

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DIEGO LUÍS RIBEIRO

**Avaliação da mutagenicidade, genotoxicidade e alterações no
perfil de expressão gênica induzida pela sinefrina em células
humanas *in vitro***

Ribeirão Preto

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da mutagenicidade, genotoxicidade e alterações no
perfil de expressão gênica induzida pela sinefrina em células
humanas *in vitro***

Versão Corrigida

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Genética para obtenção
do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi
Antunes

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Rafael
Mazzaron Barcelos

Ribeirão Preto

2018

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.

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

FICHA CATALOGRÁFICA

Diego Luís Ribeiro
Ribeiro, D.L.

Avaliação da mutagenicidade, genotoxicidade e alterações no perfil de expressão gênica induzida pela sinefrina em células humanas *in vitro*

Ribeirão Preto: FMRP, 2018.

Número de Páginas: 153

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo/USP.

Área de concentração: Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos

1. Sinefrina; 2. Termogênicos; 3. Genotoxicidade; 4. Estresse oxidativo; 5. Expressão gênica;

FOLHA DE APROVAÇÃO

Diego Luís Ribeiro

Avaliação da mutagenicidade, genotoxicidade e alterações no perfil de expressão gênica induzida pela sinefrina em células humanas *in vitro*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos

Aprovado em: 06/04/2018

Banca Examinadora

Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP).

Profa. Dra. Catarina Satie Takarashi

Instituição: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP).

Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

Instituição: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP).

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

Instituição: Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Profa. Dra. Farah Maria Drumond Chequer

Instituição: Universidade Federal São João Del Rei (UFSJ).

NORMALIZAÇÃO

Este documento foi elaborado de acordo com:

Diretrizes para apresentações de dissertações e teses da USP: Parte I (ABNT) - Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade de São Paulo (SIBI-USP). Documento eletrônico e impresso; 3^o edição, São Paulo, 2016. 100 p.

Instruções gerais de apresentação seguem as conformidades do Artigo 89 da Resolução CoPGr N° 6542 de 18 de abril de 2013 da USP.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe Marilene Miola Ribeiro e ao meu pai Luiz Carlos Ribeiro, por todo o amor, estímulo e esforço dedicados para que seu filho sempre alcançasse o seu sonho. Dedico esse trabalho também a minha saudosa amiga e companheira de laboratório Lívia Cristina Hernandes que virou uma estrela do céu.

Agradecimentos

À **Deus**, por sempre direcionar o meu caminho e por me conceder todos os dias muita saúde, paz e proteção. Obrigado senhor, por estar sempre presente nos momentos de alegrias e também nos momentos de dificuldades. Obrigado por abençoar o meu caminho, a minha família e os meus amigos.

À minha mãe **Marilene Miola Ribeiro**, ao meu pai **Luiz Carlos Ribeiro** e ao meu irmão “peludo” **Snow** pelo amor incondicional de todos os dias, por me incentivarem a continuar sempre estudando e pelas orações que diariamente fazem em minha intenção. Sem esse apoio de todos os dias, nada seria possível em toda minha caminhada. Obrigado por serem minha fonte de inspiração, meus exemplos de conduta e o meu porto seguro quando as dificuldades aparecem. O meu amor por vocês é infinito!

À minha orientadora **Profa. Dra. Lusânia Maria Greggí Antunes**. Obrigado Profa. Lusânia por me acolher em seu laboratório, por acreditar em mim e no nosso projeto e por ter me passado tanto conhecimento e experiência nesses anos. Obrigado também por sua confiança, amizade, paciência, broncas e por tantos momentos de descontração dentro e fora do laboratório. Obrigado também pelos conselhos profissionais e pessoais que sempre me acalmam. Tenha minha gratidão eterna por tudo.

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos**. Obrigado Gustavo por toda a sua ajuda na parte prática e teórica do meu trabalho, além de sua amizade. Ao mesmo tempo que trabalhamos muito na parte científica discutindo artigos, projetos e resultados dentro da universidade, somos amigos e compadres fora do ambiente de trabalho.

À **Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi**, por todo apoio, auxílio, incentivo, pela boa amizade e convivência no Laboratório de Nutrigenômica ao longo dos anos.

Aos amigos e colegas pós-graduandos do Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP-USP. Obrigado **Livia Cristina Hernandez** (in memoriam), **Ana Rita Thomazela Machado**, **Katiuska Tuttis Rodrigues**, **Patrick Santos** e **Rone Aparecido De Grandis**. Obrigado também aos amigos e colegas que passaram ao longo dos anos em nosso laboratório, em especial, **Carla da Silva Machado**, **Michela Bianchi de Mello** e **Alexandre Ferro Aissa (Xandão)**. Agradeço de coração a vocês pela ajuda em experimentos, pelo aprendizado, discussões e correções científicas enriquecedoras, pela amizade e conselhos, por me escutarem e ajudarem sempre que preciso. Obrigado também **Tainá Keiller Leão**, pela amizade e por permitir que pudesse repassar um pouco do meu aprendizado durante sua iniciação científica.

À **Joana D’Arc Castania Darin**, **Regislaine Valéria Burim** e **Jefferson Leandro Codognotto** por todo apoio técnico, auxílio nos experimentos e principalmente pela amizade e convivência de todos os dias.

Aos amigos agregados do Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP-USP. Obrigado **Tássia Rafaela Costa**, **Paula Piccoli Devoz** e **Willian Robert Gomes** pela parceria de trabalho nesses anos todos.

À secretária da pós-graduação da Genética **Susie Adriana Penha Nalon**, pelo excelente atendimento e disposição na resolução das dificuldades que surgiram ao longo do doutorado.

À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)** e ao **Programa de Pós-Graduação em Genética**, que possibilitaram ingressar no doutorado e me proporcionaram grandes conhecimentos. Obrigado também a **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da USP** onde realizei os experimentos do doutorado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa pelo financiamento da pesquisa.

A todos os meus familiares, tios, padrinhos, primos, primas, avós e em especial ao meu avô **Gilberto Ribeiro**, por sempre lembrar de seu neto mais velho e ligar todo domingo para saber como estou.

Aos amigos de Ribeirão Preto-SP. Em especial, minha gratidão ao amigo do coração **Elder Francisco Latorraca**. Obrigado também **Bruno Alves Rocha** e **André Lengert** pela parceria. Por fim, ainda gostaria de agradecer ao pessoal do futebol de “segunda” e “quarta”, entre eles os meus amigos e parceiros **Sidney M. Cruz** e **Marcelo Nicoletti**.

Aos amigos de Londrina-PR, que mesmo longe sempre estão em meu coração e demonstraram ao longo desses anos que distância não esfria amizades. Obrigado a minha amiga/mãe científica, **Ilce Mara Syllós Cólus** por sempre me ajudar, apoiar, incentivar e aconselhar. Obrigado também aos amigos **Juliana Mara Serpeloni**, **Gustavo Strassacapa**, **Heloísa Lizzoti Cilião** e **Marilesia Ferreira de Souza** pela amizade, carinho e apoio nos momentos difíceis. A todos os integrantes, ex-integrantes e agregados do Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, minha gratidão.

À **Tássia Juliane Malacarne**, pela sua amizade, parceria e ajuda com a elaboração da tese.

Aos amigos de Toledo-PR. Em especial a minha amiga e psicóloga **Licioneide Scharnberg** por sua amizade e por me colocar no eixo quando preciso. Por fim, meu obrigado aos amigos de infância do “Língua de Fogo” **Giovani Simon Manfio**, **Bruno F. W. Nogueira**, **Patrick A. Basso**, **Michel P. Vargas**, **Carlos Kreuz** e **Fernando Mantella**, pelos churrascos, barris de chopp e descontrações sempre que estou na cidade.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá”

(Ayrton Senna da Silva)

Apoio e suporte financeiro

Este projeto foi realizado com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio do Processo Nº 141697/2014-8; da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio da concessão de bolsa de doutorado, Processo FAPESP Nº 2014/20344-9; e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em adição, este doutoramento também contou com o apoio financeiro providos pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da Universidade de São Paulo.

