

**Efeitos da sinefrina em associação com cafeína na indução de
citotoxicidade, danos no DNA e modulação da expressão de
genes relacionados à apoptose em células de
hepatocarcinoma humano *in vitro***

Tainá Keiller Leão

Ribeirão Preto
2022

TAINÁ KEILLER LEÃO

Efeitos da sinefrina em associação com cafeína na indução de citotoxicidade, danos no DNA e modulação da expressão de genes relacionados à apoptose em células de hepatocarcinoma humano *in vitro*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado: Tainá Keiller Leão

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 28/jun/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2022

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

Tainá Keiller Leão
Leao, T.K.

Efeitos da sinefrina em associação com cafeína na indução de citotoxicidade, danos no DNA e modulação da expressão de genes relacionados à apoptose em células de hepatocarcinoma humano *in vitro*.
Ribeirão Preto: FCFRP, 2022.

Número de páginas: # 77#

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes

1. Nutrigenômica; Citotoxicidade; HepG2; Ensaio do cometa; Expressão gênica;

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tainá Keiller Leão

Efeitos da sinefrina em associação com cafeína na indução de citotoxicidade, danos no DNA e modulação da expressão de genes relacionados à apoptose em células de hepatocarcinoma humano *in vitro*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais **Jezeli Keiller de Andrade** e **Disney Leão** por sempre serem meus pilares na vida. Ao meu segundo pai **Fabiano Pereira de Andrade** que me sempre me ensinou a ver a leveza da vida. Dedico também às minhas irmãs **Mariana Keiller Leão**, **Letícia Keiller de Andrade** e **Carolina David Piedade** por sempre me entenderem e estarem ao meu lado. E em especial, dedico à minha irmã **Alexandra David Piedade** que me guia sempre que eu olho para o céu e vejo a estrela mais brilhante e que me ensinou a sempre festejar às mínimas conquistas dessa vida.

Agradecimento

À minha mãe **Jezeli Keiller de Andrade** e ao meu segundo pai **Fabiano Pereira de Andrade**, que sempre me apoiaram durante meus estudos, sempre me deram uma casa com muito amor e suporte, permitiram que eu seguisse meus sonhos e por sempre colocarem suas filhas em primeiro lugar.

Ao meu pai **Disney Leão** e sua esposa **Eliana David Leão** que sempre me criaram para ver o mundo e por me apoiarem a me desenvolver como pessoa e profissionalmente.

À minha irmã **Mariana Keiller Leão** que me mostra a cada dia como é ser forte, a como enfrentar as dificuldades que a vida nos impõe e por estar ao meu lado sempre. Quando muitas vezes quis desistir, você foi a minha força para continuar. À minha irmã **Letícia Keiller de Andrade**, minha caçula, que a cada dia que passa tem um coração enorme e bondoso, obrigada por encher minha vida com amor. À minha irmã **Carolina David Piedade** sempre com uma risada contagiante e que deu os melhores presentes à família, meus sobrinhos **Theo Piedade Leme** e **Maria Luisa Piedade Justi**.

E gostaria muito de agradecer a minha irmã **Alexandra David Piedade** que, infelizmente, não posso mais abraçar hoje. Obrigada Alê, por me ensinar a sempre querer mais para mim e levar alegria onde eu for. Obrigada por me ensinar a não desistir e por ter sido muito guerreira e luz em nossas vidas.

Ao meu parceiro **Leonardo César Venâncio dos Reis** pelo companheirismo, amizade, ensinamentos, paciência, suporte e todos os momentos de leveza e risadas. Obrigada pelos momentos de desabafos, por sempre me incentivar e não me deixar desistir.

À minha orientadora **Profa. Dra. Lusânia Maria Greggí Antunes**. Obrigada por me acolher em seu laboratório desde a minha iniciação científica e agora por mais essa fase no mestrado. Obrigada por entender os meus momentos pessoais delicados durante esses últimos anos e por me apoiar a seguir meu caminho profissional. Obrigada pelos ensinamentos e pelo apoio durante essa trajetória, pelos comentários, correções, pelas conversas e risadas no laboratório.

Obrigada **Ana Rita Thomazela Machado**, **Katiuska Tuttis Rodrigues** e **Patrick Santos** por todas as conversas, ajudas no laboratório, discussões e aprendizados. Obrigada também ao **Diego Luís Ribeiro**, que me auxiliou desde a minha iniciação científica, me apoiou a ingressar no mestrado e está sempre disponível para me auxiliar, obrigada também pelas conversas e risadas durante esses anos. Obrigada aos amigos e colegas que passaram ao longo dos anos em nosso laboratório. Agradeço a todos vocês pela ajuda em experimentos, pelo aprendizado, discussões e correções científicas enriquecedoras, pela amizade e conselhos. À **Joana D'Arc Castania Darin** e **Regislaine Valéria Burim** por todo apoio técnico, auxílio nos experimentos, pelas conversas e risadas durante nossos dias no laboratório e,

principalmente, pela amizade, tenho muito carinho por vocês. Aos amigos agregados do Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP-USP. Obrigada à **Profa. Dra. Suely Vilela Sampaio** e à **Tássia Rafaela Costa** pela parceria e ajuda durante esses anos.

Agradeço também a todos os meus familiares que sempre me acolheram quando retornava para casa e o coração apertava quando tinha que viajar novamente.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto-SP, obrigada por todos esses anos. Obrigada aos meus colegas de turma do curso Farmácia-Bioquímica, às turmas de vôlei (CEFER, LAURP, farmácia) e ao pessoal do handbol por proporcionarem momentos de descontração e risadas. E também aos amigos do meu amado boxe chinês (Sanda) que sempre me acolheram e trouxeram muitos momentos gostosos duante esses anos.

À secretária da pós-graduação da Toxicologia **Rosemary Ioshimine Gerolineto**, pelo atendimento e disposição na resolução das dificuldades que surgiram ao longo do mestrado. À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP)**, ao **Programa de Pós-Graduação de Toxicologia** e aos funcionários que possibilitaram ingressar no mestrado e pelo auxílio durante o desenvolvimento do projeto À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo # 2014/20344-9, 2015/00740-0 e 2011/23236-4), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo 302479/2019-8) e à Agência Brasileira de Inovação (FINEP) (processo 01.09.0447.00) pelos apoios financeiros concedidos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

LEAO, T. K. **Efeitos da sinefrina em associação com cafeína na indução de citotoxicidade, danos no DNA e modulação da expressão de genes relacionados à apoptose em células de hepatocarcinoma humano *in vitro***. 2022. 77f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O consumo abusivo de suplementos termogênicos ocorre mundialmente e deve ser observado com atenção devido ao seu uso para estimular a perda de peso e prevenir a obesidade. As formulações termogênicas, geralmente contêm sinefrina (SN) e cafeína (CAF), compostos estimulantes extraídos de fontes naturais, mas ainda não há estudo de toxicologia genética, como ensaios de mutagênese, genotoxicidade, carcinogênese e epigenética, que analisou o potencial da associação entre os dois compostos. Este estudo analisou as respostas toxicogenômicas induzidas por SN e CAF isoladamente ou em associação, em células humanas hepáticas tumorais HepG2 *in vitro*. Os compostos isolados SN (0,03-30 μM) e CAF (0,6 - 600 μM) não diminuíram a viabilidade celular ou induziram danos ao DNA, conforme avaliado usando os ensaios MTT e cometa, respectivamente. As concentrações *in vitro* associadas de SN (3 μM) e CAF (30 - 600 μM) foram semelhantes às concentrações plasmáticas encontradas em suplementos alimentares comerciais após administração. SN / CAF em proporções de 3:90 e 3:600 μM diminuíram significativamente a viabilidade celular e aumentaram os danos ao DNA em células HepG2. CAF (600 μM) e a associação SN / CAF nas razões 3:60, 3:90 e 3:600 μM promoveram a morte celular por apoptose, conforme demonstrado por citometria de fluxo. Resultados semelhantes foram observados na expressão gênica (RT-qPCR): SN / CAF regulou positivamente a expressão de genes relacionados à apoptose (*BCL-2* e *CASP9*) e relacionados ao reparo de DNA (*XPC*). SN / CAF em 3:90 μM também regulou negativamente a expressão de genes de controle do ciclo celular (*CDKN1A*). Em conclusão, a associação de SN / CAF reduziu a viabilidade celular induzindo apoptose, causou danos ao DNA e modulou a expressão transcricional de genes relacionados à apoptose, ciclo celular e reparo de DNA em células humanas hepáticas tumorais *in vitro*. Outros biomarcadores precisam ser investigados, pois a associação SF + CAF pode prejudicar a saúde dos consumidores de suplementos termogênicos.

Palavras-chave: Nutrigenômica; Citotoxicidade, HepG2; Ensaio do cometa; Expressão gênica.

ABSTRACT

LEAO, T. K. **Synephrine and caffeine combination effects on cytotoxicity, DNA damage and transcriptional modulation of apoptosis-related genes in human hepatocarcinoma HepG2 cells in vitro.** 2022. 77f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The abusive consumption of thermogenic supplements occurs worldwide and deserves special attention due to their use to stimulate weight loss and prevent obesity. Thermogenic formulations usually contain Synephrine (SN) and Caffeine (CAF), stimulating compounds extracted from natural sources, but there is still no genetic toxicology study, as mutagenesis, genotoxicity, carcinogenesis and epigenetic assays, that has analyzed the potential of the association between the two compounds. This study examined the toxicogenomic responses induced by SN and CAF, either alone or in association, in the human hepatic cell line HepG2 in vitro. SN (0.03–30 μM) and CAF (0.6–600 μM) alone did neither decrease cell viability nor induce DNA damage, as assessed using the MTT and comet assays, respectively. SN (3 μM) and CAF (30–600 μM) in vitro were combined at concentrations similar to those found in commercial dietary supplements after administration. SN/CAF at 3:90 and 3:600 μM ratios significantly decreased cell viability and increased DNA damage levels in HepG2 cells. CAF (600 μM) and the SN/CAF association at 3:60, 3:90, and 3:600 μM ratios promoted cell death by apoptosis, as demonstrated by flow cytometry. Similar results were observed in gene expression (RT-qPCR): SN/CAF up-regulated the expression of apoptosis- (*BCL-2 and CASP9*) and DNA repair-related (*XPC*) genes. SN/CAF at 3:90 μM also downregulated the expression of cell cycle control (*CDKN1A*) genes. In conclusion, the SN/CAF combination reduces cell viability by inducing apoptosis, damages DNA, and modulates the transcriptional expression of apoptosis-, cell cycle-, and DNA repair-related genes in human hepatic (HepG2) cells in vitro. Other biomarkers need to be investigated, as the association SF + CAF may harm the health of consumers of thermogenic supplements.

Keywords: Nutrigenomic; Cytotoxicity; HepG2 cells; Comet assay; Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Semelhanças entre as estruturas químicas dos compostos SN, adrenalina, noradrenalina e efedrina.....	3
Figura 2 - Redução do MTT para o cristal de formazan.....	7
Figura 3 - Estruturas do nucleoide e danos no DNA no ensaio cometa	9
Figura 4 - Fotomicrografia da linhagem celular HepG2 (Aumento original de 1000x)	16
Figura 5 - Estruturas químicas de (A) SN (B) CAF	17
Figura 6- Viabilidade celular (%) em células HepG2 tratadas após tratamento por 24 h com SN; 0,03 - 30 μ M e CAF; 0,6 - 600 μ M isoladas avaliada pelo ensaio MTT	25
Figura 7 - Viabilidade celular (%) em células HepG2 após tratamento por 24 h com associação de SN e CAF nas concentrações de 3:30, 3:60, 3:90 e 3:600 μ M avaliada pelo ensaio MTT	26
Figura 8 - Dano no DNA (%) em células HepG2 após tratamento por 4 h com SN; 0,03 - 30 μ M e CAF; 0,6 - 600 μ M isoladas avaliado pelo ensaio do cometa	27
Figura 9 - Dano no DNA (%) em células HepG2 após tratamento por 4 h com associação de SN e CAF concentrações de 3:30, 3:60, 3:90 e 3:600 μ M avaliado pelo ensaio do cometa.....	27
Figura 10 – (A) Porcentagem (%) de células viáveis, apoptóticas e necróticas em células HepG2 após tratamentos por 24 h com SN 3 μ M, CAF; 600 μ M, associações SN e CAF (3:60; 3:90 e 3: 600 μ M) e seus respectivos controles (B) histogramas de distribuição celular são marcados com Anexina V-FITC / Iodeto de Propídio (PI).....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de genes analisados por RT-qPCR e suas vias relacionada	20
Tabela 2 - Expressão relativa de genes associados à apoptose, inflamação, reparo de DNA, resposta de dano de DNA e vias de sinalização do ciclo celular na linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$2^{-\Delta\Delta CT}$	Método 2-delta delta Ct
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANSES	French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety
BCL-2	Linfoma de células B2
Ca ²⁺	Cátio positivo cálcio
CAF	Cafeína
Caco-2	Linhagem celular adenocarcinoma colorretal humano
CASP9	Caspase-9
CBMN-cyt	Cytokinesis block micronucleus cytome assay
CCK-8	Ensaio contagem de célula kit-8
Ct	Cycle Threshold
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DP	Desvio Padrão
CDKN1A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A
EGCG	Epigallocatequina galato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	European Medicines Agency
ERs	Espécies Reativas
EURL ECVAM	European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing
FDA	Food And Drug Administration
GG-NER	Global-genome nucleotide excision repair
GLUT-4	Transportador de glicose 4
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio

HCIO ₄	Ácido perclórico
H4IIE	Linhagem celular de hepatocarcinoma de rato
HepG2	Linhagem celular de hepatocarcinoma humano
hFOB 1.19	Linhagem celular osteoblástica humana
HK-2	Linhagem celular renal humana
ICH	International Conference on Harmonisation
IP	Iodeto de propídeo
JB6 Cl 41	Linhagem celular epidérmica de camundongo
L5178Y	Linhagem celular de linfoma de camundongo
L6	Linhagem celular de tecido muscular esquelético de rato
LDH	Lactato desidrogenase
LMP	Low melting point
MCF-7	Linhagem celular tumoral mamária
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
MDCKII	Linhagem celular renal de canino
MMS	Methyl Methanesulfonate
MN	Micronúcleo
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]
N2a	Linhagem celular de neuroblastoma de camundongo
NER	Nucleotide excision repair
NMP	Normal melting point
NMU2R	Receptor 2 da neuromedina-U
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
p21	Proteína reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular
p53	Proteína supressora de tumor codificada pelo gene <i>TP53</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PS	Phosphatidylserine

RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SGCE	Single-cell electrophoresis
SN	<i>p</i> -sinefrina
TMR	Taxa metabólica de repouso
TC-NER	Transcription-coupled nucleotide excision repair
XPC	Xeroderma Pigmentosum C
WADA	World Anti-Doping Agency

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. SUPLEMENTOS ALIMENTARES	1
1.2. SINEFRINA E CAFEÍNA.....	2
1.3. ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	6
1.3.1. VIABILIDADE CELULAR	6
1.3.2. ENSAIO DE GENOTOXICIDADE.....	8
1.3.3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	10
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. OBJETIVO GERAL	13
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. REAGENTES QUÍMICOS.....	15
3.2. LINHAGEM CELULAR	15
3.3. CONCENTRAÇÕES DE SN E CAF	16
3.4. ENSAIO DO MTT	17
3.5. ENSAIO DO COMETA	18
3.6. CITOMETRIA DE FLUXO	19
3.7. RT-qPCR.....	19
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
5. RESULTADOS.....	25
5.1. SN E CAF ISOLADOS NÃO DIMINUÍRAM VIABILIDADE CELULAR	25

5.2. SN EM ASSOCIAÇÃO COM AS MAIORES CONCENTRAÇÕES DE CAF REDUZIRAM A VIABILIDADE CELULAR.....	25
5.3. A ASSOCIAÇÃO SN / CAF PROMOVEU DANOS AO DNA NAS MAIORES CONCENTRAÇÕES	26
5.4. SN ASSOCIADA À CAF INDUZIU MORTE CELULAR VIA APOPTOSE.....	28
5.5. SN ASSOCIADA À CAF MODULOU A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO REPARO DE DNA, CICLO CELULAR E APOPTOSE	29
<u>6. DISCUSSÃO</u>	<u>34</u>
<u>7. CONCLUSÕES</u>	<u>45</u>
<u>8. REFERÊNCIAS.....</u>	<u>47</u>
<u>9. ANEXO.....</u>	<u>58</u>
9.1. ANEXO A – MENÇÃO HONROSA – XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA 2019	58
9.2. ANEXO B – MANUSCRITO- SYNEPHRINE AND CAFFEINE COMBINATION PROMOTES CYTOTOXICITY, DNA DAMAGE AND TRANSCRIPTIONAL MODULATION OF APOPTOSIS-RELATED GENES IN HUMAN HEPG2 CELLS.....	59

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Suplementos Alimentares

A obesidade é um problema de saúde pública que acomete 39% das pessoas globalmente, sendo considerada um fator de risco para doenças crônicas e está associada ao desenvolvimento de vários distúrbios, incluindo síndromes metabólicas, hipertensão, aterosclerose, dislipidemia, doenças cardiovasculares, diabetes tipo II e alguns tipos de câncer (DE LORENZO et al., 2019; PARIDA; SIDDHARTH; SHARMA, 2019). Os estudos sobre o tratamento da obesidade devem incluir uma equipe multidisciplinar que integra dieta, exercícios e farmacoterapia. As estratégias recomendadas para a perda de peso consistem em quatro eixos principais: modificação do estilo de vida (dieta e exercícios físicos), terapia cognitivo-comportamental, cirurgia bariátrica e farmacoterapia (KHENISER; SAXON; KASHYAP, 2021). Uma alternativa é o uso de suplementos termogênicos para diminuir a ingestão calórica, estimular a saciedade e promover a perda de peso (STOHS; BADMAEV, 2016). Esses suplementos são compostos biologicamente ativos que estimulam a termogênese e a oxidação de gorduras (KIM; PARK; LIM, 2016; STOHS; BADMAEV, 2016).

