

SHIGENAGA MK, GIMENO CJ, AMES BN. Urinary 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine as a biological marker of *in vivo* oxidative DNA damage. Proc Natl Acad Sci USA. 1989;

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am.J.Med.,* v.91 (suppl 3C): p.31S38S, 1991;

SILVA, C. R. **Genética toxicológica da chalcona sulfonamida (CPN): evidências de genoto-xicidade e antimutagenicidade em diferentes sistemas-teste *in vivo* e *in vitro*.** 2015. 88 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015;

SIMIC, M. G.; BERGTOLD, D. S.; KARAM, L. R. Generation of oxy radicals in biosystems. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 214, n. 1, p. 3–12, 1989;

SMITH, C. C.; O'DONOVAN, M. R.; MARTIN, E. A. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis*, v. 21, n. 3, p. 185–190, 2006;

SPEIT,G., SCHUTZ,P., BONZHEIM,I., TRENZ,K. AND HOFFMANN,H. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol. Lett.,* 146, 151–158, 2004;

SPERANDIO, O. *et al.* Theoretical study of fast repair of DNA damage by cistanoside C and analogs: Mechanism and docking. *SAR and QSAR in environmental research*, v. 13, n. 2, p. 243–260, 2002;

TIBBITT, M. W.; ANSETH, K. S. *Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture*. *Biotechnology and Bioengineering*. [S.l: s.n.]. , 2009;

TICE, R. R. *et al.* Single Cell Gel / Comet Assay : Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, v. 35, n. 3, p. 206–21, 2000;

TICE, R. R. et al. Single Cell Gel / Comet Assay : Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 206–21, 2000;

VARGAS-MENDOZA, N. *et al. Hepatoprotective effect of silymarin*. *World Journal of Hepatology*. [S.l: s.n.]. , 2014;

VASCONCELOS, A. G.; ARAÚJO, K. V.; SANTANA, L.A.B. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. *R-BITS*. v. 5, n. 3, 2015;

WANG, J.;ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; SONG, H.; LI, P. *Int. J. Biol*. Macromol. v.30, p.6–12, 2010;

WANG, L.; *Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years*. [S.l: s.n.], 2014. v. 12.

WARREN, J.J.; FORSBERG, L.J.; BEESE, L.S. The structural basis for the mutagenicity of O(6)-methyl- guanine lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.103, p.19701–19706, 2006;

WESSMAN, S.J.; LEVINGS, R.L. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. *Dev. Biol. Stand.* v.*99*, p.3-8;

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S.K. Biological activities and potential health benefits of sulphated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr Polym*. V. 84, p.14–21, 2011;

WILLIAMS, G.M. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology.* v. 166, p. 3–10, 2002;

XU, J.; MA, M.; PURCELL, W. M. Characterisation of some cytotoxic endpoints using rat liver and HepG2 spheroids as in vitro models and their application in hepatotoxicity studies. I. Glucose metabolism and enzyme release as cytotoxic markers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 189, n. 2, p. 100–111, 2003;

XU, J.; PURCELL, W. M. Energy metabolism and biotransformation as endpoints to pre-screen hepatotoxicity using a liver spheroid model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 216, n. 2, p. 293–302, 2006;

YANG, J.; MANI, S.A.; WEINBERG, R.A. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res*. v. 66, n. 9, p. 4549-52, 2006;

YAROSH, D.B.; FOOTE, R.S.; MITRA, S.; DAY, R.S. Repair of O6-methylguanine in DNA by demethylation is lacking in Mer- human tumor cell strains. *Carcinogenesis* v. 4, p.199–205, 1983;

YILMAZ, S.; UÇAR, A. A review of the genotoxic and carcinogenic effects of aspartame: does it safe or not? Cytotechnology. v. 66, p. 875-881, 2014;

YOON, J.H.; BHATIA, G.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Error-free replicative bypass of thymine glycol by the combined action of DNA polymerases kappa and zeta in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 14116–14121, 2010;

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, [s. l.], v. 54, p. 176–186, 2001. Disponível em: http://jcp.bmj.com/content/jclinpath/54/3/176.full.pdf;

ZARAGOZÁ, M. C. et al. Toxicity and Antioxidant Activity in Vitro and in Vivo of Two *Fucus vesiculosus* Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s. l.], v. 56, n. 17, p. 7773–7780, 2008;

ZEIGER, E. Reflections on a career and on the history of genetic toxicity testing in the National Toxicology Program. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research,* [s. l.], v. 773, p. 282–292, 2017

ZHAO, C. *et al.* Fast repair of the radical cations of dCMP and poly C by quercetin and rutin. *Mutagenesis*, v. 16, n. 3, p. 271–5, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11320154>;

ZONG, A., CAO, H., & WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research. *Carbohydrate Polymers*. v.*90,* n. 4, p. 1395–410, 2012;

ZOU, Z.H.; YAO, S.D.; LEE, H.C.; LIN, W.Z.; ZHANG, J.S; LIN, N.Y. Kinetic observation of rapid electron transfer between thymine and thymidine anion radicals and caffeic acid: a pulse radiolysis study. In: Proceedings of the 6th JapanChinabilateral symposium on radiation chemistry, Waseda University, Tokyo, Japan, JAERI-Conf; 95-003. p. 211-15, 1995.