RESUMO

RIBEIRO, D. L. **Avaliação da mutagenicidade, genotoxicidade e alterações no perfil de expressão gênica induzida pela sinefrina em células humanas *in vitro***. 2018. 153f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Atualmente, a obesidade é um dos maiores problemas globais de saúde pois aumenta o risco de desenvolvimento de doenças como o câncer. Como alternativa para perda de peso, suplementos termogênicos contendo o proto-alcalóide sinefrina são amplamente utilizados para estimular a queima de calorias. Dúvidas surgiram sobre os efeitos da sinefrina desde que esta, apresenta semelhanças com efedrina e anfetaminas. Existe ainda, uma lacuna na literatura sobre os efeitos da sinefrina na indução de danos no DNA e modulação da expressão gênica em células humanas. A proposta desta investigação foi determinar os efeitos de tratamentos com sinefrina sobre danos no DNA, estado redox e alterações na expressão gênica em linhagens celulares humanas hepáticas, gástricas e intestinais *in vitro*. Como modelo de células humanas foram utilizadas células HepG2 (carcinoma hepatocelular), GAS (epitélio gástrico não tumoral) e Caco-2 (adenocarcinoma colorretal). Inicialmente, foram realizados ensaios de citotoxicidade (MTT e Vermelho Neutro) com dez concentrações (25 - 5000 μM). Posteriormente, três concentrações (2, 20 e 200 μM) foram selecionadas para obtenção de dados sobre proliferação celular (conteúdo proteico e citometria de fluxo), genotoxicidade (cometa), mutagenicidade (micronúcleo), geração de espécies reativas (ERs) (H_2DCFDA) e alterações no estado redox por quantificação das enzimas GSH, CAT, SOD mitocondrial e GPx e do produto de peroxidação malondialdeído (MDA). Por fim, efeitos da sinefrina sobre a expressão de genes (RT-qPCR) das vias de danos ao DNA e metabolismo energético foram avaliados. Sinefrina induziu ERs em células hepáticas (HepG2) e intestinais (Caco-2); além disso, em GAS aumentou CAT e GSH, em Caco-2 elevou os níveis de GSH e principalmente, em células hepáticas (HepG2) aumentou os níveis enzimáticos de GSH, GPx e da geração de MDA. Nos experimentos de expressão, 20 e 200 μM aumentaram a transcrição dos genes *MAPK1* e *JUN* em HepG2, GAS e Caco-2 evidenciando que sinefrina estimula a expressão de genes da via AMPK (Proteínas Quinases Ativadoras de Adenosina Monofosfato Cíclica) que regula o metabolismo de lipídios e glicose. Especificamente, em HepG2 a sinefrina induziu a expressão de *TNF* (citocina pró-inflamatória) e diminuiu a de *LIPE* (hidrólise de lipídeos) e *AKT1* (proliferação). Em GAS, sinefrina diminuiu a expressão de *TNF* e aumentou a expressão dos genes *ADCY3* (atividade catalítica) e *AKT1*. Similarmente em Caco-2, *AKT1* e os genes *PRKACA* e *GNAS* (catabolismo) também aumentaram a expressão. Por fim, somente em Caco-2, 2 μM aumentou os níveis de transcritos de *ATM*, *ATR* e *CHEK1* (danos ao DNA). Apesar destes resultados, não foram observados efeitos sobre a viabilidade, proliferação, ciclo celular e danos ao DNA. Em conclusão, este trabalho demonstrou que sinefrina não causou citotoxicidade e eventos genotóxicos e mutagênicos em células hepáticas, gástricas e intestinais humanas *in vitro*. Todavia, assim como anfetaminas, sinefrina demonstrou estimular significativamente a expressão de genes do metabolismo energético e causar efeitos pró-oxidativos principalmente em células hepáticas. Portanto, para representar a ausência de perigo de sinefrina ainda devem ser realizados experimentos com exposições crônicas em estudos *in vivo* para conclusões afirmativas aos usuários de termogênicos.

Palavras-chave: sinefrina; termogênicos; danos ao DNA; estresse oxidativo; expressão gênica.

ABSTRACT

RIBEIRO, D. L. **Evaluation of mutagenicity, genotoxicity and alterations in the gene expression profile induced by the synephrine in human cells *in vitro***. 2018. 153f. Thesis (Ph.D.). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Currently, obesity is one of the biggest global health problems because it increases the risk of developing diseases like cancer. As an alternative to weight loss, thermogenic supplements containing the proto-alkaloid synephrine are widely used to stimulate the burning of calories. Doubts have arisen about the effects of synephrine since it has similarities with ephedrine and amphetamines. There is still a gap in the literature on the effects of synephrine on the induction of DNA damage and modulation of gene expression in human cells. The aim of this investigation was to determine the effects of synephrine treatments on DNA damage, redox status and alterations in gene expression in liver, gastric and intestinal human cell lines *in vitro*. As model of human cells were used HepG2 (hepatocellular carcinoma), GAS (gastric epithelium non-tumor) and Caco-2 (colorectal adenocarcinoma) cells. Initially, cytotoxicity assays (MTT and Neutral Red) were performed with ten concentrations (25-5000 μM). Afterwards, three concentrations (2, 20 and 200 μM) were selected to obtain results on cell proliferation (protein content and flow cytometry), genotoxicity (comet), mutagenicity (micronucleus), generation of reactive species (RS) (H_2DCFDA), and changes in the redox state by quantification of GSH, CAT, mitochondrial SOD and GPx enzymes and the peroxidation product malondialdehyde (MDA). Finally, effects of synephrine on gene expression (by RT-qPCR) in pathways of DNA damage and energetic metabolism were evaluated. Synephrine induced RS in hepatic (HepG2) and intestinal (Caco-2) cells; in addition, in GAS increased CAT and GSH levels, in Caco-2 induced the GSH levels and, mainly in hepatic cells (HepG2) were observed increases in enzymatic levels of GSH, GPx and generation of MDA. In gene expression experiments, 20 and 200 μM increased the transcription of the *MAPK1* and *JUN* genes in HepG2, GAS and Caco-2, evidencing that treatment with synephrine stimulate the expression of AMPK (Adenosine Monophosphate Protein Kinases Cytosolic Activating) pathway, responsible by energetic metabolism of lipids and glucose. Specifically, in HepG2 cells synephrine induced expression of *TNF* (pro-inflammatory cytokine) and decreased of *LIPE* (lipid hydrolysis) and *AKT1* (proliferation) gene expression. In GAS, synephrine decreased *TNF* expression and increased expression of the genes *ADCY3* (catalytic activity) and *AKT1*. Similarly, in Caco-2, *AKT1* and the genes *PRKACA* and *GNAS* (catabolism) also increased expression. Finally, only in Caco-2, 2 μM increased the transcript levels of *ATM*, *ATR* and *CHEK1* (DNA damage). Despite these results, no effects on viability, proliferation, cycle kinetics and DNA damage were observed. In conclusion, this work demonstrated that synephrine did not cause cytotoxicity, genotoxic and mutagenic effects in liver, gastric and intestinal human cells *in vitro*. However, as well as amphetamines, synephrine has been shown to stimulate significantly the expression of energetic metabolism genes and cause pro-oxidative effects mainly in liver cells. Therefore, in order to represent the absence of hazard of synephrine, experiments with chronic exposures using *in vivo* studies should be performed for affirmative conclusions to thermogenic users.

Key-words: synephrine; thermogenics; DNA damage; oxidative stress; gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparação entre as estruturas químicas de sinefrina, efedrina, epinefrina (adrenalina), norepinefrina (noradrenalina) e de anfetamina.....	5
Figura 2. Resumo gráfico dos efeitos da sinefrina após sua ingestão em suplementos alimentares termogênicos, de acordo com a revisão feita por Stohs, Preuss e Shara (2012).....	6
Figura 3. Possíveis danos causados em macromoléculas devido ao acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	18
Figura 4. Cascata de sinalização da via de AMPK, suas respectivas funções em células humanas e possível mecanismo de ação da sinefrina nesta via em células humanas.	22
Figura 5. Fotomicrografia das linhagens celulares utilizadas para experimentos <i>in vitro</i>	28
Figura 6. Imagens de nucleoides de células gástricas (GAS) capturadas com o software CometAssay IV.	32
Figura 7. Fotomicrografia obtida no ensaio citoma micronúcleo em células HepG2.	34
Figura 8. Viabilidade celular de células HepG2, GAS e Caco-2 obtidas no ensaio do MTT para determinação da citotoxicidade da sinefrina.	46
Figura 9. Viabilidade celular em células HepG2, GAS e Caco-2 obtidas no ensaio do VN para determinação da citotoxicidade da sinefrina..	47
Figura 10. Proliferação celular baseada em conteúdo proteico de células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para avaliação de efeitos antiproliferativos	49
Figura 11. Análise de citometria de fluxo em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para determinação dos efeitos sobre a cinética de ciclo celular.....	50
Figura 12. Determinação dos danos causados ao DNA em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina por meio do ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade.	52
Figura 13. Determinação dos níveis intracelulares de ERs em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para avaliação do potencial pró-oxidativo... ..	58
Figura 14. Determinação dos níveis enzimáticos de GSH em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para análise de alterações no estado redox intracelular.....	60

Figura 15. Determinação dos níveis enzimáticos de CAT em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para análise de alterações no estado redox intracelular.....	62
Figura 16. Determinação dos níveis enzimáticos de SOD mitocondrial em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para análise de alterações no estado redox intracelular..	64
Figura 17. Determinação dos níveis enzimáticos de GPx em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para análise de alterações no estado redox intracelular.....	66
Figura 18. Determinação dos níveis intracelulares de MDA presentes em TBARS em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para análise de alterações no estado redox intracelular.....	68
Figura 19. Perfil de expressão gênica em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para análise comparativa..	74