O consumo de suplementos alimentares tem aumentado na Europa e na América, sendo que aproximadamente 15% dos norte-americanos já utilizaram alguma vez suplementos alimentares com objetivo de perda de peso (FERREIRA et al., 2020). Atualmente, a maior divulgação dos suplementos em mídias, como TV, rádio, imprensa, internet e as vendas online, em drogarias e farmácias facilitaram para que o consumo desses suplementos alimentares tenha aumentado (CLARK; WELCH, 2021). Os suplementos alimentares são utilizados por pessoas em diversas idades, como jovens, adultos e idosos e também por atletas profissionais para aumentar a performance ou de forma recreativa por atleta amadores, pessoas que, frequentemente, realizam alguma atividade física ou apenas desejam emagrecer (JEĐREJKO; LAZUR; MUSZYŃSKA, 2021). Estudos recentes identificaram que suplementos dietéticos comercialmente disponíveis contêm uma associação de ingredientes termogênicos que

aumentam a taxa metabólica de repouso (TMR). Com essa influência positiva na TMR, os suplementos termogênicos ganharam ainda mais magnitude e força para sua utilização no emagrecimento (FERREIRA et al., 2020).

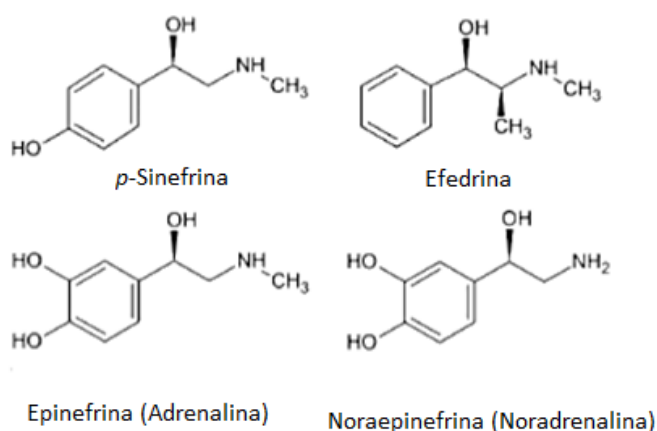
A magnitude pode variar com base no ingrediente ativo e nas combinações das substâncias utilizadas nos termogênicos (CAMPBELL et al., 2016). Entretanto, suplementos termogênicos para perda de peso, geralmente, são consumidos sem supervisão médica (BLANCK et al., 2007) devido à crença de que os suplementos fitoterápicos e dietéticos são “naturais” e livres de efeitos adversos para os consumidores (WALTER, NAVARRO, ROSSI, 2018). Além disso, um estudo analisou 272 produtos utilizados como suplementos alimentares e 51% desses produtos apresentaram diferença entre os compostos apresentados no rótulo e aqueles que estavam de fato presentes nos suplementos alimentares (NAVARRO et al., 2019).

1.2.Sinefrina e Cafeína

Muitos dos suplementos utilizados têm como compostos ativos predominantes derivados de alcaloides de efedrina e, mais recentemente, a sua associação com outros compostos, incluindo a cafeína (CAF) anídrica, extratos de efedrina que são livres de alcaloide, ácido clorogênico, epigallocatequina galato (EGCG), com CAF e sinefrina (SN) (CLARK; WELCH, 2021). A SN é um derivado de feniletilamina presente em diferentes frutos como na laranja amarga (*Citrus aurantium*), laranja de Sevilha, laranja verde e está presente em outras espécies de cítricos como a tangerina (RUIZ-MORENO et al, 2021). Essa substância é utilizada como ingrediente ativo em suplementos esportivos por possui propriedades termogênicas com a intenção de promover a perda de peso, bem como melhorar a performance atlética e aumentar a energia (BAKHIYA et al., 2017). Estudos anteriores demonstraram que a ingestão aguda e crônica de suplementos contendo SN e outras substâncias simpatomiméticas como CAF e octopamina, podem induzir aumentos no gasto energético de repouso e lipólise (GUTIÉRREZ-HELLÍN; DEL COSO, 2016).

A SN tornou-se muito popular nos últimos anos devido à sua semelhança química e estrutural com outros compostos anfetaminicos como a efedrina, adrenalina e noradrenalina (Figura 1), que atualmente estão proibidos pela Organização Internacional Anti-Doping (*World Anti-Doping Agency - WADA*) como estimulantes físicos (BAKHIYA et al., 2017; GUTIÉRREZ-HELLÍN; RUIZ-MORENO; DEL COSO, 2020). O consumo da SN tem mostrado aumentar a glicogenólise, a glicólise, e o consumo de oxigênio. Tal fato pode ser observado pela sinalização α - e β -adrenérgica, embora exijam a participação simultânea de AMPc e Ca^{2+} (STOHS; SHARA; RAY, 2020). A SN não tem efeitos perigosos significativos em doses comumente empregadas destinadas a promover a termogênese (STOHS, 2017).

Figura 1 - Semelhanças entre as estruturas químicas dos compostos SN, adrenalina, noradrenalina e efedrina.



Fonte: Adaptado de BAKHIYA et al., (2017).

A concentração de SN em alguns suplementos contendo laranja amarga difere significativamente da concentração declarada no rótulo (PAWAR; SAGI; LEONTYEV, 2020). A diretriz Health Canada recomenda cautela no consumo de produtos que contenham estimulantes devido aos graves efeitos adversos que eles podem causar. Por exemplo, produtos fitoterápicos com SN associados à CAF são contraindicados para pacientes

em uso de anti-hipertensivos, medicamentos para a tireoide e inibidores da monoamina oxidase (MARLES, 2011).

Como previamente descrito, geralmente, a composição dos suplementos termogênicos além de conter SN, possui a adição de CAF (CLARK; WELCH, 2021). A CAF é conhecida como um alcaloide do grupo das xantinas que atua como um estimulante do sistema nervoso central e é um dos estimulantes mais consumidos do mundo, sendo que a quantidade de café consumido pela população adulta pode variar de 3 a 4 xícaras por dia, totalizando um consumo de aproximadamente 300 a 400 mg de CAF (GRGIC et al., 2021; HIGDON; FREI, 2006). O consumo diário de até 400 mg de cafeína proveniente de todas as fontes alimentares ao longo do dia é considerado seguro para adultos saudáveis. Dessa forma, o limite máximo diário estabelecido para ser recomendado pelo fabricante de suplementos alimentares de cafeína é de 200 mg (ANVISA, 2018).

Sabe-se que a característica ergogênica da CAF depende dos receptores de adenosina A1 e A2A como o principal mecanismo durante os exercícios de alta intensidade, sendo que diminui a sensação de cansaço durante as atividades (COLLADO-MATEO et al., 2020). A sua ação na ativação do sistema nervoso central mostrou diminuir o apetite, aumentar a saciedade e estimular o gasto energético, em parte pelo aumento da oxidação da gordura (HARPAZ et al., 2017). A CAF sozinha não é citotóxica ou genotóxica para linhagens de células humanas em concentrações de até 1000 μM (D'AMBROSIO, 1994). Entretanto, foi observado em 92 casos que a concentração plasmática de CAF (73 mg/L (375,92 μM) – 1040 mg/L (5355,58 μM) administrada por via oral/intravenosa levaram a fatalidade em pessoas de diferentes gêneros e idades (CAPPELLETTI et al., 2018). Por isso, é importante que sejam realizados estudos adicionais para determinar os efeitos perigosos da SN associada com CAF.

Inicialmente, a CAF quando associada à SN, em relação ao desempenho esportivo, mostrou aumentar a potência e a velocidade do desempenho, sugerindo um efeito termogênico aumentado (RATAMESS et al., 2015). Todavia, essa associação em suplementos termogênicos tem aumentado o número de efeitos adversos relatados à saúde humana, principalmente com relação aos sistemas cardiovascular (onde foram

descritos efeitos como hipertensão, taquicardia e cardiotoxicidade) e nervoso (ligado a acidentes vasculares cerebrais) (ROSSATO et al., 2011; STOHS et al., 2012). Em uma revisão que avaliou mais de 20 artigos, Stohs et al. (2012), observaram que a SN sem a associação com outros compostos como CAF, por exemplo, não causa quaisquer tipos de efeitos adversos em estudos *in vivo* e pré-clínicos em humanos avaliando parâmetros hemodinâmicos e cardiovasculares. Entretanto, os suplementos alimentares que estão presentes em diferentes compostos alimentares, entre eles SN e CAF, podem estimular significativamente o sistema cardiovascular evidenciado por elevação da pressão sanguínea e frequência cardíaca (HALLER; BENOWITZ; JACOB, 2005).

Em 2014, a agência Francesa de Saúde Alimentar, Ambiental e Ocupacional (*French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety - ANSES*) selecionou aproximadamente 20 relatórios de reações adversas coletadas de 2009 a 2014, que estavam relacionados à saúde cardiovascular e ao consumo de suplementos alimentares que contêm SN. A maioria dos casos relatados diz respeito à pessoas que usaram esses suplementos alimentares em um contexto esportivo e/ou para fins de perda de peso. Os produtos consumidos em questão continham CAF, indicando que SN quando associada a CAF pode causar efeitos cardiovasculares graves (ANSES, 2014). Bakhiya et al. (2017) realizaram estudos em ratos que foram tratados diariamente com extratos de *C. aurantium*, que contém SN, e foram adicionadas doses de CAF. Observou-se um aumento da pressão sanguínea e da frequência cardíaca em todos os grupos tratados com SN e esses efeitos foram mais pronunciados quando a CAF foi adicionada.

Todavia, estudos sobre possíveis perigos da associação de SN à CAF, principalmente os que aplicam ensaios de genética toxicológica que avaliam a citotoxicidade e genotoxicidade, ainda são ausentes na literatura.

Deste modo, este estudo teve como objetivo examinar se diferentes concentrações de SN e CAF, isoladamente ou em associação, induzem citotoxicidade, morte celular e dano ao DNA na linhagem celular de hepatocarcinoma humano HepG2 *in vitro*. Considerando que a transcriptômica é a tecnologia ômica mais utilizada (SCHMITZ-SPANKE, 2019), as respostas toxicogenômicas foram avaliadas por meio da análise da

expressão transcricional de genes relacionados à apoptose, inflamação, resposta a dano ao DNA, reparo do DNA e vias do ciclo celular.

1.3. Ensaaios *in vitro*

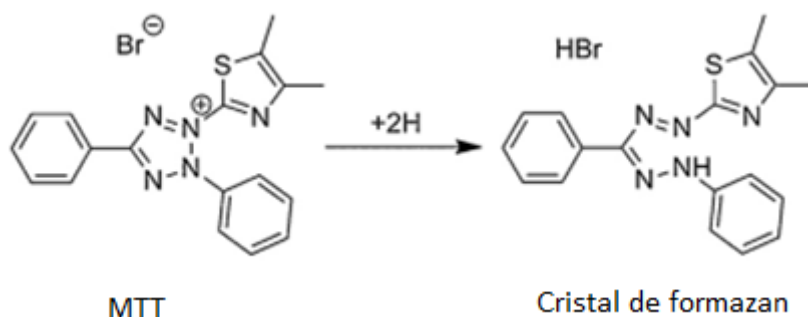
1.3.1. Viabilidade celular

Para avaliar o possível perigo de um composto é indispensável e valiosa a obtenção de informações sobre a sua toxicidade, seja esse composto isolado ou associado com outra substância. Um modelo de cultura de células *in vitro*, por exemplo, pode ser utilizado inicialmente para analisar a toxicidade de compostos antes da avaliação em estudos com animais, sendo que os estudos estão cada vez mais avançando na substituição, redução e refinamento (3Rs) dos seus testes, além de também reduzir o custo no desenvolvimento de um produto (MYERS et al., 2017). Os ensaios de citotoxicidade são recomendados como os primeiros a serem realizados em estudos de genética toxicológica, pois segundo a “*European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing*” (EURL ECVAM), é por meio dessa avaliação inicial detalhada, que se pode reduzir a ocorrência de resultados falso-positivos ou falso-negativos gerados na avaliação de compostos em células de mamíferos (HAMM et al., 2018; KIRKLAND et al., 2016). Existem diferentes técnicas de detecção de toxicidade, como por exemplo, o ensaio de viabilidade celular, no qual há diferenciação de células viáveis/não viáveis através dos métodos colorimétricos que são utilizados como uma avaliação rápida e econômica e detectam as alterações de funcionamento de enzimas ou organelas (ALAMOUDI et al., 2018).

Um destes testes é o ensaio do Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT), que foi descrito inicialmente por Mosmann (1983) e consiste na redução do sal de tetrazolium (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Figura 2) principalmente pela enzima da membrana interna mitocondrial, não mitocondrial e redutases de membrana plasmática de células formando os cristais de formazan (1-[4,5-dimetil-2-il]3,5-diphenylformazan (NGA et al., 2020). Segundo Mosmann (1983), este ensaio serve como alternativa para medir a atividade celular.

Portanto, estes cristais produzidos estão diretamente relacionados à quantidade de células metabolicamente ativas, uma vez que a atividade de redução do MTT é atribuída à atividade de enzimas redutases intracelulares, fornecendo uma viabilidade estimada (GRELA; KOZŁOWSKA; GRABOWIECKA, 2018).

Figura 2 - Redução do MTT para o cristal de formazan



Fonte: Adaptada de GRELA, KOZŁOWSKA; GRABOWIECKA (2018).

Outro ensaio utilizado para análise da viabilidade celular é a citometria de fluxo, que é capaz de apresentar diferentes técnicas e aplicações como contagem celular, ensaio de fagocitose, análise de ciclo e proliferação celular, análise de dano no DNA, diagnóstico de doenças e análise de apoptose (DELMONTE; FLEISHER, 2019; JOHANSSON et al., 2017; McKINNON, 2018). A análise da morte celular por apoptose pode ser identificada por meio de diferentes tipos de vias bioquímicas e marcadores que podem variar de acordo com a linhagem celular estudada, pois ocorrem mudanças morfológicas e bioquímicas que conduzem o processo de morte celular como a condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e do material genético, assim como alterações na membrana celular (MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018; TELFORD, 2018).

O fosfolípido de membrana fosfatidilserina (*phosphatidylserine* - PS), que normalmente se localiza no interior da membrana celular, é translocado para o lado externo e através dessa alteração, a Anexina V se liga por afinidade ao PS, sendo possível identificar a emissão de fluorescência quando as células estão em processo inicial de apoptose (MARTIN et al., 1995; MARTIN et al., 1996; VAN ENGELAND et al., 1998). Em consequência,

as células que passaram pelo processo de morte celular por necrose ou estão em fase tardia da apoptose tiveram alteração de permeabilidade na membrana celular, permitindo com que o fluoróforo iodeto de propídeo (IP) se ligue ao DNA e sendo identificado também pela emissão de fluorescência (VAN ENGELAND et al., 1998).

