

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Indução do sistema citocromo P450 em linhagens de
hepatoma humano para utilização como modelo *in vitro*
no desenvolvimento de fármacos**

Míriam Cristina Sakuragui Matuo

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

**Orientadora:
Prof^a. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto**

São Paulo

2011

MÍRIAM CRISTINA SAKURAGUI MATUO

**Indução do sistema citocromo P450 em linhagens de
hepatoma humano para utilização como modelo *in vitro*
no desenvolvimento de fármacos**

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

**Orientadora:
Prof^a. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto**

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Matuo, Míriam Cristina Sakuragui
M445i Indução do sistema citocromo P450 em linhagens de hepatoma humano para utilização como modelo *in vitro* no desenvolvimento de fármacos / Míriam Cristina Sakuragui Matuo. -- São Paulo, 2011.
115p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Medicamento : Controle de qualidade I. T. II. Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli, orientador.

615.19 CDD

MÍRIAM CRISTINA SAKURAGUI MATUO

Indução do sistema citocromo P450 em linhagens de hepatoma humano para utilização como modelo *in vitro* no desenvolvimento de fármacos

**Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor**

**Prof^a. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientadora/Presidente**

Prof^a. Dr^a. Maria José Vieira Fonseca

Prof^a. Dr^a. Ana Paula de Melo Loureiro

Dr^a. Aurea Silveira Cruz

Prof^a. Dr^a. Sylvia Stuchi Maria Engler

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sueli e Jorge, com amor e gratidão por seus ensinamentos e exemplos, e por me apoiar em todos os momentos da minha vida. A minha mãe, Sueli, agradeço por sua constante presença, dedicação e apoio durante todo desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu marido Lino, com amor e gratidão por sua compreensão, paciência e apoio em todos os momentos.

Aos meus *meninos* Daniel e Tiago, com todo amor e carinho!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto por me acolher, desde o mestrado até hoje. Pela orientação e por transmitir seus conhecimentos. Por seus exemplos de força e dedicação. E acima de tudo pelo apoio e incentivo recebido durante todo período como sua aluna.

À Prof^a. Dra. Irene Satiko Kikuchi por sua importante participação neste trabalho, como co-orientadora. Por compartilhar suas experiências profissionais, conhecimentos científicos e idéias. E principalmente por sempre me incentivar e transmitir seu entusiasmo pela pesquisa.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de doutorado e desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP pelo auxílio financeiro, essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES pela concessão de bolsa nos dois primeiros anos de doutorado.

À Corantec Corantes Naturais Ltda pela doação das amostras de bixina e norbixina utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço e à Rosa Noriko Yamamoto do Laboratório CONFAR por toda ajuda e concessão do uso de equipamentos. A todos os funcionários do CONFAR, em especial às analistas do Laboratório físico-químico Elizabete de Almeida Barbosa, Daniela Dal Molim Ghisleni e ao estagiário Marcus Augusto Lyrio Traple pela contribuição nos ensaios de HPLC. Às colegas do Laboratório microbiológico pela disponibilidade em ajudar e à Marly N. Assunção por sua atenção e colaboração prestadas.

Ao estagiário Rafael Teruiti de Oliveira Takamoto por sua contribuição em diversos momentos do desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Tit. Mari Cleide Sogayar por gentilmente conceder o uso do sistema de PCR em tempo real e a todos do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Química – USP, em especial à Luciana Gomes pelas instruções nos primeiros ensaios de RT-PCR.

Ao Prof. Dr. Alberto A. G. F. C. Ribeiro do Laboratório de Microscopia do Instituto de Biociências - USP por conceder o uso do microscópio confocal e ao técnico Waldir Caldeira por toda ajuda prestada.

A todos os colegas do Laboratório de Controle de Qualidade Biológico de Qualidade de medicamentos e cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, em especial ao estagiário Wesley Anderson de Oliveira

e ao técnico de laboratório José de Souza Sobrinho, por toda ajuda e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata e Prof^a. Dr^a. Rosário Dominguez Crespo Hirata, do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, pelo uso do equipamento Nanodrop.

Ao Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, do Laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, pelo uso do sistema de fotodocumentação de géis.

A Coordenadoria do Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos e aos funcionários Elizabeth C. de Souza Paiva, David Olimpio, Elaine Midori e Jorge Alves de Lima pela atenção e ajuda prestada.

À Leila Aparecida Bonadio pela revisão das Referências Bibliográficas e a todos os bibliotecários do Conjunto das Químicas pela atenção e colaboração sempre que solicitados.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
AhR	Aril hidrocarboneto
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
B[a]P	Benzo[a]pireno
CAR	Receptor androstano constitutivo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL50	Concentração letal 50%
DL50	Dose letal 50%
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FDA	Food and drug administration
FMO	Flavinas monooxigenases
GST	Glutathione-S-transferase
HMBS	Hidroximetilbilano sintase
IC50	Índice de citotoxicidade 50%
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
KOH	Hidróxido de potássio
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
MAO	Monoaminoxigenases
MN	Micronúcleos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NAT	N-acetiltransferase
PBS	Solução tampão de fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PXR	Receptor pregnano X
RNA	Ácido ribonucléico

RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
ST	Sulfotransferase
TBE	Tris-borato-EDTA
UGT	Uridina difosfato glicuronil transferase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do grupo heme do citocromo P450.....	22
Figura 2- Ciclo catalítico básico do sistema citocromo P450.	23
Figura 3- Sementes de urucum (<i>Bixa orellana L.</i>).....	31
Figura 4- Estrutura química de (A) bixina e (B) norbixina.....	32
Figura 5- Linhagens de hepatoma humano: (A) HepG2; (B) C3A e (C) SK-HEP-1.....	38
Figura 6- Espectro de absorção de bixina em clorofórmio.	39
Figura 7- Espectros de absorção de norbixina em KOH 2,5%	40
Figura 8- Microscopia eletrônica de varredura das vesículas de bixina.	41
Figura 9- Eletroforese em gel de agarose-formaldeído do RNA.....	46
Figura 10- Placa de 96 poços empregada no Teste de MTT realizado com o composto bixina por 48 h de exposição, indicando variações na intensidade de coloração, devido a diferenças na metabolização do reagente de MTT pela linhagem HepG2.	57
Figura 11- Curvas de viabilidade celular das linhagens (A) HepG2, (B) C3A e (C) SK-HEP-1 tratadas com bixina por períodos de exposição de 24 e 48 horas	58
Figura 12- Viabilidade celular das linhagens HepG2, C3A e SK-HEP-1 tratadas com solvente etanol 2,5% (v/v) e 5,0% (v/v), por 24 e 48 horas de incubação	60
Figura 13- Curvas de viabilidade celular das linhagens (A) HepG2, (B) C3A e (C) SK-HEP-1 tratadas com norbixina por períodos de exposição de 24 e 48 horas.....	61
Figura 14- Cromatograma obtido por CLAE de: (A) Meio de cultura; (B) meio de cultura + diclofenaco de sódio 0,3 mM, antes da incubação; (C) meio de cultura + diclofenaco de sódio 0,3 mM, após 1 h de incubação em células HepG2 tratadas com norbixina 0,01 mM; (D) meio de cultura + diclofenaco de sódio 0,3 mM, após 1 hora de incubação em células HepG2 sem tratamento.....	66
Figura 15- Eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos de RT-PCR.....	70
Figura 16- Eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos de RT-PCR.....	70

Figura17- Análise de expressão gênica de CYPs em células HepG2 submetidas a tratamento com diferentes concentrações de norbixina por (A) 24 horas e (B) 48 horas.	74
Figura18- Análise de expressão gênica de CYPs em células HepG2 submetidas a tratamento com diferentes concentrações de bixina, por (A) 24 h e (B) 48h.....	76
Figura 19- Análise de expressão gênica de CYPs em células HepG2 tratadas com bixina (antes e após o processo de diálise) . Em (A) bixina 0,1 mM, (B) bixina 0,05 mM e (C) bixina 0,01 mM.	78
Figura 20- Análise de expressão gênica de CYPs em células C3A submetidas a tratamento com bixina 0,1mM por (A) 24 horas e (B) 48 horas.....	81
Figura 21- Análise de expressão gênica de CYPs em células SK-HEP-1 submetidas a tratamento com bixina 0,1mM por (A) 24 horas e (B) 48 horas.	82
Figura 22- Reações e CYPs envolvidas na biotransformação do benzo[a]pireno (B[a]P).....	85
Figura 23- Espectros de massa de amostras extraídas de meio de cultura após incubação em células HepG2. (A) Células HepG2 sem tratamento (B) Células HepG2 tratadas com bixina 0,1 mM.	86
Figura 24- Espectros de massa de amostras extraídas de meio de cultura após incubação em células C3A. (A) Células C3A sem tratamento (B) Células C3A tratadas com bixina 0,1 mM.....	87
Figura 25- Cromatogramas das amostras de B[a]P: (A) Antes da incubação. Após incubação em células HepG2 (B) sem tratamento e (C) tratadas com bixina. Após incubação em células C3A (D) sem tratamento e (E) tratadas com bixina.....	89
Figura 26- Micronúcleos originados de cromossomos inteiros e de fragmentos de cromossomos acêntricos, no estágio de anáfase da divisão celular.....	91
Figura 27- Teste de micronúcleos em células HepG2 e C3A. (A) Células HepG2 monocleadas (Mono), binucleadas (BN) e binucleada com micronúcleo (MN). (B) Célula HepG2 mononucleada. (C) Célula HepG2 binucleada com micronúcleo (MN). (D) Célula C3A binucleada. (E) Célula C3A binucleada com micronúcleo (MN).	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- <i>Primers</i> empregados nas reações de RT-PCR	48
Tabela 2- Valores de índice de citotoxicidade 50% (IC50) de bixina em.....	59
Tabela 3- Valores de índice de citotoxicidade 50% (IC50) de norbixina	62
Tabela 4- Área do pico de diclofenaco de sódio 0,3mM obtido por CLAE, após incubação por 1 hora em células HepG2 tratadas com norbixina em diferentes concentrações e sem tratamento.	67
Tabela 5- Área do pico de diclofenaco de sódio 0,3mM obtido por CLAE após incubação por 24 horas em células HepG2 tratadas com norbixina e bixina	68
Tabela 6- Comparação dos resultados da análise de expressão de CYPs, na linhagem HepG2, obtidos neste trabalho e por outros autores.	71
Tabela 7- Comparação dos resultados da análise de expressão de CYPs, na linhagem C3A, obtidos neste trabalho e por outros autores.....	71
Tabela 8- Comparação dos resultados da análise de expressão de CYPs, na linhagem SK-HEP-1, obtidos neste trabalho e por outros autores. .	72
Tabela 9- Área do pico de B[a]P obtido por CLAE antes e após incubação por 24 horas, em células HepG2 e C3A tratadas com bixina 0,1mM e sem tratamento.....	90
Tabela 10- Frequência de micronúcleos em células HepG2 expostas a B[a]P 50 µM.	93
Tabela 11- Frequência de micronúcleos em células C3A expostas a B[a]P 50 µM.	93

RESUMO

MATUO, M. C. S. Indução do sistema citocromo P450 em linhagens de hepatoma humano para utilização como modelo *in vitro* no desenvolvimento de fármacos. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Na etapa inicial do desenvolvimento de novos fármacos, a avaliação do metabolismo e da toxicidade é fundamental para definir seu potencial emprego como candidato a fármaco. Nestes estudos, diversos modelos *in vitro* são empregados, dentre eles linhagens de hepatoma humano. Entretanto, uma grande limitação ao uso deste modelo *in vitro* é a baixa expressão das enzimas do sistema citocromo P450. O carotenóide bixina, componente majoritário do anato (urucum), apresentou em estudos *in vivo*, a capacidade de induzir algumas isoformas do sistema citocromo P450, com a vantagem de apresentar baixa toxicidade. Neste trabalho, a fração lipossolúvel do anato (bixina) e hidrossolúvel (norbixina) foram avaliadas como indutores do sistema citocromo P450 em linhagens de hepatoma humano. Ensaios de MTT, empregando as linhagens HepG2, C3A e SK-HEP-1 indicaram que bixina e norbixina em concentrações abaixo de 0,22 mM são seguras quanto à citotoxicidade. A expressão dos genes CYP 1A1, 1A2, 2C9, 2B6, 2E1 e 3A4 foi avaliada, através de ensaios de RT-PCR em tempo real, em linhagens de hepatoma humano submetidas a tratamento com os compostos bixina e norbixina. Os resultados mostraram que células HepG2 e C3A tratadas com bixina nas concentrações de 0,05 e 0,1 mM, por períodos de 24 e 48 horas, apresentaram aumento de expressão da CYP 1A1 e CYP 1A2. Porém, a exposição de células HepG2 e C3A ao composto norbixina não resultou em aumento de expressão das isoformas avaliadas neste estudo. Os resultados deste trabalho indicaram o potencial emprego de bixina como agente indutor das CYPs 1A1 e 1A2, em linhagens de hepatoma humano utilizadas como modelo *in vitro*, para estudo de compostos cuja metabolização envolva uma destas vias, entretanto, estudos

adicionais são fundamentais, a fim de avaliar a ação deste composto sobre outras isoformas do sistema citocromo P-450, bem como outros sistemas enzimáticos.

Palavras-chave: citocromo P450, bixina, modelos *in vitro*, linhagens de hepatoma humano.

ABSTRACT

MATUO, M. C. S. **Induction of cytochrome P450 system in human hepatoma cell lines for using as *in vitro* model in drug development.** Tesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

In the early development stage of the new drugs, the pharmacological and toxicological properties are critical to define the potential use of the candidate drug. During this stage, several *in vitro* models systems are employed, including human hepatoma cell lines. However, the main limitation of the use of cell lines as *in vitro* model is the low expression level of cytochrome P450 enzymes. A carotenoid known as bixin, the main pigment in the annatto (*urucum*), it has been reported to induce some isoforms of cytochrome P450 in rats, with the advantage of its low toxicity. In this work, the oil-soluble (bixin) and aqueous soluble extracts (norbixin) were evaluated as inducers of the cytochrome P450 system in human hepatoma cell lines (HepG2, C3A, SK-HEP-1). The results of MTT assays showed that bixin concentrations below 0.22 mM were not cytotoxic in HepG2, C3A and SK-HEP-1 cell lines. Expression changes in CYP 1A1, 1A2, 2C9, 2B6, 2E1 and 3A4 were evaluated, by real time RT-PCR and the results showed that the exposition to 0,05 mM and 0,1 mM bixin, for 24 and 48 hours of treatment, lead to an increase in CYP 1A1 and CYP 1A2 expression level. By contrast, the cytochrome P450 isoforms were not affected by the exposition to norbixin. In conclusion, this work indicated the potential use of bixin induced hepatoma cell lines as *in vitro* model for studies of biotransformation and toxicity of drugs involving CYP 1A, however, further studies are necessary to evaluate the effect of bixin on the other cytochrome P450 isoforms as well as other enzymatic systems.

Keywords: cytochrome P450, bixin, *in vitro* models, human hepatoma cell lines

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1.	Estudo de metabolismo e toxicidade de fármacos	20
2.2.	Sistema citocromo P450.....	21
2.3.	Modelos experimentais para estudo de toxicidade e metabolismo de fármacos	25
2.4.	Emprego de cultura de hepatócitos humanos como modelo <i>in vitro</i>	27
2.5.	Linhagens de hepatoma humano	28
2.6.	Carotenóides bixina e norbixina	30
3.	OBJETIVOS	34
4.	MATERIAL E MÉTODO	35
4.1.	Material.....	35
4.1.1.	Reagentes e soluções	35
4.1.2.	Materiais diversos	36
4.1.3.	Equipamentos	37
4.1.4.	Linhagens celulares	37
4.2.	Método	38
4.2.1.	Cultura celular	38
4.2.2.	Determinação do teor de bixina.....	39
4.2.3.	Determinação do teor de norbixina	40
4.2.4.	Preparação de norbixina	40
4.2.5.	Preparação de lipossomos de bixina.....	41
4.2.5.1.	Diálise da preparação de bixina	42
4.2.6.	Avaliação da citotoxicidade de bixina e norbixina.....	42
4.2.7.	Indução do sistema citocromo P450 por bixina e norbixina em linhagens de hepatoma humano.....	43
4.2.8.	Determinação de atividade enzimática da CYP 2C9 por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	44

4.2.9. Análise de expressão das isoformas do sistema citocromo P450 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR).....	45
4.2.9.1. Extração do RNA total	45
4.2.9.2. Síntese de cDNA	46
4.2.9.3. <i>Primers</i> 47	
4.2.9.4. Ensaio de PCR convencional	48
4.2.9.5. Ensaio de PCR em tempo real	49
4.2.9.6. Determinação dos valores de expressão gênica pelo Método C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$)	50
4.2.9.7. Determinação da eficiência da amplificação.....	51
4.2.10. Análise de metabólitos do benzo[a]pireno por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS)	51
4.2.11. Análise de benzo[a]pireno em meio de cultura por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência (CLAE/FL).....	52
4.2.12. Teste de micronúcleos.....	53
4.3. Análise estatística.....	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1. Avaliação da citotoxicidade de bixina e norbixina	56
5.2. Avaliação da indução do sistema citocromo P450 por bixina e norbixina em linhagens de hepatoma humano.....	64
5.2.1. Avaliação da atividade enzimática da CYP 2C9 por método cromatográfico	64
5.2.2. Análise de expressão das isoformas do sistema citocromo P450 por transcrição reversa seguido de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) 69	
5.3. Avaliação das linhagens de hepatoma humano induzidas por bixina como modelo <i>in vitro</i> em ensaios de biotransformação e mutagenicidade.....	84
5.3.1. Ensaios de biotransformação do benzo[a]pireno (B[a]P)	86
5.4. Teste de Micronúcleos	91
5.5. Considerações finais	96
7 CONCLUSÕES.....	97
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo extremamente desafiador, sendo que a cada 10.000 compostos desenvolvidos, apenas um chega ao mercado. Este processo envolve anos de investimento, além de gastos de milhões de dólares. Os principais motivos do fracasso de muitos compostos candidatos a fármacos são a biodisponibilidade e a toxicidade. Muitos compostos apresentam excelentes resultados quanto às suas propriedades farmacológicas e segurança biológica, em ensaios pré-clínicos realizados em animais de laboratório, porém, devido a variações interespecíes, o uso de animais nem sempre é capaz de reproduzir o metabolismo humano, assim sendo, ao atingir a etapa clínica, a eficácia e segurança, inicialmente observadas em animais, não são confirmadas em humanos (GUENGERICH et al, 2006).

Esforços têm sido dirigidos na busca de sistemas–teste *in vitro*, que permitam prever os efeitos de fármacos em humanos. Embora, o emprego de animais de laboratório ainda seja indispensável na etapa pré-clínica, a adoção de procedimentos alternativos, envolvendo o uso de modelos *in vitro*, permite realizar uma triagem dos compostos candidatos a fármacos, aumentando as chances de sucesso deste composto na fase de pesquisa clínica, além de reduzir o uso de animais de laboratório.

Guias emitidos por órgãos internacionais como a *Food and Drug Administration* (FDA) incentivam a realização de ensaios *in vitro* nos estágios iniciais do estudo de metabolismo e interação entre fármacos, inclusive com sugestões de modelos *in vitro* (FDA, 1997). No Brasil, com o crescimento da indústria farmacêutica nacional e o incentivo à pesquisa de novos fármacos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), divulgou recentemente o “Guia para condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos” no qual são citados, dentre os estudos a serem realizados, ensaios de genotoxicidade *in vitro* (ANVISA, 2010).

Apesar dos incentivos, o estudo de metabolismo e toxicidade de fármacos empregando modelos *in vitro* é ainda um desafio para os pesquisadores, devido à dificuldade de detecção de metabólitos, a complexidade dos sistemas enzimáticos e a dificuldade de extrapolação dos resultados *in vitro* – *in vivo*. Essas dificuldades estão em grande parte associadas às limitações inerentes aos modelos *in vitro* atualmente conhecidos, sendo, portanto de fundamental importância o desenvolvimento de técnicas que permitam superar essas limitações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estudo de metabolismo e toxicidade de fármacos

Nos estágios iniciais do desenvolvimento de fármacos, o estudo do metabolismo e da toxicidade é fundamental para definir o potencial emprego do composto candidato a fármaco.

A investigação do metabolismo compreende diversas etapas de estudo dentre elas, a identificação dos metabólitos principais e secundários, buscando traçar um perfil metabólico do composto em estudo; o destino e a função destes metabólitos, indicando prováveis conseqüências biológicas da exposição a esta substância; a identificação das enzimas envolvidas na metabolização deste composto; a determinação do potencial de inibir ou induzir enzimas metabolizadoras, levando a alterações farmacocinéticas do fármaco em estudo ou de outros compostos administrados simultaneamente (PLANT, 2004; PELKONEN et al., 2005).

A avaliação da toxicidade do fármaco envolve a investigação de efeitos toxicológicos, em níveis local e sistêmico, bem como as conseqüências da exposição aguda, sub crônica e crônica a este composto. Estes estudos buscam avaliar a natureza dos efeitos tóxicos em células, tecidos e órgãos, obtendo assim informações sobre o mecanismo pelo qual se manifesta a toxicidade, além de avaliar a variação da resposta, em diferentes espécies e identificar doses nas quais possam ocorrer alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas, obtendo dados para estimar o potencial de dano ao usuário, através da determinação dos valores de DL_{50} e CL_{50} . Além disso, ensaios toxicológicos permitem conhecer possíveis efeitos cumulativos do agente e de seus metabólitos e predizer efeitos adversos, dentre eles a mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade, decorrentes da exposição intermitente, repetida ou crônica ao agente em questão (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Um dos principais fatores que afetam o perfil terapêutico e toxicológico de fármacos, levando não apenas a sua detoxicação e excreção, mas também a sua bioativação, é a biotransformação (BRANDON et al., 2003).

As reações de biotransformação são divididas em dois tipos: Fase I, na qual os fármacos e outros compostos externos ao organismo (xenobióticos) são metabolizados por diversos sistemas enzimáticos, através de reações de oxidação, redução ou hidrólise que irão converter o fármaco em um metabólito mais polar e Fase II, na qual os metabólitos da fase I sofrem reações de conjugação, sendo adicionadas ao metabólito pequenas moléculas endógenas de alta polaridade, formando conjugados hidrossolúveis que serão por fim excretados (BARREIRO; SILVA; FRAGA, 1996).

Diversos sistemas enzimáticos participam das reações de Fase I, dentre eles: o sistema citocromo P450, as monoaminoxidases (MAO) e as flavinas monooxigenases (FMO). Nas reações de Fase II participam: o sistema UGT (uridina difosfato glicuronil transferase); NAT (N-acetiltransferase), GST (glutathione-S-transferase) e ST (sulfotransferase) (BRANDON et al., 2003). Dentre estes sistemas enzimáticos, o sistema citocromo P450 é considerado o principal responsável pela ativação e eliminação de fármacos, participando de cerca de 70 - 80% das reações de Fase I de biotransformação (INGELMAN-SUNDBERG, 2005).

2.2. Sistema citocromo P450

As enzimas denominadas citocromo são hemoproteínas, que apresentam um grupo prostético heme composto por quatro anéis pirrólicos ligados por pontes \square CH=, formando uma molécula planar porfirina, no centro da qual se encontra um átomo de ferro (Figura 1) (JONES; POOLE, 1985). Citocromos são divididos em quatro grupos (*a*, *b*, *c* e *d*) de acordo com a natureza do grupo prostético heme, sendo que cada grupo apresenta diferentes cadeias laterais em suas porfirinas (KÄPPELI, 1986). As enzimas citocromo P450 são do tipo *b* assim como os citocromos *b* e *o*, além da hemoglobina e mioglobina (JONES; POOLE, 1985).

A denominação citocromo P450 tem origem nas características de hemoproteínas destas enzimas e em suas propriedades espectrais, observadas por Omura e Sato (1962), de produzir um pico de absorção máximo em 450 nm, quando reduzido na presença de monóxido de carbono. Este fenômeno é incomum, uma vez que as demais hemoproteínas, como por exemplo, a hemoglobina, absorvem luz a 420 nm.

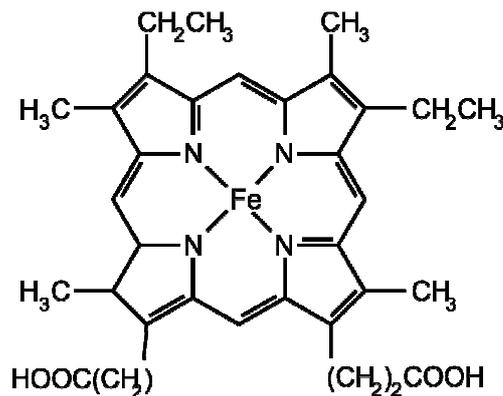


Figura 1. Estrutura do grupo heme do citocromo P450

O sistema citocromo P450 apresenta inúmeras isoformas, sendo que quase 4000 diferentes seqüências já foram identificadas (NELSON, 2005). Devido a esta vasta multiplicidade de formas, uma nomenclatura foi criada, para subdivisão e classificação destas isoformas, baseada na identidade de aminoácidos, critérios filogenéticos e organização dos genes. Desta forma, a grande família do sistema citocromo P450 (CYP) é dividida em famílias (identificadas por números arábicos), correspondente ao grupo de proteínas com mais de 40% de homologia na seqüência de aminoácidos; subfamílias (identificadas por letras maiúsculas), que correspondem às proteínas com mais de 55% de homologia e por último um número, que identifica a isoforma (WERCK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000). Por exemplo, a CYP 3A4 corresponde a isoforma 4, da subfamília A e família 3.

O grande envolvimento deste sistema enzimático no metabolismo de fármacos está provavelmente relacionado a esta multiplicidade de formas, levando o sistema citocromo P450 a apresentar um maior número de substratos que qualquer outro sistema enzimático (GUENGERICH, 2006). As enzimas P450 são capazes de catalisar uma grande variedade de reações, participando de mais de 20 diferentes

reações como hidroxilação, epoxidação, N-, S- e O-dealquilação, oxigenação, redução, dealquilação, desidrogenação, dehalogenação, dentre outras. Seus substratos incluem xenobióticos como fármacos, solventes orgânicos, pesticidas, corantes, compostos carcinogênicos e pró-carcinogênicos, além de substratos endógenos como ácidos graxos, esteróides, eicosanóides, prostaglandinas, dentre outros (COON, et al, 1992; BERNHARDT, 2006).