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Lista de genes avaliados nos experimentos de expressão gênica por RT-qPCR e suas respectivas funcionalidades42
- Tabela 2** - Frequência de micronúcleos (MNi), brotos nucleares (NBUDs) e pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células binucleadas; porcentagens de células binucleadas (% BN) e índices de divisão nuclear (IDN) em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de sinefrina (SNF).....54
- Tabela 3** - Frequência de micronúcleos (MNi), brotos nucleares (NBUDs) e pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células binucleadas; porcentagens de células binucleadas (% BN) e índices de divisão nuclear (IDN) em células gástricas primárias (GAS) tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de sinefrina (SNF).....55
- Tabela 4** - Frequência de micronúcleos (MNi), brotos nucleares (NBUDs) e pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células binucleadas; porcentagens de células binucleadas (% BN) e índices de divisão nuclear (IDN) em células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2) tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de sinefrina (SNF).....56
- Tabela 5** - Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo energético e à danos no DNA que foram significativamente alterados em células HepG2 após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μ M) no tempo de 6 horas. *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1* foram utilizados como genes de referência para a normalização71
- Tabela 6** - Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo energético e à danos no DNA que foram significativamente alterados em células GAS após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μ M) no tempo de 6 horas. *GAPDH*, *ACTB* e *HPRT1* foram utilizados como genes de referência para a normalização72
- Tabela 7** - Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo energético e à danos no DNA que foram significativamente alterados em células Caco-2 após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μ M) no tempo de 6 horas. *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1* foram utilizados como genes de referência para a normalização73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK	<i>Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase</i>
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BCRJ	Banco De Células Do Rio De Janeiro
BER	<i>Base Excision Repair</i>
% BN	Porcentagem de Células Binucleadas
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclica
CAT	Catalase
CBMN-Cyt	Ensaio Citoma Do Micronúcleo Com Bloqueio De Citocinese
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECHA	<i>European Chemicals Agency</i>
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERN	Espécies Reativas De Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas De Oxigênio
ERs	Espécies Reativas
FC	<i>Fold Change</i>
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDA	<i>Food And Drug Administration</i>
GAS	Culturas de Células do Epitélio Gástrico Não Tumerais
GPCRs	Receptores Acoplados a Proteína G
GPx	Glutaciona Peroxidase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSTs	Glutaciona-S-Transferase
H ₂ DCFDA	2',7'-Diclorodihidrofluoresceína Diacetato
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IDN	Índice De Divisão Nuclear
JaCVAM	<i>Japanese Center for the Validation of Alternative Methods</i>
LDH	<i>Lactate Dehydrogenase</i>
MAOs	Monoamina Oxidases
MDA	Malondialdeído
MMS	Metil Metanosulfonato
MN	Micronúcleo
mRNA	RNA Mensageiro
miRNA	MicroRNA
MTT	Brometo De [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Il)-2,5-Difeniltetrazólio
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NBUDs	<i>Nuclear Buds</i>
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NF-kappa-B	<i>Nuclear Factor Kappa Beta</i>
NPBs	<i>Nucleoplasmic Bridges</i>
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OMS	Organização Mundial Da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGC-1	<i>Peroxisome-Proliferator Activated Receptor Co-Activator 1</i>
PI3K	Fosfatidilinositol-3-Quinase
PKA	Proteína Quinase A
PKB	Proteína Quinase B
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SCGE	<i>Single-Cell Gel Electrophoresis</i>
SOD	Superóxido Dismutase
SULTs	Sulfotransferases
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
TMR	Taxa Metabólica De Repouso
UGTs	Difosfogluconosil Transferases
VN	Vermelho Neutro
WADA	<i>World AntiDoping Agency</i>
8-OHdG	8-oxo-dihidroguanosina

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Obesidade	1
1.2. Sinefrina	3
1.3. Citotoxicidade	9
1.4. Genotoxicidade e Mutagenicidade	12
1.5. Estresse Oxidativo	16
1.6. Expressão Gênica	19
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos Específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Reagentes Químicos	26
3.2. Linhagens Celulares e Condições de Cultivo	27
3.3. Concentrações de Sinefrina	28
3.4. Ensaio do MTT	28
3.5. Ensaio de Captação do Vermelho Neutro	29
3.6. Curva de Proliferação Celular	30
3.7. Citometria de Fluxo	30
3.8. Ensaio Cometa	31
3.9. Ensaio Citoma Micronúcleo	33
3.10. Determinação dos Níveis Intracelulares de Espécies Reativas (ERs) ..	34
3.11. Quantificação de Malondialdeído (MDA) em Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	35
3.12. Quantificação de Glutationa (GSH) Intracelular	36
3.13. Quantificação de Catalase (CAT)	37
3.14. Quantificação de Superóxido Dismutase (SOD) Mitocondrial	37
3.15. Quantificação de Glutationa Peroxidase (GPx)	38
3.16. Extração de RNA, Síntese de cDNA e PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)	39

3.17. Análise Estatística	43
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Citotoxicidade	45
4.2. Proliferação e Cinética de Ciclo Celular	48
4.3. Genotoxicidade	51
4.4. Mutagenicidade	53
4.5. Estresse Oxidativo e Quantificações Enzimáticas	57
4.5.1. Determinação de Espécies Reativas (ERs).....	57
4.5.2. Quantificações Enzimáticas	59
4.5.2.1. Glutathiona (GSH) Intracelular.....	59
4.5.2.2. Catalase (CAT).....	61
4.5.2.3. Superóxido Dismutase (SOD) Mitocondrial	63
4.5.2.4. Glutathiona Peroxidase (GPx)	65
4.5.2.5. Malondialdeído (MDA).....	67
4.6. Expressão Gênica	69
5. DISCUSSÃO	76
6. CONCLUSÕES.....	98
7. REFERÊNCIAS.....	101
8. APÊNDICES.....	116
9. MANUSCRITO	124

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Obesidade e Suplementos Alimentares

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade e o sobrepeso mais que dobraram no mundo desde 1980. Na última estimativa de dados em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos com 18 anos ou mais possuíam sobrepeso, e desses, mais de 600 milhões de pessoas eram considerados obesos. Outro dado alarmante, é que em 2014 a mesma organização estimou que cerca de 41 milhões de crianças com 5 anos ou menos possuíam sobrepeso ou eram obesas no mundo (WHO, 2014). No Brasil, o último levantamento realizado pelo Ministério da Saúde em 2016 revelou que 18,9% da população brasileira é obesa, ou seja, um a cada cinco brasileiros possuem a doença (BRASIL, 2017a).

Os problemas relacionados com a obesidade são uma das maiores preocupações globais em saúde pública (STOHS; BADMAEV, 2016), isso porque o excesso de peso está associado ao aumento do risco de desenvolver doenças cardíacas, inflamações crônicas, hipertensão e diabetes *mellitus* tipo 2 (O'FLANAGAN; BOWERS; HURSTING, 2015). Além disso, o excesso de peso e a obesidade estão associadas com a resistência à insulina, que por sua vez pode levar a hiperglicemia, distúrbios lipídicos (KERN et al., 2003) e promover o estresse oxidativo, um dos principais responsáveis no desenvolvimento de processos carcinogênicos (RANI et al., 2016).

Com relação ao processo de carcinogênese, no geral, a obesidade é estimada como um fator causal dominante entre 10 a 20% de todos os casos de neoplasias (CALLE et al., 2003; RENEHAN et al., 2008; O'ROURKE, 2014). Segundo revisão publicada em 2016 pela Agência Internacional de Pesquisa para o Câncer – IARC (*International Agency for Research on Cancer*), que realizou metanálise de estudos disponíveis para animais e humanos, existem associações causais entre obesidade e câncer para 13 tipos diferentes de tumores (LAUBY-SECRETAN et al., 2016; COLDITZ; PETERSON, 2018). Estas correlações positivas entre obesidade e carcinogênese ocorrem principalmente para casos de câncer de mama (pós-menopausa), cólon e reto, endométrio, esôfago (adenocarcinoma), vesícula biliar, estômago, rim (célula renal), fígado, mieloma múltiplo, próstata, ovário, pâncreas e tireoide (RENEHAN et al., 2008; LAUBY-SECRETAN et al., 2016).

Para evitar ou diminuir o sobrepeso e seus consequentes problemas, a maneira considerada ideal para o controle de peso é a gestão do consumo de calorias bem como o seu gasto por meio do exercício físico. No entanto, devido à falta de tempo, boa parte da população não realiza a gestão correta do número de calorias ingeridas e não executa práticas diárias de exercícios (STOHS; BADMAEV, 2016). Como alternativa, muitos recorrem ao uso de suplementos alimentares.

Os suplementos alimentares são definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como “um produto de ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, e destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados” (BRASIL, 2017b). No Brasil, o uso destes suplementos alimentares é destinado principalmente para atletas profissionais e amadores desportivos, todavia, segundo a legislação atual regulamentada na RDC Nº 18 de 27 de abril de 2010 da ANVISA (BRASIL, 2010), qualquer indivíduo pode utilizar suplementos alimentares desde que orientado por nutricionista. A utilização dos suplementos alimentares atualmente, baseia-se nas expectativas em relação à promoção dos efeitos desejados relacionados, como por exemplo, aumento de energia, desempenho atlético, perda de peso, crescimento muscular, aceleração da recuperação ou indução de outras respostas fisiológicas e metabólicas (WILLIAMS, 2006).