Assim, a utilização desses testes se tornou importante para determinação de concentrações a serem testadas em ensaios posteriores, como os ensaios de genotoxicidade, que identificam possíveis danos causados ao material genético. A identificação do potencial genotóxico representa uma etapa crítica e decisiva na avaliação de compostos químicos, tais como fármacos, praguicidas, aditivos alimentares etc., sendo que agências regulatórias exigem a execução de uma série de ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade para a liberação de produtos no mercado consumidor (DIRECTORATE et al., 2017). Efeitos como quebras de fita simples e duplas do DNA ou a formação de aductos podem ser utilizados como indicadores para prever a carcinogenicidade de um composto (HARTWIG et al., 2020; PETKOV et al., 2015).

1.3.2. Ensaio de genotoxicidade

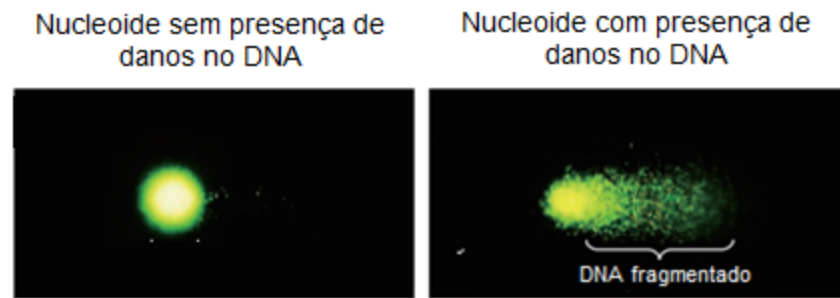
A utilização de modelos *in vitro* para a determinação da genotoxicidade é usada como primeiro passo para a identificação de potenciais compostos que causem perigo à saúde (ZUANG et al., 2021). Vários métodos atualmente são empregados e aceitos para a detecção dos efeitos biológicos iniciais induzidos no DNA e cromossomos pelos agentes genotóxicos, como o teste de AMES, ensaio do micronúcleo e o ensaio do cometa (CORDELLI; BIGNAMI; PACCHIEROTTI, 2021; SASSA et al., 2021; SOMMER; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2020). Nos últimos 30 anos, o ensaio do cometa (*comet assay* ou *single-cell gel electrophoresis - SGCE*), amplamente usado para a investigação de danos no DNA e reparo, tornou-se um teste viável financeiramente e facilmente reproduzível (MOLLER, 2018).

O ensaio do cometa é uma técnica versátil, sensível, simples e econômica, usada para avaliar danos e reparo de DNA em uma célula individual através das análises de quebras de DNA de fita simples / dupla em

sítio alcalinos lábeis (locais apurínicos / apirimidínicos) e danos de pares de bases (ZUANG et al., 2021). Por conta de sua simplicidade e rapidez, o ensaio do cometa tem sido usado para estudos de exposição ocupacional e intervenções dietéticas com antioxidantes e suplementos alimentares (COLLINS et al., 2014). As investigações em toxicologia genética utilizando o ensaio do cometa têm tido como desafio o uso com maior frequência de linhagem de células *in vitro*, como método alternativo na redução ao uso de animais, sendo esta uma das propostas da *International Conference on Harmonisation (ICH) for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ELLIS et al., 2013).

As estruturas identificadas no ensaio do cometa podem ser diferenciadas em forma de uma “cabeça” e uma “cauda” representando diferentes estruturas de DNA (Figura 3). Nesse ensaio, o DNA danificado migra para fora do núcleo para formar uma estrutura que se assemelha a uma “cauda” de um cometa durante a eletroforese e o DNA que permanece intacto no nucleóide apresenta uma estrutura que se assemelha a “cabeça” do cometa. Após a eletroforese, o DNA é visualizado por coloração com corante de ligação ao DNA sob microscopia de fluorescência (HONG et al., 2020). A estrutura denominada cabeça contém o nucleóide com DNA não fragmentado e a cauda consiste predominantemente em DNA de fita simples. O tamanho da cauda mostra o nível de dano ao DNA, sendo que o aparecimento da cauda pode ser induzido por necrose e apoptose (MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018). O dano do DNA nas imagens do ensaio cometa pode ser determinado por score visual ou análise por software (GANAPATHY et al., 2016). Através do score visual, é possível dividir em categorias diferentes com base no grau de dano ao DNA (visualmente comprimento e forma estimados da cauda) subjetivamente. No entanto, a análise de imagens por software fornece diferentes parâmetros de cada cometa por computação baseada em pixels. Embora o score visual seja simples e mais econômico, a análise de imagem realizada por software é preferível para avaliar danos ao DNA, pois pode fornecer informações quantificadas objetivas dos cometas formados (HONG et al., 2020).

Figura 3 - Estruturas do nucleóide e danos no DNA no ensaio cometa



Legenda: Adaptado de MATSUYAMA et al., 2009.

1.3.3. Análise de expressão gênica

A capacidade de identificar os efeitos de associações de fármacos ou de compostos bioativos em nível molecular é limitada, parcialmente pela dificuldade de acessar e obter respostas da associação de duas monoterapias. A associação pode alcançar múltiplos alvos ou a mesma via de sinalização, podendo reduzir os efeitos de cada composto, reduzindo a toxicidade, ou aumentar o mecanismo de resistência celular, ou ainda prolongar a exposição ao tratamento. As análises de transcriptoma apresentam resultados confiáveis e únicos nas investigações de associações de fármacos e compostos bioativos (DIAZ et al., 2020). A transcriptômica é uma técnica bem estabelecida na pesquisa toxicogenômica e tem sido usada para identificar padrões de expressão gênica de compostos hepatotóxicos (WANG et al., 2020; ZHU et al., 2021; VAN DEN HOF et al., 2014). Existem diferentes métodos utilizados para analisar a expressão gênica, como Análise Serial da Expressão Gênica (*Serial Analysis of Gene Expression - SAGE*); Microarranjo de DNA e reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) (KOZIAN; KIRSCHBAUM, 1999). A técnica PCR foi desenvolvida por Kary Mullis e colaboradores, o que os levou a receberem o prêmio Nobel de Química em 1983 (GARCIA; MA, 2005).

Como previamente descrito, ainda não existem estudos de citotoxicidade e genotoxicidade com experimentos planejados e controlados que avaliem o perigo do uso associado de SN e CAF em células humanas *in vitro*. Desta forma, este estudo pretende analisar os efeitos citotóxicos e genotóxicos desta associação em células humanas HepG2 *in vitro*. Sendo assim, a hipótese básica a ser examinada neste estudo é a de que SN associada à CAF, por meio da indução de efeitos citotóxicos e alteração da expressão gênica, cause danos ao DNA (efeitos genotóxicos) em linhagens de células HepG2 *in vitro*.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos citotóxicos e genotóxicos de diferentes concentrações de sinefrina e cafeína em associação e isoladamente em células hepáticas tumorais (HepG2) *in vitro*. Ademais, também foram avaliadas a expressão gênica e morte celular por meio dos ensaios de RT-PCR e citometria de fluxo.

2.2. Objetivo Específico

- Avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações isoladas e associadas de SN e CAF por meio do ensaio do MTT em células humanas hepáticas tumorais (HepG2) *in vitro*;
- Avaliar os possíveis efeitos genotóxicos de diferentes concentrações isoladas e/ou associadas de SN e CAF por meio do ensaio do cometa;
- Analisar morte celular por meio do ensaio de citometria de fluxo após tratamento de concentrações isoladas e/ou associadas de SN e CAF;
- Analisar a expressão gênica para citotoxicidade (apoptose, ciclo celular e inflamação) e genotoxicidade (resposta a danos no DNA e excisão de bases, excisão de nucleotídeos, incompatibilidade, recombinação homóloga, end-join não homóloga reparo) pelo ensaio RT-qPCR após tratamento com diferentes concentrações associadas de SN e CAF em células humanas hepáticas tumorais (HepG2) *in vitro*;

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes químicos

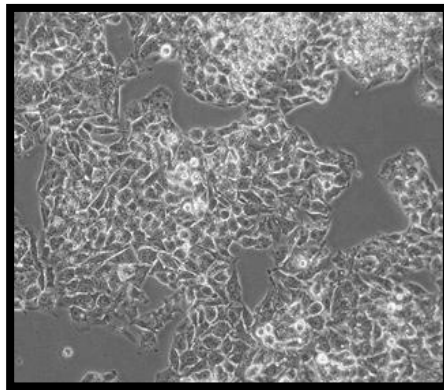
p- (\pm) Sinefrina (SN; $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}(\text{CH}_2\text{NHCH}_3)\text{OH}$; pureza $\geq 98\%$; CAS: 94-07-5), cafeína (CAF; $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$, pureza $\geq 99\%$; CAS: 58-08-2), brometo [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan (MTT, CAS: 298-931), etanol (CAS: 64-17-5), metanossulfonato de metila (*Methyl Methanesulfonate* - MMS, CAS: 66-27-3), ácido perclórico (HClO_4 , CAS: 7601-90-3) e outros produtos químicos de grau analítico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os reagentes para cultura de células, mistura de antibióticos 100X (penicilina, estreptomicina, neomicina), Meio Eagle Modificado de Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - DMEM), Soro Bovino Fetal (SBF), Tripsina-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 5X; Kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (catálogo # 4368814), PureLink® RNA Mini kit (catálogo # 12183018A); Grau de amplificação de DNase I (catálogo # 18068015); Agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point* - LMP) (CAS: 39346-81-1); Agarose de Ponto de Fusão Normal (*Normal Melting Point* - NMP) (CAS: 9012-36-6); Placas de matriz TaqMan Custom RT-qPCR (catálogo # 4413258; Array ID # RP7DPC2); TaqMan Fast Universal PCR Mastermix 2X (catálogo # 4352042) e MicroAmp® Clear Adhesive Film (catálogo # 4306311) foram adquiridos da Thermo Fischer Scientific (Carlsbad, CA, EUA). GelRed® foi adquirido da Biotium (Fremont, CA, EUA). Frascos de cultura (25 cm³), placas de cultura de 6 poços, 12 poços, 24 poços e 96 poços foram adquiridos na TPP (Trasadingen, Suíça) e Greiner Bio-One (Monroe, NC, EUA).

3.2. Linhagem celular

Células de hepatocarcinoma humano (HepG2) (Figura 4) foram obtidas na American Type Culture Collection (catálogo ATCC # HB-8065) e cultivadas de acordo com o protocolo relatado por Bal-Price e Coecke (2011). Resumidamente, as células HepG2 foram cultivadas em DMEM com 10% de SBF, 1% de antibiótico (5 mg / mL de penicilina, 5 mg / mL de estreptomicina e 10 mg / mL de neomicina) e 0,024% de NaHCO_3 , em uma incubadora de CO_2 com 5% de atmosfera a 37 ° C e 96% de umidade relativa. Os meios de cultura foram trocados a cada 2-3 dias. Quando as culturas atingiram a confluência, as células foram lavadas duas vezes

com solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline - PBS*, pH 7,4), tripsinizadas com tripsina / EDTA 0,25%, centrifugadas em $174 \times g$ por 5 min e subcultivadas. Todos os experimentos foram conduzidos entre a terceira e a oitava passagem das células. O agente alquilante MMS foi utilizado como controle positivo, conforme recomendação de Kirkland et al. (2016) em uma lista com compostos químicos a serem usados como controle positivo em testes de genotoxicidade.

Figura 4 - Fotomicrografia da linhagem celular HepG2 (Aumento original de 1000x)



Fonte: *American Type Culture Collection (ATCC)*, 2013.

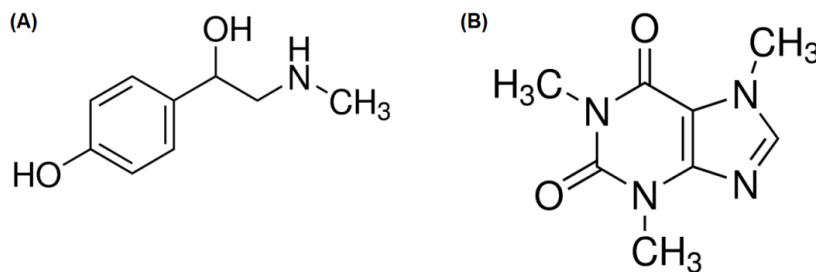
3.3. Concentrações de SN e CAF

Inicialmente, uma solução estoque SN (3000 μM) foi preparada em 5% de HClO_4 (ROSSATO et al, 2010) e posteriormente diluída em meio de cultura para as concentrações necessárias (0,03, 0,3, 3 e 30 μM) para cada série experimental. Essas concentrações foram escolhidas com base no estudo de: (I) Haller et al. (2008), que em seres humanos, demonstraram que após uma administração oral de 33 μM (5,5 mg), a concentração plasmática máxima de SN foi de 2 ng/mL (0,03 μM = 5 ng/mL) e (II) Da Silva Pereira et al. (2016), que ao avaliar o perfusato de saída no fígado de ratos Wistar por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), mostraram a extração de 9 μM de SN (90%) quando administrada oral na concentração de 10 μM . Para a CAF ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$, pureza $\geq 99\%$) as concentrações de 0,6; 6; 60 e 600 μM foram escolhidas de acordo com: (I) a instrução normativa (IN) Anvisa nº 28, de 26 de julho de 2018 que recomenda a concentração segura de cafeína como dose única de 200 mg (1029 μM) e (II) nos estudos prévios de

Dong et al. (2015) que avaliaram os efeitos de cafeína em células HepG2 entre concentrações de 50 – 600 μM , obedecendo relatos que a concentração plasmática em humanos é limitada a 80 $\mu\text{g/mL}$ (412 μM) para evitar toxicidade.

Após a realização dos ensaios preliminares, análise dos resultados e levando em consideração (I) a proporção de SN/CAF (1:10 v / v), respectivamente) presente na formulação de suplementos e (II) limites que não ultrapassem possíveis valores plasmáticos para o ensaio associado das duas substâncias, foram selecionadas as concentrações nas proporção de proporções 1:10, 1:20, 1:30 e 1: 200, utilizado então 3 μM de SN e 30, 60, 90 e 600 μM de CAF.

Figura 5 - Estruturas químicas de (A) SN (B) CAF



Fonte: Sigma-Aldrich (2016).

3.4. Ensaio do MTT

O ensaio de MTT foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Mosmann, (1993). As células HepG2 (1×10^4) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas por 24 h antes do tratamento. Após foram realizados os tratamento com: SN (0,03, 0,3, 3 e 30 μM) ou CAF (0,6, 6, 60 e 600 μM) isoladas; SN (3 μM) associada com CAF (30; 60, 90 e 600 μM); MMS (300 μM ; controle positivo); HClO_4 (0,05%; controle de veículo); e 1% PBS (controle negativo), por 24 horas. A solução estoque de 5 mg / mL de MTT em PBS foi diluída para 0,5 mg / mL em meio de cultura (10: 100 μL v / v; 0,5 mg / mL) e adicionada a cada poço. Após incubação por 4 h, o sobrenadante foi substituído por DMSO. A absorbância foi registrada em um espectrofotômetro (Biotek Elx800; Winooski, VT, EUA) ajustado em $\lambda = 570$ nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada após a normalização com o controle negativo (PBS), considerada 100%

de viabilidade celular. Todos os experimentos foram realizados em cinco repetições técnicas ($n = 5$) e três experimentos biológicos ($n = 3$).