O ciclo catalítico básico das enzimas do citocromo P450 envolve diversas etapas (Figura 2), iniciando com a ligação do substrato ao citocromo P450 oxidado (1). A seguir, o primeiro elétron é transferido à enzima P450 via NADPH-P450 redutase, reduzindo o grupo heme ao estado ferroso (3). Um oxigênio molecular é incorporado ao grupo heme e o segundo elétron é transferido ao átomo de ferro, via NADPH-P450-redutase (4). A seguir, ocorre a clivagem da ligação O-O (5) e liberação de uma molécula de água (6). Um complexo FeO^{3+} é formado, retirando um átomo de hidrogênio do substrato (7), seguido de transferência de um átomo de oxigênio ao substrato (8). Finalmente, o produto é liberado e o grupo heme retorna ao estado férrico (9).

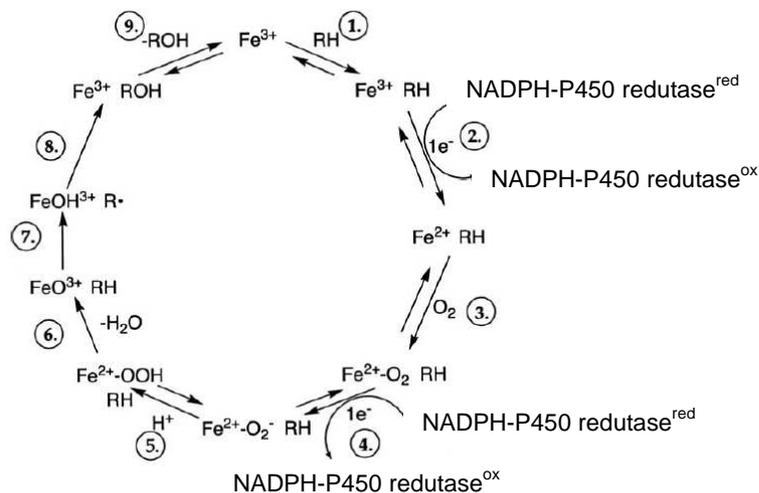


Figura 2. Ciclo catalítico básico do sistema citocromo P450. O átomo de ferro (Fe) representa o grupo heme, sítio ativo do citocromo P450. RH representa o substrato e ROH, o produto. Ox e red representam os estados oxidado e reduzido, respectivamente, da enzima P450 redutase. Adaptado de FURGE e GUENGERICH (2006).

O sistema citocromo P450 está presente em diversos organismos, de bactérias ao homem, ocorrendo grande variação no número de genes codificadores das enzimas P450 entre diferentes espécies. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* são encontrados apenas 3 genes do sistema citocromo P450, em camundongos, 102 genes (SELISKAR; ROZMAN, 2007). Em humanos, 57 genes funcionais (codificadores de enzimas ativas), além de 58 pseudogenes foram identificados. Dos 57 genes funcionais, os genes das famílias CYP1, CYP2 e CYP3 desempenham um papel central nas reações de Fase I de biotransformação de xenobióticos, sendo responsáveis por cerca de 90% do metabolismo de fármacos (GUENGERICH, 2006; SINGH et al., 2011).

Os principais membros da família CYP1, em humanos, são CYP 1A1, CYP 1A2 e CYP 1B1. Dentre estas, a CYP 1A1 é uma das mais importantes enzimas envolvidas no processo de detoxificação devido a sua afinidade a diversos substratos e ampla distribuição pelo corpo.

Na família CYP2, as principais isoformas que contribuem para o metabolismo de xenobióticos são: CYP 2A6, CYP 2B6, CYP 2C8, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2D6, CYP 2E1 e CYP 2F1, sendo que dentre estas, estima-se que a CYP 2C9 seja responsável pela metabolização de aproximadamente 16% dos fármacos.

A família CYP3 compreende, em humanos, apenas quatro membros: CYP 3A4, CYP 3A5, CYP 3A7 e CYP 3A4, destes a CYP 3A4 apresenta papel de destaque, estando envolvida no metabolismo de cerca de 50% dos xenobióticos (PAVEK; DVORAK, 2008).

Os genes que codificam as isoformas das famílias 1 a 3 do sistema citocromo P450 são polimórficos, sendo que para uma determinada enzima P450, podem existir de 5 a quase 50 alelos variantes (INGELMAN-SUNDBERG, 2005). A importância funcional, bem como a frequência da distribuição destes alelos, difere entre os grupos étnicos. Assim sendo, o polimorfismo está associado a importantes variações interindividuais na expressão das enzimas P450 e, portanto na resposta aos xenobióticos (INGELMAN-SUNDBERG, 2004).

Em humanos, o sistema citocromo P450 está distribuído em todos os tecidos do corpo, exceto em células do músculo esquelético e nas células vermelhas do sangue (FURGE; GUENGERICH, 2006). Nos diversos tecidos, estas enzimas apresentam diferentes níveis de expressão, sendo que a forma seletiva como ocorrem nos tecidos é um dos fatores que determinam a especificidade da ação farmacológica e toxicológica de fármacos e de outros xenobióticos em diferentes órgãos (PELKONEN; RAUNIO, 1997; MURRAY; BURKE, 1995).

Apesar da expressão das enzimas do sistema citocromo P450, em tecidos extra-hepáticos, contribuir para biotransformação de fármacos ou ativação de pró-carcinogênicos ou pró-fármacos, a capacidade metabólica nestes tecidos é muito baixa se comparado à biotransformação hepática (PAVEK; DVORAK, 2008). Desta forma, pode-se dizer que as enzimas P450 hepáticas desempenham um papel central no metabolismo de xenobióticos.

2.3. Modelos experimentais para estudo de toxicidade e metabolismo de fármacos

Animais de laboratório têm sido tradicionalmente, empregados na investigação do metabolismo de fármacos e da capacidade de compostos químicos em causar danos ao organismo. Estes modelos experimentais são importantes para demonstrar possíveis efeitos adversos e reproduzir interações complexas entre o composto em estudo e o organismo vivo. Entretanto, o emprego destes modelos inclui uma série de limitações, como o elevado custo para manutenção de animais de laboratório e a dificuldade de isolamento de metabólitos em fluidos biológicos altamente complexos, para realização de análises físico-químicas e bioquímicas (DAVILA et al., 1998).

Outro grande desafio, em ensaios *in vivo*, é determinar qual animal melhor representa o metabolismo humano. As espécies mais freqüentemente empregadas em estudos de metabolismo de fármacos são o camundongo, rato, coelho, cão e macaco, devido à semelhança entre os sistemas enzimáticos destes animais e o homem, em especial o sistema citocromo P450. Entretanto, pequenas semelhanças nas sequências de aminoácidos no sítio ativo destas enzimas resultam em grande

variação na especificidade do substrato e conseqüentemente na resposta ao fármaco, dificultando assim, a extrapolação dos dados de toxicidade e metabolismo de animais de laboratório para o homem (TURPEINEN et al., 2007). Além disso, com o aumento não apenas do número de novos fármacos, mas também dos critérios de segurança envolvidos no seu desenvolvimento, o uso de grande quantidade de animais, torna-se ética e economicamente questionável. Desta forma, o emprego de modelos *in vitro*, em ensaios preliminares de metabolismo e toxicidade de fármacos, apresenta grande utilidade na medida em que permite prever os efeitos farmacológicos *in vivo*.

Sendo o fígado o principal órgão envolvido no processo de biotransformação, diversos modelos *in vitro* baseados neste órgão, foram desenvolvidos, dentre estes: cultura primária de hepatócitos e linhagens de hepatoma humano, preparações enzimáticas (microsomas de fígado humano, fração S9 e fração citosólica de fígado), culturas de tecido e fígado isolado. Além destes, podemos ainda citar o emprego de organismos inferiores, como por exemplo, células de inseto (BRANDON et al., 2003).

Microsomas (fragmentos do retículo endoplasmático de hepatócitos), fração citosólica de fígado e fração S9 de fígado humano (correspondente a ambas as frações, citosólica e microsomal) são preparações enzimáticas amplamente empregadas como modelos *in vitro* devido à facilidade de uso e baixo custo, porém reproduzem de forma incompleta a situação *in vivo*, necessitando da adição de cofatores, além da baixa atividade enzimática, reduzindo a sensibilidade destes sistemas. O emprego de organismos inferiores, como modelo *in vitro*, consiste na expressão de proteínas recombinantes em células de inseto. A vantagem deste sistema é a possibilidade de estudo de uma única isoforma específica, porém uma importante questão é se as enzimas expressas em células de inseto apresentam as mesmas características de enzimas naturalmente expressas no fígado (PLANT, 2004)

Outro modelo *in vitro*, menos freqüentemente empregado, é a cultura de tecido hepático. Este modelo apresenta a vantagem da preservação de sua estrutura celular, porém a baixa viabilidade e a inadequada penetração do meio de cultura no

tecido são algumas das limitações relacionadas ao uso deste modelo. Por fim, o emprego de fígado isolado como modelo experimental, além da dificuldade de manipulação e baixa viabilidade, não se aplica ao fígado humano, ficando, portanto restrito aos animais de laboratório (BRANDON et al., 2003).

2.4. Emprego de cultura de hepatócitos humanos como modelo *in vitro*

Cultura de hepatócitos humanos tem sido amplamente empregada como modelo *in vitro* em estudo de metabolismo de fármaco e toxicidade. Os motivos para a popularidade deste modelo incluem fatores éticos e econômicos, além do desenvolvimento de técnicas de cultura e isolamento de hepatócitos (DAVILA et al., 1998).

Uma grande vantagem do emprego de culturas celulares é a possibilidade de uso deste modelo na elucidação de mecanismos de ação, uma vez que permite observar a interação entre célula e fármaco, a nível molecular e sob condições controladas. Além disso, o emprego de culturas de hepatócitos humanos permite eliminar a necessidade de extrapolação dos dados de animais de laboratório para humanos. Por outro lado, algumas limitações no emprego de culturas celulares dificultam a extrapolação direta dos dados *in vitro* para a situação *in vivo*, como a perda de determinadas características celulares após dissociação do tecido, o surgimento de sítios de ligação normalmente não funcionais *in vivo*, a dificuldade de avaliação da concentração na qual o composto é farmacologicamente e toxicologicamente ativo e relevante *in vivo* (DAVILA et al., 1998).

Apesar destas limitações, dentre os modelos *in vitro* atualmente empregados, a cultura primária de hepatócitos é considerada a melhor aproximação da situação *in vivo* devido ao fato de preservar muitas das características observadas *in vivo*. Isto se deve, em grande parte, às enzimas do sistema citocromo P450 que, na cultura primária, são expressas em níveis elevados. Uma vez que hepatócitos são obtidos de diferentes doadores, o emprego da cultura primária possibilita o estudo em indivíduos com diferentes características ou em um *pool* de hepatócitos, por outro lado, esta grande variabilidade pode levar a erros experimentais, devido a variações

técnicas (diferenças de viabilidade entre as preparações), farmacêuticas (exposição dos diferentes doadores a fármacos, antes da coleta das amostras) e biológicas (polimorfismos genéticos). Outra desvantagem é a dificuldade de obtenção de doadores, além dos procedimentos de isolamento dos hepatócitos, que podem ser complicados e demorados (PLANT, 2004).

Como em cultura primária de hepatócitos a perda gradual das funções específicas do fígado, com diminuição da expressão das enzimas do sistema citocromo P450 ao longo dos dias de cultivo, é amplamente reconhecida (BRANDON et al., 2003; PLANT, 2004; PELKONEN et al., 2005), várias técnicas de cultivo de hepatócitos têm sido desenvolvidas com a finalidade de prolongar a viabilidade destas células e reduzir a perda de suas características específicas. Dentre estes métodos podemos citar: cultura de células em dupla camada de colágeno ou “sanduíche” (VINKEN et al., 2005; DE SMET et al., 2000), co-cultura de hepatócitos com células epiteliais do fígado (MILOSEVIC; SCHWALDER; MAIER, 1999; HENKENS et al., 2005), além do aprimoramento da técnica de criopreservação (HENGSTLER et al., 2000; TERRY et al., 2005; LI, 2007). Porém, o alto custo da técnica de criopreservação, a variabilidade entre hepatócitos obtidos de diferentes doadores, além da dificuldade de obtenção dos doadores permanecem como grandes limitações ao uso da cultura primária de hepatócitos como modelo *in vitro* (PLANT, 2004).

2.5. Linhagens de hepatoma humano

Uma alternativa ao uso da cultura primária de hepatócitos é o emprego de linhagens de hepatoma humano, derivadas de tecidos tumorais ou de células primárias artificialmente transformadas. Dentre as linhagens de hepatoma humano, a mais empregada é a HepG2, seguido da linhagem Hep3B (PLANT, 2004). Outras linhagens celulares utilizadas no estudo de metabolismo e toxicidade de fármacos são: BC2 (FABRE et al., 2003; O’CONNOR et al., 2005), C3A (ELKAYAM et al., 2006), Huh7 (KLEEBERG et al., 1999; CHAO et al., 2006), SK-HEP-1 (BRANDON et al., 2003) e mais recentemente, HepaRG (KANEBRATT; ANDERSSON, 2008).

A grande vantagem do emprego de linhagens de hepatoma humano é a facilidade de cultivo, comparativamente à cultura primária de hepatócitos, além da capacidade de manter estáveis suas concentrações enzimáticas, contribuindo desta forma para a baixa variação e redução de erros experimentais. Entretanto, a ausência ou baixa expressão das isoformas do sistema citocromo P450 em linhagens de hepatoma humano dificultam a detecção de metabólitos limitando, portanto, o uso destas linhagens como modelos *in vitro* (BRANDON et al., 2003; PLANT, 2004; WILKENING; STAHL; BADER, 2003).

Rodriguez-Antona et al. (2002) atribuíram a baixa expressão do sistema citocromo P450, em linhagens de hepatoma humano, à redução da transcrição das CYPs e a alterações na expressão de fatores de transcrição. Embora os mecanismos que levam à baixa expressão das enzimas P450 em linhagens celulares não tenham sido ainda totalmente elucidados, sabe-se que está relacionada ao processo de imortalização da linhagem celular, ou seja, ao longo do processo de adaptação e imortalização, que farão com que estas células se multipliquem indefinidamente, ocorre a desdiferenciação celular, com perda das funções celulares específicas (HAHN, 2002). Em linhagens de hepatoma humano, a perda das funções hepáticas envolve a ausência ou redução da expressão das enzimas metabolizadoras, dentre elas as isoformas do sistema citocromo P450.

Devido à baixa expressão das enzimas do sistema citocromo P450 estudos têm sido desenvolvidos com intuito de aumentar a expressão destas enzimas, na tentativa de tornar as linhagens de hepatoma humano um modelo mais representativo da situação *in vivo*. Desta forma, novas técnicas de cultivo de linhagens celulares, que aumentem a expressão destas CYPs, têm sido propostas, como por exemplo, o desenvolvimento de técnicas de culturas tridimensionais (ELKAYAM et al., 2006; NAKAMURA et al., 2011).

O cultivo de linhagens celulares em dimetilsulfóxido (DMSO) tem sido proposto por alguns autores, como uma alternativa para aumentar a expressão das isoformas do citocromo P450 em linhagens de hepatoma humano (CHOI et al., 2009). O emprego de DMSO se justifica pelo fato desta substância ser considerada um indutor de diferenciação celular, levando à restauração das características celulares

específicas, e, desta forma aumentando a expressão de CYPs, fatores de transcrição e receptores nucleares (SU; WAXMAN, 2004). Entretanto, a citotoxicidade do DMSO é bastante conhecida e considerando que as linhagens celulares deverão ser tratadas com a substância-teste para estudo de biotransformação e toxicidade, é desejável que o indutor adicionado ao meio de cultura apresente baixa citotoxicidade.

Além do DMSO, estudos realizados em linhagens celulares, têm demonstrado que outros compostos como os carotenóides, pigmentos responsáveis pela coloração de frutas e vegetais, também apresentam a capacidade de induzir a diferenciação celular, modulando a proliferação e funções celulares, embora os mecanismos sejam ainda desconhecidos (GROSS et al., 1997; MCDEVITT et al., 2005).

2.6. Carotenóides bixina e norbixina

Carotenóides são pigmentos amarelo-alaranjados presentes em diversos alimentos, como frutas e vegetais, além de animais, como peixes e crustáceos. Além da função de colorir, importantes atividades biológicas têm sido atribuídas a estes compostos, como a prevenção de doenças degenerativas e a atividade anticarcinogênica (KNASMÜLLER et al., 2002).

Estes corantes naturais são amplamente empregados na indústria alimentícia e de bebidas, além das indústrias farmacêuticas e de cosméticos (PAUMGARTTEN et al., 2002), sendo que dentre estes o mais utilizado pela indústria brasileira é o urucum, representando cerca de 90% dos corantes naturais usados no Brasil e 70% no mundo (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001). O urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) é uma planta nativa da América do Sul e Central, sendo também cultivada em diversos países tropicais como Jamaica, México e Filipinas, sendo o Peru, Brasil e Quênia os principais países produtores de urucum. As folhas, sementes e raízes de *Bixa orellana* L. são amplamente empregadas pela medicina popular brasileira como antitérmico, antiinflamatório, antihelmíntico, dentre outras aplicações (PAUMGARTTEN et al., 2002). Na culinária brasileira, o urucum é conhecido como

“colorau”, proporcionando coloração avermelhada aos alimentos, sendo também empregado como condimento no México e em outros países da América do Sul. Na indústria alimentícia o urucum é empregado como corante de produtos como manteiga, margarina, queijo, sorvetes, cereais, além de embutidos, carnes e bebidas (GALINDO-CUSPINERA; LUBRAN; RANKIN, 2002).

O corante extraído do pericarpo das sementes de urucum (Figura 3) é internacionalmente conhecido como *annatto* (anato). O anato é uma mistura de pigmentos, sendo que destes, 80% correspondem ao carotenóide bixina. Vários outros carotenóides foram isolados e identificados, porém constituem uma parcela minoritária (COSTA; CHAVES, 2005).



Figura 3. Sementes de urucum (*Bixa orellana L.*)

Bixina (Figura 4A) é composta por uma cadeia isoprênica de 24 carbonos, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades, apresentando assim a fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$ (COSTA; CHAVES, 2005). A hidrólise do grupo metil éster forma o ácido dicarboxílico correspondente, a norbixina, com fórmula molecular $C_{24}H_{28}O_4$, (Figura 4B), sendo o principal componente das preparações hidrossolúveis do *anato* (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001; PAUMGARTTEN et al., 2002). A norbixina ocorre naturalmente no anato, porém em pequena quantidade, assim sendo, este pigmento é, em geral, obtido industrialmente, através da saponificação da bixina (COSTA; CHAVES, 2005).

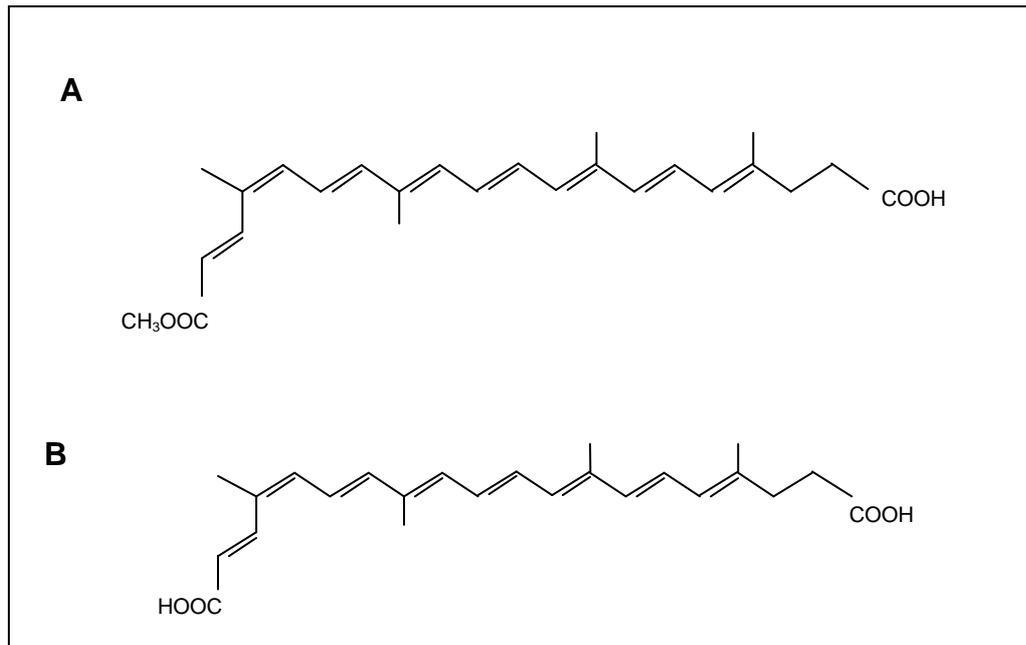


Figura 4. Estrutura química de (A) bixina e (B) norbixina.

O baixo custo de produção e a baixa toxicidade tornaram o anato um pigmento muito atrativo para indústria, em substituição de muitos corantes sintéticos potencialmente mutagênicos ou carcinogênicos (AGNER et al., 2004). Estudos de toxicidade oral subcrônica constataram que a ingestão de norbixina ou bixina na dieta, não produz nenhum efeito tóxico significativo em ratos (HAGIWARA et al., 2003; BAUTISTA et al., 2004). Ensaio de embriotoxicidade e carcinogenicidade, em animais de laboratório também demonstraram ausência de efeitos tóxicos (PAUMGARTTEN et al., 2002; AGNER et al., 2004).

Além de sua baixa toxicidade, trabalhos *in vivo* têm demonstrado que anato, além de outros carotenóides como astaxantina e cantaxantina, apresenta efeito indutor de algumas das enzimas do sistema citocromo P450. Este efeito indutor foi observado por Jewell e O'Brien (1999) em ensaios realizados em ratos após ingestão de anato na dieta por um período de 16 dias, sendo observado aumento de atividade das enzimas CYP 1A1, CYP 1A2 e CYP 2B1. Esse mesmo efeito foi observado por Oliveira et al. (2003) em ensaios realizados *in vivo*, empregando além de bixina, a mistura anato.

A baixa toxicidade do anato, aliada à capacidade de aumentar a atividade das enzimas do sistema citocromo P450, torna o cultivo de linhagens de hepatoma humano em meio de cultura suplementado com bixina ou norbixina uma alternativa simples e de baixo custo, para indução das enzimas do sistema citocromo P450 e conseqüentemente, o aumento da sensibilidade em ensaios de biotransformação e citotoxicidade de fármacos.

3. OBJETIVOS

Objetivo principal:

- ✓ Indução das enzimas do sistema citocromo P450 em linhagens de hepatoma humano

Objetivos secundários:

- ✓ Avaliação da citotoxicidade dos compostos bixina e norbixina
- ✓ Avaliação do potencial de indução das isoformas CYP 1A1, 1A2, 2B6, 2C9, 2E1 e 3A4 pelos compostos bixina e norbixina
- ✓ Determinação da concentração e o tempo de exposição ao agente indutor necessários para indução das CYPs
- ✓ Comparação do efeito indutor em diferentes linhagens de hepatoma humano
- ✓ Avaliação do emprego de linhagens de hepatoma humano tratadas com agente indutor, em ensaios de biotransformação e mutagenicidade

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Material

4.1.1. Reagentes e soluções

- Bixina (Corantec Corantes Naturais Ltda)
- Norbixina (Corantec Corantes Naturais Ltda)
- Soro fetal bovino (Cultilab Insumos para Cultura celular)
- Solução de tripsina/ EDTA (1: 250) (Cultilab Insumos para Cultura celular)
- Solução tampão de fosfato (PBS) (Cultilab Insumos para Cultura celular)
- Meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) (Cultilab Insumos para Cultura celular)
- Bicarbonato de sódio P.A. (Sigma-Aldrich)
- Reagente de MTT, para cultura celular (Thiazolyl blue tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich)
- Trypan Blue, para cultura celular (Sigma–Aldrich)
- Diclofenaco de sódio (Novartis Biociências SA)
- Dimetilsulfóxido (DMSO), para biologia molecular (LGC Biotecnologia)
- Kit para extração de RNA (Total RNA Isolation Nucleospin Kit – RNA II (Marcherey-Nagel)
- Kit para síntese de cDNA (Maxima™ First strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR) (Fermentas)
- RNase H (Fermentas)
- Kit para PCR convencional (Dream Taq Green PCR Master Mix - 2X) (Fermentas)
- Kit para PCR em tempo real (Maxima® SYBR Green/ ROX qPCR Master Mix – 2X) (Fermentas)
- Gel de agarose (Ultrapure™ agarose) (Invitrogen)
- Solução de formaldeído, para biologia molecular (Sigma-Aldrich)
- β-mercaptoetanol, para cultura celular (Sigma-Aldrich)

- Solução tampão TBE 10X concentrada (AMRESCO)
- Brometo de etídio, para biologia molecular (Sigma-Aldrich)
- Dodecil sulfato de sódio (SDS), para biologia molecular (Sigma-Aldrich)
- Formamida, para biologia molecular (Sigma-Aldrich)
- Azul de bromofenol, para biologia molecular (Sigma-Aldrich)
- Xileno cianol, para biologia molecular (Sigma-Aldrich)
- Azul de bromofenol, para biologia molecular (Sigma-Aldrich)
- Benzo[a]pireno (Sigma-Aldrich)
- Citocalasina B (Sigma-Aldrich)
- Alaranjado de acridina (Sigma-Aldrich)
- Etanol P.A. (Synth)
- Metanol grau CLAE (Carlo Erba)
- Tetrahydrofurano grau CLAE (Carlo Erba)
- Fosfato de sódio dibásico dihidratado grau P.A.
- Hidrogenofosfato de sódio P.A. (Merck)
- Ácido acético P.A. (Carlo Erba)
- Acetonitrila grau CLAE (Carlo Erba)
- Hidróxido de potássio P.A. (Merck)
- Acetato de amônio grau CLAE (Carlo Erba)
- Clorofórmio P.A. (Carlo Erba)
- Acetato de etila P.A. (Carlo Erba)
- Ácido morfolino-propanosulfônico P.A. (MOPS) (Serva)
- Acetato de sódio P.A. (Sigma-Aldrich)
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (LGC Biotecnologia)

4.1.2. Materiais diversos

- Membrana de celulose para diálise, 25 mm de largura (Sigma-Aldrich)
- Unidade filtrante Millex 0,45 µm, PVDF, 33 mm diâmetro (Millipore)
- Unidade filtrante Millex 0,22 µm, PVDF, 25 mm diâmetro (Millipore)
- Botijão criogênico XC20 Millennium (Volta)

4.1.3. Equipamentos

- Estufa de CO₂ modelo 3140 (Forma Scientific)
- Capela de fluxo laminar vertical (VECO)
- Microscópio Axiovert 25 (Zeiss)
- Banho Maria modelo PWB-4 (Boeco)
- pHmetro modelo B474 (Micronal)
- Balança analítica AG 204 (Mettler Toledo)
- Freezer modelo Forma Pharmacy (Thermo)
- Ultrafreeer vertical (Revco)
- Centrífuga refrigerada modelo 5804R (Eppendorf)
- Espectrofotômetro UV-Vis para micro-volumes (Nanodrop[®] Spectrophotometer modelo ND-1000) (Thermo Scientific)
- Espectrofotômetro modelo Nicolet Evolution UV-Vis (Thermo Scientific)
- Cuba de eletroforese horizontal e fonte modelo LPS – 300 V (Loccus Biotecnologia)
- Sistema de fotodocumentação de géis Mini BIS PRO (DNR Bio Imaging Systems)
- Termociclador modelo THERM-1000 (Maxygene)
- Sistema de PCR em tempo real ABI Prism[®] 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems).
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência HPLC modelo THERMO SCM 1000 (Thermo Scientific)
- Leitor de microplaca modelo LM-LGC (LGC Biotecnologia)

4.1.4. Linhagens celulares

- HepG2 (CR0294): célula epitelial, isolada em 1979 de hepatoblastoma primário humano (Figura 5A). Fornecida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

- C3A (CRL-10741): clone derivado de HepG2 (Figura 5B). Fornecida pela American Type Culture Collection (ATCC).
- SK-HEP-1 (HTB-52): célula endotelial, isolada em 1971 de carcinoma hepatocelular humano (Figura 5C). Fornecida pela American Type Culture Collection (ATCC).