No caso específico de suplementos alimentares que auxiliam a aumentar o gasto de calorias, estimular a saciedade e induzir a perda de peso/emagrecimento, estes recebem o nome de suplementos alimentares termogênicos ou ergogênicos (STOHS; BADMAEV, 2016). No Brasil, não existe ainda definição exata para este tipo de suplemento alimentar na RDC Nº 18 da ANVISA, entretanto, novas definições e classificações estão em elaboração pela agência reguladora. Estudos recentes realizados com termogênicos identificaram que esses suplementos dietéticos comercialmente disponíveis, também podem aumentar a taxa metabólica de repouso (TMR). Com essa influência positiva na TMR, os suplementos termogênicos ganharam ainda mais magnitude e força popularmente para sua utilização no emagrecimento sem a prática constante de exercícios (CAMPBELL et al., 2016).

Os suplementos termogênicos geralmente são preparações altamente heterogêneas, ou seja, contêm várias substâncias diferentes em sua composição e costumam possuir em sua fórmula a presença de extratos ou compostos isolados de várias espécies botânicas diferentes juntamente com fontes naturais ou sintéticas de

cafeína (BAKHIYA et al., 2017). O fato de possuir muitas preparações de origem natural em sua composição, induz muitos consumidores a considerarem esses produtos termogênicos como livres de “risco” ou perigo, pois possuem a falsa crença e opinião de que "natural" é igual a "seguro". No entanto, dependendo dos fitoquímicos individuais, suas concentrações e a combinação de compostos dentro dos termogênicos, certos produtos oriundos de plantas podem potencialmente induzir efeitos adversos indesejados, interferir na ação de medicamentos, ou até mesmo causar sérios danos à saúde (BAKHIYA et al., 2017).

Atualmente, existe um grande número de suplementos termogênicos disponíveis comercialmente. Em sua maioria, estes produtos contêm em sua composição além da cafeína, uma complexa mistura de substâncias tais como sinefrina, chá-verde, salicina e outras vitaminas, minerais e fitoterápicos (STOHS PREUSS; SHARA, 2011; STOHS; PREUSS; SHARA, 2012; RATAMESS et al., 2015; SCHMITT et al., 2016). Destas substâncias citadas anteriormente, a sinefrina (*p*-sinefrina) é uma das mais frequentemente presentes em suplementos termogênicos em combinação com cafeína. Por causa de sua semelhança estrutural com agentes simpaticomiméticos, de possíveis efeitos adrenérgicos no sistema nervoso e por ser considerado “seguro” em razão de sua origem natural, o uso de sinefrina isolada ou associada na composição de suplementos termogênicos aumentou de forma significativa com o passar dos anos (ROSSATO et al., 2011).

1.2. Sinefrina

A sinefrina (ou *p*-sinefrina) é um proto-alcalóide derivado do grupo das feniletilaminas com o grupo hidroxila na posição *para* do anel benzeno da molécula, e é naturalmente encontrada no fruto imaturo ou cascas de *Citrus aurantium*, que é conhecida como laranja amarga ou laranja de Sevil, ou ainda, pode estar presente em outras espécies cítricas como as tangerinas e clementinas. O extrato patenteado de laranja amarga, que é o padrão para *p*-sinefrina, é conhecido como Advantra Z[®] (Nutratech Inc. – Fairfield, EUA) e é amplamente utilizado em suplementos termogênicos destinados à perda de peso, podendo ou não ser combinado com outros produtos como cafeína e chá verde (STOHS; BADMAEV, 2016). Esta sinefrina que é encontrada naturalmente em frutas cítricas e presente em suplementos alimentares não deve ser confundida com *m*-sinefrina (sinônimos: fenilefrina ou neosinefrina), que

é um fármaco simpaticomimético usado principalmente como descongestionante nasal (BAKHIYA et al., 2017).

Em alguns casos, a ingestão dietética da sinefrina pode ocorrer até mesmo sem o conhecimento pessoal, isso porque o consumo de frutas cítricas e seus derivados, como por exemplo sucos e marmeladas, contêm a substância na composição. A ingestão diária total de sinefrina via alimentação convencional já foi estimada em algumas populações, entre elas a da Alemanha, onde concentrações equivalentes a 6,7 mg (400 μ M) até 25,7 mg (1537 μ M) /dia já foram observadas (BFR, 2012). A sinefrina que é adicionada aos suplementos alimentares termogênicos, pode ser encontrada (I) ou na forma de extratos preparados a partir das cascas de frutas de laranjas amargas (*C. aurantium*) com 6-10% de conteúdo de sinefrina, ou (II) na forma fitoquímica purificada com até 95% de pureza (NTP/NIEHS, 2004; BLUMENTHAL, 2005).

O conteúdo de sinefrina em diferentes suplementos termogênicos que são comercializados mundialmente, pode variar de acordo com a formulação proposta pela empresa fabricante e pela legislação vigente das agências reguladoras em cada país. Normalmente, doses diárias de sinefrina estão entre faixas de 5 (298 μ M) e 150 mg (8955 μ M) /dia. No Brasil, por exemplo, onde a regulamentação de 6 diferentes propostas para avaliação, eficácia e segurança de suplementos alimentares está em elaboração pela ANVISA, o conteúdo de sinefrina em suplementos termogênicos foi analisado por Viana et al. (2016) e foram encontradas concentrações que correspondem a uma ingestão entre 59,1 (3535 μ M) e 127 mg (7595 μ M) /dia.

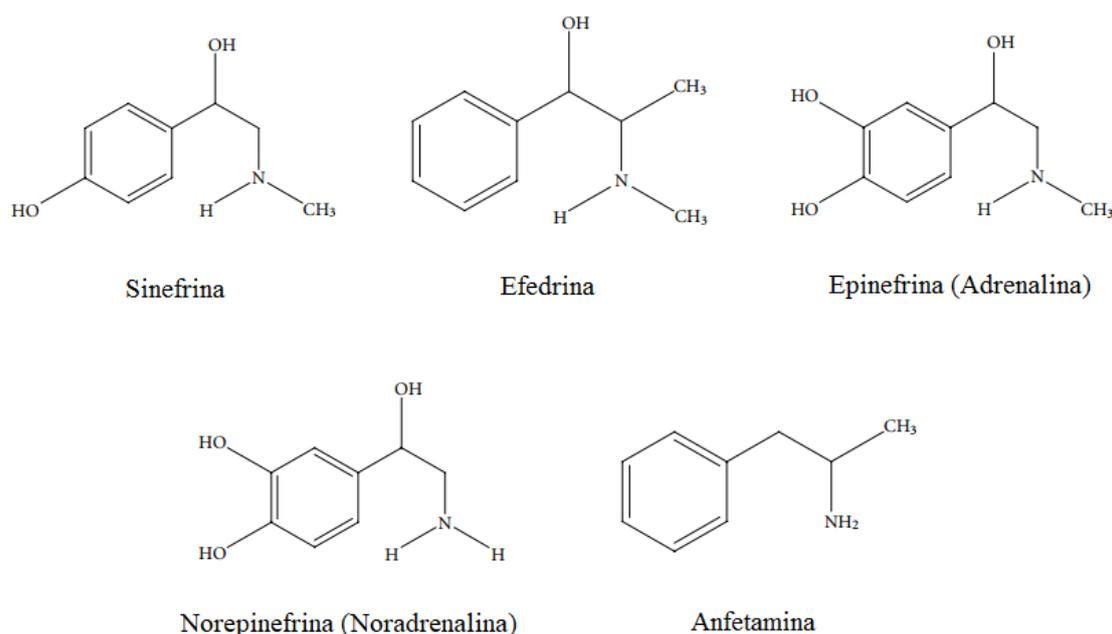
Em humanos, após a administração oral de sinefrina, geralmente as concentrações sanguíneas de pico variam de 2 a 3 ng/mL e sua meia-vida no organismo oscila de 2,5 a 3 horas (HALLER et al., 2005; HALLER et al., 2008; ROSSATO et al., 2011). Essa baixa concentração plasmática e curta meia-vida ocorrem principalmente porque posteriormente a ingestão, a maior fração do composto absorvido no intestino (30-90%) chega ao fígado por meio da veia porta, onde a sinefrina tem transformação e metabolização hepática rápida (DA SILVA-PEREIRA et al., 2016).

De acordo com Haller et al. (2005), a sinefrina é metabolizada por enzimas mitocondriais chamadas monoamina oxidases (MAOs) em ácido *p*-hidroximandélico. Os experimentos realizados por Suzuki et al. (1979), por exemplo, demonstraram a capacidade de MAOs na transformação de sinefrina com mitocôndrias isoladas de

cérebro de ratos e, estudos de farmacocinética mostraram que essa reação é exercida predominantemente no fígado, seu principal sítio de ação (DA SILVA-PEREIRA et al., 2016). Depois disso, ainda no fígado, sinefrina também pode sofrer metabolismo de fase II principalmente por glucuronidação, realizada por enzimas UDP-glicuroniltransferases (UGTs), e sulfatação, promovida por enzimas sulfotransferases (SULTs) (IBRAHIM et al., 1983). Nos seres humanos, dados disponíveis sobre excreção demonstram que sinefrina, seja na sua forma *meta* ou *para*, quando consumida oralmente, pode ser eliminada dentro de 16 a 24 horas na urina (KUSU et al., 1996; HAAZ et al., 2006) e a presença de ácido *p*-hidroximandélico foi comprovadamente o principal produto metabólico encontrado na excreção urinária (SUZUKI et al., 1979).