3.5. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com o protocolo de Tice et al, (2000). Inicialmente, células HepG2 (3×10^5) foram semeadas em uma placa de cultura de 12 poços com meio DMEM completo e cultivadas em condições padrão por 24 horas. As células foram tratadas durante 4 horas com os compostos SN (0,03; 0,3; 3 e 30 μM) ou CAF (0,6, 6, 60 e 600 μM) isolados; SN (3 μM) associado com quatro concentrações de CAF (30; 60; 90 e 600 μM); MMS (300 μM ; controle positivo); HClO_4 (0,05%; controle de veículo); ou PBS a 1% (controle negativo). A viabilidade celular foi determinada pela técnica de exclusão de azul Trypan usando o Countess Automated Cell Counter (Life Technologies; Carlsbad, CA, EUA). Apenas as amostras com viabilidade $> 80\%$ foram submetidas ao ensaio do cometa. Cada pellet celular inicialmente semeado ($3 \times 10^5/200 \mu\text{L}$) em cada poço, com viabilidade $> 80\%$, foi suspenso em agarose LMP 0,5% e transferido para lâminas microscópicas pré-revestidas com agarose NMP 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínulas e incubadas a 4°C por 20 min. As lamínulas foram removidas e cada tratamento foi imerso em solução de lise preparada recentemente, (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10) durante 1 h, a 4°C . As lâminas (duas réplicas por tratamento) foram incubadas por 20 min em uma câmara de eletroforese fria cheia com tampão (300 mM de NaOH e 1 mM de EDTA pH > 13), no escuro, e a eletroforese foi conduzida em condições padrão (25 V; 300 mA; 1,25 V / cm) durante 20 min. As lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M pH 7,5, secas ao ar, fixadas em etanol absoluto por 5 min e coradas com GelRed® (Biotium Inc., Fremont, CA, EUA) (GelRed™ / PBS; 1: 10.000 μL ; v / v). Em seguida, foram analisados em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Axiostar Plus; Jena, Alemanha) com filtro de excitação $\lambda = 515\text{-}560\text{nm}$ e filtro de barreira $\lambda = 590\text{nm}$, com auxílio do software Comet Assay IV™ (Perceptive Instruments; Haverhill, Reino Unido). A intensidade da cauda (% DNA na cauda) foi usada como parâmetro de análise. Todos os experimentos foram realizados em três repetições biológicas ($n = 3$), e cem nucleoides para cada concentração foram analisados. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (DP).

3.6. Citometria de Fluxo

A análise de citometria de fluxo foi realizada utilizando o Kit Dead Cell Apoptosis com Anexina V-FITC e IP (Cat Nº V13242; Invitrogen), após 24 h de tratamento com SN (3 μ M), CAF (600 μ M), SN / CAF (3:60; 3:90; 3: 600 μ M) ou seus respectivos controles negativos (1% PBS), veículo (0,05% HClO₄) e positivo (MMS; 300 μ M). As células HepG2 (2×10^5) foram semeadas em uma placa de cultura de 12 poços com meio DMEM completo e cultivadas em condições padrão por 24 h. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4), tripsinizadas com TrypLE™ Express Enzyme (1X) e centrifugadas a 300 xg por 5 min. O sobrenadante foi removido, os pellets celulares foram suspensos em tampão de ligação de anexina (1X) e as suspensões transferidas para tubos de citometria de fluxo (Falcon® Round-Bottom Polystyrene Tubes; Corning, Tewksbury, MA, USA). As células foram incubadas com Anexina V-FITC por 15 min em um banho de gelo, misturadas com IP (2 μ g / mL), e imediatamente analisadas em um Citômetro de Fluxo BD LSR Fortessa® (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), usando $\lambda = 488$ nm de laser de excitação e emissão detectada em $\lambda = 530/575$ nm (ou equivalente). Foram analisados 10000 eventos em triplicata técnica para cada tratamento e as células não marcadas com Anexina V ou IP foram consideradas viáveis. As células marcadas com anexina (com marcação com IP) foram consideradas apoptóticas e as células marcadas apenas com IP foram consideradas necróticas. Essas análises foram realizadas no laboratório multiusuário de Imagens de Alta Resolução e Estudos Celulares (LIAREC) da FCFRP-USP.

3.7. RT-qPCR

A expressão de mRNA foi quantificada por PCR em tempo real (RT-qPCR) usando o protocolo relatado por Nolan et al. (2006). Células HepG2 (5×10^5) foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² com meio completo, por 24 h, a 37 °C, e sob 5% de CO₂ para estabilização. As células foram tratadas durante 6 horas com HClO₄ (0,05%; veículo de controle) ou SN (3 μ M) associada com CAF (90 e 600 μ M). As células foram colhidas e o RNA total foi extraído com o Kit PureLink® RNA Mini, de acordo com as especificações do fabricante. A quantidade, integridade e qualidade do extrato de RNA total foram determinadas por

espectrofotometria (NanoDrop 2000 TM, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), considerando as taxas de absorvância A260 / 280 e A260 / 230 entre 1,8 a 2,2. A integridade do RNA também foi avaliada por eletroforese desnaturante em gel de agarose a 1%, segundo Aranda et al. (2012). Para eliminação do DNA genômico, o RNA total foi tratado com DNase I Grau de Amplificação (1 U / µg), de acordo com as especificações do fabricante. O DNA foi sintetizado a partir de 2 µg (2000 ng) do RNA total extraído usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade. Três reações distintas de síntese de cDNA foram realizadas para cada amostra testada, e os produtos resultantes foram combinados para obter uma única mistura para cada um, conforme descrito por Pfaffl et al. (2004) e Bustin et al. (2005). As placas RT-qPCR Custom Array foram adquiridas da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA) e 44 genes foram avaliados por placa qPCR array. A Tabela 1 relata a lista de conjuntos de genes e o “ID do ensaio” com a sequência de primers (direta e reversa) fornecida pelo fabricante. As reações qPCR foram realizadas usando o TaqMan TM Fast Universal PCR Mastermix 2X em StepOnePlus TM Real-Time PCR System, de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram analisados usando o software DataAssist TM v3.01 (Applied Biosystems), e o valor de corte do ciclo limite (Ct) foi definido como 40. Apenas o ciclo de quantificação (Cq) com uma variação de ± 1,0 entre os triplicados da reação foram considerados para os cálculos. A normalização foi feita subtraindo o valor Ct do gene alvo do valor Ct médio dos dois genes de referência (*GAPDH* e *GUSB*). Os valores obtidos no controle do veículo foram usados como referência para comparação. A expressão relativa do gene foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).

Tabela 1 - Lista de genes analisados por RT-qPCR e suas vias relacionada

Símbolo do gene	Nome do gene	RefSeq ID	TaqMan Assay ID
Apoptose			
<i>CASP9</i>	<i>Caspase 9</i>	NM_962278	Hs00962278_m1
<i>CASP3</i>	<i>Caspase 3</i>	NM_234387	Hs00234387_m1
<i>CASP8</i>	<i>Caspase 8</i>	NM_001001719	Hs01018151_m1
<i>CASP10</i>	<i>Caspase 10</i>	NM_1017899	Hs01017899_m1

<i>CASP6</i>	<i>Caspase 6</i>	NM_154250	Hs00154250_m1
<i>BAD</i>	<i>BCL2 associated agonist of cell death</i>	NM_188930	Hs00188930_m1
<i>BAX</i>	<i>BCL2 associated X</i>	NM_180269	Hs00180269_m1
<i>BCL2</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	NM_608023	Hs00608023_m1
<i>BID</i>	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	NM_609632	Hs00609632_m1
<i>BIRC5</i>	<i>Baculoviral IAP repeat containing 5</i>	NM_4194392	Hs04194392_s1
<i>DIABLO</i>	<i>Direct IAP-binding protein with low PI</i>	NM_218976	Hs00219876_m1
<i>APAF1</i>	<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>	NM_559441	Hs00559441_m1
<i>FADD</i>	<i>Fas associated via death domain</i>	NM_538709	Hs00538709_m1
<i>TRADD</i>	<i>TNFRSF1A associated via death domain</i>	NM_601065	Hs00601065_g1

Inflamação

<i>FAS</i>	<i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i>	NM_236330	Hs00269492_m1
<i>TNFRSF10A</i>	<i>TNF receptor superfamily member 10a</i>	NM_269492	Hs00236330_m1

Reparo de excisão de nucleotídeo

<i>XPA</i>	<i>Xeroderma Pigmentosum group A</i>	NM_902270	Hs00902270_m1
<i>XPC</i>	<i>Xeroderma Pigmentosum group C</i>	NM_190295	Hs00190295_m1
<i>ERCC2</i>	<i>Excision repair cross-complementation group 2</i>	NM_361161	Hs00361161_m1
<i>ERCC1</i>	<i>Excision repair cross-complementation group 1</i>	NM_1012158	Hs01012158_m1

Reparo de excisão de base

<i>NTHL1</i>	<i>Nth like DNA glycosylase 1</i>	NM_267385	Hs00267385_m1
<i>APEX1</i>	<i>Apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease 1</i>	NM_172396	Hs00172396_m1
<i>PARP1</i>	<i>Poly(ADP-ribose) polymerase 1</i>	NM_242302	Hs00242302_m1
<i>PCNA</i>	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	NM_427214	Hs00427214_g1
<i>OGG1</i>	<i>8-Oxoguanine DNA glycosylase</i>	NM_213454	Hs00213454_m1
<i>XRCC1</i>	<i>X-Ray repair cross complementing 1</i>	NM_959834	Hs00959834_m1

Reparo de incompatibilidade			
<i>MSH2</i>	<i>MutS Homolog 2</i>	NM_979919	Hs00953527_m1
<i>MLH1</i>	<i>MutL Homolog 1</i>	NM_953527	Hs00979919_m1
Reparação de quebra de fita dupla (homóloga, não homóloga e junção)			
<i>BRCA1</i>	<i>BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 1</i>	NM_1556193	Hs01556193_m1
<i>RAD51</i>	<i>RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)</i>	NM_947967	Hs00947967_m1
<i>LIG1</i>	<i>DNA ligase 1</i>	NM_1553527	Hs01553527_m1
<i>TOPBP1</i>	<i>Topoisomerase (DNA) II binding protein 1</i>	NM_199775	Hs00199775_m1
<i>XRCC6</i>	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6</i>	NM_1922652	Hs01922652_g1
<i>XRCC4</i>	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4</i>	NM_243327	Hs00243327_m1
Respostas ao dano no DNA			
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein p53</i>	NM_1034249	Hs01034249_m1
<i>CHEK2</i>	<i>Checkpoint kinase 2</i>	NM_200485	Hs00200485_m1
<i>TP53BP2</i>	<i>Tumor protein P53 binding protein 2</i>	NM_610488	Hs00610488_m1
<i>GADD45A</i>	<i>Growth arrest and DNA damage inducible alpha</i>	NM_169255	Hs00169255_m1
Ciclo celular			
<i>CDC25A</i>	<i>Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)</i>	NM_947994	Hs00947994_m1
<i>CDKN1A</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>	NM_355782	Hs00355782_m1
Housekeeping			
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	NM_99999905	Hs99999905_m1
<i>GUSB</i>	<i>Beta-glucuronidase</i>	NM_99999908	Hs99999908_m1

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos dados foi analisada pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os dados do ensaio MTT e do cometa com distribuição paramétrica foram analisados usando ANOVA seguido pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). Os dados do ensaio de morte celular (citometria de fluxo) foram analisados usando ANOVA de duas vias seguido pelo teste LSD de Fisher ($p < 0,05$). O GraphPad Prism 7.00 para Windows (GraphPad Software; La Jolla, CA, EUA) foi usado para realizar análises estatísticas e traçar os gráficos. As diferenças entre a expressão gênica foram consideradas significativas quando o Fold Change (FC) foi $\geq 1,50$ ou $\leq 0,66$.

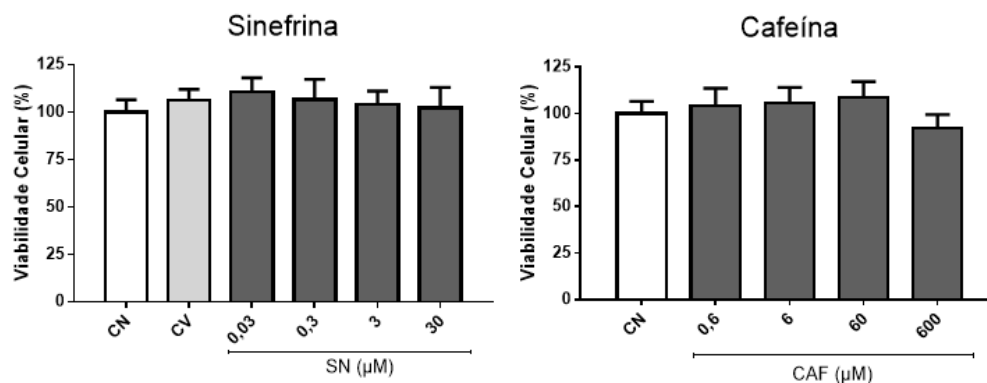
Resultados

5. RESULTADOS

5.1. SN e CAF isolados não diminuíram viabilidade celular

A viabilidade celular de células HepG2 tratadas por 24 h com SN e CAF isolados foi determinada usando o ensaio MTT. Em comparação com o controle negativo (1% PBS), SN (0,03 - 30 μM) e CAF (0,6 - 600 μM) não diminuíram significativamente a viabilidade celular (Figura 6), demonstrando que eles não foram citotóxicos para as células HepG2.

Figura 6- Viabilidade celular (%) em células HepG2 tratadas após tratamento por 24 h com SN; 0,03 - 30 μM e CAF; 0,6 - 600 μM isoladas avaliada pelo ensaio MTT



As barras representam a média \pm desvio padrão da porcentagem de viabilidade celular em relação ao CN (100% de viabilidade celular), calculado a partir de três ($n = 3$) experimentos biológicos. CN: Controle negativo (1% PBS); CV: Controle de veículo (0,05% HClO_4). * $p < 0,05$ vs. NC (One-way ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

5.2. SN em associação com as maiores concentrações de CAF reduziram a viabilidade celular

As células HepG2 foram tratadas por 24 h com SN (3 μM) e CAF (30; 60, 90 e 600 μM) em associação (Figura 7). As razões SN / CAF mais altas de 3:90 e 3:600 μM reduziram significativamente a viabilidade celular das células HepG2 quando comparadas com o controle negativo. Como esperado, MMS (300 μM) diminuiu significativamente a viabilidade celular de células HepG2.

Figura 7 - Viabilidade celular (%) em células HepG2 após tratamento por 24 h com associação de SN e CAF nas concentrações de 3:30, 3:60, 3:90 e 3:600 μM avaliada pelo ensaio MTT

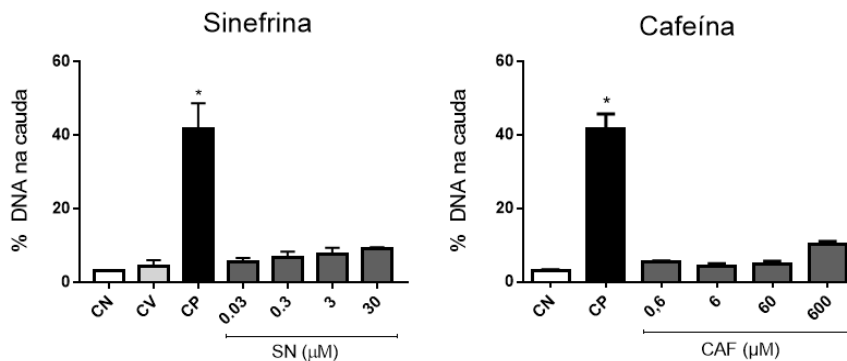


As barras representam a média \pm desvio padrão da porcentagem de viabilidade celular em relação ao CN (100% de viabilidade celular), calculado a partir de três ($n = 3$) experimentos biológicos. CN: Controle negativo (1% PBS); CP: Controle positivo (300 μM MMS); CV: Controle de veículo (0,05% HClO_4). * $p < 0,05$ vs. NC (One-way ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

5.3.A associação SN / CAF promoveu danos ao DNA nas maiores concentrações

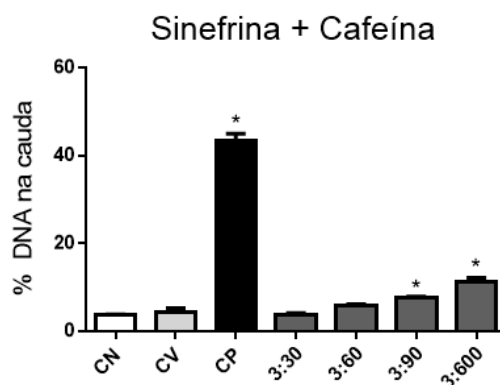
O ensaio do cometa foi usado para avaliar o dano ao DNA em células HepG2 após 4 h de tratamento com SN e CAF, isoladamente ou em associação, conforme ilustrado na Figura 8 e na Figura 9, respectivamente. Em comparação com o CN, SN (0,03; 0,3; 3 e 30 μM) e CAF (0,6; 6; 60 e 600 μM) isoladas não aumentaram significativamente os danos ao DNA. As associações entre a concentração testada de SN (3 μM) e as maiores concentrações de CAF (90 e 600 μM) induziram significativamente a maior % de DNA na cauda (Tail intensity).