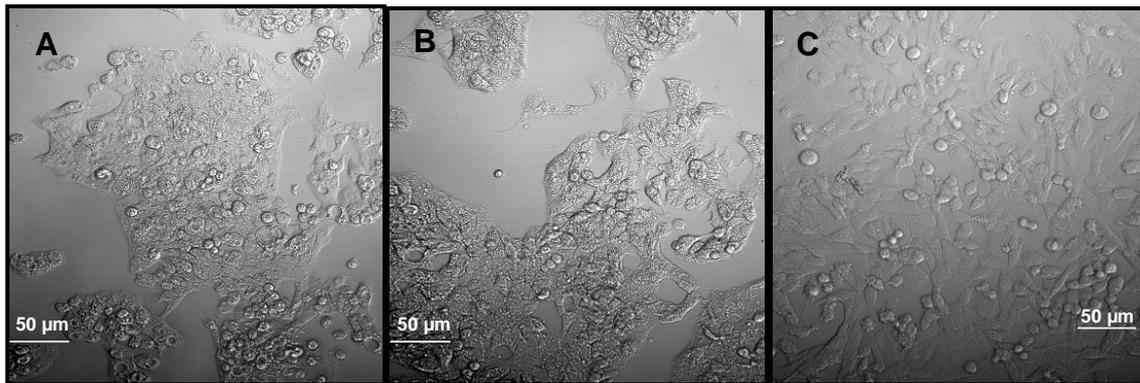


Figura 5. Linhagens de hepatoma humano: (A) HepG2; (B) C3A e (C) SK-HEP-1. Imagens obtidas por microscopia confocal (Laser Scan Microscopy, LSM 410, marca Zeiss).

4.2. Método

4.2.1. Cultura celular

Para manutenção das linhagens celulares foi seguido procedimento padrão de cultura celular (FRESHNEY, 2000). As células foram cultivadas em monocamada, em frascos de cultura celular, empregando meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), contendo 4,0 mM de L-glutamina. Após esterilização do meio de cultura, adicionou-se solução de bicarbonato de sódio 1,0 M, sendo que o pH final foi ajustado para $7,7 \pm 0,5$. O meio DMEM foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

As linhagens celulares foram mantidas em estufa umidificada, a 37°C e 5% CO_2 . A tripsinização das células foi realizada empregando solução de tripsina 0,25 % (p/v) e EDTA 0,5 mM.

Os estoques de culturas celulares são mantidos em meio de cultura DMEM + 10% SFB + 5% dimetilsulfóxido (DMSO), em reservatório contendo nitrogênio líquido, a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2. Determinação do teor de bixina

O teor de bixina foi determinado por espectrofotometria, utilizando clorofórmio como solvente. Para cálculo da concentração de bixina foi considerado $E1\% = 2826$ a 470 nm (YABIKU; TAKAHASHI, 1992). Esta mesma preparação foi utilizada para varredura espectrofotométrica nos comprimentos de onda entre 300 e 600 nm para fins de identificação do composto. A Figura 6 mostra o espectro de absorção da bixina obtido após diluição em clorofórmio. O espectro obtido é semelhante ao descrito na literatura (BRITTON; LIAAEN-JENSEN; PFANDER, 1995), ou seja, apresenta picos de absorção em 446 nm, 470 nm e em 501 nm.

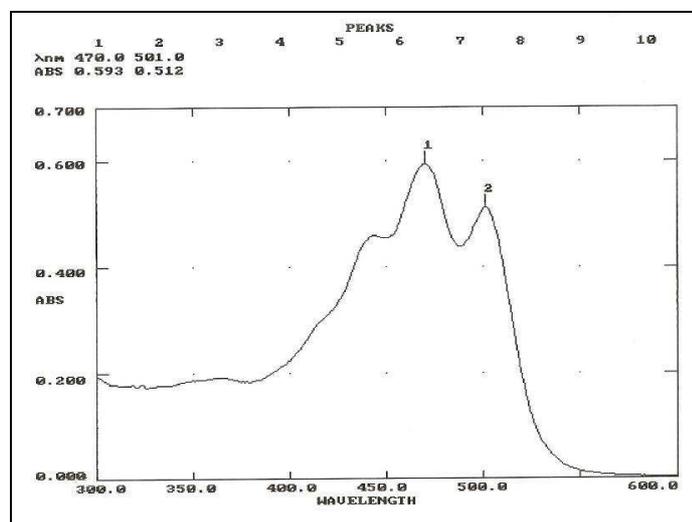


Figura 6. Espectro de absorção de bixina em clorofórmio.

4.2.3. Determinação do teor de norbixina

O teor de norbixina foi obtido por diluição em solução de KOH 2,5% e determinação espectrofotométrica em 453 nm, considerando $E1\% = 2850$ (FERREIRA et al., 1999). Esta mesma preparação foi utilizada para varredura nos comprimentos de onda entre 300 e 600 nm para fins de identificação do composto. A Figura 7 corresponde ao espectro da norbixina em KOH 2,5 % e mostra picos de absorção em 453 nm e 481 nm, característico deste composto (BRITTON; LIAAEN-JENSEN; PFANDER, 1995).

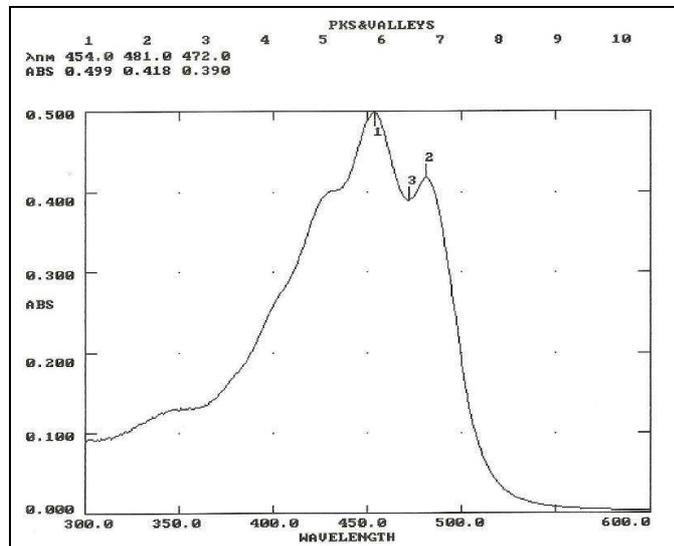


Figura 7. Espectros de absorção de norbixina em KOH 2,5% .

4.2.4. Preparação de norbixina

A norbixina foi solubilizada em água destilada, obtendo-se uma solução estoque de 1,0 mM. A partir desta solução estoque foram realizadas diluições em meio de cultura para obtenção das concentrações empregadas nos ensaios.

4.2.5. Preparação de lipossomos de bixina

O processo descrito a seguir, para obtenção de lipossomos de bixina, foi totalmente desenvolvido em nosso laboratório, resultando em patente nacional (PINTO et al., 2009).

A bixina, correspondente à fração lipossolúvel do anato, foi solubilizada em etanol, obtendo-se uma solução de 10 mM. Esta solução foi adicionada gota a gota, sob agitação, na proporção de 1:10 e à temperatura ambiente, sendo obtida uma solução estoque de 1,0 mM, a partir da qual foram realizadas diluições em meio de cultura para obtenção das concentrações empregadas nos ensaios.

Desta preparação de bixina resultou na obtenção de lipossomos, sendo que as vesículas de bixina se formaram por interação entre sua região polar e água, e por interações hidrofóbicas entre suas cadeias longas, resultando em uma típica bicamada estável, de estrutura esférica (Figura 8).

A preparação das vesículas de bixina foi baseada em técnicas clássicas de obtenção de lipossomos, nas quais lipídios são solubilizados em álcool e então injetados em soluções aquosas (BATZRI; KORN, 1973; KREMER et al., 1977).

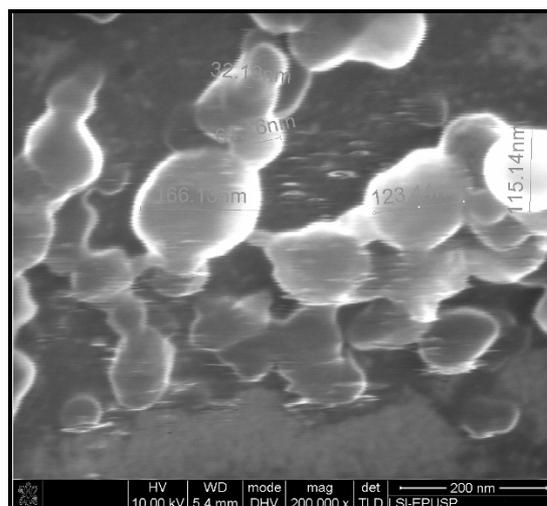


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura das vesículas de bixina.

4.2.5.1. Diálise da preparação de bixina

A remoção do solvente etanol, empregado na preparação de bixina, foi realizada por processo de diálise, utilizando membrana de celulose específica com largura de 25 mm. Esta membrana foi pré-ativada por aquecimento em água e preparada de tal maneira a formar um reservatório para um volume de 5,0 mL da solução estoque de bixina 1,0 mM, sendo lacrado nas extremidades e mergulhado em água destilada para o processo de diálise sob agitação. Após 30 minutos foi realizada a troca da água de lavagem. Outras duas trocas foram realizadas após 2 e 4 horas. A membrana de diálise, contendo a solução de bixina foi então mantida em água destilada *overnight* e a seguir realizada uma última lavagem por 1 – 2 minutos.

4.2.6. Avaliação da citotoxicidade de bixina e norbixina

Para avaliação da citotoxicidade de bixina e norbixina foi realizado o Teste de MTT, empregando células HepG2, C3A e SK-HEP1. As linhagens celulares foram cultivadas em frascos de 75 cm² e após atingir cerca de 70 – 80 % de confluência foram tripsinizadas e a concentração celular ajustada para 10⁵ células/mL. Para este ajuste, as células foram coradas com Trypan Blue 0,4% (p/v), e realizada a contagem em câmara de Neubauer. A seguir, as células foram transferidas para placas de 96 poços (100 µL de suspensão de células/ poço) e incubadas *overnight* a 37° C e 5 % CO₂, em meio de cultura DMEM + 10% SFB.

Após incubação, o meio de cultura foi removido e adicionado um volume de 100 µL do meio de cultura + 10 % SFB suplementado com norbixina ou bixina em diferentes concentrações.

Tanto norbixina e como bixina 1,0 mM foram preparadas como descrito nos itens 4.2.4 e 4.2.5, respectivamente. A partir da solução estoque de 1,0 mM, foram realizadas diluições em meio de cultura + 10 % SFB até as concentrações finais de: 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 e 0,01 mM.

Para os ensaios com o composto bixina, foi realizado um controle do solvente etanol nas concentrações mais altas empregadas nos ensaios. Desta forma, o etanol foi diluído até as concentrações finais de 5% (v/v) e 2,5% (v/v) em meio de cultura + 10% SFB.

As placas foram incubadas a 37° C e 5 % CO₂, por 24 e 48 horas. Após cada período, o meio de cultura foi removido, seguido de adição de 100 µL de meio de cultura fresco e 10 µL de solução de MTT (5 mg/ mL). As placas foram incubadas por 4 horas em estufa de CO₂, até a formação dos cristais de formazan no interior das células, visíveis ao microscópio. A seguir, os cristais de formazan foram solubilizados através da adição de 100 µL de DMSO, sendo que as placas foram mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz, por 1 hora, até a completa solubilização dos cristais. A seguir foi realizada leitura de absorbância a 570 nm, utilizando em leitor de microplaca. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada para cada concentração, baseando-se nas leituras de absorbância das amostras em relação ao controle (FRESHNEY, 2000).

4.2.7. Indução do sistema citocromo P450 por bixina e norbixina em linhagens de hepatoma humano

Para os ensaios de indução, as linhagens foram cultivadas em frascos de 75 cm² e após atingirem 70-80% de confluência foram tripsinizadas e a concentração celular ajustada para 10⁵ cél/ mL, em meio de cultura DMEM + 10% de soro fetal bovino. As células foram semeadas em placas de seis poços (2,0 mL de suspensão de células/ poço) e incubadas *overnight* a 37° C e 5% CO₂.

Após incubação, o meio de cultura foi removido e adicionado um volume de 2,0 mL de DMEM + 10% de soro fetal bovino suplementado com bixina ou norbixina. As concentrações de bixina e norbixina testadas nos ensaios de indução foram determinadas através dos ensaios de MTT, sendo empregadas concentrações abaixo do IC₅₀, índice de citotoxicidade que provoca a redução de 50% na viabilidade celular. Desta forma, foram testadas as concentrações finais de 0,1 mM; 0,05 mM e 0,01 mM, para ambos os compostos, preparados conforme descrito nos

itens 4.2.4 e 4.2.5. As placas foram incubadas a 37° C e 5% CO₂ por períodos de 24 e 48 horas. Para cada experimento, foi realizado um controle, com células não expostas aos compostos bixina e norbixina.

4.2.8. Determinação de atividade enzimática da CYP 2C9 por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Após o tratamento das linhagens celulares com bixina e norbixina, conforme item 4.2.7, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 1,0 mL de PBS.

O padrão de diclofenaco de sódio foi solubilizado em água destilada, seguido de diluição em meio DMEM + 10 % SFB até a concentração final de 0,3 mM (RODRIGUEZ-ANTONA et al., 2002) . Deste preparado, um volume de 1,0 mL foi transferido para cada um dos seis poços da placa de cultura celular.

Após adição do meio de cultura contendo diclofenaco de sódio, as placas foram novamente submetidas à incubação em estufa a 37° C e 5 % CO₂, por períodos de 1 hora e 24 horas. A seguir, o meio de cultura foi coletado, filtrado pelo sistema Millex[®] 0,45 µm e submetido à determinação de atividade enzimática por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Na análise cromatográfica foi utilizada a coluna Gemini C18 110A, 5µm, 250 x 4,6 mm. A fase móvel foi composta por uma mistura de acetonitrila/ metanol/ tetrahydrofurano/ água (22:10:3:65, v/v), além de fosfato de sódio dibásico dihidratado (4,5 g/L) e hidrogenofosfato de sódio (2,3 g/L). (DORADO et al., 2003). O fluxo foi ajustado em 1,0 mL/ min.

4.2.9. Análise de expressão das isoformas do sistema citocromo P450 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR)

A baixa expressão das isoformas do sistema citocromo P450 em linhagens de hepatoma humano, dificulta a detecção da atividade enzimática, motivo pelo qual se optou por avaliar a indução das CYPs através da análise de expressão gênica. Para tanto, foi empregada a técnica de transcrição reversa (RT) seguida de reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real.

4.2.9.1. Extração do RNA total

Após 24 e 48 horas de exposição à bixina e norbixina, células HepG2, C3A e SK-HEP-1 foram tripsinizadas e centrifugadas a 500 g por 4 min. O sobrenadante foi removido e as células lavadas com PBS. A extração do RNA total foi realizada, empregando o Kit Total RNA Isolation Nucleospin RNA II (Marcherey-Nagel), seguindo instruções do fabricante. Este kit emprega, para lise celular, tampão contendo tiocianato de guanidina e β -mercaptoetanol. Após extração do RNA, foi realizada a digestão do DNA, empregando enzima DNase (fornecida no kit), conforme instruções do fabricante.

O rendimento do RNA extraído foi avaliado por espectrofotometria no UV, utilizando o equipamento Nanodrop[®] Spectrophotometer modelo ND-1000 (Thermo Scientific) e o grau de pureza das amostras de RNA determinado pela relação $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$.

A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% – formaldeído, empregando como tampão de corrida MOPS pH 7,0 (MOPS 0,4 M; acetato de sódio 10 mM e EDTA 1 mM) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Como marcador de tamanho molecular de RNA foi utilizado RiboRuler High Range RNA ladder[™] (Fermentas). As amostras de RNA e o marcador foram preparados em solução contendo 95% de formamida, 0,025% de SDS, 0,025% de azul de bromofenol, 0,025% de xileno cianol, 0,025% brometo de etídio e EDTA 0,5 mM.

A eletroforese foi realizada a 100 V em cuba de eletroforese horizontal (Loccus Biotecnologia) e fonte modelo LPS – 300 V (Loccus Biotecnologia). As bandas foram visualizadas sob luz UV e documentadas em sistema de fotodocumentação de géis.

Foram obtidas amostras de RNA com alto grau de pureza, apresentando relação $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ em torno de 2,0 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A integridade do RNA extraído pode ser observada, por eletroforese em gel de agarose-formaldeído, através da visualização das bandas 18S e 28S (Figura 9).

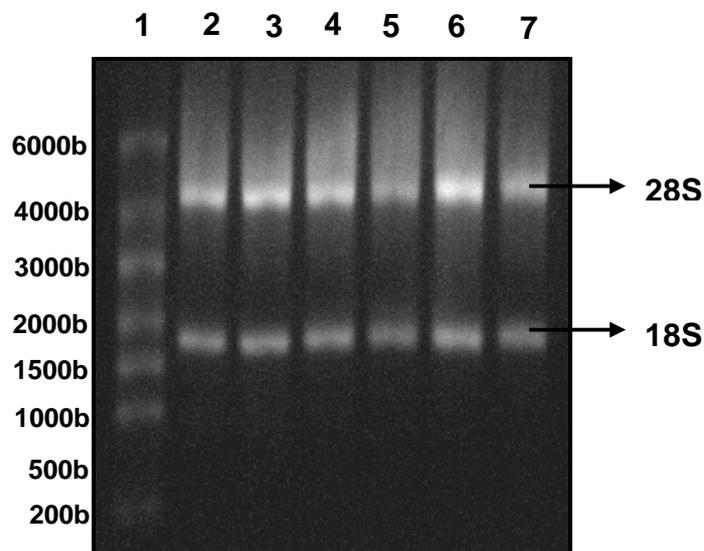


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose-formaldeído do RNA extraído de células HepG2 (Linhas 2 e 3); C3A (Linhas 4 e 5) e SK-HEP-1 (Linhas 6 e 7). Linha 1: Marcador de tamanho molecular.

4.2.9.2. Síntese de cDNA

1 μg de RNA total isolado das células foi empregado nas reações de transcrição reversa para obtenção de cDNA, empregando o kit Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas). Este kit consiste de tampão de reação, dNTPs, *primers* inespecíficos *random primers* e *oligo (dT)₁₈*, enzima transcriptase reversa e inibidor de RNase.

As reações foram realizadas em um volume total de 20 µL, em termociclador, nas seguintes condições: 10 minutos a 25°C (anelamento), 15 minutos a 50°C (extensão), 5 minutos a 85°C (inativação enzimática).

As amostras de cDNA obtidas foram tratadas com 1,0 µL de RNase H (5 unidades/ µL) (Fermentas), aquecidas a 37°C por 30 minutos, para digestão do RNA da reação, e a 72°C por 10 minutos, para inativação da RNase H. As amostras foram, então armazenadas à - 20°C para posterior análise.

4.2.9.3. Primers

Para amplificação dos genes alvos CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2B6, CYP 2C9, CYP 2E1, CYP 3A4 e do gene de expressão constitutiva HMBS, utilizado como controle endógeno, foram empregados *primers* previamente descritos na literatura (WILKENING; STAHL; BADER, 2003), sintetizados pela empresa Bioneer.

As seqüências dos *primers* empregados nos ensaios de RT-PCR, seus respectivos números de acesso no Banco de genes do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e tamanho esperado dos fragmentos gerados nas reações de PCR são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* empregados nas reações de RT-PCR

Gene	Número de acesso*	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do fragmento
<i>CYP 1A1</i>	NM_000499	5' TTC GTC CCC TTC ACC ATC 3' 5' CTG AAT TCC ACC CGT TGC 3'	302 bp
<i>CYP 1A2</i>	NM_000761	5' TCG TAA ACC AGT GGC AGG T3' 5' GGT CAG GTC GAC TTT CAC G3'	254 bp
<i>CYP 2B6</i>	NM_000767	5' ATG GGG CAC TGA AAA AGA CTG A 3' 5' AGA GGC GGG GAC ACT GAA TGA C 3'	283 bp
<i>CYP 2E1</i>	NM_000773	5' GAC TGT GGC CG ACCT GTT 3' 5' ACT ACG ACT GTC CCC TTG G 3'	297 bp
<i>CYP 2C9</i>	NM_000771	5' CTG GAT GAA GGT GGC AAT TT 3' 5' AGA TGG ATA CCC CAG AG 3'	308 bp
<i>CYP 3A4</i>	NM_001202855	5' ATT CAG CAA GAA GAA CAA GGA CA 3 5' TGG TGT TCT CAG GCA CAG AT 3'	314 bp
HMBS	NM_000190	5' TTC GCT GCA TCG CTG AAA 3' 5' TGC CCC ACA AAC CAG TTA AT 3'	368 bp

* Banco de genes do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

4.2.9.4. Ensaio de PCR convencional

As reações de PCR foram realizadas empregando o kit DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Fermentas), seguindo instruções do fabricante. O kit consiste de uma solução duas vezes concentrada de Taq DNA polimerase, dNTPs, e corante DreamTaq™ Green buffer.

Em um microtubo, em banho de gelo, foram adicionados 100 nM de cada um dos *primers forward* e *reverse*, 1,0 µL (50 ng) de amostra de cDNA molde e água livre de nuclease, completando o volume final da reação para 50 µL. As reações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: 3 minutos a 95 °C (desnaturação inicial); 35 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 60°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão); e 10 minutos a 72°C (extensão final).

Após o término da reação de PCR uma alíquota de 5,0 µL do produto da reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2,5% em tampão TBE 1X. A

eletroforese foi realizada a 100 V em cuba de eletroforese horizontal (Loccus Biotecnologia) e fonte modelo LPS – 300 V (Loccus Biotecnologia). Como marcador de peso molecular foi empregado PCR Low Ladder 20bp (Sigma) diluído em solução tampão contendo 0,05% de azul de bromofenol (Gel Loading Buffer – Sigma). Após o término da corrida, o gel foi corado em solução de brometo etídio 0,5 µg/mL, descorado em água destilada e em seguida visualizado sob luz UV.

4.2.9.5. Ensaio de PCR em tempo real

Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados empregando o sistema *SYBR Green*. O reagente SYBR Green é um corante que apresenta afinidade ao DNA dupla fita, emitindo fluorescência a 530 nm. Durante a reação de PCR, o SYBR Green se liga a cada nova cópia de DNA dupla fita gerada, resultando em aumento na intensidade de fluorescência proporcional à quantidade de produto formado. O sinal de fluorescência é então detectado, em tempo real, por um sistema de detecção (BUSTIN, 2000). Neste trabalho, as reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento ABI Prism[®] 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Os ensaios foram realizados em um volume total de 12 µL, empregando 9 µL da solução denominada Maxima[®] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 2 vezes concentrada (Fermentas), 600 nM do par de *primers* (*forward* e *reverse*) e 3 µL de cDNA diluído 15 vezes em água livre de nucleases. Os ensaios de amplificação foram realizados em duplicata e individualmente para cada *primer*. Além disso, para cada *primer*, foi realizado, em duplicata, um controle *NTC* (*No Template Control*), substituindo a amostra de cDNA por água livre de nucleases.

As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: 95 °C por 10 minutos (desnaturação inicial), seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão). Ao final de cada reação de amplificação foi adicionada uma etapa de dissociação. Na etapa dissociação, a temperatura é elevada gradativamente, sendo que ao atingir a temperatura de *melting*, específica para cada produto amplificado, ocorre

dissociação do *SYBR Green*, reduzindo o sinal de fluorescência, sendo geradas, pelo equipamento, curvas de dissociação. Desta forma, curvas de dissociação foram analisadas, para cada ensaio, como controle da especificidade da reação.

Os resultados, expressos em valores de C_T (ciclo *threshold*), correspondentes ao número de ciclos de PCR no qual a fluorescência ultrapassa o *threshold* (limiar de detecção dos sinais de fluorescência), foram empregados nos cálculos dos valores de expressão gênica pelo método C_T comparativo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.2.9.6. Determinação dos valores de expressão gênica pelo Método C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$)

O método C_T comparativo é um método de quantificação relativa, no qual é determinada a variação de expressão de um gene alvo em relação a uma referência (calibrador) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para a comparação dos valores de expressão de um gene alvo entre a amostra e o calibrador é necessário realizar a normalização dos dados, ou seja, a correção de possíveis variações da concentração de cDNA adicionado como molde na reação de PCR, podendo ocasionar distorções dos resultados. A normalização é realizada através de controles endógenos, ou seja, genes de expressão constitutiva, necessários para sobrevivência das células, cuja expressão gênica mantém-se estável mesmo quando submetidos a tratamento (PFAFFL; 2001).