A utilização de sinefrina como suplemento alimentar para perda de peso se intensificou por causa de dois importantes fatores. Inicialmente, conforme demonstrado na Figura 1, devido às suas semelhanças estruturais químicas com agentes simpaticomiméticos como a efedrina, noradrenalina e norepinefrina, que atualmente se encontram proibidos pela Organização Internacional Antidoping (*World Antidoping Agency - WADA*) para a utilização como estimulantes físicos (STOHS; BADMAEV, 2016).

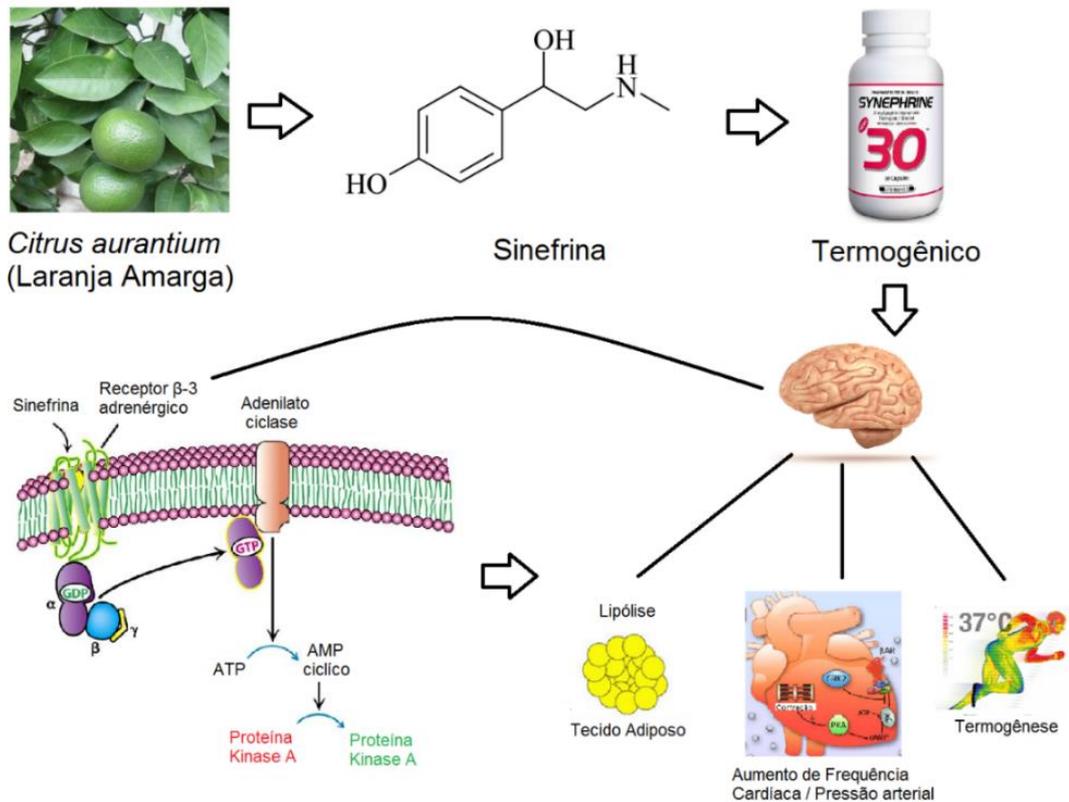
Figura 1. Comparação entre as estruturas químicas de sinefrina, efedrina, epinefrina (adrenalina), norepinefrina (noradrenalina) e de anfetamina.



Fonte: Imagem adaptada de Stohs, Preuss e Shara (2011).

Posteriormente, também foi verificado que devido às suas propriedades de ligação aos receptores adrenérgicos, sinefrina possui ação farmacológica similar ao de anfetaminas e aminas adrenérgicas (SCHMITT et al., 2016). Essa ação farmacológica de sinefrina ocorre com baixa afinidade de ligação com os receptores α -1 e α -2, bem como os adrenoreceptores β -1 e β -2 (STOHS; PREUSS; SHARA, 2011). Entretanto, conforme demonstrado na Figura 2, as ações ergogênicas de sinefrina são mediadas principalmente porque esta substância realiza a ativação dos receptores adrenérgicos β -3, levando assim, ao aumento da taxa metabólica, aumento na pressão sanguínea, elevação da frequência cardíaca, lipólise, inibição de apetite e termogênese (FUGH-BERGMAN; MYERS, 2004; CUI et al., 2015; RATAMESS et al., 2015).

Figura 2. Resumo gráfico dos efeitos da sinefrina após sua ingestão em suplementos alimentares termogênicos, de acordo com a revisão feita por Stohs, Preuss e Shara (2012).



Fonte: Diego Luís Ribeiro, 2014.

Publicações disponíveis onde os efeitos de sinefrina presentes em suplementos termogênicos foram testados, relatam que esta substância também pode aumentar a TMR (STOHS; PREUSS; SHARA, 2011) e possuir efeitos inibitórios nas enzimas α -amilase e α -glicosidase (TASLIMI; AKINCIOGLU; GÜLÇİN, 2017). Geralmente, substâncias com potencial de inibir a enzima α -glicosidase ajudam a diminuir os níveis de glicose no sangue após o consumo de alimentos e podem possuir potencial no desenvolvimento de medicamentos para o controle da diabetes (TASLIMI; AKINCIOGLU; GÜLÇİN, 2017).

Por causa de sua metabolização rápida, modo de ação farmacológico similar ao de anfetaminas e sua estrutura química semelhante a agentes simpaticomiméticos, estudos sobre perigo, risco, eficácia e segurança de sinefrina geram inúmeras publicações na literatura sobre a presença ou ausência de possíveis efeitos adversos, principalmente em modelos *in vivo* e em humanos. De um lado, relatos de casos publicados com humanos têm associado os suplementos termogênicos contendo sinefrina com vários efeitos adversos, como infarto do miocárdio (THOMAS et al., 2009), acidente vascular cerebral isquêmico (BOUCHARD et al., 2005), hipertensão arterial aguda (MOADDEB; TOFADE; BEVINS, 2011) e taquicardia (FIRENZUOLI; GORI; GALAPAI, 2005). Também foram relatados, em modelos laboratoriais e em seres humanos, efeitos tóxicos como ação adrenérgica inespecífica e exoftalmia (protrusão anormal ou projeção de um ou ambos globos oculares), relacionados com a utilização de produtos contendo este proto-alcalóide (BUI; NGUYEN; AMBROSE, 2006; GANGE et al., 2006; ARBO et al., 2009; STOHS, 2010; DE OLIVEIRA et al., 2014).

Por outro lado, apesar dos efeitos adversos descritos anteriormente, estudos epidemiológicos em seres humanos e experimentos com modelos laboratoriais *in vivo* relatam a ausência de efeitos adversos causados pela sinefrina, principalmente quando testada sem a combinação de outras substâncias como cafeína (RATAMESS et al., 2015; STOHS; BADMAEV, 2016; BAKHIYA et al., 2017; STOHS, 2017). Haller et al. (2005), ao examinarem os efeitos no sistema cardiovascular de um suplemento contendo somente sinefrina e um suplemento dietético multi-componente com sinefrina e cafeína, observaram que somente o suplemento com a associação entre os componentes termogênicos sinefrina e cafeína causou efeitos hipertensivos e taquicardias, enquanto o suplemento somente com sinefrina não demonstrou ocasionar maiores complicações. Em última revisão detalhada, Stohs (2017)

comparou resultados publicados em periódicos científicos de estudos *in vitro*, *in vivo* com animais e de mais de 30 trabalhos com dados pré-clínicos em humanos, onde parâmetros hemodinâmicos e cardiovasculares foram avaliados, e observou que sinefrina sem a combinação de outros compostos como cafeína e chá verde, não é capaz de causar quaisquer tipos de efeitos adversos.

Apesar das controvérsias relatadas anteriormente sobre a indução ou não de efeitos adversos em usuários de suplementos termogênicos, alguns dados sobre o mecanismo de ação de sinefrina continuam sem definições claras ou então sem dados suficientes para obtenção de possíveis conclusões. Um exemplo, é que nenhuma publicação em literatura realizou a avaliação do potencial de sinefrina em induzir morte celular (citotoxicidade) combinando diferentes ensaios celulares e utilizou como modelo células oriundas de órgãos alvos da ação dessa substância, como linhagens hepáticas, gástricas e intestinais. Apenas estudos de toxicidade em animais foram realizados pelo *National Center for Toxicological Research* em conjunto com a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América para avaliação da segurança do extrato de laranja amarga e de sinefrina (HANSEN et al., 2011, 2012, 2013).