Figura 8 - Dano no DNA (%) em células HepG2 após tratamento por 4 h com SN; 0,03 - 30 μM e CAF; 0,6 - 600 μM isoladas avaliadas pelo ensaio do cometa



As barras representam a média \pm desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda, calculada a partir de três experimentos biológicos ($n = 3$; 100 nucleoides por réplica). CN: Controle negativo (1% PBS); CP: Controle positivo (300 μM MMS); CV: Controle de veículo (0,05% HClO_4). * $p < 0,05$ vs. NC (One-way ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

Figura 9 - Dano no DNA (%) em células HepG2 após tratamento por 4 h com associação de SN e CAF concentrações de 3:30, 3:60, 3:90 e 3:600 μM avaliadas pelo ensaio do cometa

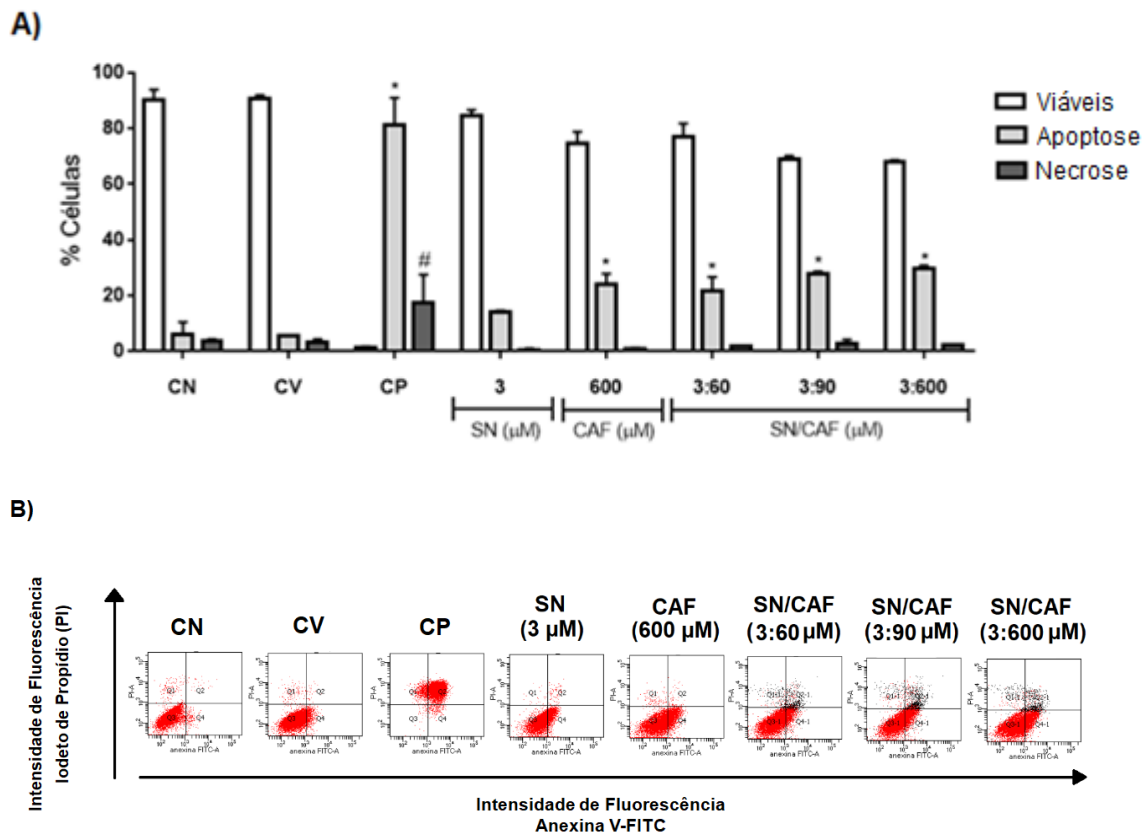


As barras representam a média \pm desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda, calculada a partir de três experimentos biológicos ($n = 3$; 100 nucleoides por réplica). CN: Controle negativo (1% PBS); CP: Controle positivo (300 μM MMS); CV: Controle de veículo (0,05% HClO_4). * $p < 0,05$ vs. NC (One-way ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

5.4.SN associada à CAF induziu morte celular via apoptose

Após 24 h de tratamento, CAF (600 μM) sozinha e todas as associações SN / CAF testadas (3:60, 3:90 e 3:600 μM) aumentaram significativamente a porcentagem de células marcadas com Anexina V quando comparadas com CN, demonstrando que os tratamentos induziram apoptose (Figura 10). SN (3 μM) isolada não induziu apoptose em células HepG2. No entanto, a porcentagem de células marcadas com anexina-V e PI no controle positivo (MMS 300 μM) foi alta, indicando forte indução de morte celular por apoptose e necrose.

Figura 10 – (A) Porcentagem (%) de células viáveis, apoptóticas e necróticas em células HepG2 após tratamentos por 24 h com SN 3 μM , CAF; 600 μM , associações SN e CAF (3:60; 3:90 e 3: 600 μM) e seus respectivos controles (B) histogramas de distribuição celular são marcados com Anexina V-FITC / Iodeto de Propídio (PI).



(A) As barras representam a média \pm desvio padrão de três ($n = 3$) repetições técnicas. *, # Valores estatisticamente diferentes do grupo CN ($p < 0,05$; Two-Way ANOVA seguida pelo teste LSD de Fisher). CN: Controle Negativo (1% PBS); CV: Controle de veículo (0,05% HClO_4); CP: Controle

Positivo (MMS; 300 μ M). (B) Viáveis: quadrante esquerdo inferior (Q3; células negativas para a anexina V-FITC e IP); Apoptose: quadrante inferior direito (Q4; células marcadas com anexina V no início da apoptose) + quadrante superior direito (Q2; células positivas para anexina V e IP na apoptose tardia); Necrose: quadrante superior esquerdo (Q1; células coradas apenas com IP).

5.5.SN associada à CAF modulou a expressão de genes relacionados ao reparo de DNA, ciclo celular e apoptose

Os efeitos do tratamento de 6 h com SN (3 μ M) associado com CAF (90 e 600 μ M) na expressão de genes relacionados a diferentes vias moleculares são relatados na Tabela 2. A associação SN / CAF em 3:90 μ M mostrou regulação negativa no gene *CDKN1A* (*inibidor da quinase dependente da ciclina 1A*) (ciclo celular / replicação), mas regulou positivamente a expressão dos genes *Capase-9* (*CASP9*) e *linfoma de células B2* (*BCL-2*) relacionados à apoptose. A associação SN / CAF a 3:600 μ M regulou positivamente os níveis de transcrição do gene *BCL-2*, bem como regulou positivamente o gene *Xeroderma Pigmentoso tipo C* (*Xeroderma Pigmentosum C – XPC*) da via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeo (*Nucleotide excision repair – NER*). SN / CAF não alterou os níveis de transcrição de genes relacionados à inflamação, reparo de excisão de base, reparo de incompatibilidade, reparo de quebra de fita dupla de DNA e resposta a danos no DNA.

Tabela 2 - Expressão relativa de genes associados à apoptose, inflamação, reparo de DNA, resposta de dano de DNA e vias de sinalização do ciclo celular na linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2

Símbolo do gene	Nome do gene	RefSeq ID	Fold change ^a	
			3:90 μ M (SN/CAF)	3:600 μ M (SN/CAF)
Apoptose				
<i>CASP9</i>	<i>Caspase 9</i>	NM_962278	1.50*	1.18
<i>CASP3</i>	<i>Caspase 3</i>	NM_234387	0.92	0.93

<i>CASP8</i>	<i>Caspase 8</i>	NM_001001719	1.10	1.09
<i>CASP10</i>	<i>Caspase 10</i>	NM_1017899	1.11	0.90
<i>CASP6</i>	<i>Caspase 6</i>	NM_154250	0.98	0.85
<i>BAD</i>	<i>BCL2 associated agonist of cell death</i>	NM_188930	1.06	1.34
<i>BAX</i>	<i>BCL2 associated X</i>	NM_180269	0.94	1.04
<i>BCL2</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	NM_608023	1.51*	2.01*
<i>BID</i>	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	NM_609632	0.81	0.99
<i>BIRC5</i>	<i>Baculoviral IAP repeat containing 5</i>	NM_4194392	1.04	0.96
<i>DIABLO</i>	<i>Direct IAP-binding protein with low PI</i>	NM_218976	0.92	0.99
<i>APAF1</i>	<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>	NM_559441	0.86	0.79
<i>FADD</i>	<i>Fas associated via death domain</i>	NM_538709	0.97	1.11
<i>TRADD</i>	<i>TNFRSF1A associated via death domain</i>	NM_601065	0.83	0.73
Inflamação				
<i>FAS</i>	<i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i>	NM_236330	1.28	1.06
<i>TNFRSF10A</i>	<i>TNF receptor superfamily member 10a</i>	NM_269492	0.79	0.99
Reparo de excisão de nucleotídeo				
<i>XPA</i>	<i>Xeroderma Pigmentosum Group A</i>	NM_902270	1.19	0.97
<i>XPC</i>	<i>Xeroderma Pigmentosum Group C</i>	NM_190295	1.18	1.52*
<i>ERCC2</i>	<i>Excision repair cross-complementation group 2</i>	NM_361161	1.18	0.92
<i>ERCC1</i>	<i>Excision repair cross-complementation group 1</i>	NM_1012158	1.01	1.07
Reparo de excisão de base				
<i>NTHL1</i>	<i>Nth like DNA glycosylase 1</i>	NM_267385	1.07	1.41
<i>APEX1</i>	<i>Apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease 1</i>	NM_172396	1.08	1.06
<i>PARP1</i>	<i>Poly(ADP-ribose) polymerase 1</i>	NM_242302	1.06	1.03
<i>PCNA</i>	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	NM_427214	1.07	0.93

OGG1	8-Oxoguanine DNA glycosylase	NM_213454	1.03	1.00
XRCC1	X-Ray repair cross complementing 1	NM_959834	0.96	1.01
Reparo de incompatibilidade				
MSH2	MutS homolog 2	NM_979919	1.01	1.01
MLH1	MutL homolog 1	NM_953527	0.93	0.94
Reparação de quebra de fita dupla (homóloga, não homóloga e junção)				
BRCA1	BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 1	NM_1556193	0.98	1.24
RAD51	RAD51 homolog (RecA homolog, <i>E. coli</i>) (<i>S. cerevisiae</i>)	NM_947967	0.97	1.02
LIG1	DNA ligase 1	NM_1553527	0.96	1.13
TOPBP1	Topoisomerase (DNA) II binding protein 1	NM_199775	0.90	0.95
XRCC6	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6	NM_1922652	0.91	0.81
XRCC4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6	NM_243327	0.89	0.80
Resposta ao dano de DNA				
TP53	Tumor protein p53	NM_1034249	1.24	1.16
CHEK2	Checkpoint kinase 2	NM_200485	0.99	0.92
TP53BP2	Tumor protein P53 binding protein 2	NM_610488	0.96	0.88
GADD45A	Growth arrest and DNA damage inducible alpha	NM_169255	0.82	1.01
Ciclo celular				
CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A (<i>S. pombe</i>)	NM_947994	0.88	0.91
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	NM_355782	0.62*	0.91

Expressão relativa de genes associados à apoptose, inflamação, reparo de DNA (reparo de excisão de nucleotídeos; reparo de excisão de base; reparo de incompatibilidade; reparo de quebra de fita dupla), resposta ao dano de DNA e vias de sinalização do ciclo celular na linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2 após 6 h de tratamento *in vitro* com SN associada com CAF nas concentrações de 3:90 e 3:600 μM . ^a Os valores de Fold Change (expressão relativa dos genes de

interesse em comparação com os genes de referência) foram obtido pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e normalizado usando os genes de manutenção GUSB (NM_99999908) e GAPDH (NM_99999905).

Discussão

6. DISCUSSÃO

Uma série de riscos à saúde associados à ingestão de suplementos termogênicos foi descrita, como a ocorrência de lesões citotóxicas do sistema nervoso central e lesões hepáticas (GALNARES-OLALDE et al., 2019; SANTOS et al., 2021). De acordo com Santos et al. (2021), a hepatotoxicidade relacionada ao consumo de suplementos dietéticos, incluindo os termogênicos, é um crescente problema de saúde global. Os autores realizaram uma revisão sistemática de estudos publicados por pesquisadores da América Latina sobre danos à saúde pelo consumo de suplementos dietéticos. Os resultados foram semelhantes aos de estudos dos Estados Unidos, Europa e China, com predominância de mulheres jovens, indução de danos hepatocelulares e insuficiência hepática aguda. A estimativa do LATIN DILI Network (LATIN Drug-Induced Liver Injury) é de que o consumo de suplementos dietéticos foi responsável por 10% dos casos de insuficiência hepática aguda na América Latina.

O fígado é o alvo primário da toxicidade sistêmica causada por agentes químicos. A hepatotoxicidade induzida por agentes químicos, geralmente, surge da combinação de ações citotóxicas não específicas e outras tecido-específicas. De fato, a toxicidade hepática relacionada ao consumo de medicamentos é responsável por mais de 50% de todos os casos clínicos de insuficiência hepática aguda. Nas últimas duas décadas, ficou evidente que além dos medicamentos, outros agentes químicos, tais como produtos da indústria, praguicidas, cosméticos, aditivos e suplementos alimentares também podem causar hepatotoxicidade (TABERNILLA et al., 2021).

Considerando que o fígado é um dos principais órgãos para o metabolismo de medicamentos, seus metabólitos e compostos tóxicos podem induzir hepatotoxicidade por vários mecanismos, como diminuição de enzimas antioxidantes, aumento do estresse oxidativo e indução de disfunção mitocondrial (MOHI-UD-DIN et al., 2019). Ao longo da história, os testes de hepatotoxicidade em animais têm sido usados como base para essa avaliação de segurança e identificação de efeitos adversos. Contudo, efeitos que não são observados em animais de laboratório aparecem, frequentemente, em seres humanos, o que mostra a relevância das diferenças interespecíficas, sendo pouco relacionados aos dados clínicos humanos, por diferenças de função hepática, farmacocinética, metabolismo e alvos celulares. Portanto, considerando as razões éticas e as

restrições científicas para extrapolar dados entre espécies diferentes, é crescente a tendência de métodos alternativos ao uso de animais de experimentação e recomendação para a realização de estudos *in vitro* (TABERNILLA et al., 2021). O perfil toxicológico de diferentes compostos pode ser previsto por sistemas *in vitro* que reduzem o uso de animais de laboratório e ajudam a elucidar os mecanismos moleculares relacionados à indução de toxicidade (RAMIREZ et al., 2018).

Vários modelos de linhagens celulares hepáticas humanas são utilizados com o objetivo de melhor representar o ambiente *in vivo*, sendo que os hepatócitos primários humanos são considerados as melhores linhagens para estudo de toxicidade e análise de interações entre compostos (BULUTOGLU et al., 2020). Entretanto, considerando que esse modelo de linhagem celular *in vitro* é pouco acessível, tem maior custo e exige maior manutenção, outras linhagens hepáticas *in vitro* são utilizadas, como HepaRG, a Huh7 e HepG2, sendo que essa última é muito utilizada para estudar as atividades enzimáticas na metabolização de fármacos (GUPTA et al., 2021; BULUTOGLU et al., 2020). Diferentes estudos na literatura mostram a utilização da linhagem HepG2 *in vitro* nos ensaios de toxicidade de diferentes compostos, inclusive na análise de compostos bioativos comumente utilizados na dieta (DATTA; BOSE; KUMAR MANDAL, 2020; LEVORATO et al., 2018; ŠTAMPAR et al., 2022). O presente estudo usou células HepG2 para avaliar os efeitos toxicogenômicos na associação de SN/CAF.

Alguns estudos na literatura mostram que extratos de laranja amarga e SN são consumidos isoladamente ou em associação com outros ingredientes, sendo que estão entre os consumidores homens e mulheres de diversas idades. Esses estudos demonstraram que o consumo associado da CAF à SN melhora o desempenho do exercício físico, sem alterar o valor de marcadores bioquímicos no sangue (RATAMESS et al., 2016). Stohs e Ratamess (2017) fizeram uma análise da literatura com mais de 30 ensaios clínicos com seres humanos, estudos em animais e ensaios *in vitro* e foi possível observar que nenhum risco cardiovascular foi relatado ou observado ao usar a associação de SN e CAF, assim como não foi observado diferença nos valores dos biomarcadores sanguíneos. Mesmo estudos conduzidos em animais, utilizando concentrações elevadas da associação de SN e CAF, não foram evidenciadas alterações no sistema cardiovascular e nos biomarcadores sanguíneos, fato que corrobora os resultados dos ensaios clínicos realizados em humanos. Bush et al. (2018) realizaram um ensaio clínico randomizado duplo cego com 16 participantes que entraram em diferentes grupos

de randomização, nos quais alguns participantes ingeriram diferentes concentrações de SN e CAF isoladamente ou associadas ou placebo. Esse estudo demonstrou que os participantes que receberam apenas CAF mostraram aumento de concentração, energia e vigor e quando houve ingestão de CAF com a SN, esse último composto não apresentou evento adverso negativo nos parâmetros sanguíneos, assim como não aumentou o efeito da CAF ou mostrou ter efeitos de humor perceptivos semelhantes a estimulantes.