Neste trabalho, foi empregado como controle endógeno o gene HMBS (hidroximetilbilano sintase). Este gene constitutivo foi citado na literatura como o controle endógeno mais apropriado em ensaios de RT-PCR quantitativo, empregando linhagens de hepatoma humano (CICINNATI et al.; 2008).

Para cada amostra de cDNA, foi realizada, em duplicata, uma reação para o gene alvo (*CYPs*) e outra para o controle endógeno (HMBS). Obtidos os valores de C_T para o gene alvo e controle endógeno, foi calculada a diferença de expressão gênica entre amostra e referência (calibrador), empregando a seguinte fórmula:

$$\text{Variação de expressão gênica} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

onde,

$$\Delta C_T = C_T \text{ gene alvo} - C_T \text{ controle endógeno}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ amostra} - \Delta C_T \text{ calibrador}$$

4.2.9.7. Determinação da eficiência da amplificação

Para que o método $\Delta\Delta C_T$ comparativo seja válido, é necessário que a eficiência de amplificação do gene alvo e do controle endógeno sejam aproximadamente iguais (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Desta forma, foram realizadas reações de PCR em tempo real empregando 600 nM de primers (alvos e controle endógeno) e, como molde, um *pool* de amostras de cDNA diluídas em série. Em função dos valores de ΔC_T (C_T gene alvo – C_T controle endógeno) e do logaritmo das diluições, foi realizada análise de regressão linear, obtendo-se o valor do coeficiente angular da reta (*slope*). Segundo Livak e Schmittgen (2001), a eficiência de amplificação entre os genes alvos e o controle endógeno é considerada semelhante quando o valor do *slope* é próximo de zero. Neste trabalho, foram obtidos valores de *slope* entre -0,1 e 0,1.

4.2.10. Análise de metabólitos do benzo[a]pireno por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS)

As linhagens de hepatoma humano induzidas foram avaliadas como modelo *in vitro*, em ensaios de análise de metabólitos do composto benzo[a]pireno (B[a]P).

Para tanto, as linhagens celulares foram tratadas com bixina 0,1 mM, conforme descrito no item 4.2.7. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS e adicionados 2,0 mL de meio de cultura DMEM + 10% SFB

+ B[a]P 50 μ M. Para preparação do padrão de B[a]P, foi empregado DMSO como solvente, obtendo uma solução estoque de 10 mM. A partir desta solução foram realizadas diluições seriadas em meio de cultura até a concentração final de 50 μ M (correspondente a 0,5% de DMSO).

As células foram expostas ao B[a]P por 24 horas e após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e realizada extração com acetato de etila, na proporção de 1:1. O solvente foi evaporado com auxílio de gás nitrogênio e o resíduo redissolvido em 100 μ L de acetonitrila e submetido à análise de metabólitos, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS).

O ensaio de LC-MS foi realizado na Central Analítica do Instituto de Química – USP. Foi empregado sistema de HPLC marca Shimadzu e coluna Gemini C18, 250 mm X 4,60 mm (5 μ m), marca Phenomenex. Para espectrometria de massa foi empregado o espectrômetro ESQUIRE 3000 Plus (Bruker Daltonics), equipado com fonte de electrospray (ESI), operando no modo negativo.

A fase móvel consistiu de: Fase A (acetato de amônio 20 mM/ acetonitrila; 95:5; v/v) e Fase B (acetonitrila). O fluxo foi ajustado em 1,0 mL/ min, e o seguinte gradiente foi empregado: 0 min, 0% Fase B; 35 min, 60% Fase B; 50-60 min, 100% Fase B, 65-70 min, 0% Fase B (JACQUES et al., 2010).

4.2.11. Análise de benzo[a]pireno em meio de cultura por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência (CLAE/FL)

Paralelamente aos ensaios de LC-MS foram realizadas análises de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência (CLAE/FL) para identificação do composto B[a]P em amostras de meio de cultura, antes e após incubação em linhagens de hepatoma humano, tratadas com bixina e sem tratamento. Estes ensaios foram realizados com o intuito de verificar a metabolização de B[a]P pelas linhagens celulares, através da comparação da área do pico do B[a]P entre as amostras.

Para tanto, células induzidas por bixina 0,1 mM foram expostas a B[a]P 50 μ M, preparado conforme descrito no item 4.2.10. Após incubação, o meio de cultura foi coletado e realizada extração com acetato de etila, seguido de evaporação, com auxílio de gás nitrogênio. O resíduo foi redissolvido em 1,0 mL de acetonitrila e submetido à análise por CLAE/FL. Neste ensaio foi empregado o equipamento HPLC Thermo SCM 1000 equipado com coluna Luna Phenil-Hexil 250 mm X 4,6 mm (5 μ m) marca Phenomenex, e detector de fluorescência Spectra System FL3000, nos seguintes comprimentos de onda $\lambda_{\text{excitação}} = 296$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 406$ nm. A fase móvel foi constituída de acetonitrila e água (85:15, v/v) e o fluxo foi ajustado em 0,5 mL/ min (TROCHE et al., 2000).

4.2.12. Teste de micronúcleos

Linhagens de hepatoma humano induzidas foram avaliadas como modelo *in vitro* em ensaio de mutagenicidade. Para tanto, foi realizado o Teste de micronúcleos, tendo como mutagênico padrão, o B[a]P.

As linhagens de hepatoma humano foram tratadas com bixina 0,1 mM conforme descrito no item 4.2.7, porém para este ensaio, foram utilizadas placas de 60 mm, sendo que a concentração celular foi ajustada para cerca de 1×10^6 células/placa.

Após tratamento com bixina, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com PBS e adicionados 4,0 mL de meio de cultura DMEM + 10% SFB, contendo B[a]P 50 μ M, preparado conforme item 4.2.10. A seguir, as células foram incubadas, em contato com o mutagênico padrão, por um curto período de exposição (6 horas), conforme uma das opções de protocolo proposto pela ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) para Teste de micronúcleos em células de mamífero (OECD, 2010). Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS e adicionado meio DMEM + 10% SFB contendo citocalasina B 3,0 μ g/mL.

Citocalasina B atua como um bloqueador de citocinese, levando à formação de células binucleadas (FENECH, 2000) e para que estas sejam detectadas, é recomendado que o período de incubação seja correspondente a 1,5 – 2,0 ciclos celulares (OECD, 2010). Baseado no ciclo celular da linhagem HepG2 que é de cerca de 20 - 24 horas (DARROUDI et al., 1996), o período de exposição à citocalasina foi estabelecido em 30 horas, para ambas as linhagens, HepG2 e C3A.

Após o período de incubação, o meio de cultura contendo citocalasina B foi removido, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em 2,5 mL de PBS. A esta suspensão foram adicionados lentamente, 2,5 mL de solução de fixação gelada (metanol / ácido acético, na proporção de 3:1) e mantida em banho de gelo por 10 minutos. A seguir, as células foram centrifugadas sob refrigeração a 4 °C por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi removido, mantendo apenas um volume de cerca de 0,5 mL. As células foram ressuspensas e adicionados, lentamente, 5,0 mL da solução de fixação. A suspensão foi mantida em banho de gelo por 10 minutos e a seguir, centrifugada a 4 °C por 5 minutos a 1000 rpm. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes (DORIS, 2006).

Após a última etapa da fixação, o sobrenadante foi aspirado até um volume de 0,5 mL no qual as células foram ressuspensas. Volumes de 30 µL foram transferidos para lâminas de microscopia e foram expostas ao ar para secagem, por cerca de 10 minutos. A seguir, as lâminas foram coradas com alaranjado de acridina (40 µg/ mL em PBS) por cerca de 2 minutos e enxaguadas com água destilada (HASHIZUME et al., 2009). A visualização das células foi realizada por meio de microscópio Laser Scan Microscopy, LSM 410 (Zeiss), empregando os filtros BP 505-550 (488 nm) e LP 570 (543 nm).

No teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese apenas as células binucleadas (células que completaram um ciclo celular) são consideradas na contagem de micronúcleos. Assim sendo, a avaliação da frequência de micronúcleos foi realizada em um total de 1000 células binucleadas, sendo adotados os critérios descritos por Fenech (2007) para contagem das binucleadas e identificação de micronúcleos.

4.3. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas empregando o programa Minitab versão 15. Os dados foram avaliados através da análise de variância One Way ANOVA, seguida de teste de Tukey. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da citotoxicidade de bixina e norbixina

Na primeira etapa deste trabalho, bixina e norbixina foram avaliadas em ensaios de MTT, com a finalidade de determinar concentrações seguras, não citotóxicas, para serem empregadas nos ensaios de indução do sistema citocromo P450.

O ensaio de MTT consiste na redução de sais de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), resultando na formação de formazan, um precipitado de cor púrpura no interior das células, que pode ser solubilizado e quantificado por espectrofotometria. Sais de tetrazólio são reduzidos na mitocôndria, por ação de enzimas desidrogenases e, portanto esta reação ocorre apenas em células metabolicamente ativas. Desta forma, o Teste de MTT permite avaliar a viabilidade e proliferação celulares, sendo a quantidade de formazan produzido proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

A Figura 10 ilustra a variação da intensidade de coloração observada no teste de MTT em células expostas ao composto bixina em concentrações entre 0,01 e 0,5 mM e ao solvente (etanol). Nesta figura observamos que a coloração, ou seja, a quantidade de formazan produzido foi mais intensa nos poços contendo células tratadas com bixina nas concentrações de 0,01 mM a 0,1 mM, nos controles do solvente etanol e em células sem tratamento. Porém, nos poços contendo bixina 0,25 mM e 0,5 mM houve uma queda na intensidade da coloração.

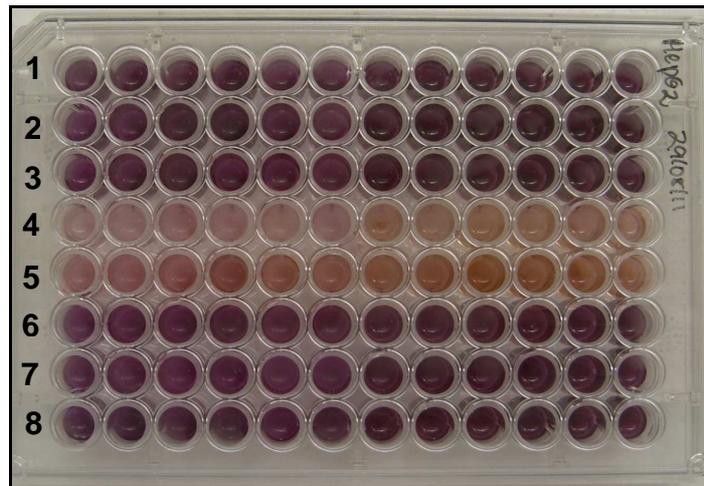


Figura 10. Placa de 96 poços empregada no Teste de MTT realizado com o composto bixina por 48 h de exposição, indicando variações na intensidade de coloração, devido a diferenças na metabolização do reagente de MTT pela linhagem HepG2. As células foram expostas à bixina 0,01 mM (Linha 1); bixina 0,05 mM (Linha 2); bixina 0,1 mM (Linha 3); bixina 0,25 mM (Linha 4); bixina 0,5 mM (Linha 5); Etanol 5% (Linha 6); Etanol 2,5% (Linha 7) e Controle (Linha 8)

Com base nas leituras de absorbância, obtidas nos ensaios de MTT, foi possível obter curvas de viabilidade celular em função da concentração de bixina como mostra a Figura 11.

Após 24 horas de tratamento com bixina, a viabilidade celular permaneceu elevada (entre 100% e 90%) nas concentrações entre 0,01 mM e 0,1 mM, em todas as linhagens testadas. Nas linhagens HepG2 (Figura 11A) e C3A (Figura 11B), ocorreu queda da viabilidade, para 44% e 51%, respectivamente, na concentração de 0,25 mM de bixina. Porém, na concentração de 0,5 mM não foi observada redução da viabilidade, que permaneceu constante. Na linhagem SK-HEP-1 (Figura 11C) a viabilidade celular permaneceu acima de 50% em todas as concentrações testadas.

Após 48 horas de tratamento, observou-se resposta semelhante à obtida em 24 horas de exposição à bixina, nas linhagens HepG2 e C3A: viabilidade elevada, variando entre 100% e 80%, até a concentração de 0,1 mM, com redução para cerca de 40%, nas concentrações entre 0,25 mM e 0,5 mM. Porém, na linhagem SK-HEP-1, a Figura 11C mostra que, bixina provocou redução da viabilidade celular para 53% já na concentração de 0,1 mM.

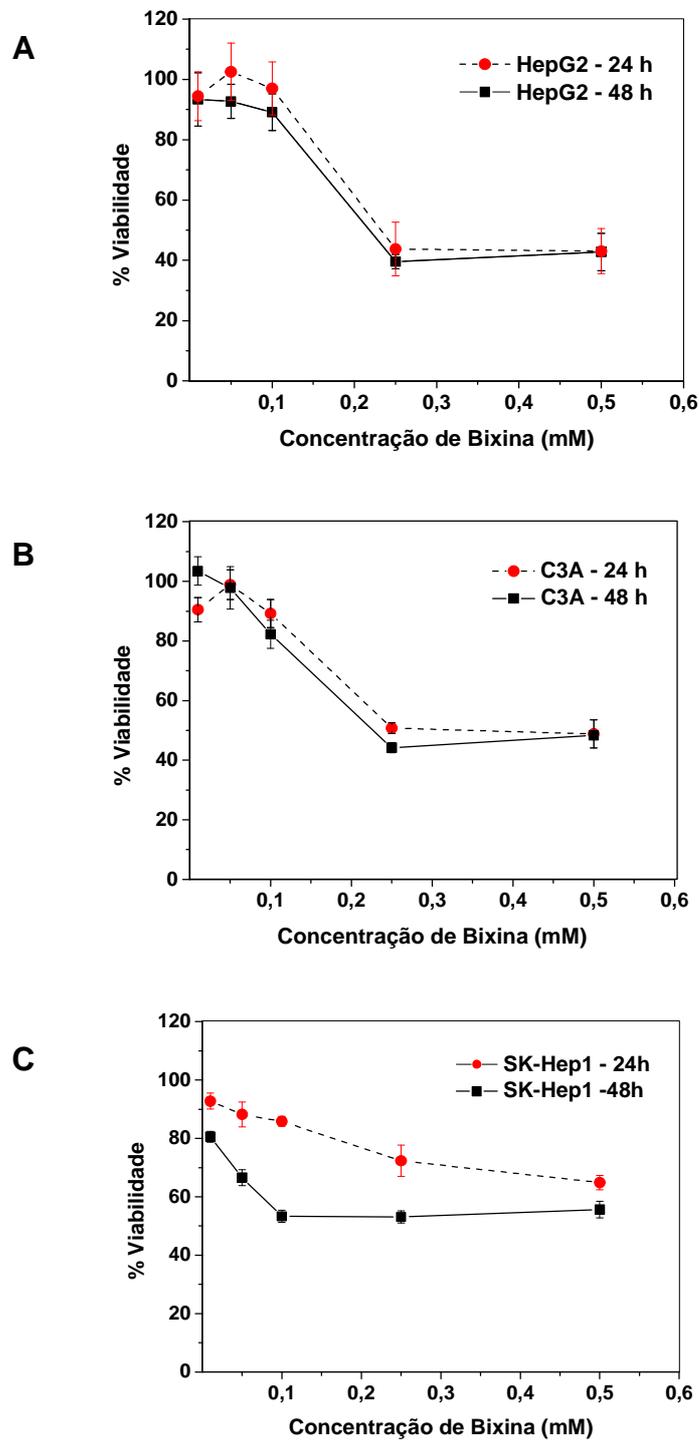


Figura 11. Curvas de viabilidade celular das linhagens (A) HepG2, (B) C3A e (C) SK-HEP-1 tratadas com bixina por períodos de exposição de 24 e 48 horas.

Com base nas curvas de viabilidade celular, foi possível determinar o IC50 do composto bixina, ou seja, a concentração que provoca a redução de 50% na viabilidade celular, como mostra a Tabela 2. Estes valores foram calculados com base nos resultados obtidos em linhagens HepG2 e C3A, uma vez que na linhagem SK-HEP-1, a viabilidade se manteve acima de 50% em todas as concentrações e tempos de exposição avaliados (Figura 11C). Observa-se, através da Tabela 2 que, em média, o valor de IC50 foi de 0,24 mM em 24 horas de tratamento, e 0,22 mM em 48 horas, indicando que o maior tempo de exposição à bixina não provocou aumento de citotoxicidade, nas linhagens avaliadas.

Tabela 2. Valores de índice de citotoxicidade 50% (IC50) de bixina em linhagens HepG2 e C3A.

Linhagem celular	IC50 de bixina (mM)	
	24 horas*	48 horas*
HepG2	0,23	0,22
C3A	0,25	0,23
Média	0,24	0,22

*Tempos de exposição à bixina no teste de MTT

Paralelamente aos ensaios de MTT com bixina, foi avaliada a citotoxicidade do etanol, o solvente empregado na sua preparação. Foram testadas as concentrações mais altas empregadas nos ensaios, ou seja, 2,5% (v/v) e 5% (v/v), correspondentes às concentrações de bixina de 0,25 mM e 0,5 mM, respectivamente. A Figura 12 mostra que a interação com etanol 2,5% (v/v) e 5% (v/v), por períodos de 24 e 48 horas, não interferiu na viabilidade celular que se manteve elevada (acima de 75%) nas linhagens HepG2, C3A e SK-HEP-1.

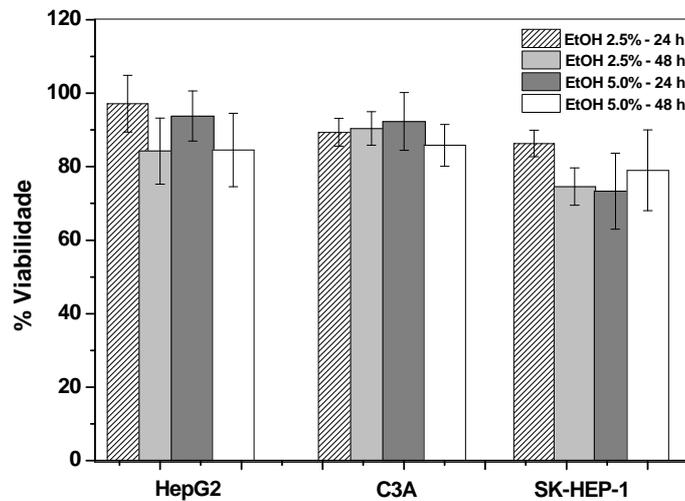


Figura 12. Viabilidade celular das linhagens HepG2, C3A e SK-HEP-1 tratadas com solvente etanol 2,5% (v/v) e 5,0% (v/v), por 24 e 48 horas de incubação.

A citotoxicidade de norbixina foi também avaliada através do Teste de MTT. Podemos observar, através do perfil das curvas obtidas em ensaios realizados nas linhagens HepG2, C3A e SK-HEP-1 (Figura 13), que a viabilidade celular reduziu gradativamente com aumento da concentração de norbixina. Em norbixina 0,01 mM, todas as linhagens apresentaram viabilidade celular em torno de 100%, sendo que, na concentração de 0,5 mM, este composto apresentou elevada citotoxicidade, reduzindo a viabilidade para cerca de 5%, nas linhagens HepG2 e C3A, e 15% na linhagem SK-HEP-1, em 24 horas de exposição. Em 48 horas de tratamento, norbixina 0,5 mM provocou queda de viabilidade para cerca de 5% nas linhagens C3A e SK-HEP-1, sendo que na linhagem HepG2, levou à quase total morte celular (1% de viabilidade).

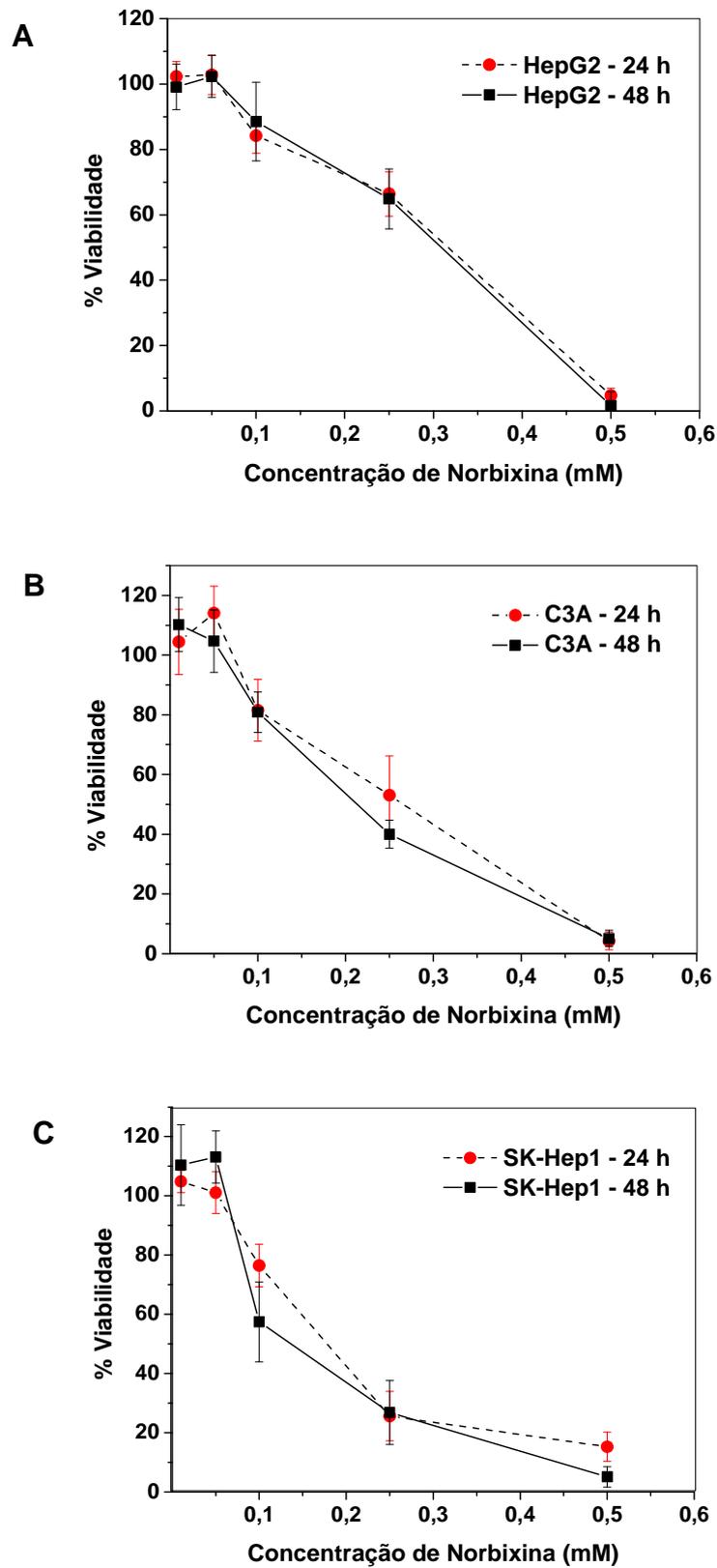


Figura 13. Curvas de viabilidade celular das linhagens (A) HepG2, (B) C3A e (C) SK-HEP-1 tratadas com norbixina por períodos de exposição de 24 e 48 horas.

Valores de IC50 foram também determinados para o composto norbixina, como mostra a Tabela 3. Observa-se que a linhagem SK-HEP-1 apresentou maior sensibilidade ao composto, com valores de IC50 de 0,17 e 0,13 mM, em 24 e 28 horas de exposição, respectivamente. Por outro lado, a linhagem HepG2 se mostrou mais resistente ao tratamento com norbixina, com valores de IC50 mais elevados. Porém, em média o IC50 de norbixina foi de 0,26 mM e 0,22 mM, em 24 e 48 horas de exposição, respectivamente.

Tabela 3. Valores de índice de citotoxicidade 50% (IC50) de norbixina em linhagens HepG2, C3A e SK-HEP-1

Linhagem Celular	IC50 de norbixina (mM)	
	24horas*	48horas*
HepG2	0,32	0,31
C3A	0,28	0,22
SK-HEP-1	0,17	0,13
Média	0,26	0,22

*Tempos de exposição à norbixina no teste de MTT

Os resultados obtidos através dos ensaios de MTT mostraram que bixina e norbixina apresentam valores de IC50 muito próximos, sendo que, para ambos os compostos, concentrações abaixo de 0,22 mM são seguras quanto à citotoxicidade. Apesar da semelhança nos valores de IC50, as curvas de viabilidade celular de bixina (Figura 11) e norbixina (Figura 13) mostraram perfis muito diferentes. Essa diferença pode estar relacionada aos mecanismos de entrada através da membrana celular.

No caso da norbixina, fração solúvel do anato, estas pequenas moléculas atravessam os poros da membrana celular, sendo que com aumento da concentração e, portanto, da entrada deste composto nas células, observa-se uma maior citotoxicidade (Figura 13). Por outro lado, os resultados obtidos com o

composto bixina (Figura 11) mostram que a citotoxicidade a partir de 0,25 mM não é dependente da concentração deste composto, ou seja, a partir desta concentração a viabilidade permanece constante, sem que ocorra quase 100% de morte celular como foi observado em norbixina (Figura 13). Conforme descrito no item 4.2.5, a preparação de bixina, fração lipossolúvel do anato, foi realizada de forma a obter vesículas ou lipossomos, tornando possível sua solubilização e, portanto, o emprego deste composto no presente trabalho. Estando a bixina, na forma de lipossomos, sua passagem através da célula, não ocorre através dos poros, como é o caso da norbixina. Ao contrário, sua entrada depende da interação entre as vesículas de bixina e a membrana celular, para que então ocorra a liberação das moléculas de bixina no interior da célula.

Poucos trabalhos relacionados à toxicidade de norbixina e bixina foram relatados, sendo que em geral tratam-se de ensaios *in vivo* empregando a mistura anato e não frações isoladas de bixina e norbixina. Estes trabalhos demonstraram ausência de efeitos toxicológicos em ratos tratados com anato (HAGIWARA et al., 2003; PAUMGARTTEN et al., 2002). Além destes trabalhos, Bautista et al. (2004) realizaram ensaios de toxicidade *in vivo* com a fração bixina, sendo que nenhum efeito toxicológico foi observado.