Além disso, até este momento, os estudos que analisaram o extrato de *Citrus aurantium* ou sinefrina na sua forma isolada, demonstraram a segurança e a ausência de perigo diretamente atribuídas a este composto (STOHS, 2017). Todavia, as recentes revisões e publicações disponíveis na literatura destacam apenas 5 estudos onde o potencial de sinefrina em causar danos primários ao DNA (genotoxicidade) ou induzir quebras e/ou perdas cromossômicas (mutagenicidade), foram avaliados (STOHS, 2017; BAKHIYA et al., 2017). A avaliação do impacto de sinefrina sobre o material genético após exposições em diversas concentrações faz parte dos estudos de perigo de uma substância, e estes trabalhos ou não foram realizados em células humanas ou então utilizaram células humanas *in vitro*, porém apresentaram resultados que são inconclusivos.

Por fim, também existem ainda dúvidas sobre o potencial pró-oxidativo de sinefrina, pois relatos evidenciam que após sua metabolização, metabólitos secundários podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e assim, direta ou indiretamente, contribuir com mecanismos de toxicidade da sinefrina (KOVACIC; COOKSY, 2005) e promover alterações no estado redox intracelular. Por causa dessas lacunas citadas anteriormente, são necessários ainda, a obtenção de

mais dados utilizando linhagem de células humanas *in vitro* que apliquem os ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e de estresse oxidativo para obtenção de resultados sobre o perigo da sinefrina, principalmente em células hepáticas, gástricas e colorretais.

1.3. Citotoxicidade

Para avaliar o possível perigo de uma substância, é indispensável e valiosa a obtenção de informações sobre a toxicidade desta substância em um modelo de cultura de células *in vitro*, que pode ser utilizado inicialmente para rastreio de toxicidade de compostos antes da avaliação em estudos com animais (ROTHEN-RUTISHAUSER et al., 2008). Estes rastreios iniciais de toxicidade que utilizam modelos de culturas de células *in vitro* incluem experimentos com linhagens celulares primárias, linhagens celulares não tumorais imortalizadas, linhagens celulares tumorais e sistemas de cultura em 3D, que podem ser oriundas de vários tipos de tecidos (JUDSON et al., 2016).

Nos últimos anos, devido ao desenvolvimento tecnológico, amplas baterias de ensaios *in vitro* que utilizam múltiplas tecnologias vêm sendo observadas. Existem muitas vias para induzir efeito tóxico, portanto, podem ser utilizadas diferentes técnicas para detecção da citotoxicidade. As diferenciações de células viáveis/não viáveis com métodos colorimétricos podem detectar, por exemplo, processos citotóxicos que promoveram a desintegração da membrana plasmática ou que induziram alterações no funcionamento de enzimas ou organelas. Somado a isso, também é possível realizar, com o auxílio de marcadores fluorescentes específicos, a avaliação de diversos mecanismos de indução de vias de morte celular (SCHERLIEß, 2011; VINKEN; BLAAUBOER, 2017).

Entre os ensaios baseados em detecções colorimétricas, o ensaio do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que foi descrito inicialmente por Mosmann (1983), tornou-se um dos métodos mais utilizados para a determinação da viabilidade e da proliferação celular desde o seu desenvolvimento. O ensaio do MTT consiste na redução do sal de tetrazolium (*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) em cristais de formazan (*1-[4,5-dimetil-2-il]3,5-diphenylformazan*) por enzimas desidrogenases que estão presente principalmente nas mitocôndrias, como por exemplo, a enzima da membrana interna succinato desidrogenase, e também em

outras organelas como o retículo endoplasmático de células viáveis (VAN TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015). Estes cristais produzidos estão diretamente relacionados com a quantidade de células metabolicamente ativas e fornecem, de forma estimativa, a viabilidade celular (BERNHARD et al., 2003). Segundo Mosmann (1983), o ensaio do MTT serve como alternativa para medir proliferação, atividade celular e a citotoxicidade causada por diferentes substâncias. Assim, devido sua facilidade e funcionalidade, a utilização deste teste tornou-se importante como um primeiro *screening* para determinação de concentrações a serem testadas em ensaios posteriores específicos.

Outro teste colorimétrico muito utilizado em pesquisa básica é o Ensaio de Captação de Vermelho Neutro (*Neutral Red Uptake Assay*), sendo recomendado por agências regulatórias internacionais como um dos primeiros ensaios *in vitro* na avaliação de perigo de substâncias químicas (OECD, 2004). O ensaio do Vermelho Neutro (VN) baseia-se na capacidade de células viáveis em incorporar o corante vermelho neutro, que penetra nas membranas celulares e, por difusão passiva não iônica, concentra-se nos lisossomos, onde se liga aos radicais aniônicos e/ou grupos fosfatos da matriz lisossomal. O corante é então extraído das células viáveis e sua absorbância é quantificada utilizando um espectrofotômetro (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008). Segundo Repetto, Del Peso e Zurita (2008), o ensaio quantifica a viabilidade celular e pode ser utilizado para avaliar a replicação celular, efeitos citostáticos ou morte celular dependendo da densidade de células. Além disso, os autores ainda relatam que o procedimento é muito mais sensível, barato, apresenta menor interferência e não utiliza reagentes instáveis quando comparado ao MTT, por exemplo.

Para se obter a melhor caracterização do potencial citotóxico de substâncias em teste que serão utilizadas como aditivos alimentares, pesticidas, cosméticos ou agentes farmacológicos, a escolha do melhor ensaio de citotoxicidade é fundamental. Em adição a isso, uma combinação de ensaios com diferentes alvos de ação (*endpoints*) é ainda mais importante para melhor validação de dados (FUKUSHIMA; TANAKA; YAMAMOTO, 2014). Segundo Vinken e Blaauboer (2017), para os estudos de citotoxicidade *in vitro* com substâncias químicas que apresentam poucas informações ou então para as quais não existe informação toxicológica pré-existente relevante, devem ser realizados pelo menos dois ensaios diferentes que avaliem diferentes *endpoints*.

A combinação das metodologias do MTT e do VN vem sendo considerada uma boa alternativa para ensaios de citotoxicidade *in vitro*. Como demonstrado no estudo de Borenfreund, Babich e Martin-Alguacil (1988), quando houve uma comparação de resultados entre os ensaios de MTT e VN para 28 compostos diferentes, a concordância aproximada entre os dois ensaios foi de 93,9% para a maioria dos valores de IC₅₀, a concentração que promove a perda de viabilidade de 50% das células. Em estudos publicados por Clothier et al. (2013), onde foram testados 57 diferentes compostos químicos neurotóxicos e hepatotóxicos em fibroblastos de ratos 3T3, foi demonstrado que os dois ensaios apresentaram correlação positiva de 67,7%.

Além disso, a associação de diferentes ensaios de citotoxicidade juntamente com a utilização de várias linhagens celulares provenientes de órgãos alvos da possível ação da substância e a escolha de tempos de exposição, são essenciais para reproduzir um painel integrado das respostas específicas do organismo, e assim, serem utilizados para avaliar os efeitos após exposição e para prever a toxicidade *in vivo* (MONTEIRO-RIVIERE et al., 2015). Levando-se em consideração que suplementos termogênicos são consumidos em forma de cápsulas, após sua ingestão, a sinefrina inicialmente é exposta no trato gástrico, posteriormente é absorvida no intestino e rapidamente chega ao fígado, onde é metabolizada. Uma excelente alternativa, por exemplo, seria avaliar e utilizar como modelos linhagens de células humanas gástricas, intestinais e hepáticas *in vitro*.

No caso específico de sinefrina, existem resultados disponíveis na literatura onde ensaios de citotoxicidade foram executados em células hepáticas (CUI et al., 2015), fibroblastos embrionários (ROH et al., 2014) e células musculares (HONG et al., 2012) de camundongos. Em células humanas, apenas um estudo avaliou os efeitos citotóxicos de sinefrina utilizando o ensaio do LDH, que avalia a integridade da membrana plasmática em células humanas intestinais *in vitro* (ROSSATO et al., 2010). A pouca disponibilidade de dados e resultados onde foram empregadas linhagens celulares humanas provenientes de órgãos alvos da possível ação da sinefrina também são observadas em outras etapas essenciais na avaliação do seu perigo como, por exemplo, na identificação da genotoxicidade e mutagenicidade deste termogênico, no emprego de ensaios que analisem seus efeitos pró-oxidativos no estado redox intracelular e, por fim, em experimentos que analisem mais detalhadamente seu mecanismo de ação sobre a modulação da expressão gênica.

1.4. Genotoxicidade e Mutagenicidade

A identificação do potencial genotóxico e mutagênico representa outra etapa crítica e decisiva na avaliação de perigo de compostos químicos, tais como fármacos, praguicidas, aditivos alimentares etc., sendo que agências regulatórias de vários países exigem a execução de uma série de ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade para a liberação de produtos no mercado consumidor (FDA, 2006; JI et al., 2017). A mutagenicidade é um importante parâmetro que precisa ser adequadamente investigado durante o processo de avaliação de perigo de determinado produto. Outro fato importante é que historicamente, os testes de mutagenicidade têm sido aplicados para estudar o potencial carcinogênico de diferentes compostos, e muitos esforços para o desenvolvimento de ensaios *in vitro* e *in vivo* a curto prazo estão sendo realizados (POTTENGER; GOLLAPUDI, 2010).