A SN apresenta baixa afinidade com receptores α -1, β -1 e β -2 adrenérgicos, no entanto exibe maior ligação seletiva aos receptores β -3 adrenérgicos (STOHS; PREUSS; SHARA, 2011; STOHS; SHARA; RAY, 2020), demonstrando assim a atividade lipolítica. Além disso, Zheng et al (2014) demonstraram que a SN também pode atuar no sistema nervoso central e regular a ingestão alimentar e a homeostase energética por ser agonista do receptor 2 da neuromedina-U (NMU2R), enquanto a CAF ativa os receptores α -adrenérgicos do sistema cardiovascular (KALMAN, 2004; SCHMITT et al., 2016). Por outro lado, vários estudos demonstraram que o consumo de diferentes suplementos dietéticos pode levar a lesão hepática (KOTHADIA et al., 2018; STICKEL; SHOUVAL, 2015; ZHENG; NAVARRO, 2015). Nesse sentido, é recomendado primeiro realizar ensaios de citotoxicidade em estudos toxicológicos porque a avaliação inicial detalhada da toxicidade evita resultados falso-positivos / falso-negativos durante a avaliação dos compostos (HONG et al., 2012).

As estratégias dos experimentos *in vitro*, inicialmente, incluem a avaliação da citotoxicidade. A citotoxicidade denota a capacidade de um agente químico danificar células vivas, em particular por comprometer as características funcionais e estruturais relacionadas com a organização celular. A análise pode ser dividida em três etapas: (i) lesão celular inicial; (ii) disfunção mitocondrial e (iii) morte celular (VINKEN; BLAAUBOER, 2017).

Corroborando com prévios estudos realizados, a SN demonstrou não diminuir a viabilidade celular em células humanas HepG2 *in vitro*. No trabalho de Cui et al. (2015), que avaliaram os possíveis efeitos citotóxicos da SN em linhagem celular de hepatocarcinoma de rato (H4IIE) após realizar o ensaio do MTT com concentrações de 1 a 100 μ M, não foram observadas diminuições na viabilidade celular dessa linhagem hepática, demonstrando assim, como no ocorrido em células hepáticas humanas HepG2, que a SN, não possui efeitos citotóxicos mesmo após a sua possível metabolização. Rossato et al. (2010), por exemplo, ao

executarem o ensaio de citotoxicidade da Lactato desidrogenase (LDH) com células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2) em concentrações de 500 e 1000 μM , após 3 horas de tratamento, também relataram não encontrar efeito citotóxico de SN. Quando o efeito dessa substância foi avaliado em linhagem de células musculares esqueléticas L6 de ratos *in vitro*, os estudos de Hong et al. (2012) não demonstraram efeitos citotóxicos de SN em concentrações de até 100 μM e nesse estudo foi possível observar que houve maior consumo basal de glicose, envolvendo o canal GLUT-4 (Transportador de glicose 4) dependente e estimulação da fosforilação da proteína quinase estimulada pela ativação AMP.

Em outro estudo, Guo et al. (2019) utilizaram o ensaio MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) para avaliar a viabilidade celular de pré-adipócitos 3T3-L1 após o tratamento com SN (0-200 μM) por 24 ou 144 horas e não foi observado citotoxicidade, nem mesmo na concentração mais alta testada. Ribeiro et al. (2021) demonstraram em um estudo mais recente que, após ensaio do MTT, SN nas concentrações de 25-500 μM não foi citotóxica após 24 horas de tratamento nas linhagens celulares Caco-2 e na linhagem celular da mucosa do estômago (MNP01). Entretanto, Xu et al. (2018) demonstraram a diminuição da proliferação celular em linhagens tumorais celulares escamosas de esôfago de maneira concentração dependente após tratamento com SN (0-20 μM) durante 120 horas utilizando o ensaio contagem de célula kit-8 (CCK-8), assim como observaram a diminuição de formação de colônias, diminuição da migração celular e capacidade de invasão após tratamento com 10 μM de SN.

Em relação aos resultados de viabilidade celular, nesse estudo foi possível observar que as concentrações de CAF testadas não diminuíram a viabilidade celular na linhagem HepG2 *in vitro*. Nobre et al. (2010) observaram que a CAF manteve viáveis as células mesencefálicas de rato e impediu apoptose quando comparada ao controle exposto apenas a substância 6-OHDA que é uma neurotoxina para os neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos. Assim como Downey et al. (2014), que demonstraram que CAF em concentrações de 10, 100 e 1000 μM , sem a associação de outra anfetamina (MDMA/Ecstasy), não possui efeitos citotóxicos em células renais (HK-2, MDCKII), intestinais (Caco-2), hepáticas (HepG2) ou neuronais (N2a) *in vitro*. Paini et al. (2016) analisaram a citotoxicidade pelo ensaio do MTT em células hepáticas humanas HepG2 após o tratamento com diferentes concentrações de CAF (34,3 a 75.000 μM) e, assim

como em nossos resultados, foi possível observar que concentrações de até 600 μM não foram citotóxicas. Demonstrou-se nesse estudo de Paini et al. (2016) que apenas concentrações de CAF acima de 25000 μM reduziram estatisticamente a viabilidade celular. Outro estudo demonstrou que o tratamento na linhagem celular osteoblástica humana (hFOB 1.19) por 24 horas com concentrações de CAF superiores a 500 μM diminuiu a viabilidade celular de maneira dependente da concentração (LU; LAI; WEN-HSIUNG, 2008). Jang et al. (2002) demonstraram que CAF na concentração de 10 mM em diferentes tempos de tratamento (12, 24 e 36 h) diminui a viabilidade celular de maneira concentração-dependente na linhagem celular de neuroblastoma SK-N-MC *in vitro*.

Conforme relatado nos objetivos propostos, esse estudo pretende auxiliar principalmente na compreensão dos perfis citotóxicos da SN associada à CAF em células humanas *in vitro*. Nos ensaios prévios de citotoxicidade, foram testadas concentrações maiores e menores com base em concentrações que poderiam estar presentes a nível hepático ou plasmático de usuários de suplementos termogênicos consumidos pela população em geral, e essas demonstraram ausência de citotoxicidade para células HepG2 *in vitro*. Seguindo os critérios de escolha previamente descritos na metodologia, foi realizado o ensaio do MTT associando uma concentração de SN (3 μM) e as concentrações de 30, 60, 90 e 600 μM de CAF, que representam proporções iguais (1:10) ou maiores (1:20, 1:30 e 1:200) destas duas substâncias presentes na formulação de suplementos termogênicos vendidos mundialmente.

Haller, Benowitz, Jacob (2005) relataram que um suplemento termogênico contendo 5,5 mg (28 μM) de SN e 239,2 mg (1231 μM) de CAF aumentou a pressão arterial sistólica e diastólica em humanos normotensos. Em casos mais graves, Jordan, Murty, Pilon (2004) relatam que dois indivíduos que ingeriram um suplemento dietético contendo SN, CAF e efedrina morreram devido a complicações cardíacas, sugerindo que essa associação pode aumentar significativamente a cardiotoxicidade. No presente estudo, podemos concluir que a associação de SN com a CAF, nas concentrações avaliadas, diminuiu a viabilidade celular em linhagem de células hepáticas humanas HepG2 *in vitro* nas concentrações mais elevadas de CAF associada com SN (3: 90 e 3:600 μM).

No entanto, a ausência da diminuição da viabilidade celular de SN e CAF não significa que sua ingestão simultânea não cause efeitos adversos. Como outros mecanismos de ação podem levar a danos ao DNA sem causar morte

celular, é necessário analisar as atividades genotóxicas causadas por SN e CAF isoladamente e em associação. Para isso, o ensaio do cometa tem sido utilizado para avaliação de ecotoxicologia, nutrigenômica e reparo de DNA, sendo considerado versátil, um ensaio de baixo custo, sensível e fornece resultados estatísticos confiáveis para avaliação de quebras de DNA, dentre os testes de genotoxicidade disponíveis (CORDELLI; BIGNAMI; PACCHIEROTTI, 2021). O parâmetro analisado foi a porcentagem (%) de DNA na cauda (Tail Intensity), que é a medida mais utilizada por ser reconhecida como o desfecho primário mais adequado para avaliação e interpretação dos resultados, além de ter a vantagem de ser um parâmetro padronizado entre os relatórios da literatura (LOVELL; OMORI, 2008).

Os resultados do ensaio do cometa aqui relatados corroboram com os dados sobre a ausência de danos ao DNA e de mutagenicidade (mutações genéticas e danos cromossômicos) de SN em diferentes concentrações na linhagem HepG2 (2, 20 e 200 μM) e em células de infoma de rato L5178Y (120 – 21500 μM) (MCGREGOR et al, 1988; RIBEIRO et al., 2019; RIBEIRO et al., 2021). Da mesma forma, concentrações de CAF de 515 a 51500 μM não foram genotóxicas nem citotóxicas para linfócitos humanos em uma amostra de quarenta indivíduos jovens saudáveis (AL-WASITI et al, 2016). A CAF induziu danos ao DNA apenas em concentrações $\geq 2.500 \mu\text{M}$ em células mamárias tumorais da linhagem MCF-7 após 24 h de tratamento (MACHADO et al, 2020) e induziu mutagenicidade apenas em concentrações $\geq 1.000 \mu\text{M}$ em linfócitos do sangue periférico (PBLs), conforme avaliado usando o ensaio de micronúcleo (MN) com bloqueio da citocinese- citoma (CBMN-cyt) (HATZI et al., 2015). Até o momento, não há relatos na literatura que analisem o dano ao DNA induzido pela associação SN / CAF, sendo este o primeiro estudo a avaliar parâmetros citotóxicos e de dano ao DNA em células humanas hepáticas.

Há evidências indicando que espécies reativas (ERs) podem contribuir, direta ou indiretamente, com os mecanismos de toxicidade da SN (KOVACIC; COOKSY, 2005; RIBEIRO et al., 2019; RIBEIRO et al., 2021), resultando em alterações no estado redox intracelular e estresse oxidativo. Está bem estabelecido que espécies reativas, tais como radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$), são os principais causadores do estresse oxidativo (GURER-ORHAN et al., 2004; ZHIMING et al., 2018) que está diretamente associado aos danos em macromoléculas, como membranas lipídicas, e também no desenvolvimento da carcinogênese de várias

maneiras, incluindo danos diretos ao DNA sob a forma de quebras de fita simples e duplas, oxidação de bases nitrogenadas e formação de aductos (FEDERICO et al., 2007; VALLÉE, LECARPENTIER, 2018; THANAN et al., 2014) que podem ser detectados no ensaio cometa, por exemplo.

Possivelmente, o estresse oxidativo seja o principal fator para esses efeitos adversos relatados e para os efeitos citotóxicos e genotóxicos observados nesse estudo na associação de SN e CAF com células hepáticas HepG2. No entanto, foi visto que a SN e a CAF, quando não estão associadas, não demonstraram efeitos citotóxicos ou genotóxicos. Curiosamente, existem poucos relatos de casos de toxicidade cardíaca aguda quando essas substâncias não estão associadas (BAKHIYA et al., 2017). Haller, Benowitz, Jacob (2004) analisaram o possível mecanismo quando há o consumo de produtos que contenham a associação da CAF com a efedrina, uma substância simpatomimética, assim como a SN. Quando se tem associação da CAF com um agente simpatomimético, há um aumento do efeito agonista dos receptores de adenosina, pelo efeito da CAF, e um efeito agonista β -adrenérgico, efeito causado por SN, que podem aumentar a produção de espécies reativas e de danos ao DNA.

Considerando a diminuição da viabilidade celular das concentrações associada SN / CAF, realizamos experimentos de citometria de fluxo para elucidar os mecanismos de morte celular em células HepG2, a terceira etapa da avaliação de citotoxicidade. A citometria de fluxo pode medir várias características com base na detecção de membrana, citoplasma e antígenos nucleares (ADAN et al., 2017). Em nosso estudo, CAF isolado (600 μ M) ou associado com SN (3:60, 3:90 e 3: 600 μ M) aumentou a porcentagem de células marcadas com anexina-V, indicando indução de apoptose. Por outro lado, SN e CAF, isoladamente ou em associação, não alteraram a porcentagem de células marcadas com IP, demonstrando que não levaram a morte celular por necrose (CROWLEY et al., 2016).

Nossos dados sugerem que a CAF alterou significativamente a taxa de morte celular devido à indução de apoptose, independentemente de seu uso isolado ou em associação com diferentes concentrações de SN. Esses resultados estão de acordo com os relatos de que CAF (500 μ M) levou a apoptose em células gástricas SGC-7901 após 24 h de tratamento (LIU; ZHOU; TANG, 2017). Assim como CAF nas concentrações 50-450 μ M aumentou a porcentagem de células apoptóticas de maneira concentração-dependente em linhagem epidérmica de camundongo JB6 Cl 41 (HE et al., 2003). Além da análise de viabilidade celular,

danos ao DNA e ensaios de citometria de fluxo, as ferramentas toxicogenômicas são complementos valiosos para os testes *in vitro* estabelecidos que fornecem informações mecanicistas sobre o modo de toxicidade (BOURDON-LACOMBE, 2015; CORVI; MADIA, 2017).

Atualmente, muitos modelos *in vitro* baseados em células de fígado humano são combinados com análises toxicogenômicas, principalmente como uma alternativa aos testes em animais para estudar os mecanismos de hepatotoxicidade. A aplicação de abordagens baseadas em ômicas para modelos *in vitro* de células hepáticas humanas pode revelar alterações nas vias e redes intracelulares associadas à exposição aos agentes químicos, aumentando assim a chance de identificar modificações moleculares mais específicas e confiáveis capazes de melhorar as respostas *in vitro* e gerar dados que podem ser empregados em estudos futuros (JIANG et al., 2019).

O presente estudo realizou análises transcriptômicas por RT-qPCR de genes relacionados às vias de citotoxicidade (apoptose, ciclo celular e inflamação) e genotoxicidade (resposta a danos no DNA e excisão de bases, excisão de nucleotídeos, incompatibilidade, recombinação homóloga, end-join não homóloga reparo). Em relação às vias de apoptose, os genes *CASP9* e *BCL-2* foram regulados positivamente após os tratamentos SN / CAF. *CASP9* ativa a via de apoptose intrínseca, também conhecida como apoptose mitocondrial (CAZZALINI et al., 2010), e estimula caspases executoras que coordenam o processo de morte celular (JANG et al., 2002).

Em nosso estudo, a regulação positiva de *CASP9* pode estar associada à morte celular por apoptose em células HepG2 *in vitro* tratadas com SN / CAF, conforme evidenciado por citometria de fluxo. O resultado está de acordo com o estudo de Lu; Lai e Wen-Hsiung (2008), que após o tratamento de 24 horas de osteoblastos humanos com CAF nas concentrações de 0,5 mM – 2 mM ativou a via dependente da mitocôndria *CASP9* e aumentou a porcentagem de células apoptóticas. Jang et al. (2002) demonstraram que após o tratamento de 24 h e 26 h com CAF nas concentrações de 1 mM e 10 mM houve aumento da atividade enzimática Caspase-3, sendo um possível mecanismo apoptótico em células de neuroblastoma *in vitro*. Em outro estudo foi observado que CAF (0,5-8 mM) inibiu a progressão do ciclo celular nas fases G0/G1 nas linhagens celulares de câncer gástrico MGC-803 e SGC-7901 *in vitro*. Nesse mesmo estudo foi analisado que após tratamento de 24 h com CAF houve apoptose e no ensaio de western blot foi

observado um aumento na expressão das caspases 9 e 3 (LIU; ZHOU; TANG, 2017). A expressão do gene *BCL-2* também foi regulada positivamente no presente estudo. *BCL-2* é um gene anti-apoptótico que codifica uma proteína da membrana mitocondrial que bloqueia a morte celular por apoptose (EBRAHIM et al., 2016). A regulação positiva de genes anti-apoptóticos é um mecanismo para prevenir a morte celular induzida por fármacos (MAJI et al., 2018).