Os ensaios de toxicidade *in vitro* com o composto norbixina apresentados, neste trabalho, são inéditos. Porém, com relação à fração bixina, foi encontrado na literatura apenas o trabalho de Reddy; Alexander-Lindo e Nair (2005), em que diferentes linhagens celulares foram submetidas a ensaios de MTT, para determinação do IC50. Os valores de IC50 obtidos por estes autores, entre 0,08 mM e 0,12 mM em 48 horas de tratamento, foram menores que aqueles obtidos por nosso grupo (0,22 mM). Esta diferença pode ser atribuída à forma de preparação da bixina, isto é, Reddy, Alexander-Lindo e Nair (2005) realizaram a extração deste composto empregando solventes tóxicos como o clorofórmio, além de dissolver bixina em DMSO antes de sua diluição final em meio de cultura e nosso grupo preparou bixina em etanol, um solvente de baixa toxicidade, sendo que os ensaios de MTT demonstraram que o etanol, nas concentrações empregadas, não interfere na viabilidade celular (Figura 12). Assim, as diferenças observadas entre os nossos resultados e de Reddy, Alexander-Lindo e Nair (2005) se devem aos tipos de

formulação de bixina, sendo que a preparação lipossomal, empregada neste trabalho mostrou ser mais adequada e com baixa citotoxicidade

5.2. Avaliação da indução do sistema citocromo P450 por bixina e norbixina em linhagens de hepatoma humano

Após tratamento das linhagens HepG2, C3A e SK-HEP-1, com os compostos bixina e norbixina, nas concentrações e tempos de exposição definidos através do teste de MTT, foram realizados ensaios para avaliar a indução das isoformas *CYP* 1A1, *CYP* 1A2, *CYP* 2B6, *CYP* 2C9, *CYP* 2E1 e *CYP* 3A4. Essas isoformas foram selecionadas para este estudo por fazerem parte do grupo de enzimas que participam da metabolização de xenobióticos, sendo comumente expressas em tecidos hepáticos humanos (FURGE; GUENGERICH, 2006).

5.2.1. Avaliação da atividade enzimática da *CYP* 2C9 por método cromatográfico

Os primeiros ensaios para avaliação da indução das CYPs foram realizados por métodos físico-químicos, ou seja, através da medida de atividade enzimática. Inicialmente, tentou-se medir a atividade da *CYP* 2C9, em células HepG2, empregando o diclofenaco, como marcador de atividade desta isoforma (LUTZ; MARKLING; MASIMIREMBWA, 2002; DORADO et al., 2003). Em humanos, o principal metabólito do diclofenaco é o 4-hidroxi-diclofenaco, sendo também formados em menor extensão, os metabólitos secundários 3-hidroxi-diclofenaco e 5-hidroxi-diclofenaco. A principal enzima responsável pela 3-hidroxilação e 4-hidroxilação do diclofenaco é a *CYP* 2C9 (DORADO et al., 2003). Desta forma, a atividade enzimática da *CYP* 2C9 pode ser avaliada, medindo-se a quantidade formada de metabólito principal (4-hidroxi-diclofenaco), após tratamento com o substrato específico (diclofenaco).

A determinação de atividade da CYP 2C9 foi realizada em meio de cultura coletado de células HepG2 tratadas, por 24 horas, com norbixina nas concentrações de 0,01 mM e 0,05 mM, seguido de exposição ao diclofenaco por um período de 1 hora. A Figura 14A mostra o cromatograma, obtido por CLAE, do meio de cultura (DMEM + 10% SFB), apresentando picos nos tempos de retenção entre 2 e 6 minutos. A Figura 14B mostra o cromatograma deste mesmo meio de cultura, contendo diclofenaco de sódio 0,3 mM, antes da incubação em células HepG2, sendo que o tempo de retenção do diclofenaco foi de 36 minutos. Observa-se que após incubação do meio de cultura + diclofenaco de sódio 0,3 mM em células tratadas com norbixina 0,01 mM (Figura 14C) e sem tratamento (Figura 14D), nenhum outro pico foi observado além daqueles correspondentes ao diclofenaco e ao meio de cultura. Esses resultados mostraram que, o metabólito principal (4-OH-diclofenaco) bem como os metabólitos secundários do diclofenaco de sódio não foram detectados por CLAE, tanto em células tratadas com norbixina quanto em células sem tratamento.

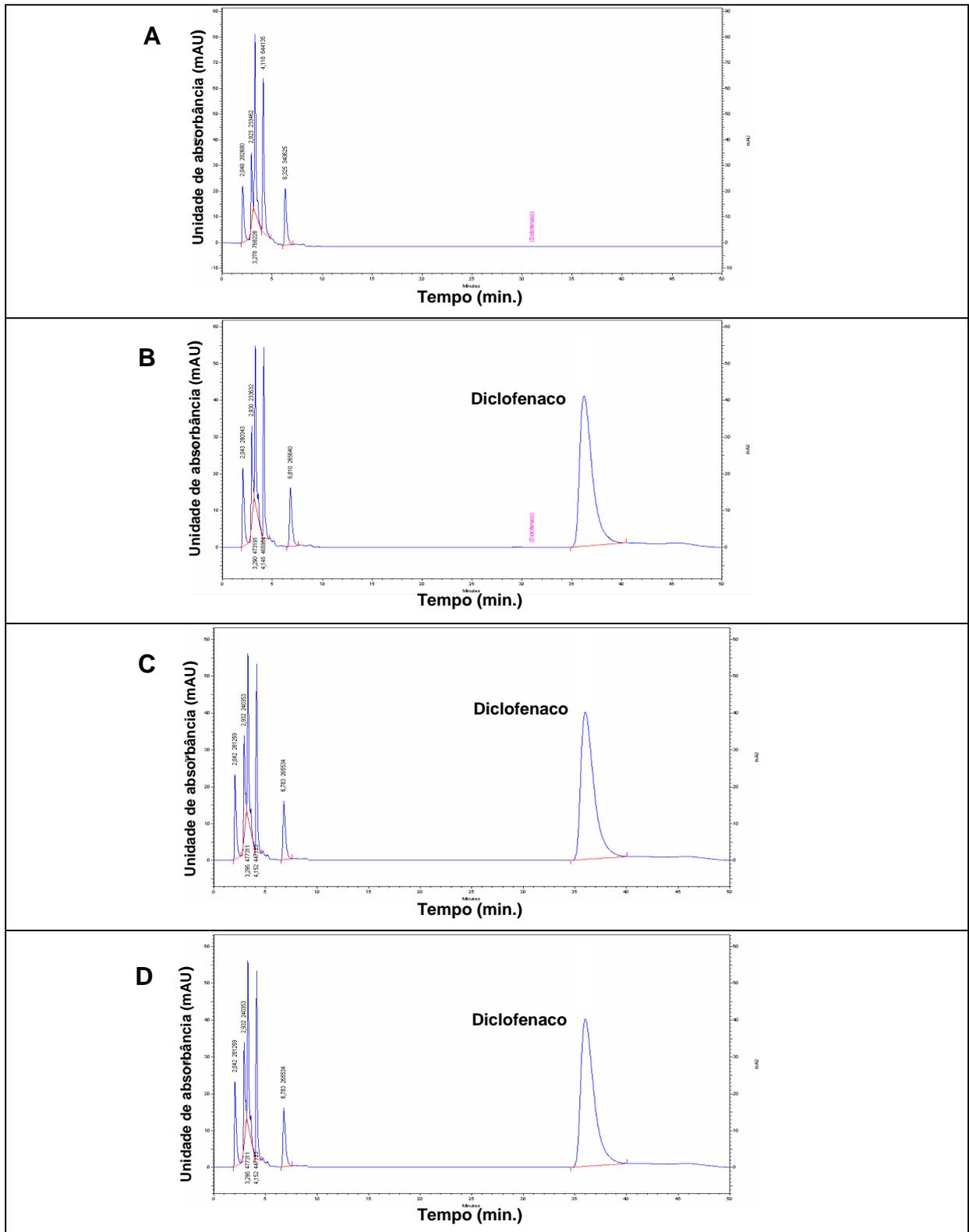


Figura 14. Cromatograma obtido por CLAE de: (A) Meio de cultura; (B) meio de cultura + diclofenaco de sódio 0,3 mM, antes da incubação; (C) meio de cultura + diclofenaco de sódio 0,3 mM, após 1 h de incubação em células HepG2 tratadas com norbixina 0,01 mM; (D) meio de cultura + diclofenaco de sódio 0,3 mM, após 1 hora de incubação em células HepG2 sem tratamento.

A seguir, foram realizados ensaios empregando norbixina, em concentração mais alta (0,1 mM) e tempo de exposição ao diclofenaco de sódio de 24 horas. Além destes, foram também realizados experimentos em células tratadas com bixina na concentração de 0,1 mM. Porém, assim como ocorreu em ensaios anteriores, os metabólitos do diclofenaco não foram detectados por CLAE.

Mesmo não detectando nenhum metabólito, esperava-se observar uma redução da área do pico do diclofenaco, indicando que este substrato foi biotransformado pelas células. Entretanto, comparando-se as áreas dos picos correspondentes ao diclofenaco, antes e após incubação, não são observadas variações (Tabelas 4 e 5), indicando que este substrato foi pouco ou até mesmo não metabolizado pelas células. Estes resultados, portanto, sugeriram a baixa atividade enzimática da CYP 2C9 em células HepG2, mesmo após tratamento com os compostos norbixina e bixina.

Tabela 4. Área do pico de diclofenaco de sódio 0,3mM obtido por CLAE, após incubação por 1 hora em células HepG2 tratadas com norbixina em diferentes concentrações e sem tratamento.

Tratamento	Área do pico
Norbixina 0,01 mM	3,6E+6
Norbixina 0,05 mM	3,5E+6
Sem tratamento	3,5E+6
Controle*	3,6E+6

* Meio de cultura + diclofenaco de sódio 0,3 mM (antes da incubação)

Tabela 5. Área do pico de diclofenaco de sódio 0,3mM obtido por CLAE após incubação por 24 horas em células HepG2 tratadas com norbixina e bixina, e sem tratamento.

Tratamento	Área
Norbixina 0,05 mM	4,7E+6
Norbixina 0,1 mM	4,8E+6
Bixina 0,1 mM	4,5E+6
Sem tratamento	4,8E+6
Controle*	4,8E+6

* Meio de cultura + diclofenaco de sódio 0,3 mM
(antes da incubação)

Ensaio físico-químico apresenta como vantagem a detecção de variações da atividade no metabolismo de fármacos (HEWITT; LECLUYSE; FERGUSON, 2007), porém têm sido empregados principalmente para amostras com níveis enzimáticos elevados.

Pesquisadores têm utilizado homogenato de fígado de animais (BURKE; MAYER, 1974) e de humanos (PEARCE et al., 1996), cultura primária de hepatócitos (DONATO; GOMEZ-LECHÓN; CASTELL, 1993; MEUNIER et al., 2000) e outras amostras com elevado nível das enzimas do sistema citocromo P450, para medir atividade enzimática, porém, poucos trabalhos citam o emprego de linhagens celulares, em ensaios físico-químicos, sendo que, quando empregadas, níveis muito baixos ou nenhuma atividade é detectada (RODRIGUEZ-ANTONA et al., 2002).

Desta forma, buscou-se outro método para avaliação da indução do sistema citocromo P450. Além dos métodos físico-químicos de medida de atividade enzimática, através de técnicas como fluorimetria (BURKE; MAYER, 1974) e CLAE (PEARCE et al., 1996; LUTZ; MARKLING; MASIMIREMBWA, 2002), são também citados na literatura, a análise de expressão gênica, através da técnica de transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR) (PELKONEN; RAUNIO, 1997) e imunoenaios (Western Blot). Neste trabalho, optou-se pela realização de ensaios de análise de expressão gênica, através da técnica de RT-PCR em tempo real.

5.2.2. Análise de expressão das isoformas do sistema citocromo P450 por transcrição reversa seguido de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Atualmente, PCR em tempo real é considerado um método altamente sensível para quantificação de RNAs pouco abundantes, além de permitir a detecção de pequenas variações na expressão gênica (PFAFFL, 2001). Embora a modulação de muitas enzimas ocorra a nível pós-transcricional, uma alteração na transcrição de RNA fornece fortes evidências de mudanças no nível da respectiva proteína. Assim sendo, se o RNA não for transcrito, a enzima não será sintetizada, e ao contrário, uma indução da expressão gênica representa um aumento da síntese protéica (WILKENING; STAHL; BADER, 2003).

Os ensaios de RT-PCR realizados neste trabalho permitiram detectar todas as CYPs investigadas em células HepG2, C3A e SK-HEP-1 (Figuras 15 e 16), inclusive a CYP 2C9, cujo metabólito não foi detectado nos ensaios de medida de atividade enzimática. Além disso, a eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos de amplificação (Figuras 15 e 16) mostra que foram gerados fragmentos de tamanhos correspondentes ao esperado (Tabela 1), confirmando a especificidade dos *primers*, empregados nas reações de amplificação.

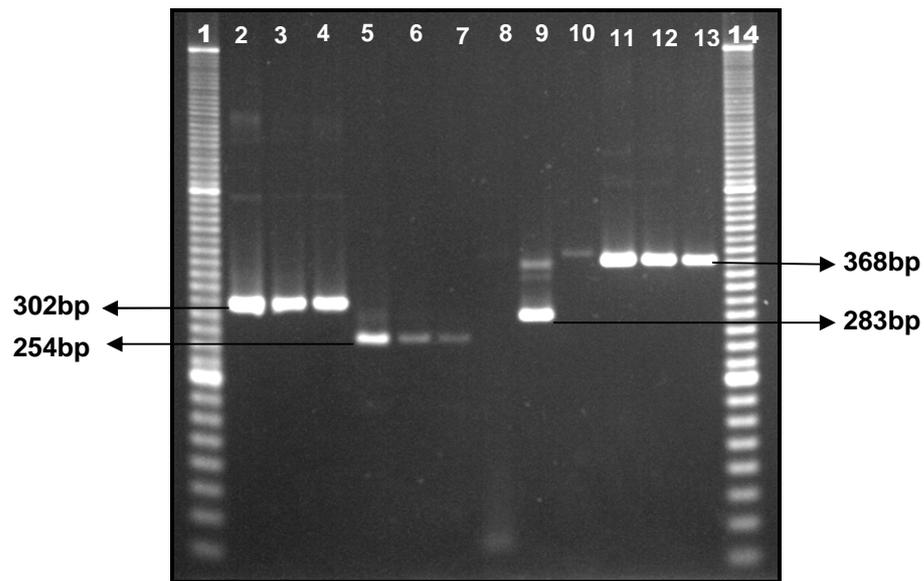


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos de RT-PCR. Linhas 1 e 14: Marcador de tamanho molecular PCR Low Ladder 20bp. Linhas 2 a 4: produtos de amplificação do gene CYP1A1 de células HepG2 (2), C3A (3) e SK-HEP-1 (4). Linhas 5 a 7: produtos de amplificação do gene CYP1A2 de células HepG2 (5), C3A (6) e SK-HEP-1 (7). Linhas 8 a 10: produtos de amplificação do gene CYP2B6 de células HepG2 (8), C3A (9), SK-HEP-1 (10). Linhas 11 a 13: produtos de amplificação do gene constitutivo HMBS de células HepG2 (11), C3A (12) e SK-HEP-1 (13).

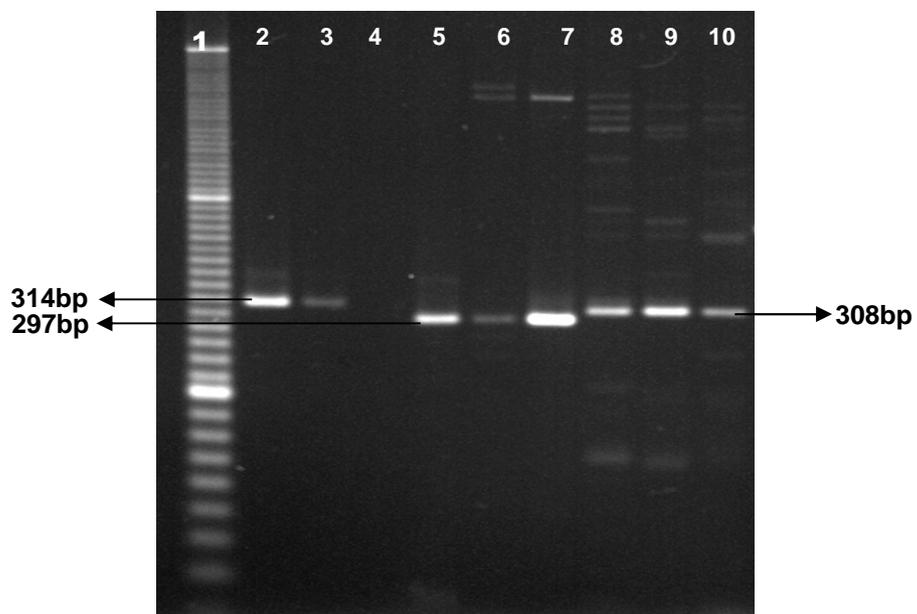


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos de RT-PCR. Linha 1: Marcador de tamanho molecular PCR Low Ladder 20bp. Linhas 2 a 4: produtos de amplificação do gene CYP3A4 de células HepG2 (2), C3A (3) e SK-HEP-1 (4). Linhas 5 a 7: produtos de amplificação do gene CYP2E1 de células HepG2 (5), C3A (6) e SK-HEP-1 (7). Linhas 8 a 10: produtos de amplificação do gene CYP2C9 de células HepG2 (8), C3A (9), SK-HEP-1 (10).

Através dos ensaios de RT-PCR foi possível avaliar e comparar a expressão das diferentes isoformas, nas linhagens HepG2, C3A e SK-HEP-1, sendo que em alguns casos, a expressão das CYPs não foi observada. Os resultados obtidos nestes ensaios foram comparados com os de diversos autores, como mostram as Tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6. Comparação dos resultados da análise de expressão de CYPs, na linhagem HepG2, obtidos neste trabalho e por outros autores.

CYP	1A1	1A2	2E1	2B6	2C9	3A4
Resultados*	+	+	+	-	+	+
Maruyama et al. (2007)	-	+	+	+	+	+
Wilkening; Stahl e Bader (2003)	+	+	+	+	+	-
Guo et al. (2011)	+	-	-	-	-	-

+ Expressão detectada

- Expressão não detectada

* Resultados obtidos neste trabalho

Tabela 7. Comparação dos resultados da análise de expressão de CYPs, na linhagem C3A, obtidos neste trabalho e por outros autores.

CYP	1A1	1A2	2E1	2B6	2C9	3A4
Resultados*	+	+	+	+	+	+
Elkayam et al. (2006)	**	+	**	**	**	+

+ Expressão detectada

** Isoforma não avaliada

* Resultados obtidos neste trabalho

Tabela 8. Comparação dos resultados da análise de expressão de CYPs, na linhagem SK-HEP-1, obtidos neste trabalho e por outros autores.

CYP	1A1	1A2	2E1	2B6	2C9	3A4
Resultados*	+	+	+	-	+	-
Guo et al. (2011)	-	-	+	-	-	-

+ Expressão detectada

- Expressão não detectada

* Resultados obtidos neste trabalho

Apenas um trabalho foi encontrado na literatura demonstrando a expressão das CYPs em células C3A (Tabela 8) e SK-HEP-1 (Tabela 9), porém quanto à linhagem HepG2, muitos trabalhos têm sido descritos, sendo encontradas discrepâncias entre os resultados de diversos autores (Tabela 7). Pesquisadores têm associado essas discrepâncias a variações na composição do meio de cultura e nas condições de cultivo das linhagens celulares, que podem exercer grande influência nos níveis das CYPs (BRANDON et al., 2003; MARUYAMA et al., 2007).

Os resultados da análise de expressão gênica realizada em células HepG2, C3A e SK-HEP-1, refletem as diferentes origens destas linhagens, bem como diferenças nos níveis de preservação das funções hepáticas. HepG2 é uma linhagem celular do tipo epitelial, capaz de produzir e secretar muitas das proteínas plasmáticas típicas do fígado humano saudável, mantendo, desta forma, diversas funções hepáticas, o que justifica seu amplo uso como modelo *in vitro* em estudos de toxicidade e metabolismo de fármacos (KNASMÜLLER, et al., 1998; GUO et al., 2011).

A linhagem C3A é um clone derivado de HepG2, que apresenta elevada produção de albumina e alfa fetoproteína (informações do catálogo do fornecedor – ATCC), produtos específicos do fígado. Devido ao fato de manter preservadas muitas das funções hepáticas específicas, esta linhagem tem sido estudada como uma opção no suporte de pacientes com falência hepática, através de seu emprego em sistemas de fígado artificial (FILIPPI, et al., 2004).

A linhagem SK-HEP-1 foi descrita por Heffelfinger et al. (1992) como sendo de origem endotelial, ao contrário de HepG2 e seu clone C3A, sendo que foi observada, nestas células, ausência de produção de proteínas específicas do fígado (albumina e alfa fetoproteína).

Os resultados obtidos neste trabalho, mostraram que, apesar da linhagem HepG2 ser a mais amplamente empregada em ensaios *in vitro* de biotransformação e toxicidade de fármacos, o seu clone, a linhagem C3A, foi a única que expressou todas as CYPs investigadas (Tabela 7). Por outro lado, a linhagem SK-HEP-1 expressou menor número de enzimas do sistema citocromo P450 (Tabela 8).

Após a realização destes ensaios, prosseguiu-se com o estudo quantitativo da expressão das CYPs, através da técnica de PCR em tempo real, para avaliação da indução das enzimas do sistema citocromo P450 por bixina e norbixina.

A análise de expressão das CYPs foi inicialmente realizada em células HepG2 tratadas com norbixina nas concentrações de 0,01; 0,05 e 0,1 mM. Os resultados obtidos nestes experimentos (Figura 17) mostram que o composto norbixina, nas concentrações e tempos de exposição avaliados, não provocou aumento de expressão das isoformas estudadas, uma vez que, através da análise de variância (One Way ANOVA), não foi observada diferença significativa entre as amostras tratadas com norbixina e sem tratamento. A CYP 2B6, que não havia sido detectada em células HepG2, na eletroforese em gel de agarose (Figura 15), também não foi detectada por PCR em tempo real, mesmo após tratamento com norbixina.

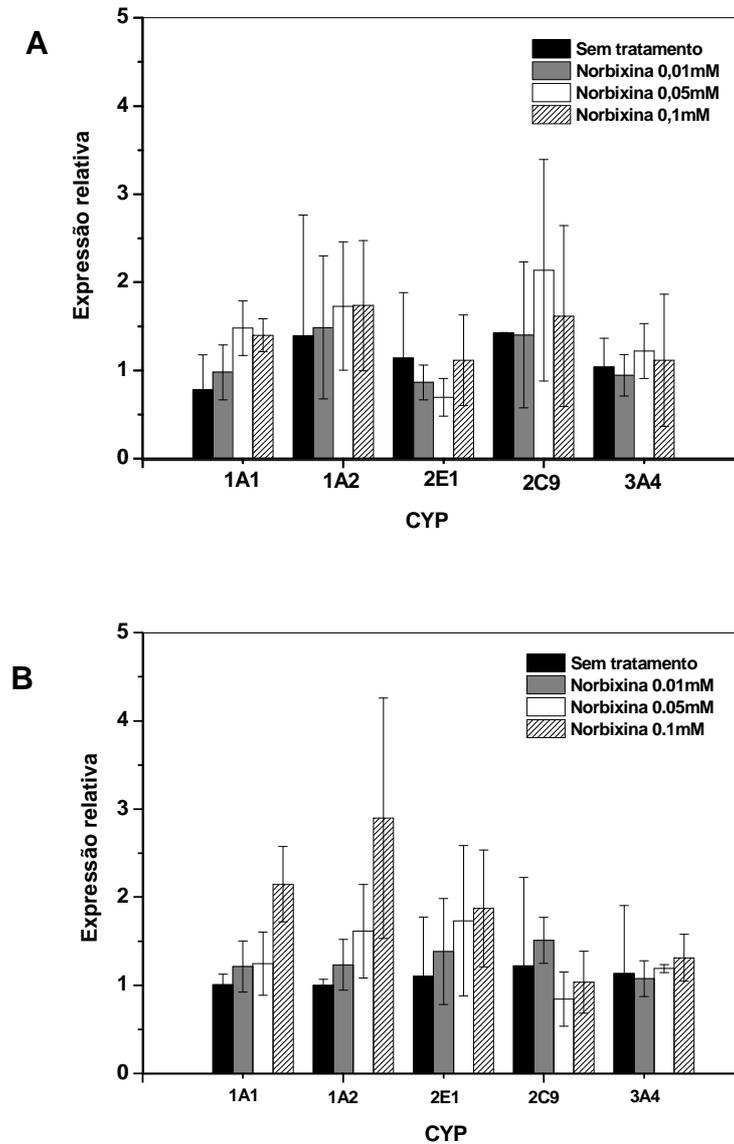


Figura 17. Análise de expressão gênica de CYPs em células HepG2 submetidas a tratamento com diferentes concentrações de norbixina por (A) 24 horas e (B) 48 horas. Os níveis de expressão relativos foram normalizados pelo controle endógeno HMBS, tendo como amostra calibradora, células sem tratamento.

A linhagem HepG2 foi a seguir tratada com bixina nas mesmas concentrações e tempos de exposição do composto norbixina. Na concentração de 0,01 mM nenhum efeito indutor foi observado, porém nas concentrações de 0,05 mM e 0,1 mM foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) de expressão das CYPs 1A1 e 1A2, em 24 e 48 horas de exposição. As demais isoformas não apresentaram diferença significativa entre os níveis de expressão medidos antes e após tratamento com este composto (Figura 18).

Comparando-se a indução observada na CYP 1A1 (Figura 18), nas concentrações de 0,05 mM e 0,1 mM de bixina, observa-se que o efeito indutor foi mais intenso em 0,1 mM, com aumento de expressão de 60 e 25 vezes após 24 e 48 horas de exposição, respectivamente. Em 0,05 mM, o aumento de expressão foi de apenas 6 e 10 vezes após 24 e 48 horas, respectivamente. Quanto ao tempo de exposição ao composto bixina, o aumento do tempo de 24 para 48 horas não levou a uma maior expressão desta CYP, ao contrário, observou-se uma redução no valor de expressão.

Bixina apresentou também um leve efeito indutor sobre a CYP1A2 (Figura 18). Na concentração de 0,05 mM, observou-se um aumento de expressão de 3,5 e 6 vezes, em 24 e 48 horas de exposição, respectivamente. Em 0,1 mM, houve aumento de expressão de 10 vezes em ambos os tempos de exposição. Quanto ao tempo de exposição, assim como foi observado na CYP 1A1, o maior tempo de tratamento (48 horas) não levou a um aumento de expressão da CYP 1A2.