Na avaliação de perigo, a identificação de genotoxicidade e mutagenicidade baseia-se principalmente, em uma revisão inicial dos dados existentes na literatura juntamente com a execução de ensaios validados que determinem possíveis danos causados ao DNA por substâncias em bactérias e em células de mamíferos. Efeitos como quebras de fita simples e duplas do DNA ou a formação de aductos são considerados, quando os resultados são combinados de forma adequada, indicadores para prever a carcinogenicidade (PETKOV et al., 2015). As investigações em toxicologia genética, área da ciência que estuda os efeitos de agentes químicos na estrutura e composição do material genético, são parte da abordagem baseada em evidências para a detecção de carcinogenicidade em seres humanos. O novo desafio da genética toxicológica para as próximas décadas é desenvolver e aperfeiçoar testes de genotoxicidade e mutagenicidade com a redução do uso de animais.

A utilização com maior frequência de ensaios *in vitro*, como métodos alternativos ao uso de animais, é uma das propostas da *International Conference on Harmonisation (ICH) for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ELLIS et al., 2013). Entre as principais agências regulatórias mundiais, a utilização de modelos *in vitro* para a determinação da genotoxicidade e mutagenicidade é considerado, juntamente com os ensaios de citotoxicidade, como um dos primeiros passos para a identificação de potencial perigo de uma substância (FRÖHLICH; SALAR-BEHZADI, 2014; GALLOWAY, 2017).

Para a avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade de substâncias químicas, tipicamente, tem sido exigido uma abordagem em pelo menos três baterias (níveis) de testes e, atualmente, dependendo dos resultados iniciais obtidos nestes ensaios preliminares, uma quarta abordagem é solicitada por algumas agências reguladoras (ex: União Européia e Coréia do Sul). No nível I são inclusos os ensaios de mutação gênica reversa bacteriana, como por exemplo, o teste de Ames. Já no nível II, é recomendada a realização de um ensaio de mutagenicidade *in vitro* em células de mamíferos metabolizadoras e não metabolizadoras, como por exemplo, o ensaio do micronúcleo (MN). No nível III, é solicitada a execução de um ensaio *in vivo* de mutagenicidade, podendo ser o ensaio de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de mamíferos ou, então, o teste do MN em eritrócitos (PETKOV et al., 2015). Por fim, caso seja necessário a realização de nível IV, ensaios que avaliem mutações gênicas e aberrações cromossômicas em células germinativas *in vivo* devem ser realizados (JI et al., 2016).

Entre os ensaios citados, o teste do MN tem se mostrado um estabelecido biomarcador da instabilidade cromossômica induzida por agentes mutagênicos, e tornou-se um dos ensaios validados e recomendados por *guidelines* das principais agências regulatórias internacionais (KIRSCH-VOLDERS et al., 2014). A capacidade de identificação de MNs, que são formados por fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que se atrasaram durante a anáfase, possibilita a investigação do mecanismo de ação de diferentes agentes mutagênicos que induzem a formação dos MNs, a morte celular e a instabilidade genômica (BONASSI et al., 2007; MIGLIORE et al., 2011; LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013).

A formação de MNs muitas vezes é observada em pacientes com câncer, e a hipótese de uma associação entre a frequência de MNs e desenvolvimento da carcinogênese é apoiada por uma série de estudos que demonstraram suas altas frequências em pacientes com diversos tipos de neoplasias, e em indivíduos afetados por doenças crônicas (ex: diabetes *mellitus*), neurodegenerativas (ex: Alzheimer) ou autoimunes, os quais são propensos ao desenvolvimento de neoplasias (NERSESYAN et al., 2016). Além disso, uma série de estudos colaborativos internacionais demonstraram que a frequência basal de MNs em indivíduos sadios pode ser um bom preditor para um possível desenvolvimento de carcinogênese no futuro (MAFFEI et al., 2014; MILIC et al., 2015).

Nos últimos anos, em adição aos ensaios normalmente exigidos na avaliação do perigo de substâncias químicas, métodos empregados para a detecção dos efeitos biológicos iniciais induzidos no DNA pelos agentes genotóxicos vem sendo aceitos como ensaios alternativos. O ensaio do cometa (*comet assay* ou *single-cell gel electrophoresis, SCGE*) vem demonstrando um aumento de popularidade como um método alternativo estabelecido. O exemplo disso foi a publicação do *Guideline N° 489: In vivo Mammalian Alkaline Comet Assay* pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Cooperation and Development – OECD*) em setembro de 2014. Em alguns casos, o ensaio cometa é classificado e considerado como ensaio “indicador” por agências regulatórias como a *European Chemicals Agency (ECHA)*, reforçando ainda mais sua importância e reprodutibilidade para investigação de danos causados no material genético (JI et al., 2016).

O ensaio do cometa foi, originalmente, proposto para quantificar quebras de fitas duplas do DNA. Em seguida, o protocolo foi modificado a fim de identificar vários outros tipos de lesões, tais como quebras de fita simples, sítios álcali-lábeis e com mais algumas modificações, a presença de bases oxidadas. Devido à sua simplicidade e rapidez, o ensaio do cometa também tem sido usado para estudos de exposição ocupacional e intervenções dietéticas com antioxidantes e suplementos alimentares (COLLINS et al., 2014). Nos últimos anos, esforços do *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)* em colaboração com o *European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)* vem sendo realizados para elaboração de um protocolo para o ensaio cometa *in vitro*, visando diminuir as variações intra e interlaboratoriais desta técnica e estabelecer esta metodologia como um validado ensaio em avaliações de perigo para substâncias químicas (KOPPEN et al., 2017).

Como destacado anteriormente nos ensaios de citotoxicidade, é de essencial importância para compreender o impacto da exposição de sinefrina em células humanas, utilizar como modelo linhagens celulares derivadas dos chamados órgãos alvos de ação dessa substância. Porém, para obtenção e validação dos dados sobre os efeitos genotóxicos e mutagênicos causados por substâncias, as linhagens celulares escolhidas devem possuir certas características. Para a execução dos ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade *in vitro*, o ECVAM sugere que as linhagens celulares sejam proficientes no sistema de reparo de DNA, que possuam o

gene *TP53* não silenciado e que, de preferência, o modelo escolhido expresse enzimas de metabolização de xenobióticos de fase I e II (KIRKLAND et al., 2007; FOWLER et al., 2012).

Uma linhagem celular *in vitro* considerada como ótimo modelo experimental para detecção de compostos genotóxicos que são principalmente metabolizados no fígado, como a sinefrina, é a linhagem de células humanas HepG2, que são células derivadas de hepatocarcinoma humano. De acordo com Knausmüller et al. (2004), estas células possuem a expressão de algumas enzimas de metabolização de fase I e II e, embora seja uma linhagem tumoral, ela ainda apresenta diversas características de células hepáticas não tumorais, como proteína *p53* funcionalmente ativa e sistema de reparo de DNA eficiente.

Outro bom modelo de cultura de células *in vitro* para estudos de genética toxicológica com substâncias que possuem ação no trato gastrintestinal é a linhagem de células humanas intestinais Caco-2, que são células derivadas do epitélio intestinal e apresentam sistema de reparo de DNA, algumas enzimas metabolizadoras de fase I e de fase II, e ademais, uma alta capacidade de absorção de compostos, tanto em sua forma diferenciada quanto indiferenciada para estudos de toxicidade (SAMBUI et al., 2005; NATOLI et al., 2012; KISS et al., 2014; TARANTINI et al., 2015). Por fim, para estudos com sinefrina, ao se considerar que a principal forma de ingestão deste termogênico ocorre de forma oral, utilizar uma cultura de células não tumorais derivadas do epitélio gástrico *in vitro* como sistema teste poderia também adicionar importantes informações nas avaliações de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em células humanas envolvidas diretamente na absorção e metabolização deste suplemento termogênico.

Para sinefrina, até o presente momento, é observado um baixo número de publicações que investigaram o impacto deste termogênico sobre a estabilidade do material genético. Em revisão feita por Bakhiya et al. (2017), os autores citaram apenas um estudo *in vitro*, realizado em células L5178Y de linfoma de ratos, que verificou a ausência de potencial mutagênico da sinefrina. Na revisão mais recente, Stohs (2017) descreveu apenas quatro estudos onde ensaios de genética toxicológica foram executados em modelos *in vitro* para verificação de perigo da sinefrina, sendo que para ensaios recomendados por agências regulatórias, apenas um desses trabalhos avaliou os efeitos genotóxicos e mutagênicos da sinefrina e seus metabólitos em células humanas *in vitro*.

Por isso, conforme observado nos dados disponíveis na literatura, as propriedades genotóxicas e mutagênicas da sinefrina não foram investigadas em estudos anteriores utilizando linhagens celulares humanas hepáticas, intestinais e gástricas *in vitro*. Portanto, estudar e compreender o impacto da exposição de sinefrina sobre o material genético de células humanas consideradas modelos experimentais para esse tipo de verificação e, utilizar ensaios que são aceitos como alternativos ou recomendados por agências regulatórias internacionais, é de essencial relevância na avaliação do seu perigo. Outro dado pontual a ser avaliado é estudar o potencial pró-oxidativo de sinefrina, pois a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), direta ou indiretamente, foi citada como um dos possíveis mecanismos de toxicidade da sinefrina e pode contribuir na promoção de danos genotóxicos e mutagênicos em células humanas.