Em relação à genotoxicidade, o dano ao DNA desencadeia diferentes vias de reparo, incluindo a via de reparo por NER que pode ser dividida nas vias do Genoma Global (*Global-genome nucleotide excision repair - GG-NER*) e Transcrição-Acoplada (*Transcription-coupled nucleotide excision repair - TC-NER*) (KITSERÁ et al., 2019), sendo que o gene *XPC* é o principal sensor de dano ao DNA do GG-NER (CHATTERJEE; WALKER, 2017). Tratamento com SN e CAF em associação regulou positivamente a expressão de *XPC*. Esta evidência pode explicar os resultados do ensaio do cometa, uma vez que os níveis de transcrição aumentados deste gene podem ser uma resposta a danos no DNA, assim como é visto também no estudo de Cheng et al. (2008). Esse estudo analisou a formulação de um medicamento utilizado na medicina tradicional chinesa, o San-Huang-Xie-Xin-Tang (SHXXT) e a sua composição com diferentes componentes proveniente de plantas. Assim como nos resultados aqui demonstrados, o estudo mencionado realizou a análise da expressão gênica de células HepG2 *in vitro*, na qual também foi observado uma regulação positiva do gene *XPC*.

Um dos reguladores primários do ciclo celular é a p21, uma proteína codificada pelo gene *CDKN1A* que impede a fosforilação de substratos da quinase dependente da ciclina, bloqueia a progressão do ciclo celular na fase G1, garante a estabilidade genômica e costuma ser desregulado no câncer humano (BARR et al., 2017; KREIS et al., 2019; KREIS; LOUWEN; YUAN, 2019). A proteína supressora de tumor p53 controla a expressão do gene em resposta a vários estressores, incluindo a resposta a danos no DNA, onde a regulação negativa de p21 desencadeia a apoptose e favorece a morte celular (CHATTERJEE; WALKER, 2017; MARTINEZ et al., 2002). Em nosso estudo foi possível observar diminuição da expressão do gene *CDKN1A* na menor concentração associada testada de SN e CAF (3:90 μ M). O dano ao DNA promovido pela associação SN / CAF é mediado pela via de reparo do DNA via mecanismos NER associados à regulação negativa da transcrição de p21 para induzir a apoptose.

Analisando os resultados aqui relatados, é possível observar que SN e CAF isolados não diminuíram a viabilidade celular e não induziram danos no DNA de células HepG2, nas concentrações testadas. No entanto, a associação SN / CAF normalmente encontrada em produtos termogênicos levou a diminuição da viabilidade celular, induziu danos ao DNA e apoptose nas concentrações mais altas testadas e, possivelmente, pode causar efeitos perigosos para os consumidores (LEÃO et al., 2021). Esses achados foram confirmados pelo aumento da expressão de genes relacionados ao reparo e apoptose do DNA e à regulação negativa de genes relacionados ao controle do ciclo celular.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- No Ensaio do MTT nenhuma concentração de sinefrina avaliada (0,03 - 30 μM) diminuiu a viabilidade celular em HepG2, quando em comparação ao controle negativo, indicando ausência de citotoxicidade, assim como as concentrações de cafeína testadas (0,6 – 600 μM);
- Quando avaliada a citotoxicidade por meio do ensaio do MTT, a sinefrina (3 μM) associada com quatro concentrações de cafeína (30, 60, 90 e 600 μM) demonstrou efeitos citotóxicos significativos na associação com as maiores concentrações de cafeína (3: 90; 3:600 μM);
- No ensaio do cometa nenhuma concentração de sinefrina avaliada (0,03 - 30 μM) demonstrou potencial genotóxico na cultura celular de HepG2 em comparação ao controle negativo, indicando ausência de genotoxicidade, assim como as concentrações de cafeína testadas (0,6 – 600 μM);
- Ao avaliar a genotoxicidade na associação de sinefrina (3 μM) com cafeína (30, 60, 90 e 600 μM), foi possível observar potencial genotóxico nas duas maiores concentrações avaliadas (3:90 e 3:600 μM);
- Após o ensaio de citometria celular foi possível identificar morte celular por apoptose na concentração de cafeína isolada (600 μM) e nas concentrações associadas de SN / CAF (3:60; 3:90; 3: 600 μM) testadas;
- No ensaio de RT-qPCR foi possível analisar o aumento da expressão de genes relacionados a apoptose (*CASP9* e *BCL-2*) e a diminuição da expressão gênica de genes relacionados ao controle do ciclo celular (*CDKN1A*) na concentração associada 3:90 μM ; Na maior concentração associada testada 3:90 μM foi possível observar aumento na expressão gênica de *BCL-2* e *XPC* (relacionado a via de reparo de DNA).
- Sinefrina associada a cafeína em altas concentrações em suplementos termogênicos, pode oferecer possíveis perigos a saúde de usuários devido a sua indução de efeitos citotóxicos e genotóxicos em células humanas hepáticas HepG2 *in vitro*.

Referências

8. REFERÊNCIAS

ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 37, n. 2, p. 163–176, 2017.

AL-WASITI, E. A. et al. Evaluating the levels of oxidative DNA damage in human lymphocytes in response to caffeine using comet assay (single cell gel electrophoresis). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v.8, p.137-141, 2016.

ALAMOUDI, W. A. et al. A simplified colorimetric method for rapid detection of cell viability and toxicity in adherent cell culture systems. **Journal of B.U.O.N.**, Athens, v. 23, n. 5, p. 1505–1513, 2018.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/hb-8065#detailed-product-images>>. Acesso em: 28 fev. 2021.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Justificativas para os limites mínimos e máximos de nutrientes, substâncias bioativas e enzimas da proposta regulatória de suplementos alimentares p. 1-36, 2018. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/3845226/0/Justificativa_Limites_Suplementos.pdf/e265ccd0-8361-4d8e-a33f-ce8b2ca69424.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução Normativa (IN) nº 28, de 26 de julho de 2018. Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. Diário Oficial Uniao, Seção 1:141 27 jul 2018.

ANSES, FRENCH AGENCY FOR FOOD, ENVIRONMENTAL AND OCCUPATIONAL HEALTH AND SAFETY. Today ANSES publishes its recommendations on dietary supplements for weight-loss containing p-synephrine, 2014. Disponível em: <http://www.anses.fr/en/content/today-anses-publishes-its-recommendations-dietary-supplements-weight-loss-containing-p>

ARANDA, P. S.; LAJOIE, D. M.; JORCYK, C. L. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 33, n. 2, p. 366–369, 2012.

BAKHIYA, N. et al. Phytochemical compounds in sport nutrition: Synephrine and hydroxycitric acid (HCA) as examples for evaluation of possible health risks. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v.61, p. 1-17, 2017.

BAL-PRICE, A.; COEKE, S. Guidance on good cell culture practice (GCCP), in: M. Aschner, Suñol, C., & Bal-Price, A. (Ed.) **Cell Cultures Techniques**, New York, Neuromethods. P.1-25, 2011.

BARR, A. R. et al. DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. **Nature Communications**, London, v. 8, p.1 -17, 2017.

BLANCK, H. M., et al. Use of Nonprescription Dietary Supplements for Weight Loss Is Common among Americans, **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 107, p. 441-447, 2007.

BOURDON-LACOMBE, J. A et al. Technical guide for applications of gene expression profiling in human health risk assessment of environmental chemicals, **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Netherlands, v. 72, p. 292-309, 2015.

BULUTOGLU, B. et al. A comparison of hepato-cellular in vitro platforms to study CYP3A4 induction. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 2, p. 1–17, 2020.

BUSH, J. A. et al. Acute Hematological and Mood Perception Effects of Bitter Orange Extract (P-Synephrine) Consumed Alone and in Combination With Caffeine: A Placebo-Controlled, Double-Blind Study, **Phytotherapy Research**, London, v. 32, p. 593-1607, 2018.

BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 34, p. 597-601, 2005.

CAMPBELL, B. I. et al. The effects of a fat loss supplement on resting metabolic rate and hemodynamic variables in resistance trained males: A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, Woodland Park, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2016.

CAPPELLETTI, S. et al. Caffeine-related deaths: Manner of deaths and categories at risk. **Nutrients**, Basel, v. 10, n. 5, p. 1–13, 2018.

CAZZALINI, O. et al. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 704, n. 1–3, p. 12–20, 2010.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis, **Environmental Mutagen Society**, New York, v. 58, n. 5, p. 235-263, 2017.

CHENG, W. Y. et al. Relationship between San-Huang-Xie-Xin-Tang and its herbal components on the gene expression profiles in HepG2 cells. **American Journal of Chinese Medicine**, Singapore, v. 36, n. 4, p. 783–797, 2008.

CLARK, J. E.; WELCH, S. Comparing effectiveness of fat burners and thermogenic supplements to diet and exercise for weight loss and cardiometabolic health: Systematic review and meta-analysis. **Nutrition and Health**, Berkhamsted, v.27, p. 445-459, 2021

COLLADO-MATEO, D. et al. Effect of acute caffeine intake on the fat oxidation rate during exercise: A systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, Basel, v. 12, n. 12, p. 1–18, 2020.

COLLINS, A. et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Netherlands, v.759, p.27-39, 2014.

CORDELLI, E.; BIGNAMI, M.; PACCHIEROTTI, F. Comet assay: A versatile but complex tool in genotoxicity testing. **Toxicology Research**, Cambridge, v. 10, n. 1, p. 68–78, 2021.

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

CROWLEY, L. C. et al. Dead cert: Measuring cell death. **Cold Spring Harbor Protocols**, New York, v. 2016, n. 12, p. 1064–1072, 2016.

CUI, Z., et al. p-Syneprine Suppresses Glucose Production but Not Lipid Accumulation in H4IIE Liver Cells. **Journal of Medicinal Food**, New York, v.18, p.76-82, 2015.

DATTA, R.; BOSE, S.; KUMAR MANDAL, S. Evaluation of in Vitro Hepatic Toxicity of Leaves of *Pterospermum Acerifolium* (L.) Willd. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, Madhya Pradesh, n. June, p. 118–120, 2020.

DIRECTORATE, E. et al. OECD Genetic Toxicology Test Guidelines (TGs). n. 238, p. 1– 70, 2017;

D'AMBROSIO, S. M. Evaluation of the genotoxicity data on caffeine, **Regulatory Toxicology Pharmacology**, New York, v. 19, p. 243-281, 1994

DE LORENZO, A. et al. Why primary obesity is a disease? **Journal of Translational Medicine**, London, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2019.

DELMONTE, O. M.; FLEISHER, T. A. Flow cytometry: Surface markers and beyond. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, Mosby, v. 143, n. 2, p. 528–537, 2019.

DIAZ, J. E. L. et al. The transcriptomic response of cells to a drug combination is more than the sum of the responses to the monotherapies. **eLife**, Cambridge, p. 1–34, 2020.

DONG, S., et al. Low concentration of caffeine inhibits the progression of the hepatocellular carcinoma via Akt signaling pathway. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v.15, p.484-492, 2015.

DOWNEY, C., DALY, F., O'BOYLE, K. M. An in vitro approach to assessing a potential drug interaction between MDMA (ecstasy) and caffeine. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v.28, p.231-239, 2014.

EBRAHIM, A. S. et al. Hematologic malignancies: newer strategies to counter the BCL-2 protein. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v. 142, n. 9, p. 2013– 2022, 2016.

ELLIS, P. et al. Where will genetic toxicology testing be in 30 years' time? Summary report of the 25th Industrial Genotoxicity Group Meeting, Royal Society of Medicine, London, November 9, 2011. **Mutagenesis**, Oxford, v.29, p.73-77, 2013.

FEDERICO, A., et al. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, Genève, v.121, p.2381-2386, 2007.

FERREIRA, G. de S. A. et al. Acute Liver Failure Caused by Use of Fat Burner: A Case Report. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 52, n. 5, p. 1409–1412, 2020.

GALNARES-OLALDE, J. A. et al. Cytotoxic lesions of the corpus callosum caused by thermogenic dietary supplements. **American Journal of Neuroradiology**, Baltimore, v. 40, n. 8, p. 1304–1308, 2019.

GANAPATHY, S. et al. CometQ: An automated tool for the detection and quantification of DNA damage using comet assay image analysis. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, Amsterdam, v. 133, p. 143–154, 2016.

GARCIA, J. G. N.; MA, S. F. Polymerase chain reaction: A landmark in the history of gene technology. **Critical Care Medicine**, New York, v. 33, n. 12 SUPPL., p. 429–432, 2005.

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. **Acta Histochemica**, German, v. 120, n. 4, p. 303–311, 2018.

GRGIC, J. et al. International Society of Sports Nutrition position stand: sodium bicarbonate and exercise performance. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, Woodland Park, v. 18, n. 1, p. 1–37, 2021.

GUPTA, R. et al. Comparing in vitro human liver models to in vivo human liver using RNA-Seq. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 95, n. 2, p. 573–589, 2021.

GURER-ORHAN, H., et al. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. **Toxicology**, Amsterdam, v.195, p.147-154, 2004.

GUO, L. X. et al. p-Syneprine exhibits anti-adipogenic activity by activating the Akt/GSK3 β signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 43, n. 11, p. 1–9, 2019.

GUTIÉRREZ-HELLÍN, J., DEL COSO, J. Acute p-syneprine ingestion increases fat oxidation rate during exercise. **British Journal of Clinical Pharmacology**, London, v.82, p.362-368, 2016.

GUTIÉRREZ-HELLÍN, J.; RUIZ-MORENO, C.; DEL COSO, J. Acute p-syneprine ingestion increases whole-body fat oxidation during 1-h of cycling at Fatmax. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 59, n. 7, p. 3341–3345, 2020.

HAMM, J. et al. Alternative Approaches for Identifying Acute Systemic Toxicity: Moving from Research to Regulatory Testing, **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 41, p. 245-259, 2018.

HALLER, C.A., JACOB 3rd. P., BENOWITZ, N.L. Enhanced stimulant and

metabolic effects of combined ephedrine and caffeine. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, St. Louis , v.7, p.259-273, 2004.

HALLER, C.A., BENOWITZ, N.L., JACOB 3rd. P. Hemodynamic effects of ephedra-free weight-loss supplements in humans. **The American Journal of Medicine**, New York, v.118, p.98-1003, 2005.

HALLER, C.A. et al. Human pharmacology of a performance-enhancing dietary supplement under resting and exercise conditions. **British Journal of Clinical Pharmacology**, London, v.65, p.833-840, 2008

HARPAZ, E. et al. The effect of caffeine on energy balance. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, London, v.28, p.1-10, 2017.

HARTWIG, A. et al. Mode of action-based risk assessment of genotoxic carcinogens, **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 94, p. 1787-1877, 2020.

HATZI, V. I. et al. Low concentrations of caffeine induce asymmetric cell division as observed in vitro by means of the CBMN-assay and iFISH. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 793, p. 71–78, 2015.

HE, Z. et al. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. **Cancer Research**, Chicago, v. 63, n. 15, p. 4396–4401, 2003.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: A review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 46, n. 2, p. 101–123, 2006.

HONG, N. Y. et al. P-Syneprine stimulates glucose consumption via AMPK in L6 skeletal muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New Yor, v. 418, n. 4, p. 720–724, 2012.

HONG, Y. et al. Deep learning method for comet segmentation and comet assay image analysis. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

JANG, M. H. et al. Caffeine induces apoptosis in human neuroblastoma cell line SK-NMC. **Journal of Korean medical science**, Seoul, v. 17, n. 5, p. 674–678, 2002.

JĘDREJKO, K.; LAZUR, J.; MUSZYŃSKA, B. Risk Associated with the Use of Selected Ingredients in Food Supplements. **Chemistry and Biodiversity**, Zürich, v. 18, n. 2, 2021.

JIANG, J. et al. The application of omics-based human liver platforms for investigating the mechanism of drug-induced hepatotoxicity in vitro. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 93, p. 3067-3098, 2019.

JOHANSSON, P. et al. Validation of a flow cytometry-based detection of γ -H2AX, to measure DNA damage for clinical applications. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, Hoboken, v. 92, n. 6, p. 534–540, 2017.

JORDAN, S., MURTY, M., PILON, K. Products containing bitter orange or synephrine: suspected cardiovascular adverse reactions. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v.171, p.993-994, 2004.