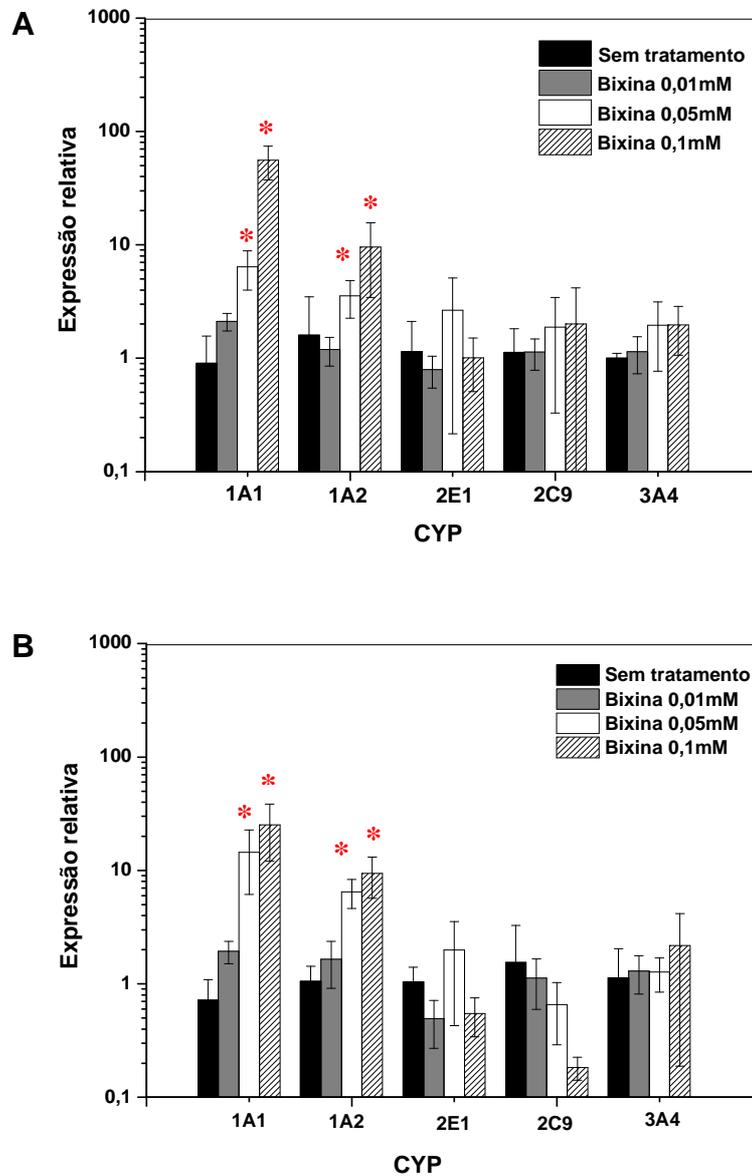


Figura 18. Análise de expressão gênica de CYPs em células HepG2 submetidas a tratamento com diferentes concentrações de bixina, por (A) 24 h e (B) 48h. Os níveis de expressão relativos foram normalizados pelo controle endógeno HMBS, tendo como amostra calibradora, células sem tratamento.

* Valores de $p < 0,05$ (One way ANOVA e Teste de Tukey)

A influência do solvente (etanol) empregado na preparação de bixina foi também avaliada, paralelamente aos ensaios de análise de expressão gênica em células HepG2 tratadas com bixina.

Conforme descrito no item 4.2.5, para preparação dos lipossomos de bixina, este composto foi solubilizado em etanol, seguido de diluição em água, obtendo uma solução com concentração final de etanol de 10% (v/v). Alguns trabalhos relatam uma possível influência de solventes orgânicos, dentre eles o etanol, na expressão das enzimas do sistema citocromo P450. Segundo Busby; Ackermann e Crespi (1999), mesmo em baixas concentrações (0,1 %), o etanol poderia inibir a expressão de algumas isoformas, como a CYP 1A1, 2B6, e 2C19. Devido à possibilidade de influência do etanol na expressão das enzimas do sistema citocromo P450, a preparação lipossomal de bixina foi submetida à diálise, para remoção do etanol da solução e a seguir testadas em células HepG2. Foram realizadas análises de expressão gênica em células tratadas com a preparação de bixina antes e após o processo de diálise e os resultados comparados (Figura 19). Os dados foram submetidos à análise de variância (One Way ANOVA) sendo que não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de expressão em células HepG2 tratadas com bixina antes e após o processo de diálise. Assim sendo, estes resultados mostraram que o etanol, nas concentrações empregadas (1%, 0,5% e 0,1%), não influenciou nos ensaios de indução, eliminado assim a necessidade de diálise da solução de bixina.

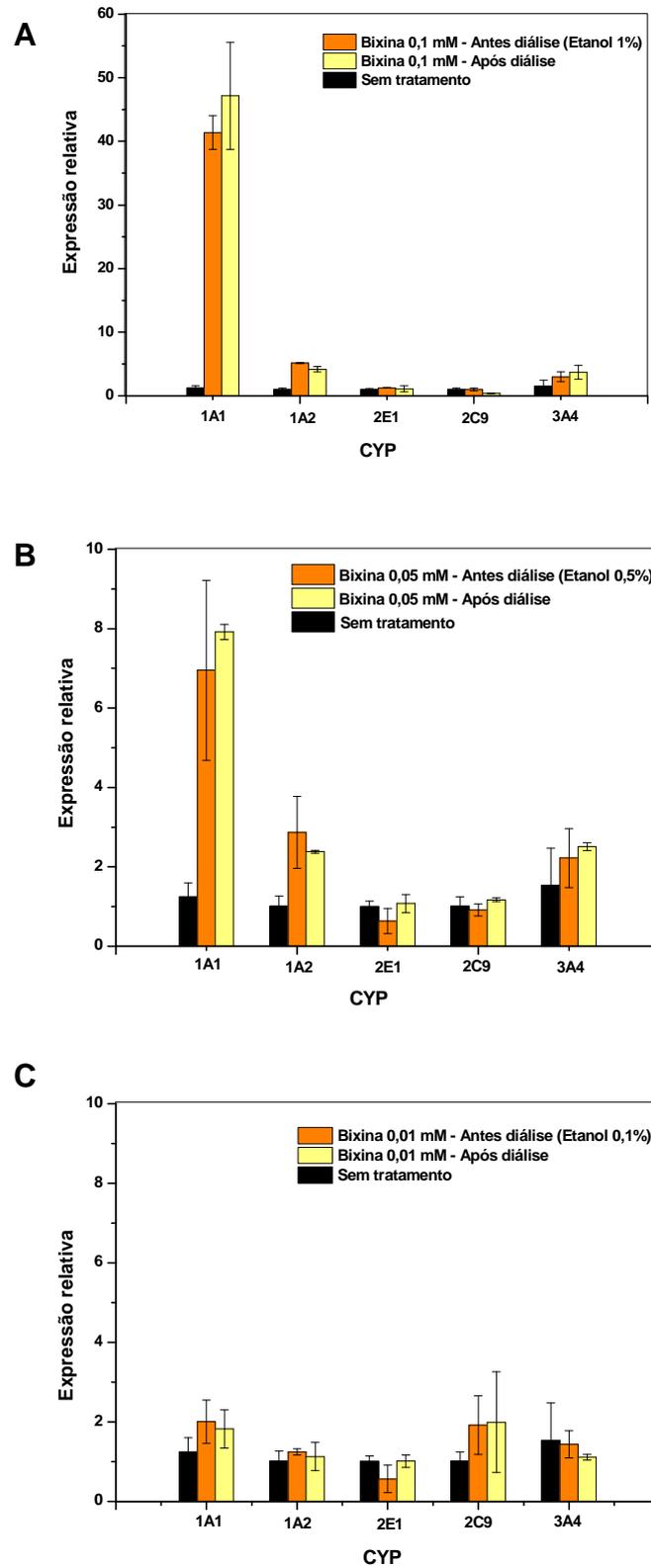


Figura 19. Análise de expressão gênica de CYPs em células HepG2 tratadas com bixina (antes e após o processo de diálise) . Em (A) bixina 0,1 mM, (B) bixina 0,05 mM e (C) bixina 0,01 mM.

Os ensaios de indução enzimática realizados em células HepG2 mostraram que bixina atua como indutor das CYPs 1A1 e 1A2 em concentrações a partir de 0,05 mM (Figura 18). Em humanos, a indução das CYPs 1A1 e 1A2 é mediada por um receptor intracelular, denominado aril hidrocarboneto (*AhR*) que por sua vez é ativado no citoplasma, por um xenobiótico, e então translocado para o núcleo, ligando-se a fatores de transcrição, que ativam a transcrição dos genes CYP 1A (WAXMAN, 1999; TOMPKINS; WALLACE, 2007; PELKONEN et al., 2008).

A maioria dos compostos que se ligam e ativam o receptor *AhR* são moléculas hidrofóbicas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e os halogenados (NGUYEN; BRADFIELD, 2008). Mas também são citados outros ligantes atípicos como a curcumina, um composto natural cuja estrutura química não apresenta anéis aromáticos conjugados, característicos dos ativadores dos receptores *AhR* (CIOLINO et al., 1998). Outros compostos, como os carotenóides cantaxantina e astaxantina, foram propostos por Gradelet et al. (1996) como uma classe de indutores da CYP1A, estruturalmente diferentes dos clássicos ligantes de *AhR*. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a interação da bixina com o receptor *AhR*, uma vez que a indução das CYPs foi observada no nível transcricional, ou seja, através do aumento da expressão dos genes CYP 1A1 e 1A2, e portanto, pode-se considerar que o carotenóide bixina, faz parte da mesma classe de indutores propostos por Gradelet et. (1996).

Apesar de bixina ter apresentado efeito indutor das CYPs 1A1 e 1A2, o mesmo não ocorreu com a norbixina. O composto bixina corresponde à fração lipossolúvel do anato, sendo a forma do carotenóide encontrada na natureza e norbixina, seu produto de saponificação, solúvel em sistemas aquosos. Desta forma, a única diferença entre estes dois compostos está no grupo metil éster, presente apenas na bixina (Figura 4), que confere maior afinidade ao receptor *AhR*. Porém, pouco se sabe ainda sobre a habilidade destes compostos não aromáticos de se ligarem a este receptor (NGUYEN; BRADFIELD, 2008).

Com base nos resultados obtidos em células HepG2, os ensaios de indução foram estendidos para as linhagens C3A e SK-HEP-1. Nestes ensaios, empregou-se apenas bixina, uma vez que experimentos realizados na linhagem HepG2 mostraram

que norbixina não apresentou efeito indutor das isoformas avaliadas neste estudo (Figura 17). A concentração de bixina foi estabelecida em 0,1 mM, correspondente à concentração na qual foi observada máxima indução das CYPs 1A1 e 1A2 em células HepG2 (Figura 18).

A Figura 20 mostra os resultados da análise de expressão gênica realizada em células C3A tratadas com bixina 0,1 mM, por períodos de exposição de 24 e 48 horas. Assim como ocorreu em células HepG2, foi observada indução das isoformas CYP 1A1 e 1A2, sendo que a indução foi mais intensa na CYP 1A1 (aumento de expressão de 200 e 150 vezes, em 24 e 48 horas de exposição, respectivamente). A isoforma CYP 1A2 sofreu também leve indução, com aumento de expressão de 7 e 6 vezes, em 24 e 48 horas de exposição, respectivamente. A análise estatística dos dados mostrou que as demais isoformas não foram induzidas por bixina 0,1 mM, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados obtidos com e sem tratamento.

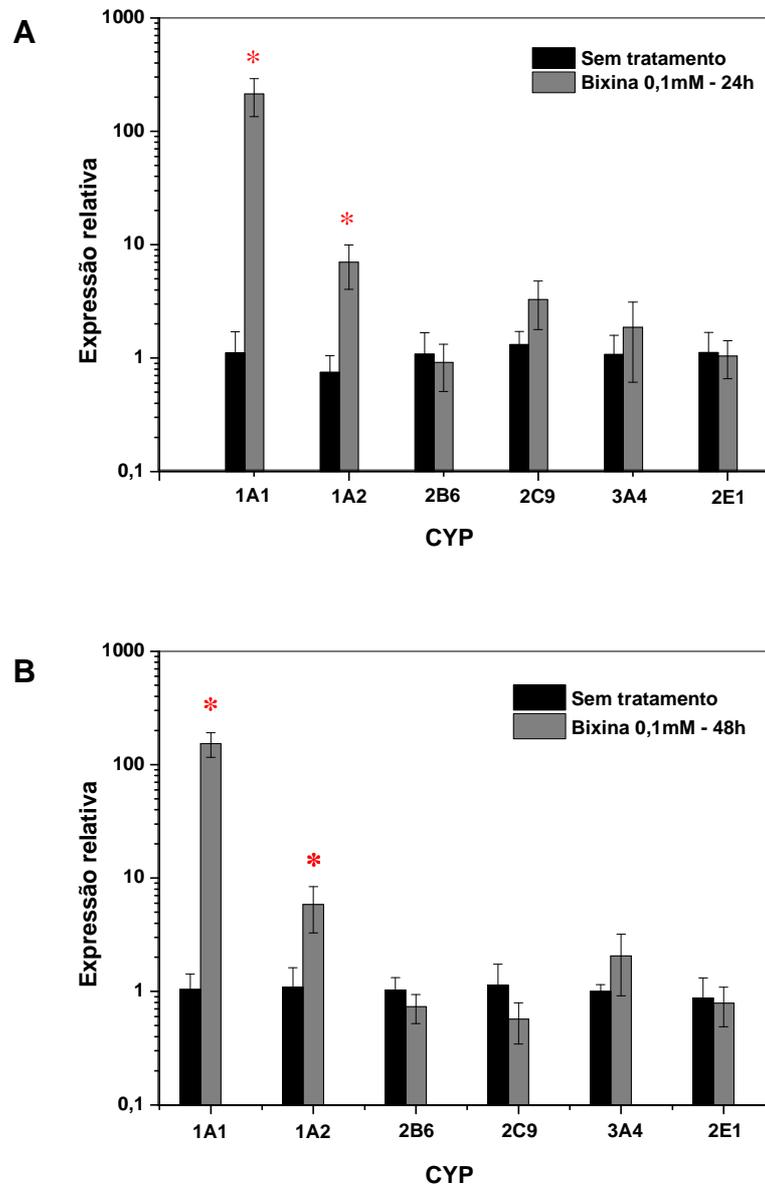


Figura 20. Análise de expressão gênica de CYPs em células C3A submetidas a tratamento com bixina 0,1mM por (A) 24 horas e (B) 48 horas. Os níveis de expressão relativos foram normalizados pelo controle endógeno HMBS, tendo como amostra calibradora, células sem tratamento.

* Valores de $p < 0,05$ (One way ANOVA e Teste de Tukey).

Quanto à linhagem SK-HEP-1 (Figura 21), ao contrário do que ocorreu em células HepG2 e C3A, não foi observado aumento significativo da expressão de nenhuma das isoformas avaliadas. As CYPs 2B6 e 3A4, não detectadas na eletroforese em gel de agarose (Figuras 15 e 16), também não foram detectadas por PCR em tempo real, mesmo após tratamento com bixina.

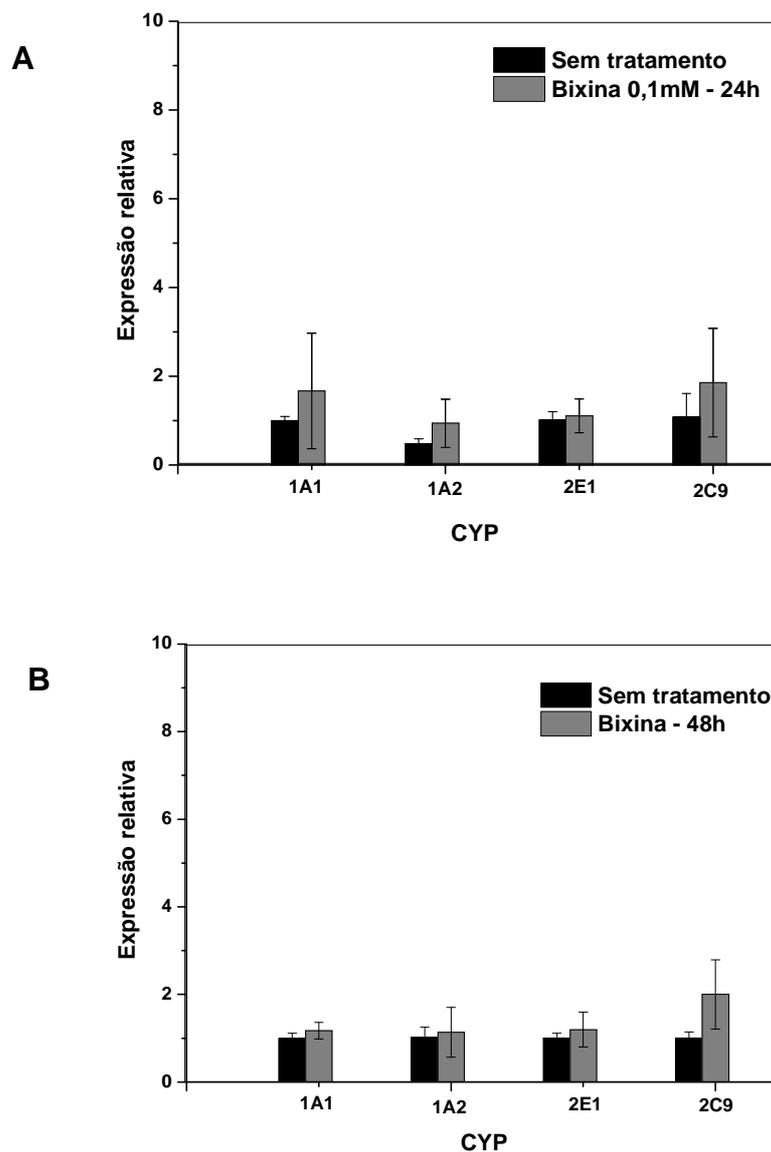


Figura 21. Análise de expressão gênica de CYPs em células SK-HEP-1 submetidas a tratamento com bixina 0,1mM por (A) 24 horas e (B) 48 horas. Os níveis de expressão relativos foram normalizados pelo controle endógeno HMBS, tendo como amostra calibradora, células sem tratamento.

Os ensaios de indução realizados nas três linhagens de hepatoma humano permitiram comparar diferentes respostas frente ao indutor bixina. Nas linhagens HepG2 (Figura 18) e C3A (Figura 20) observou-se aumento da expressão da CYP 1A1 e 1A2, mas não na linhagem SK-HEP-1 (Figura 21). Em outras palavras, CYP1A é induzível em HepG2 e C3A, mas não em SK-HEP-1.

As diferentes respostas entre as linhagens estudadas podem ser justificadas por diferenças nos níveis de receptores, fatores de transcrição ou transportadores de proteína, que em linhagens celulares encontram-se alterados, sendo que estas alterações estão relacionadas à perda das funções específicas destas células (BRANDON et al.,2003; HEWITT; LECLUYSE; FERGUSON, 2007). Como já discutido anteriormente, as linhagens HepG2 e C3A são as que melhor preservam as características e funções específicas do fígado, em contraste com SK-HEP-1 que apresenta deficiência de produção de proteínas hepáticas.

Os experimentos realizados nas linhagens HepG2, C3A e SK-HEP-1 mostraram que o efeito indutor de bixina se restringiu à CYP 1A1 e CYP 1A2, e não às demais isoformas avaliadas. Nenhum trabalho foi encontrado na literatura, descrevendo o efeito da bixina sobre as CYPs 2C9, 3A4 e 2E1, investigadas neste trabalho. Porém, Jewel e O'Brien (1999), além dos autores Oliveira et al. (2003), observaram, em ensaios *in vivo*, que bixina induz CYP 1A e em menor extensão a CYP 2B. Os ensaios de RT-PCR realizados neste trabalho detectaram a expressão da CYP 2B6 apenas na linhagem C3A, sendo que nesta linhagem, a isoforma CYP 2B6 não foi induzida por bixina. Esta ausência de indução da CYP 2B6 e de outras CYPs pode estar relacionada ao fato de algumas linhagens celulares, dentre elas, a HepG2, apresentarem baixos níveis ou ausência do receptor pregnano X (PXR) e receptor androstano constitutivo (CAR), que estão envolvidos no mecanismo de indução das CYPs de famílias como 2B e 3A (HEWITT; LECLUYSE; FERGUSON, 2007).

5.3. Avaliação das linhagens de hepatoma humano induzidas por bixina como modelo *in vitro* em ensaios de biotransformação e mutagenicidade

Ensaio de biotransformação e toxicológicos como, por exemplo, testes de mutagenicidade, são alguns dos principais ensaios *in vitro* realizados durante o desenvolvimento de um fármaco. Dentre estes últimos, o Teste de micronúcleos, recentemente reconhecido pela ECVAM (OECD, 2010) como método alternativo para avaliação de genotoxicidade, é um dos ensaios mais amplamente adotados. Desta forma, as linhagens HepG2 e C3A, que em ensaios de indução enzimática por bixina, apresentaram aumento de expressão das CYPs 1A1 e 1A2, foram avaliadas como modelo experimental em ensaios *in vitro*. Nestes ensaios, foi empregado como composto padrão o benzo[a]pireno (B[a]P).

B[a]P é um composto orgânico da classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), amplamente investigado quanto a sua biotransformação e vias de metabolização, além do seu conhecido potencial mutagênico. Os HPAs são formados por combustão incompleta de matéria orgânica, sendo abundantemente encontrados na fumaça do tabaco e como poluente ambiental (UPPSTAD et al., 2010). Historicamente, a exposição humana a estes compostos está associada ao aumento de incidência de câncer (XUE; WASHAWSKY, 2005). Dentre os diversos HPAs, o B[a]P é o mais amplamente estudado, presente em altas concentrações em ambientes contaminados com HPAs.

Apesar da complexidade das reações de biotransformação do B[a]P, do qual participam diversos sistemas enzimáticos, o envolvimento do sistema citocromo P450 é bastante conhecido, sendo o principal responsável pelas reações de Fase I deste composto. A Figura 22 mostra resumidamente as reações de biotransformação do B[a]P (XUE; WARSHAWSKY, 2005; BROWN; REISFELD; MAYENO, 2008; JACQUES et al., 2010). A primeira etapa da biotransformação é catalisada pelas enzimas do sistema citocromo P450, resultando na formação de epóxidos de B[a]P e grupos fenólicos em diferentes posições da estrutura policíclica. Estes metabólitos podem originar quinonas e dihidrodióis, ou, através das enzimas de Fase II, formar conjugados altamente hidrossolúveis, como glutationas, glucuronídeos e sulfatos conjugados. Dihidrodióis são então oxidados pelo sistema

citocromo P450, formando dihidroepóxidos, dentre eles o B(a)P-7, 8-diol-9,10-epóxido, espécie reativa que se liga ao DNA da célula, sendo responsável pelas propriedades mutagênicas e carcinogênicas do B[a]P. Este processo de bioativação do B[a]P, ocorre em grande parte via CYPs 1A1, 1A2 e 2B1 (KIM et al., 1998; ARLT, et al., 2008). Outras CYPs envolvidas no processo de biotransformação do B[a]P são a CYP 3A4 e as CYPs pertencentes à família 2C (BROWN; REISFELD; MAYENO, 2008).

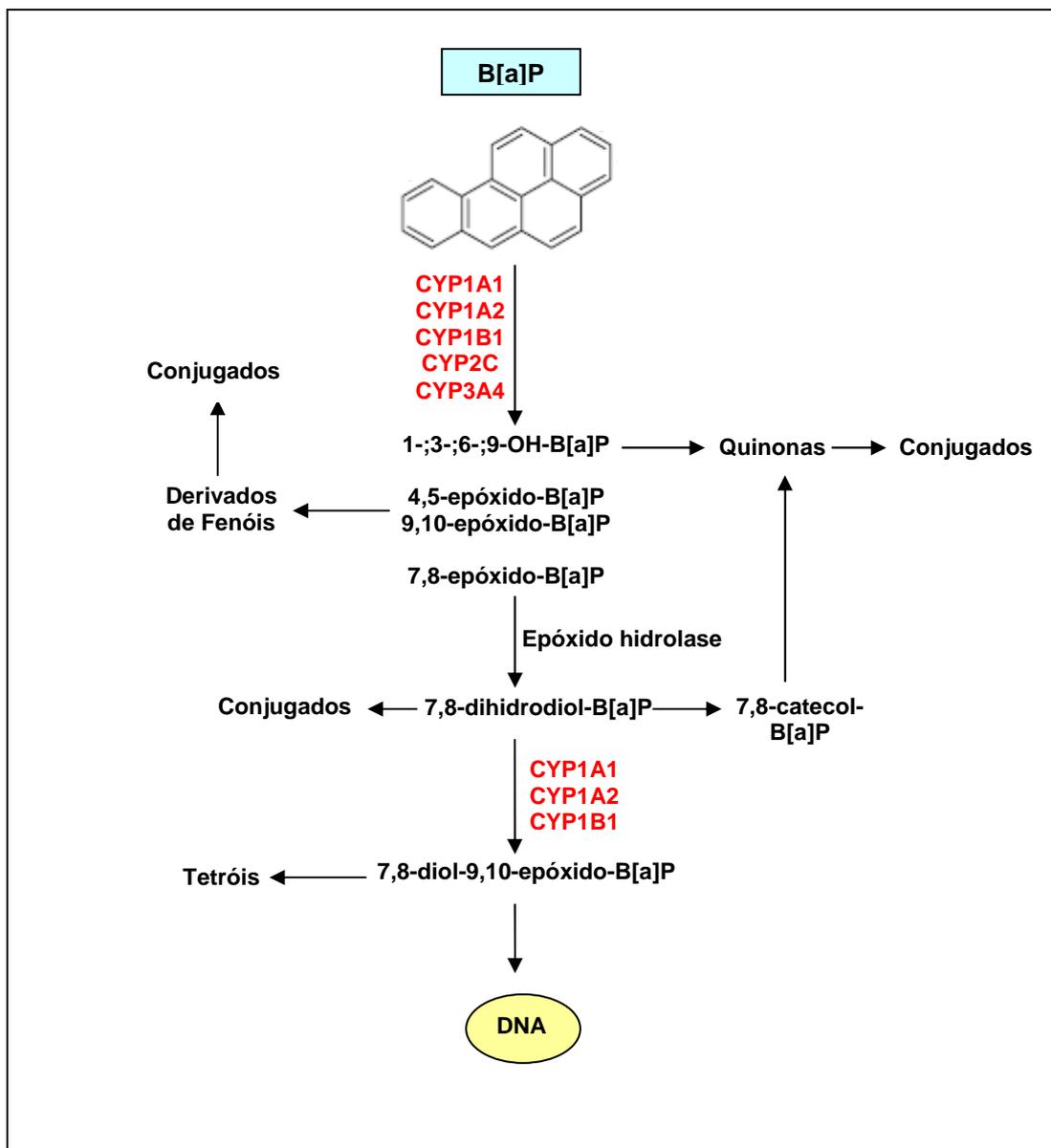


Figura 22. Reações e CYPs envolvidas na biotransformação do benzo[a]pireno (B[a]P).