KALMAN, D. S. An acute clinical trial evaluating the cardiovascular effects of an herbal ephedra-caffeine weight loss product in healthy overweight adults. **International Journal of Obesity**, Hampshire, v. 28, n. 10, p. 1355–1356, 2004.

KHENISER, K.; SAXON, D. R.; KASHYAP, S. R. Long-Term Weight Loss Strategies for Obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 106, n. 7, p. 1854–1866, 2021.

KIM, J.; PARK, J.; LIM, K. Nutrition supplements to stimulate lipolysis: A review in relation to endurance exercise capacity. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 62, n. 3, p. 141–161, 2016.

KIRKLAND, D. et al. Updated recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 795, p. 7–30, 2016.

KITSER, N. et al. Nucleotide excision repair of abasic DNA lesions. **Nucleic acids research**, London, v. 47, n. 16, p. 8537–8547, 2019

KOTHADIA, J. P. et al. Hepatotoxicity Associated with Use of the Weight Loss Supplement Garcinia cambogia: A Case Report and Review of the Literature . **Case Reports in Hepatology**, New York, v. 2018, p. 1–5, 2018.

KOVACIC, P.; COOKSY, A. L. Unifying mechanism for toxicity and addiction by abused drugs: electron transfer and reactive oxygen species. **Medical Hypotheses**, Penrith, v.64, p.357-366, 2005.

KOZIAN, D. H.; KIRSCHBAUM, B. J. Comparative gene-expression analysis. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 73–78, 1999.

KREIS, N. N. et al. Function of p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in migration and invasion of cancer and trophoblastic cells. **Cancers**, Basel, v. 11, n. 7, p. 1–17, 2019.

KREIS, N-N; LOUWEN, F; YUAN, J. The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Cell Differentiation, Migration and Cancer Therapy, **Cancers**, Basel, v. 21, p. 14–16, 2019.

LEÃO, T. K. et al. Synephrine and caffeine combination promotes cytotoxicity, DNA damage and transcriptional modulation of apoptosis-related genes in human HepG2 cells. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 503375, p. 868-869, 2021.

LEVORATO, S. et al. In vitro toxicity evaluation of estragole-containing preparations derived from *Foeniculum vulgare* Mill. (fennel) on HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 111, p. 616–622, 2018.

LIU, H.; ZHOU, Y.; TANG, L. Caffeine induces sustained apoptosis of human gastric cancer cells by activating the caspase-9/caspase-3 signalling pathway. **Molecular Medicine Reports**, Athens, v. 16, n. 3, p. 2445–2454, 2017.

LOVELL, D. P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 171–182, 2008.

LU, P. Z.; LAI, C. Y.; WEN-HSIUNG, C. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 9, n. 5, p. 698–718, 2008.

MACHADO, K. L. et al. Oxidative stress in caffeine action on the proliferation and death of human breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, p. 1-11, 2020

MAJI, S. et al. Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer, **Advances in Cancer Research**, New York, v. 137, p. 37-75, 2018.

MAJTNEROVÁ, P.; ROUŠAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 45, n. 5, p. 1469–1478, 2018.

MARLES, R. Synephrine, octopamine and caffeine health risk assessment (HRA) report. **Health Canada Natural Health Products Directorate**, File No. 172091. p. 1-49, 2011.

MARTIN, S. J. et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of BCL-2 and Abl. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 182, n. 5, p. 1545–1556, 1995.

MARTIN, S. J. et al. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 46, p. 28753–28756, 1996.

MARTINEZ, L. A. et al. p21 modulates threshold of apoptosis induced by DNA-damage and growth factor withdrawal in prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, New York, v. 23, n. 8, p. 1289–1296, 2002.

MATSUYAMA, R. et al., Comet Assay, a New in vivo Mutagenicity Test – Regulatory Significance and Scientific Development. **Sumitomo Kagaku**, v. 2009-II p.1-10, 2009.

MCGREGOR, D.B., et al. Reactivity of catecholamines and related substances in the mouse lymphoma L5178Y cell assay for mutagens. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v.11, p.523-544, 1988.

McKINNON, K. M. Flow cytometry: an overview. **Current Protocols in Immunology**, New York, v. 120, p. 1–5, 2018.

MOHI-UD-DIN, R. et al. Possible Pathways of Hepatotoxicity Caused by Chemical Agents. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 20, n. 11, p. 867–879, 2019.

MOLLER, P. The comet assay: Ready for 30 more years. **Mutagenesis**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 1–7, 2018.

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

MYERS, D. K. et al. From in vivo to in vitro: The medical device testing paradigm shift. **Altex**, Heidelberg, v. 34, n. 4, p. 479–500, 2017.

NAVARRO, V. et al. The Contents of Herbal and Dietary Supplements Implicated in Liver Injury in the United States Are Frequently Mislabeled. **Hepatology Communications**, Hoboken, v. 3, n. 6, p. 792–794, 2019.

NGA, N. T. H. et al. Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 610, n. April, 2020.

NOBRE, H.V., et al. Caffeine and CSC, adenosine A_{2A} antagonists, offer neuroprotection against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rat mesencephalic cells. **Neurochemistry International**, Oxford, v.56, p.51-58, 2010.

NOLAN, T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. , Quantification of mRNA using real-time RT-PCR, **Nature Protocols**, London, v. 1, p. 1559-1582, 2006.

PAINI, A., et al. Practical use of the Virtual Cell Based Assay: Simulation of repeated exposure experiments in liver cell lines. **Toxicology in Vitro**, Oxoford, v. 45, p. 233-240, 2016.

PARIDA, S.; SIDDHARTH, S.; SHARMA, D. Adiponectin, obesity, and cancer: Clash of the bigwigs in health and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 10, p. 1–27, 2019.

PAWAR, R. S.; SAGI, S.; LEONTYEV, D. Analysis of bitter orange dietary supplements for natural and synthetic phenethylamines by LC–MS/MS. **Drug Testing and Analysis**, Chichester, v. 12, n. 9, p. 1241–1251, 2020

PETKOV, P. I. et al. A feasibility study: Can information collected to classify for mutagenicity be informative in predicting carcinogenicity? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v.72, p.17-25, 2015.

PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations, **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, p. 509-515, 2004.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, **Nucleic Acids Research**, London, v. 30, p. 1-10, 2002.

RAMIREZ, T. et al. Prediction of liver toxicity and mode of action using metabolomics in vitro in HepG2 cells. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 92, n. 2, p. 893–906, 2018.

RATAMESS, N.A., et al. The effects of supplementation with P-Synephrine alone and in combination with caffeine on resistance exercise performance. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, Woodland Park, v.12, p.1-11, 2015.

RATAMESS, N.A., et al. The effects of supplementation with p-Synephrine alone and in combination with caffeine on metabolic, lipolytic, and cardiovascular responses during resistance exercise. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v.35, p. 657-669, 2016.

RIBEIRO, D. L. et al. Analysis of the cytotoxic, genotoxic, mutagenic, and pro-oxidant effect of synephrine, a component of thermogenic supplements, in human hepatic cells in vitro. **Toxicology**, Amsterdam, v. 422, n. August 2018, p. 25–34, 2019.

RIBEIRO, D. L. et al. p-Synephrine induces transcriptional changes via the cAMP/PKA pathway but not cytotoxicity or mutagenicity in human gastrointestinal cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, Washington, v. 84, n. 5, p. 196–212, 2021

ROSSATO, L. G., et al. Development and validation of a GC/IT-MS method for simultaneous quantitation of para and meta-synephrine in biological samples. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, Oxford, v.52, p.721-726, 2010.

ROSSATO, L. G., et al. Synephrine: From trace concentrations to massive consumption in weight-loss. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.49, p.8-16, 2011.

RUIZ-MORENO, C. et al. Effects of p-Synephrine during Exercise: A Brief Narrative Review, **Nutrients**, Basel, v. 13, p. 1-9, 2021

SANTOS, G. et al. Profile of herbal and dietary supplements induced liver injury in Latin America: A systematic review of published reports. **Phytotherapy Research**, London, v. 35, n. 1, p. 6–19, 2021.

SASSA, A. et al. Follow-up genotoxicity assessment of Ames-positive/equivocal chemicals using the improved thymidine kinase gene mutation assay in DNA repair-deficient human TK6 cells. **Mutagenesis**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 331–338, 2021.

SCHMITT, G. C. et al. Gender differences in biochemical markers and oxidative stress of rats after 28 days oral exposure to a mixture used for weight loss containing p-synephrine, ephedrine, salicin, and caffeine. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 52, n. 1, p. 59–68, 2016.

SCHMITZ-SPANKE, S. Toxicogenomics – What added Value Do These Approaches Provide for Carcinogen Risk Assessment? **Environmental Research**, New York, v. 173, n. October 2018, p. 157–164, 2019.

SOMMER, S.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. Micronucleus assay: The state of art, and future directions. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 4, p. 7–9, 2020.

ŠTAMPAR, M. et al. HepG2 spheroids as a biosensor-like cell-based system for (geno)toxicity assessment. **Chemosphere**, Oxford, v. 291, 2022.

STICKEL, F.; SHOUVAL, D. Hepatotoxicity of herbal and dietary supplements: an update. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 89, n. 6, p. 851–865, 2015.

STOHS, S. J. et al. A review of human clinical studies involving Citrus aurantium (Bitter Orange) extract) and its primary Protoalkaloid p-Synephrine. **International Journal of Medical Sciences**, v.9, p.527-538, 2012.

STOHS, S. J. Safety, Efficacy, and Mechanistic Studies Regarding Citrus aurantium (Bitter Orange) Extract and p-Synephrine. **Phytotherapy Research**, London, v. 31, n. 10, p. 1463–1474, 2017

STOHS, S.J., BADMAEV, V. Review of Natural Stimulant and Non-stimulant Thermogenic Agents. **Phytotherapy Research**, London, v. 30, p. 732-740, 2016.

STOHS, S. J.; PREUSS, H. G.; SHARA, M. A review of the receptor-binding properties of p-synephrine as related to its pharmacological effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 2011, n. Figure 3, 2011.

STOHS, S. J.; RATAMESS, N. A. Effects of p-synephrine in combination with caffeine: a review, **Nutrition and Dietary Supplements**, v. 9, p. 87-96, 2017.

STOHS, S. J.; SHARA, M.; RAY, S. D. p-Synephrine, ephedrine, p-octopamine and msynephrine: Comparative mechanistic, physiological and pharmacological properties. **Phytotherapy Research**, London, v. 34, n. 8, p. 1838–1846, 2020.

TABERNILLA, A. et al. In vitro liver toxicity testing of chemicals: A pragmatic approach. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 9, 2021.

TELFORD, W. G. Multiparametric Analysis of Apoptosis by Flow Cytometry. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1678, p. 167-202, 2018.

THANAN, R. et al. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 1, p. 193–217, 2014.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v.35, p.206-221, 2000.

VALLÉE, A.; LECARPENTIER, Y. Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the canonical WNT/ β -catenin pathway in chronic inflammation and oxidative stress during carcinogenesis. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 9, p. 1–18, 2018.

VAN DEN HOF, W. F. P. M. et al. Classification of hepatotoxicants using HepG2 cells: A proof of principle study. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 27, n. 3, p. 433–442, 2014.

VAN ENGELAND, M. et al. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, New York, v. 31, n. 1, p. 1–9, 1998.

VINKEN, M.; BLAAUBOER, B. J. In vitro testing of basal cytotoxicity: Establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 39, p. 104–110, 2017.

WALTER, J.; NAVARRO, V.; ROSSI, S. Drug-induced Liver Injury Associated with Weight Loss Supplements. **Current Hepatology Reports**, v. 17, n. 3, p. 245–253, 2018.

WANG, X. et al. Transcriptomic, proteomic and metabolomic profiling unravel the mechanisms of hepatotoxicity pathway induced by triphenyl phosphate (TPP). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 205, n. July, 2020.

XU, W. W. et al. Synephrine Hydrochloride Suppresses Esophageal Cancer Tumor Growth and Metastatic Potential through Inhibition of Galectin-3-AKT/ERK Signaling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 66, n. 35, p. 9248–9258, 2018.

ZHENG, E. X.; NAVARRO, V. J. Liver Injury from Herbal, Dietary, and Weight Loss Supplements: a Review. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, Hong Kong, v. 3, n. 2, p. 93–98, 2015.

ZHENG, X. et al. p-Synephrine: A novel agonist for neuromedin U2 receptor. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 37, n. 5, p. 764–770, 2014.

ZHIMING, W. U. et al. Roles of endoplasmic reticulum stress and autophagy on H₂O₂-induced oxidative stress injury in HepG2 cells. **Molecular Medicine Reports**, Athens, v. 18, n. 5, p. 4163–4174, 2018.

ZHU, L. et al. Evaluation of hepatotoxicity induced by 2-ethylhexyldiphenyl phosphate based on transcriptomics and its potential metabolism pathway in human hepatocytes. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 413, n. October 2020, 2021.

ZUANG, V. et al. Non-animal Methods in Science and Regulation - EURL ECVAM Status Report 2020, EUR 30553 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2021.

9. Anexo

9.1. ANEXO A – MENÇÃO HONROSA – XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA 2019



Certificamos:

MENÇÃO HONROSA - POSTER

XV TIAFT Latin-American Regional Meeting
XXI Brazilian Congress of Toxicology
28-31 de Outubro de 2019, Águas de Lindoia, Brasil.

Foi outorgado a:

TAINÁ KEILLER LEÃO

Com o trabalho:

**ASSOCIATED CONCENTRATIONS OF SYNEPHRINE AND CAFFEINE INDUCED
DNA DAMAGE AND MODULATED THE EXPRESSION OF XPC GENE IN
HUMAN HEPATIC CELLS (HEPG2) IN VITRO**


Dr. Tiago França de Oliveira
Presidente
XXI CBTOX


Dr. José Luiz da Costa
Presidente
XV TIAFT Latin American Regional Meeting

9.2. ANEXO B – MANUSCRITO- SYNEPHRINE AND CAFFEINE COMBINATION PROMOTES CYTOTOXICITY, DNA DAMAGE AND TRANSCRIPTIONAL MODULATION OF APOPTOSIS-RELATED GENES IN HUMAN HEPG2 CELLS

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 868-869 (2021) 503375



Contents lists available at ScienceDirect

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gentox



Synephrine and caffeine combination promotes cytotoxicity, DNA damage and transcriptional modulation of apoptosis-related genes in human HepG2 cells

Tainá Keiller Leão^a, Diego Luís Ribeiro^b, Ana Rita Thomazela Machado^a, Tássia Rafaela Costa^a, Suely Vilela Sampaio^a, Lusânia Maria Greggi Antunes^{a,*}

^a Department of Clinical Analyses, Toxicology and Food Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Avenida do Café, s/n°, CEP: 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^b Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Avenida dos Bandeirantes, 3900, CEP: 14040-901, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Nutrigenomic
Cytotoxicity
HepG2 cells
Comet assay
Gene expression

ABSTRACT

The abusive consumption of thermogenic supplements occurs worldwide and deserves special attention due to their use to stimulate weight loss and prevent obesity. Thermogenic formulations usually contain Synephrine (SN) and Caffeine (CAF), stimulating compounds extracted from natural sources, but no genetic toxicology studies have predicted this hazardous combination potential. This study examined the toxicogenomic responses induced by SN and CAF, either alone or in combination, in the human hepatic cell line HepG2 *in vitro*. SN (0.03–30 µM) and CAF (0.6–600 µM) alone did neither decrease cell viability nor induce DNA damage, as assessed using the MTT and comet assays, respectively. SN (3 µM) and CAF (30–600 µM) were combined at concentrations similar to those found in commercial dietary supplements. SN/CAF at 3:90 and 3:600 µM ratios significantly decreased cell viability and increased DNA damage levels in HepG2 cells. CAF (600 µM) and the SN/CAF association at 3:60, 3:90, and 3:600 µM ratios promoted cell death by apoptosis, as demonstrated by flow cytometry. Similar results were observed in gene expression (RT-qPCR): SN/CAF up-regulated the expression of apoptosis- (*BCL-2* and *CASP9*) and DNA repair-related (*XPC*) genes. SN/CAF at 3:90 µM also downregulated the expression of cell cycle control (*CDKN1A*) genes. In conclusion, the SN/CAF combination reduces cell viability by inducing apoptosis, damages DNA, and modulates the transcriptional expression of apoptosis-, cell cycle-, and DNA repair-related genes in human hepatic (HepG2) cells *in vitro*. These effects can be worrisome to consumers of thermogenic supplements.