5.3.1. Ensaios de biotransformação do benzo[a]pireno (B[a]P)

Uma vez que a baixa expressão do sistema citocromo P450 em linhagens celulares dificulta ou até mesmo impossibilita a detecção de metabólitos, o intuito destes ensaios foi verificar se o emprego de células induzidas por bixina possibilitaria uma maior detecção de metabólitos.

A análise de espectrometria de massa identificou um único metabólito do B[a]P tanto em células HepG2 sem tratamento (Figura 23A), quanto em células tratadas com bixina (Figura 23B), correspondente ao B[a]P-catecol (Massa molecular = 283) (JACQUES et al., 2010).

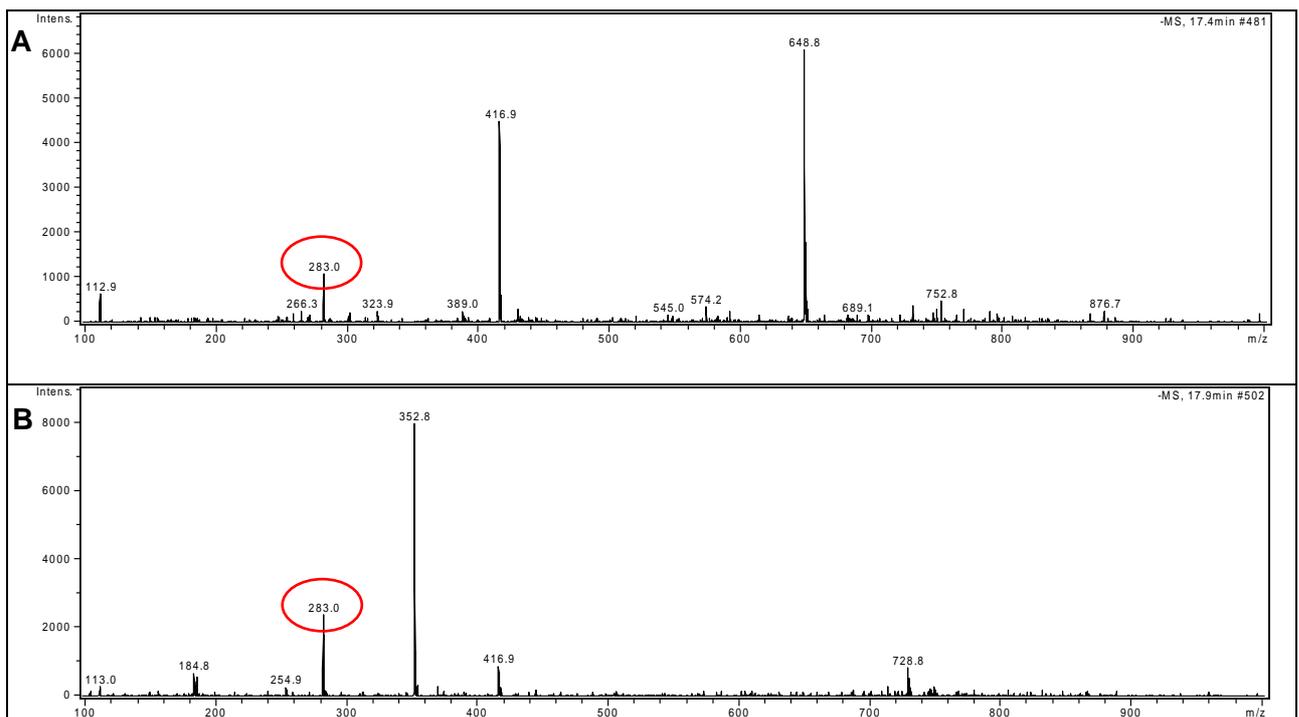


Figura 23. Espectros de massa de amostras de meio de cultura após incubação em células HepG2. (A) Células HepG2 sem tratamento (B) Células HepG2 tratadas com bixina 0,1 mM.

Ensaio realizados na linhagem C3A, sem tratamento (Figura 24A) e tratada com bixina (Figura 24B), também identificaram o metabólito B[a]P-catecol. Assim como foi observado na linhagem HepG2, nenhum outro metabólito foi identificado em células C3A.

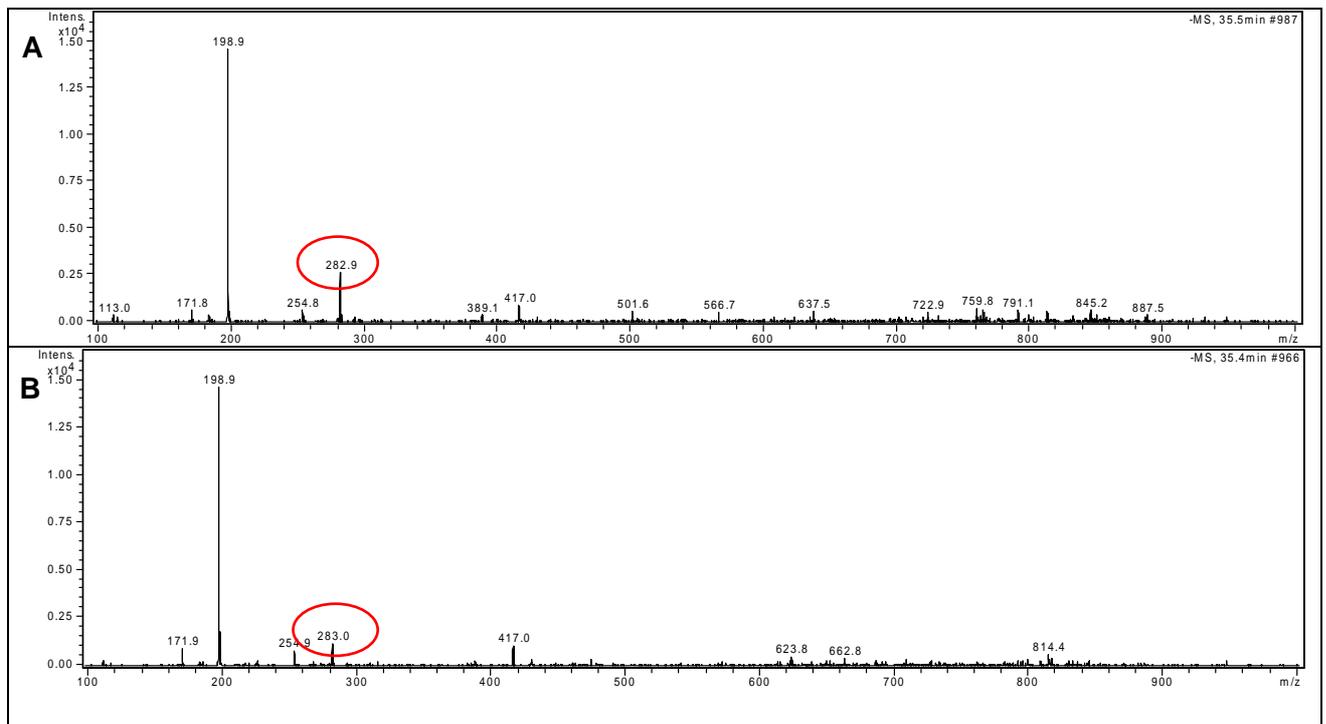


Figura 24. Espectros de massa de amostras de meio de cultura após incubação em células C3A. (A) Células C3A sem tratamento (B) Células C3A tratadas com bixina 0,1 mM.

Comparando-se a intensidade dos picos correspondentes ao B[a]P-catecol, observa-se pouca variação entre as amostras tratadas com bixina e sem tratamento, tanto em células HepG2 (Figura 23) quanto em células C3A (Figura 24). Os resultados obtidos nos ensaios de espectrometria de massa, nos quais apenas um metabólito do B[a]P foi identificado, sugeriram a baixa metabolização deste composto pelas linhagens celulares, mesmo após indução com bixina.

Uma forma de confirmar se células HepG2 e C3A estariam de fato metabolizando o B[a]P, seria através da observação do pico deste composto antes e após incubação das amostras. Desta forma, foram realizados ensaios para identificação do B[a]P, através de cromatografia de alta eficiência com detecção de fluorescência (CLAE/FL). Para tanto, foram analisadas amostras de B[a]P 50 μ M em

meio de cultura, antes e após incubação nas linhagens celulares. A Figura 25 mostra o cromatograma da amostra antes e após incubação em células HepG2 e C3A, onde se observa o pico correspondente ao B[a]P, com tempo de retenção de 16 minutos. Os resultados apresentados na Tabela 9 indicam que não houve redução da área do pico correspondente ao B[a]P após incubação, indicando a baixa metabolização deste composto pelas linhagens HepG2 e C3A, mesmo após tratamento com bixina.

Os cromatogramas das amostras após incubação (Figuras 25B a 25E) apresentam além do pico correspondente ao B[a]P, outros três picos, nos tempos de retenção de 3, 6 e 7 minutos. Considerando que a metabolização do B[a]P, por células HepG2 e C3A, foi muito baixa, pode-se associar o aparecimento destes picos a metabólitos gerados pelo próprio metabolismo celular, não sendo resultantes da biotransformação do B[a]P. Um estudo mais detalhado, porém seria necessário para identificar e determinar a origem destes metabólitos.

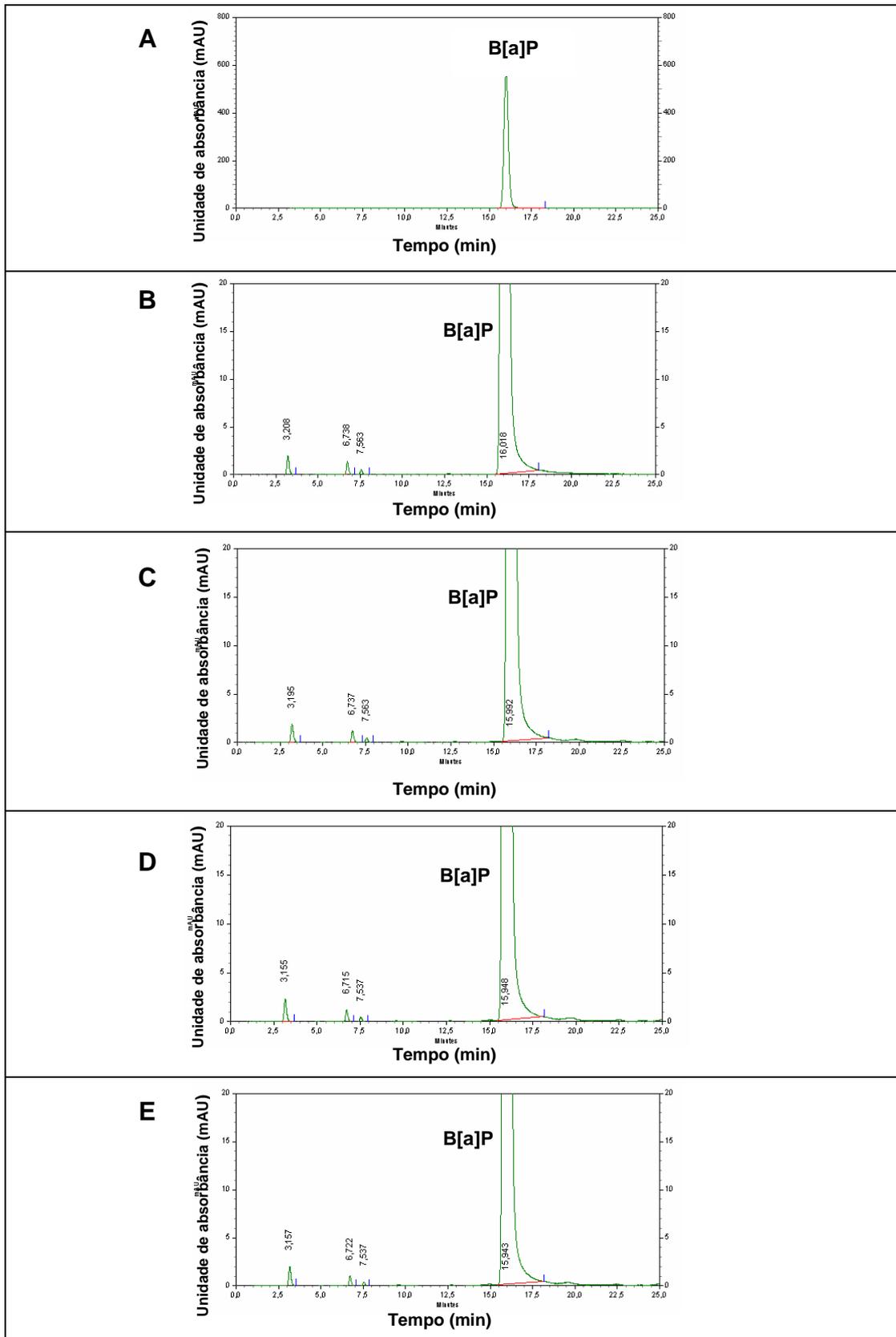


Figura 25. Cromatogramas das amostras de B[a]P: (A) Antes da incubação. Após incubação em células HepG2 (B) sem tratamento e (C) tratadas com bixina. Após incubação em células C3A (D) sem tratamento e (E) tratadas com bixina.

Tabela 9. Área do pico de B[a]P obtido por CLAE antes e após incubação por 24 horas, em células HepG2 e C3A tratadas com bixina 0,1mM e sem tratamento.

Amostra	Área
HepG2 sem tratamento	1,1E+6
HepG2 tratada com bixina 0,1mM	1,2E+6
C3A sem tratamento	1,2E+6
C3A tratada com bixina 0,1mM	1,1E+6
Controle*	1,1E+6

* B[a]P 50 μ M antes da incubação

Apesar da análise de expressão gênica, ter demonstrado aumento da transcrição dos genes CYP 1A1 e 1A2, em células HepG2 e C3A tratadas com bixina, não foi observado aumento da metabolização do B[a]P, indicando maior atividade enzimática. Uma provável explicação para estes resultados está no fato de, apesar das CYPs 1A1 e 1A2 desempenharem um importante papel na metabolização do B[a]P, muitas outras enzimas estão envolvidas no processo de biotransformação deste composto e neste caso, substratos mais específicos seriam necessários para demonstrar a metabolização via CYP 1A1 e 1A2. Alguns autores consideram a seleção do substrato o ponto crítico no estudo de CYPs individuais, uma vez que poucas moléculas servem de fato como substratos específicos ou marcadores (DONATO et al., 2004). Assim sendo, estudos adicionais para seleção de substratos mais específicos e detecção de seus metabólitos, seriam necessários para comprovar o aumento de atividade das CYPs 1A após tratamento com bixina.

Devemos ainda considerar a possibilidade de regulação pós-transcricional da CYP 1A1 como proposto por alguns autores (JORGENSEN; AUTRUP, 1996). Neste trabalho, a indução das CYPs foi avaliada através de ensaios de RT-PCR, nos quais se considera a expressão gênica e a variação na transcrição do RNA, não levando em conta as modulações da respectiva proteína, que podem ocorrer após a transcrição. Desta forma, apesar da indução das CYPs 1A1 e 1A2 ter sido intensa, principalmente na linhagem C3A, é possível que outros mecanismos de regulação

destas enzimas atuam nestas células e, portanto o aumento da transcrição gênica não correspondeu a um aumento de atividade da respectiva enzima.

5.4. Teste de Micronúcleos

O Teste de micronúcleos é um ensaio de genotoxicidade para detecção de micronúcleos, pequenos corpos extranucleares encontrados em células em divisão celular. Micronúcleos são resultantes de quebras do cromossomo ou de cromossomos inteiros que não migraram para os pólos durante o estágio de anáfase da divisão celular. Na telófase, quando o envelope nuclear é reconstituído em torno das células-filhas, esses fragmentos ou cromossomos não são incorporados ao núcleo principal, sendo, portanto encapsulados em pequenos núcleos individuais, os micronúcleos (Figura 26). Assim sendo, os micronúcleos representam uma medida não apenas da quebra, mas também da perda de cromossomos (DECORDIER; MATEUCA; KIRSCH-VOLDERS, 2011).

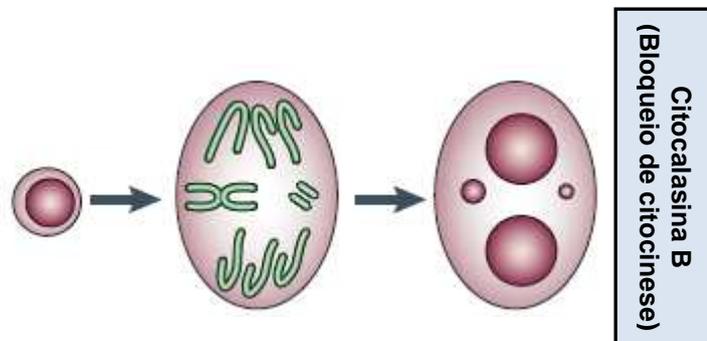


Figura 26. Micronúcleos originados de cromossomos inteiros e de fragmentos de cromossomos acêntricos, no estágio de anáfase da divisão celular. Citocalasina B bloqueia a citocinese, promovendo o acúmulo de células binucleadas (Adaptado de FENECH, 2007).

O Teste de micronúcleos foi inicialmente desenvolvido para detecção de mutações em linfócitos humanos (FENECH; MORLEY, 1986), sendo que atualmente diversas linhagens celulares de mamíferos, como CHO, CHL e L5178Y, são empregadas neste ensaio para detecção de compostos mutagênicos (LORGE et al., 2006).

Embora linhagens celulares de mamífero disponham de um sistema enzimático para ativação de pró-mutagênicos, os baixos níveis destas enzimas levam à necessidade de adição de sistemas enzimáticos exógenos, sendo normalmente empregado o S9 mix, extraído de fígado de rato (KNASMÜLLER et al., 1998; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). O protocolo de Teste de micronúcleos proposto pelo ECVAM também sugere, como uma das opções de ensaio, a exposição das linhagens celulares ao composto teste na presença de S9 mix (OECD, 2010). Entretanto, a adição de sistemas enzimáticos exógenos recai nas mesmas limitações observadas em outros ensaios de mutagenicidade, como no Teste de Ames (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Assim sendo, tem sido propagado o emprego de linhagens celulares derivadas de tecidos hepáticos, em ensaios de mutagenicidade. Apesar da maior capacidade de metabolização, as linhagens de hepatoma ainda apresentam menor capacidade de ativação de pró-carcinogênicos se comparado às células hepáticas humanas. Desta forma, no Teste de micronúcleos, frequentemente realiza-se pré-incubação das linhagens de hepatoma humano com indutores enzimáticos, como o aroclor, 1,2-benzantraceno, fenobarbital, 3-metilcolantreno, dentre outros (KNASMÜLLER et al., 1998).

No presente trabalho, bixina foi empregada como indutor enzimático, sendo que as células HepG2 e C3A foram pré-incubadas por 24 horas, em contato com este indutor e a seguir, expostas ao pró-mutagênico B[a]P. O intuito destes ensaios foi demonstrar o aumento da frequência de micronúcleos, após indução das linhagens de hepatoma humano com o composto bixina. Entretanto, experimentos realizados na linhagem HepG2 mostraram que houve redução da frequência de micronúcleos após tratamento com bixina (Tabela 10). Por outro lado, ensaios empregando células C3A indicaram aumento da frequência de micronúcleos após indução enzimática com este mesmo composto (Tabela 11).

Tabela 10. Frequência de micronúcleos em células HepG2 expostas a B[a]P 50 µM.

Linhagem celular	Frequência de MN * (%)
HepG2 sem tratamento	11,0
HepG2 tratada com bixina	9,4
Controle (0,5% DMSO)	3,5

*MN = Micronúcleos em 1000 células binucleadas

Tabela 11. Frequência de micronúcleos em células C3A expostas a B[a]P 50 µM.

Linhagem celular	Frequência de MN * (%)
C3A sem tratamento	8,4
C3A tratada com bixina	20,1
Controle (0,5% DMSO)	2,0

*MN = Micronúcleos em 1000 células binucleadas

Observa-se também que, em ambas as linhagens, o controle (células tratadas apenas com o solvente DMSO 0,5%), também apresentou uma frequência de micronúcleos, embora reduzida se comparada às amostras tratadas com B[a]P. Esta frequência de micronúcleos observada no controle pode estar associada a mutações espontâneas ou até mesmo ao uso de citocalasina B, que se por um lado promove o acúmulo de células binucleadas, por outro, pode interferir na formação de micronúcleos, embora estudos realizados não comprovem a indução de micronúcleos por citocalasina B (FENECH, 2000).

A Figura 27 mostra que o bloqueio de citocinese que, neste trabalho, foi realizado empregando citocalasina B, na concentração de 3,0 µg/mL, por um período de incubação de 30 horas, foi adequado para obtenção de elevada frequência de células binucleadas consideradas nas contagens de micronúcleos. Nesta figura observam-se células binucleadas com e sem micronúcleos, além de células mononucleadas, coradas com alaranjado de acridina (40 µg/mL). Observa-se

também o citoplasma corado de vermelho e núcleo e micronúcleos, esverdeados. As imagens foram obtidas por microscopia confocal no Laser Scan Microscopy LSM 410 (Zeiss).

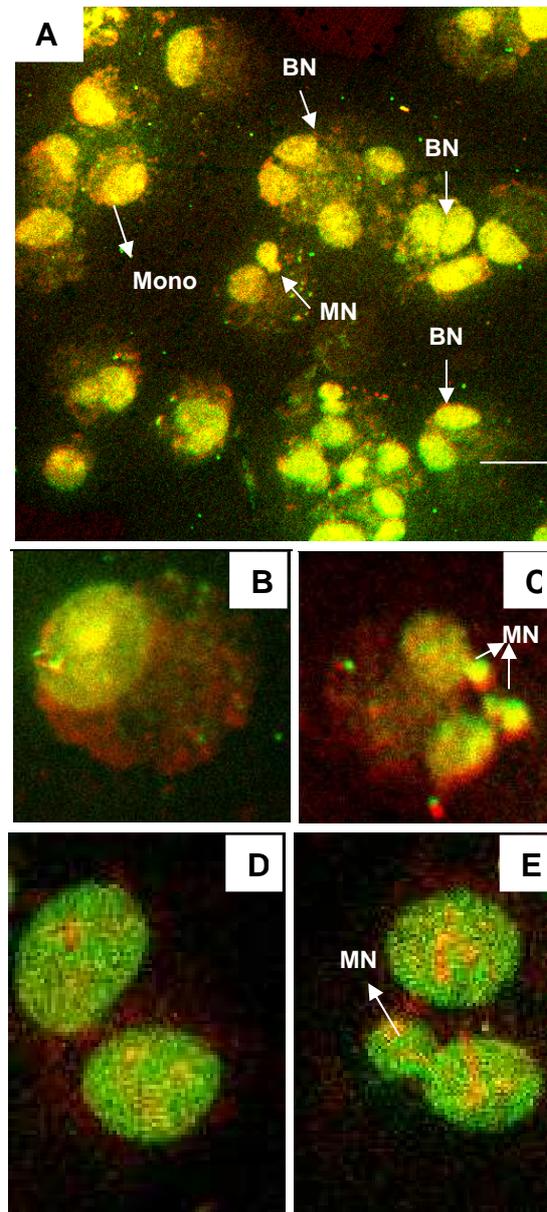


Figura 27. Teste de micronúcleos em células HepG2 e C3A. (A) Células HepG2 monocleadas (Mono), binucleadas (BN) e binucleada com micronúcleo (MN). (B) Célula HepG2 mononucleada. (C) Célula HepG2 binucleada com micronúcleo (MN). (D) Célula C3A binucleada. (E) Célula C3A binucleada com micronúcleo (MN).

Nenhum trabalho foi encontrado na literatura envolvendo o emprego da linhagem C3A em testes de micronúcleos. Porém, quanto à linhagem HepG2, Barcelos et al. (2009) observaram que a pré-incubação desta linhagem com anato, seguido de tratamento com B[a]P leva à redução da frequência de micronúcleos. Estes autores associaram esses resultados a um possível efeito antimutagênico do anato, devido à capacidade apresentada por alguns componentes desta mistura de induzir determinadas enzimas metabolizadoras. Neste trabalho, foi demonstrado que bixina induziu as CYPs 1A1 e 1A2, principais isoformas envolvidas no processo de ativação de pró-mutagênicos (PAVEK; DVORAK, 2008; PELKONEN et al., 2008), desta forma, este provável efeito antimutagênico pode estar relacionado com a ativação de outros sistemas enzimáticos envolvidos no processo de detoxificação de mutagênicos. Além disso, o fato das linhagens HepG2 e C3A terem apresentado, no Teste de micronúcleos, respostas opostas ao pré-tratamento com bixina, pode ser também um indício de que outros sistemas enzimáticos são modulados por este composto. Se as mesmas isoformas (CYP 1A1 e 1A2) foram induzidas por bixina, em ambas as linhagens, porém as respostas observadas no ensaio de mutagenicidade foram opostas, uma explicação para este fato seria a interferência de outras enzimas que, neste estudo, não foram avaliadas e que podem ser moduladas por bixina. Considerando que a modulação por um composto pode ocorrer em algumas linhagens e em outras não, visto que bixina induziu as CYPs em células HepG2 e C3A, mas não em SK-HEP-1, o efeito da bixina em outros sistemas enzimáticos pode ocorrer na linhagem HepG2, levando à detoxificação, mas não na linhagem C3A.

Entretanto, os experimentos de mutagenicidade realizados no presente trabalho, foram ensaios preliminares, sendo que estudos futuros são necessários para demonstrar o envolvimento da bixina em outros sistemas enzimáticos, que comprovem sua capacidade antimutagênica e que expliquem a resposta contraditória observada em diferentes linhagens de hepatoma humano.

5.5. Considerações finais

O presente trabalho demonstrou, pela primeira vez *in vitro*, a capacidade de bixina induzir CYP 1A em culturas de células de hepatoma humano, indicando o potencial emprego deste composto, como indutor enzimático, em estudo de fármacos cuja biotransformação envolva as CYPs 1A1 e 1A2. Estes resultados nos impulsionam para o desenvolvimento de trabalhos futuros que elucidem os mecanismos de indução da bixina e que explorem este efeito indutor sobre outras isoformas do sistema citocromo P450, bem como outros sistemas enzimáticos.

Além disso, os experimentos realizados, paralelamente, nas duas frações do anato (norbixina e bixina) permitiram comparar as respostas obtidas frente a ambos os compostos e assim, atribuir a capacidade indutora da CYP 1A apenas à bixina.

No presente trabalho, estudos mostraram como os resultados podem ser influenciados pela linhagem celular escolhida como modelo, além de refletir a complexidade do sistema citocromo P450, ao demonstrar as variações existentes entre este sistema enzimático em diferentes linhagens celulares, mesmo sendo originárias de mesma espécie animal e mesmo órgão, reforçando a necessidade do desenvolvimento de novos modelos *in vitro* ou novas técnicas de cultivo que tornem estes modelos mais próximos do modelo *in vivo*.

Por fim, o método de preparação de bixina, na forma lipossomal, foi totalmente desenvolvido em nosso laboratório, sendo que esta formulação foi, pela primeira vez, testada em ensaios *in vitro*, empregando linhagens celulares. Os resultados deste trabalho comprovaram que os lipossomos de bixina penetraram nas células, tanto que seu efeito indutor foi observado. Além disso, a baixa toxicidade desta formulação foi demonstrada através de ensaios *in vitro*. Assim sendo, este trabalho demonstra não apenas, o potencial emprego de bixina como indutor enzimático, mas também a possibilidade de uso destas vesículas em diversas outras aplicações, como o carreamento de fármacos.

7 CONCLUSÕES

- ✓ Os compostos bixina e norbixina mostraram ser seguros quanto à citotoxicidade, em concentrações abaixo de 0,22 mM, em ensaios realizados nas linhagens HepG2, C3A e SK-HEP-1.
- ✓ Norbixina, nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1 mM, não apresentou efeito indutor das isoformas CYP 1A1, 1A2, 2C9, 2E1 e 3A4, na linhagem HepG2, após 24 e 48 horas de tratamento.
- ✓ Bixina apresentou efeito indutor das CYPs 1A1 e 1A2, nas concentrações de 0,05 e 0,1 mM, após 24 e 48 horas de tratamento, sendo que este efeito foi mais intenso na CYP 1A1.
- ✓ O efeito indutor de bixina foi mais intenso na concentração de 0,1 mM, sendo que o maior tempo de exposição a este composto, ou seja, 48 horas, não provocou aumento da indução das CYPs.
- ✓ As CYPs 1A1 e 1A2 foram induzidas por bixina nas linhagens HepG2 e C3A, sendo que o maior efeito indutor foi observado na linhagem C3A. Este efeito, porém, não foi observado na linhagem SK-HEP-1.
- ✓ Bixina não apresentou efeito indutor das CYPs 2B6, 2C9, 2E1 e 3A4, nas linhagens HepG2, C3A e SK-HEP-1.
- ✓ A preparação lipossomal de bixina, empregando etanol, mostrou ser segura quanto à citotoxicidade, além de não ter sido observada influência deste solvente nos ensaios de indução enzimática, nas concentrações testadas.

- ✓ Bixina pode ser considerada um potencial agente indutor das CYPs 1A1 e 1A2 em linhagens HepG2 e C3A, em ensaios *in vitro*, para estudo de compostos cuja metabolização envolva uma destas vias. Entretanto, estudos adicionais são fundamentais, a fim de avaliar a ação de bixina sobre outras isoformas do sistema citocromo P-450 e outros sistemas enzimáticos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNER, A.R.; BARBISAN, L.F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D.M.F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. *Food and Chemical Toxicology*, v.42, p.1687-1693, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, DF, 2010. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/30dd7a0047457fa68b53df3fbc4c6735/GUIA+PARA+A+CONDU%C3%87%C3%83O+DE+ESTUDOS+N%C3%83O+CL%C3%8DNICOS+DE+SEGURAN%C3%87A+NECESS%C3%81RIOS+AO+DESENVOLVIMENTO+DE+MEDICAMENTOS.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 24 nov. 2011.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Disponível em: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-10741&Template=cellBiology>. Acesso em: 04 abr. 2011.

ARLT, V.M.; STIBOROVÁ, M.; HENDERSON, C.J.; THIEMANN, M.; FREI, E.; AIMOVÁ, D.; SINGH, R.; COSTA, G.G.; SCHMITZ, O.J.; FARMER, P.B.; WOLF, C.R.; PHILLIPS, D.H. Metabolic activation of benzo[a]pyrene *in vitro* by hepatic cytochrome P450 contrasts with detoxification *in vivo*: experiments with hepatic cytochrome P450 reductase null mice. *Carcinogenesis*, v.29, n.3, p.656-665, 2008.

BARCELOS, G.R.M.; ANGELI, J.P.F.; SERPELONI, J.M.; ROCHA, B.A.; MATOVANI, M.S.; ANTUNES, L.M.G. Effect of Annatto on micronuclei induction by direct and indirect mutagens in HepG2 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.50, p.808-8014, 2009.

BARREIRO, E.J.; SILVA, J.F.; FRAGA, C.A. Noções básicas do metabolismo de fármacos. *Química Nova*, v.19, n.6, p.641-650, 1996.

BATZRI, S.; KORN, D.E. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.298, p.1015-1019, 1973.

BAUTISTA, A.R.P.L.; MOREIRA, M.S.; BATISTA, M.S.; MOREIRA, E.L.T.; SILVA, I.M.; GOMES, I.C.S. Avaliação da toxicidade oral subcrônica da bixina para ratos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.40, n.2, p.229-233 2004.

BERNHARDT, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology*, v.124, p.128-145, 2006.

BRANDON, E.F.A.; RAAP, C.D.; MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H.M. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.189, p.233-246, 2003.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H., eds. *Carotenoids*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1995, p.532-533, [V.1B - Spectroscopy].

BROWN, C.M.; REISFELD, B.; MAYENO, A.N. Cytochrome P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metabolism Reviews*, v.40, p.1-100, 2008.

BURKE, M.D.; MAYER, R.T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcolanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*, v.2, n.6, p.583-588, 1974.

BUSBY Jr., W.F.; ACKERMANN, J.M.; CRESPI, C.L. Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on *in vitro* activities of cDNA expressed human cytochromes P-450. *Drug Metabolism and Disposition*, v.27, n.2, p.246-249, 1999.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.25, p.169-193, 2000.

CHAO, H.R.; TSOU, T.C.; LI, L.A.; TSAI, F.Y.; WANG, Y.F.; WANG, Y.F.; TSAI, C.H.; CHANG, E.E.; MIAO, Z.F.; WU, C.H.; LEE, W.J. Arsenic inhibits induction of cytochrome P450 1A1 by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human hepatoma cells. *Journal of Hazardous Materials*, v.137, p.716-722, 2006.

CHOI, S.; SAINZ Jr., B.; CORCORAN, P.; UPRICHARD, S.; JEONG, H. Characterization of increased drug metabolism activity in dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated Huh7 hepatoma cells. *Xenobiotica*, v.39, n.3, p.205-217, 2009.

CICINNATI, V.R.; SHEN, Q.; SOTIROPOULOS, G.C.; RADTKE, A.; GERKEN, G.; BECKEBAUM, S. Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer*, v.8, p.350, 2008.

CIOLINO, H.P.; DASCHNER, P.J.; WANG, T.T.; YEH, G.C. Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, v.56, p.197-206, 1998.

COON, M.J.; DING, X.; PERNECKY, S.J.; VAZ, A.D.N. Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB Journal*, v.6, p.669-673, 1992.

COSTA, C.L.S.; CHAVES, M.H. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. *Química Nova*, v.28, n.1, p.149-152, 2005.

DARROUDI, F.; MEIJERS, C.M.; HADJIDEKOVA, V.; NATARAJAN, A.T. Detection of aneugenic and clastogenic potential of X-rays, directly and indirectly acting chemicals in human hepatoma (HepG2) and peripheral blood lymphocytes, using the micronucleus assay and fluorescent *in situ* hybridization with a DNA centromeric probe. *Mutagenesis*, v.11, n.5, p.425-433, 1996.

DAVILA, J.C.; RODRIGUEZ, R.J.; MELCHERT, R.B.; ACOSTA Jr., D. Predictive value of *in vitro* model systems in toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.38, p.63-96, 1998.

DECORDIER, I.; MATEUCA, R.; KIRSCH-VOLDERS, M. Micronucleus assay and labeling of centromeres with FISH technique. In: GAUTIER, J.C., ed. *Drug safety evaluation: methods and protocols*. New York: Humana Press, 2011. p.115-136. (Methods in molecular biology, v.691).

DE SMET, K.; BRÜNING, T.; BLASZKEWICZ, T.; BOLT, M.; VERCRUYSSSE, H.M.; ROGIERS, V. Biotransformation of trichloroethylene in collagen gel sandwich cultures of rat hepatocytes. *Archives of Toxicology*, v.74, p.587-592, 2000.

DONATO, M.T.; GOMEZ-LECHÓN, M.J.; CASTELL, J.V. A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry*, v.213, p.29-33, 1993.

DONATO, M.T.; JIMÉNEZ, N.; CASTELL, J.V.; GOMEZ-LECHÓN, M.J. Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metabolism and Disposition*, v.32, n.7, p.699-706, 2004.

DORADO, P.; BERECZ, R.; CÁCERES, C.M.; LLERENA, A. Analysis of diclofenac and its metabolites by high-performance liquid chromatography: relevance of CYP2C9 genotypes in diclofenac urinary metabolic ratios. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.789, n.2, p.437-442, 2003.

DORIS, C. A general and reliable method for obtaining high-yield metaphasic preparations from adherent cell lines: Rapid verification of cell chromosomal content. In: CELIS, J.E. ed. *Cell Biology: A laboratory handbook*. 3.ed. Boston: Elsevier Academic Press, 2006. cap. 39. p.387-391.

ELKAYAM, T.; AMITAY-SHAPRUT, S.; DVIR-GINZBERG, M.; HAREL, T.; COHEN, S. Enhancing the drug metabolism activities of C3A – a human hepatocytes cell line – by tissue engineering within alginate scaffolds. *Tissue Engineering*, v.12, p.1357-1368, 2006.

FABRE, N.; ARRIVET, E.; TRANCARD, J.; BICHET, N.; ROOME, N.O.; PRENEZ, A.; VERICAT, J.A. A new hepatoma cell line for toxicity testing at repeated doses. *Cell Biology and Toxicology*, v.19, p.71-82, 2003.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low-dose X-irradiation. *Mutation Research*, v.161, p.193-198, 1986.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, v.455, p.81-95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, v.2, n.5, p.1084-1104, 2007.

FERREIRA, V.L.P.; NETO, R.O.T.; MOURA, S.C.S.R.; SILVA, M.S. Cinética da degradação da cor de solução hidrossolúvel comercial de urucum, submetida a tratamentos térmicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.19, n.1, p.37-42, 1999.

FILIPPI, C.; KEATCH, S.A.; RANGAR, D.; NELSON, L.J.; HAYES, P.C.; PLEVRIS, J.N. Improvement of C3A cell metabolism for usage in bioartificial liver support systems. *Journal of Hepatology*, v.41, p.599-605, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry. Drug metabolism/drug interaction. Studies in the drug development. Process: Studies in vitro. Disponível em:

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072104.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2011.

FRESHNEY, R.I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 4.ed. New York: Wiley-Liss, 2000. 577p.

FURGE, L.L.; GUENGERICH, F.P. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism and chemical toxicology. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, v.34, n.2, p.66-74, 2006.

GALINDO-CUSPINERA, V.; LUBRAN, M. B.; RANKIN, S. A. Comparison of volatile compounds in water- and oil-soluble Annatto (*Bixa orellana* L.) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.2010-2015, 2002.

GRADELET, S.; ASTORG, P.; LECLERC, J.; CHEVALIER, J.; VERNEVAUT, M.F.; SIESS, M.H. Effects of canthaxanthin, astaxanthin, lycopene and lutein on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat. *Xenobiotica*, v.26, n.1, p.49-63, 1996.

GROSS, M.D.; BISHOP, T.D.; BELCHER, J.D.; JACOBS Jr., D.R. Induction of HL-60 cell differentiation by carotenoids. *Nutrition and Cancer*, v.27, n.2, p.169-173, 1997.

GUENGERICH, F.P. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS Journal*, v.8, n.1, p.E101-E111, 2006.

GUO, L.; DIAL, S.; SHI, L.; BRANHAM, W.; LIU, J.; FANG, J.; GREN, B.; DENG, H.; KAPUT, J.; NING, B. Similarities and difference in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, v.39, n.3, p.528–538, 2011.

HAGIWARA, A.; IMAI, N.; SANO, M.; TAMANO, S.; AOKI, H.; YASUHARA, K.; KODA, T.; NAKAMURA, M.; SHIRAI, T. A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (*Bixa orellana* L.), in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, v.41, p.1157-1164, 2003.

HAHN, W.C. Immortalization and transformation of human cells. *Molecules and Cells*, v.13, n.3, p.351-361, 2002.

HASHIZUME, T.; YOSHITOMI, S.; ASAHI, S.; MATSUMURA, S.; CHATANI, F.; ODA, H. *In vitro* micronucleus test in HepG2 transformants expressing a series of human cytochrome P450 isoforms with chemicals requiring metabolic activation. *Mutation Research*, v.677, p.1-7, 2009.

HEFFELFINGER, S.C.; HAWKINS, H.H.; BARRISH, J.; TAYLOR, L.; DARLINGTON, G.J. SK HEP-1: A human cell line of endothelial origin. *In vitro Cellular & Developmental Biology*, v.28A, p.136-142, 1992.

HENGSTLER, J.; UTESCH, D.; STEINBERG, P.; PLATT, K.L.; DIENER, B.; RINGEL, M.; SWALES, N.; FISCHER, T.; BIEFANG, K.; GERL, M.; BÖTTGER, T.; OESCH, F. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available *in vitro* model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metabolism Reviews*, v.32, p.81-118, 2000.

HENKENS, T.; VANHAECKE, T.; PAPELEU, P.; ELAUT, G.; VINKEN, M.; SNYKERS, S.; ROGIERS, V. Rat hepatocyte cultures: conventional monolayer and cocultures with rat liver epithelial cells. In: PHILLIPS, I.R.; SHEPHARD, E.A., eds. *Cytochrome P450 protocols*. 2.ed. Totowa: Humana Press, 2005. cap.27, p.239-246. (Methods in molecular biology, 320).

HEWITT, N.J.; LECLUYSE, E.L.; FERGUSON, S.S. Induction of hepatic cytochrome P450 enzymes: methods, mechanisms, recommendations, and *in vitro-in vivo* correlations. *Xenobiotica*, v.37, n.10/11, p.1196-1224, 2007.

INGELMAN-SUNDBERG, M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.25, n.4, p.193-200, 2004.

INGELMAN-SUNDBERG, M. The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.207, p.S52-S56, 2005.

JACQUES, C.; JAMIN, E.L.; PERDU, E.; DUPLAN, H.; MAVON, A.; ZALKO, D.; DEBRAUWER, L. Characterization of B(a)P metabolites formed in an *ex vivo* pig skin model using three complementary analytical methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.396, p.1691-1701, 2010.

JEWELL, C.; O'BRIEN, N.M. Effect of dietary supplementation with carotenoids on xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, lung, kidney and small intestine of the rat. *British Journal of Nutrition*, v.81, p.235-242, 1999.

JONES, C.W.; POOLE, R.K. The analysis of cytochrome P-450. *Methods in microbiology*, v.18, p.285-328, 1985.

JORGENSEN, E.C.; AUTRUP, H. Autoregulation of human CYP1A1 gene promoter activity in HepG2 and MCF-7 cells. *Carcinogenesis*, v.17, p.435-441, 1996.

KANEBRATT, K.P.; ANDERSSON, T.B. Evaluation of HepaRG cells as an *in vitro* model for human drug metabolism studies. *Drug Metabolism and Disposition*, v.36, n.7, p.1444-1452, 2008.

KÄPPELI, O. Cytochrome P-450 of yeasts. *Microbiological Reviews*, v.50, n.3, p.244-258, 1986.

KLEEBERG, U.; FRÖTSCHL, R.; KRUSEKOPF, S.; BROCKMÖLLER, J.; ROOTS, I.; RUCKPAUL, K.; HILDEBRANT, A.G. Induction of CYP1A by various benzimidazoles and its significance in administrative drug regulation. *Drug Metabolism Reviews*, v.31, p.381-392, 1999.

KIM, J.H.; STANSBURY, K.H.; WALKER, N.J.; TRUSH, M.A.; STRICKLAND, P.T.; SUTTER, T.R. Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis*, v.19, n.10, p.1847-1853, 1998.

KIRSCH-VOLDERS, M.; DECORDIER, I.; ELHAJOUJI, A.; PLAS, G.; AARDEMA, M.J.; FENECH, M. *In vitro* genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis*, v.26, n.1, p.177-184, 2011.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFAL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research*, v.402, p.185-202, 1998.

KASMÜLLER, S. STEINKELLNER, H.B.J.; MAJER, E.C.; NOBIS, G.; SCHARF, F.; KASSIE, F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspect and extrapolation aspect and extrapolation problems. *Food Chemical Toxicology*, v.40, p.1051-1062, 2002.

KREMER, J.M.H.; ESKER, M.W.J.V.D.; PATHMAMANOCHARAN, C.; WIERSEMA, P.H. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry*, v.16, p.3932-3935, 1977.

LI, A. Human hepatocytes: Isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chemico-Biological Interactions*, v.168, p.16-29, 2007.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LORGE, E.; THYBAUD, V.; AARDEMA, M.J.; OLIVER, J.; WAKATA, A.; LORENZON, G.; MARZIN, D. SFTG International Collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, v.607, p.13-36, 2006.

LUTZ, E.S.M.; MARKLING, M.E.; MASIMIREMBWA, C.M. Monolithic silica rod liquid chromatography with ultraviolet or fluorescence detection for metabolite analysis of cytochrome P-450 marker reactions. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.780, n.2, p.205-215, 2002.

MARUYAMA, M.; MATSUNAGA, T.; HARADA, E.; OHMORI, S. Comparison of basal gene expression and induction of CYP3As in HepG2 and human fetal liver cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.30, n.11, p.2091-2097, 2007.

MCDEVITT, T.M.; TCHAO, R.; HARRISON, E.H.; MOREL, D.W. Carotenoids normally present in serum inhibit proliferation and induce differentiation of a human monocyte/macrophage cell line (U937). *Journal of Nutrition*, v.135, n.2, p.160-164, 2005.

MEUNIER, V.; BOURRIÉ, M.; JULIAN, B.; MARTI, E.; GUILLOU, F.; BERGER, Y.; FABRE, G. Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow-up. *Xenobiotica*, v.30, p.589-607, 2000.

MILOSEVIC, N.; SCHAWALDER, H.; MAIER, P. Kupffer cell-mediated differential down-regulation of cytochrome P450 metabolism in rat hepatocytes. *European Journal of Pharmacology*, v.26, p.75-87, 1999.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutaton Research*, v.455, p.29-60, 2000.

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

MURRAY, G.I.; BURKE, D. Immunohistochemistry of drug-metabolizing enzymes. *Biochemical Pharmacology*, v.50, n.7, p.895-903, 1995.

NAKAMURA, K.; KATO, N.; AIZAWA, K.; MIZUTANI, R.; YAMAUCHI, J.; TANOUE, A. Expression of albumin and cytochrome P450 enzymes in HepG2 cells cultured with nanotechnology-based culture plate with microfabricated scaffold. *Journal of Toxicological Sciences*, v.36, n.5, p.625-633, 2011.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 25 nov. 2010.

NELSON, D.R. Cytochrome P450 nomenclature, 2004. In: PHILLIPS, I.R.; SHEPHARD, E.A., eds. *Cytochrome P450 protocols*. 2.ed. Totowa: Humana Press, 2005. cap.1, p.1-10. (Methods in molecular biology, 320).

NGUYEN, L.P.; BRADFIELD, C.A. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chemical Research in Toxicology*, v.21, n.1, p.102-116, 2008.

O'CONNOR, J.E.; MARTINEZ, A.; CASTELL, J.; GOMEZ-LECHÓN, M.J. Multiparametric characterization by flow cytometry of flow-sorted subpopulations of a human hepatoma cell line useful for drug research. *Cytometry, Part A*, v.63A, p.48-58, 2006.

OECD. *OECD Guideline for testing of chemicals: in vitro mammalian cell micronucleus test.*, OECD, 2010. (Guideline, 487). Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD-TG487.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2011.

OLIVEIRA, A.C.A.X.; SILVA, I.B.; MANHÃES-ROCHA, D.A.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Induction of liver monooxygenases by annatto and bixin in female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.36, p.113-118, 2003.

OMURA, T.; SATO, R. A new cytochrome in liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, v.237, n.4, p.1375-1376, 1962.

PAUMGARTTEN, F.J.R.; CARVALHO, R.R.; ARAUJO, I.B.; PINTO, F.M.; BORGES, O.O.; SOUZA, C.A.M.; KURIYAMA, S.N. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, v.40, p.1595-1601, 2002.

PAVEK, P.; DVORAK, Z. Xenobiotic-Induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Current Drug Metabolism*, v.9, p.129-143, 2008.

PEARCE, R.E.; McINTYRE, C.J.; MADAN, A.; SANZGIRI, U.; DRAPER, A.J.; BULLOCK, P.L.; COOK, D.C.; BURTON, L.A.; LATHAM, J.; NEVINS, C.; PARKINSON, A. Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.331, p.145-169, 1996.

PELKONEN, O.; RAUNIO, H. Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environmental Health Perspectives*, v.105, suppl.4, p.767-774, 1997.

PELKONEN, O.; TURPEINEN, M.; USITALO, J.; RAUTIO, A.; RAUNIO H. Prediction of drug metabolism and interactions on the basis of *in vitro* investigations. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v.96, p.167-175, 2005.

PELKONEN, O.; TURPEINEN, M.; HAKKOLA, J.; HONKAKOSHI, P.; HUKKANEN, J.; RAUNIO, H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology*, v.82, p.667-715, 2008.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v.29, n.9, p.2002-2007, 2001.

PINTO, T.J.A.; KIKUCHI, I.S.; MATUO, M.C.S.; KANEKO, T. M.; TAKAMOTO, R.T.O. *Vesículas lipídicas de carotenóides, composição, processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides e uso de vesículas lipídicas de carotenóides*. Br Pat. IPI0.903.009-3, 31 ago. 2009. 37p.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 780p.

PLANT, N. Strategies for using *in vitro* screens in drug metabolism. *Drug Discovery Today*, v.9, p.328-335, 2004.

REDDY, M.K.; ALEXANDER-LINDO, R.L.; NAIR, M.G. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.9268-9273, 2005.

RODRIGUEZ-ANTONA, C.; DONATO, M.T.; BOOBIS A.; EDWARDS, R.J.; WATTS, P.S.; VICENTE CASTELL, J.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica*, v.32, p.505-520, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, v.1, p.5.4-5.17, 7.31-7.34, v.2, p.8.18-8.24.

SELISKAR, M.; ROZMAN, D. Mammalian cytochromes p450 – importance of tissue specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1770, p.458-466, 2007.

SINGH, D.; KASHYAP, A.; PANDEY, R.V.; SAINI, K.S. Novel advances in cytochrome P450 research. *Drug Discovery Today*, v.16, n.17/18, p.793-799, 2011.

SU, T.; WAXMAN, D.J. Impact of dimethyl sulfoxide on expression of nuclear receptors and drug-inducible cytochromes P450 in primary rat hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.424, p.226-234, 2004.

TERRY, C.; DHAWAN, A.; MITRY, R.R.; LEHEC, S.C.; HUGHES, R.D. Preincubation of rat and human hepatocytes with cytoprotectants prior to cryopreservation can improve viability and function upon thawing. *Liver Transplantation*, v.12, n.1, p.165-177, 2005.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A.Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.21, n.3, p.310-313, 2001.

TOMPKINS, L.M.; WALLACE, A.D. Mechanisms of cytochrome P450 induction. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v.21, n.4, p.176-181, 2007.

TROCHE, S.V.; FALCÓN, M.S.G.; AMIGO, S.G.; YUSTY, M.A.L.; LOZANO, J.S. Enrichment of benzo[a]pyrene in vegetable oils and determination by HPLC-FL. *Talanta*, v.51, p.1069-1076, 2000.

TURPEINEN, M.; GHICIUC, C.; OPRITOI, M.; TURSAS, L.; PELKONEN, O.; PASANEN, M. Predictive value of animal models for human cytochrome P450 (CYP)-mediated metabolism: a comparative study *in vitro*. *Xenobiotica*, v.37, n.12, p.1367-1377, 2007.

UPPSTAD, H.; OVREBO, S.; HAUGEN, A.; MOLLERUP, S. Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo[a]pyrene in human lung cell lines. *Toxicology Letters*, v.192, p.221-228, 2010.

VINKEN, M.; ELAUT, G.; HENKENS, T.; PAPELEU, P.; SNYKERS, S.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V. Rat hepatocyte cultures: collagen gel sandwich and immobilization cultures. In: PHILLIPS, I.R.; SHEPHARD, E.A., eds. *Cytochrome P450 protocols*. 2.ed. Totowa: Humana Press, 2005. cap.28, p.247-254. (Methods in molecular biology, 320).

XUE, W.; WARSHAWSKY, D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.206, p.73-93, 2005.

WAXMAN, D.J. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR and PPAR. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.369, n.1, p.11-23, 1999.

WERCK-REICHHART, D.; FEYEREISEN, R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, v.1, n.6, p.3003.1-300.9, 2000.

WILKENING, S.; STAHL, F.; BADER, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition*, v.31, p.1035-1040, 2003.

YABIKU, H.Y.; TAKAHASHI, M.Y. Determinação de bixina em sementes de urucum: estudo colaborativo. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.52, n.1/2, p.31-36, 1992.