1.5. Estresse Oxidativo

Entre as vias que são diretamente alteradas pelo consumo de compostos da dieta, como os suplementos alimentares, está a via de estado redox celular. Essencialmente, o estado redox celular é definido como a soma das moléculas redox-ativas com potencial de redução e de oxidação (POTTERS; HOREMANS; JANSEN, 2010). Para manutenção da homeostase celular, é fundamental a presença de um equilíbrio no número dessas moléculas citadas anteriormente. Entretanto, um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos reativos, os chamados pró-oxidantes, e a sua eliminação por mecanismos de proteção, como os sistemas antioxidantes, geram o chamado estresse oxidativo (HALLIWELL, 1996; HALLIWELL, 2007). É bem estabelecido que radicais livres, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}) e o oxigênio singlete (1O_2) são os principais causadores do estresse oxidativo, que está diretamente associado a danos em macromoléculas e também no desenvolvimento da carcinogênese (GURER-ORHAN; SABIR; ÖZGÜNEŞ, 2004).

De forma mais específica, no material genético, a interação das espécies reativas com o DNA pode inicialmente, induzir a formação de bases oxidadas na estrutura de dupla hélice ou modificar o *pool* de nucleotídeos livres presentes no meio intracelular, os quais depois podem causar vários outros efeitos deletérios (HAGHDOOST et al., 2005). Não havendo eficiente reparo de DNA, bases oxidadas

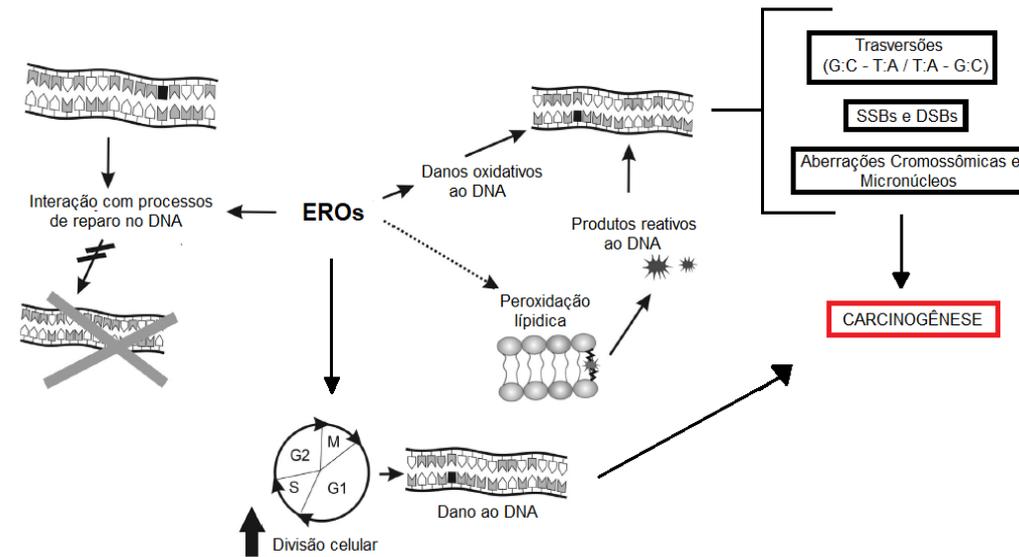
podem causar substituições de nucleotídeos do tipo transversões de G:C para T:A, enquanto que a incorporação de nucleotídeos oxidados livres no citoplasma, em ciclos celulares posteriores, conduzirá para transversões de A:T para C:G (SVOBODA; HARMS-RINGDAHL, 1999).

Estes tipos de danos ao DNA podem levar ao processo carcinogênico principalmente quando afetam duas classes de genes essenciais. Uma dessas classes são os proto-oncogenes, que são genes relacionados ao controle da progressão do ciclo celular, onde substituições de nucleotídeos levam a sua ativação e expressão contínua (oncogenes), ocasionando a proliferação celular descontrolada. Ou então, quando as substituições afetam genes supressores tumorais, que são os genes envolvidos no controle do ciclo celular, apoptose, resposta à danos e reparo do DNA, a expressão desses genes é inativada e reprimida (MARNETT, 2000).

Em outra forma de ação, os radicais livres gerados durante o estresse oxidativo podem interagir com o DNA de forma direta ocasionando efeitos extremamente deletérios como aductos, *crosslinks* e quebras de fitas simples e duplas (FEDERICO et al., 2007). Estudos também sugerem que espécies reativas podem influenciar no desenvolvimento da carcinogênese por meio do ataque sobre os mecanismos de reparo do DNA, diminuindo a fidelidade da síntese *de novo* do DNA, bem como efeitos adicionais sobre o ciclo celular, apoptose e necrose (HALLIWELL, 2007; DA COSTA; BADAWI; EL-SOHEMY, 2012).

Além do processo carcinogênico, também estão associadas ao estresse oxidativo por meio destes mecanismos citados anteriormente, o desenvolvimento de outras doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamações, diabetes *mellitus*, arteriosclerose e envelhecimento (ALIEV et al., 2014; GUPTA et al., 2015). Os principais tipos de lesões causadas por espécies reativas, principalmente as espécies reativas de oxigênio (EROs), são demonstradas na Figura 3.

Figura 3. Possíveis danos causados em macromoléculas devido ao acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).



Legenda: EROs = Espécies Reativas de Oxigênio; SSBs: Single Strand Breaks = Quebra de fita simples; DSBs: Double Strand Breaks = Quebras de fita dupla.

Fonte: Imagem adaptada de Nersesyan et al. (2016).

Como citado anteriormente, um dos possíveis efeitos adversos da sinefrina pode estar associada justamente com a geração de estresse oxidativo (ARBO et al., 2009; HONG et al., 2012). Entretanto, o potencial pró-oxidativo da sinefrina continua sem definições claras ou sem dados suficientes para obtenção de possíveis conclusões. De início, é bem estabelecido que as anfetaminas e aminas adrenérgicas, classes de substâncias nas quais sinefrina tem ação farmacológica similar, aumentam a produção de EROs por meio do estímulo das funções mitocondriais, da auto oxidação de dopamina via reação de Fenton e ativação dos receptores de glutamato que induzem a formação de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (ROSSATO et al., 2011).

Existem ainda, relatos sobre o processo de metabolização da sinefrina onde os metabólitos produzidos são mencionados como geradores de radicais livres. Sinefrina é metabolizada e transformada intracelularmente por enzimas mitocondriais monoamina oxidases (MAOs) em ácido *p*-hidroxalmandélico. De acordo com Grandy (2007), o produto metabólico ácido *p*-hidroxalmandélico é relacionado com a produção de EROs, mais especificamente na geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Ademais, estudos prévios demonstraram que sinefrina em misturas complexas com outros componentes pode alterar o estado redox intracelular e promover danos renais e hepáticos em animais *in vivo* (SCHMITT et al., 2016).

Para a obtenção de dados sobre efeitos pró-oxidativos de substâncias químicas, existem inúmeras avaliações com biomarcadores de estresse oxidativo, onde é possível realizar a quantificação de produtos de lipídios oxidados de membranas celulares, como o Malondialdeído (MDA) ou Isoprostanos, marcadores de oxidação de bases do DNA como, por exemplo, a 8-oxo-dihidroguanosina (8-OHdG) ou então, também é viável quantificar a emissão de fluorescência gerada por sensíveis marcadores fluorescentes intracelulares como a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) (DA COSTA; BADAWI; EL-SOHEMY, 2012).

Outra forma alternativa para avaliação de estresse oxidativo é utilizar a própria maquinaria celular de defesa que age em resposta a ação de radicais livres. Para evitar o desbalanço redox, as células possuem um sistema de defesa antioxidante que pode atuar por meio de uma ação detoxificadora, removendo ou inativando o agente oxidante. A ação de enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR), glutatona sintase (GS), glutatona s-transferase (GST), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona reduzida (GSH) fazem parte do sistema antioxidante que protege as células eucarióticas contra a ação de EROs e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) (VALKO et al., 2007). O uso de biomarcadores e ensaios que quantificam a atividade dessas enzimas é atualmente de grande interesse na avaliação de estresse oxidativo (HWANG; KIM, 2007).

1.6. Expressão Gênica

As principais propostas na agenda da toxicologia genética incluem também a aplicação de novas tecnologias e ferramentas de biologia molecular, tais como o uso de técnicas para estudos em genômica, transcriptômica e proteômica, para a complementação de resultados obtidos previamente (MAHADEVAN et al., 2011; FROHLICH; SALAR-BEHZADI, 2014). Os compostos da dieta, assim como qualquer outra substância, também possuem a capacidade de interferir na expressão gênica e nos processos de transcrição e tradução de proteínas e enzimas (TRUJILLO; DAVIS; MILNER, 2006). Dentro deste contexto, investigar as alterações induzidas por substâncias consumidas na dieta na expressão de genes comprovadamente envolvidos em diversos processos celulares, juntamente com o emprego de metodologias elaboradas para sua aplicação, se torna uma alternativa interessante a ser explorada (BENICIO, 2014).

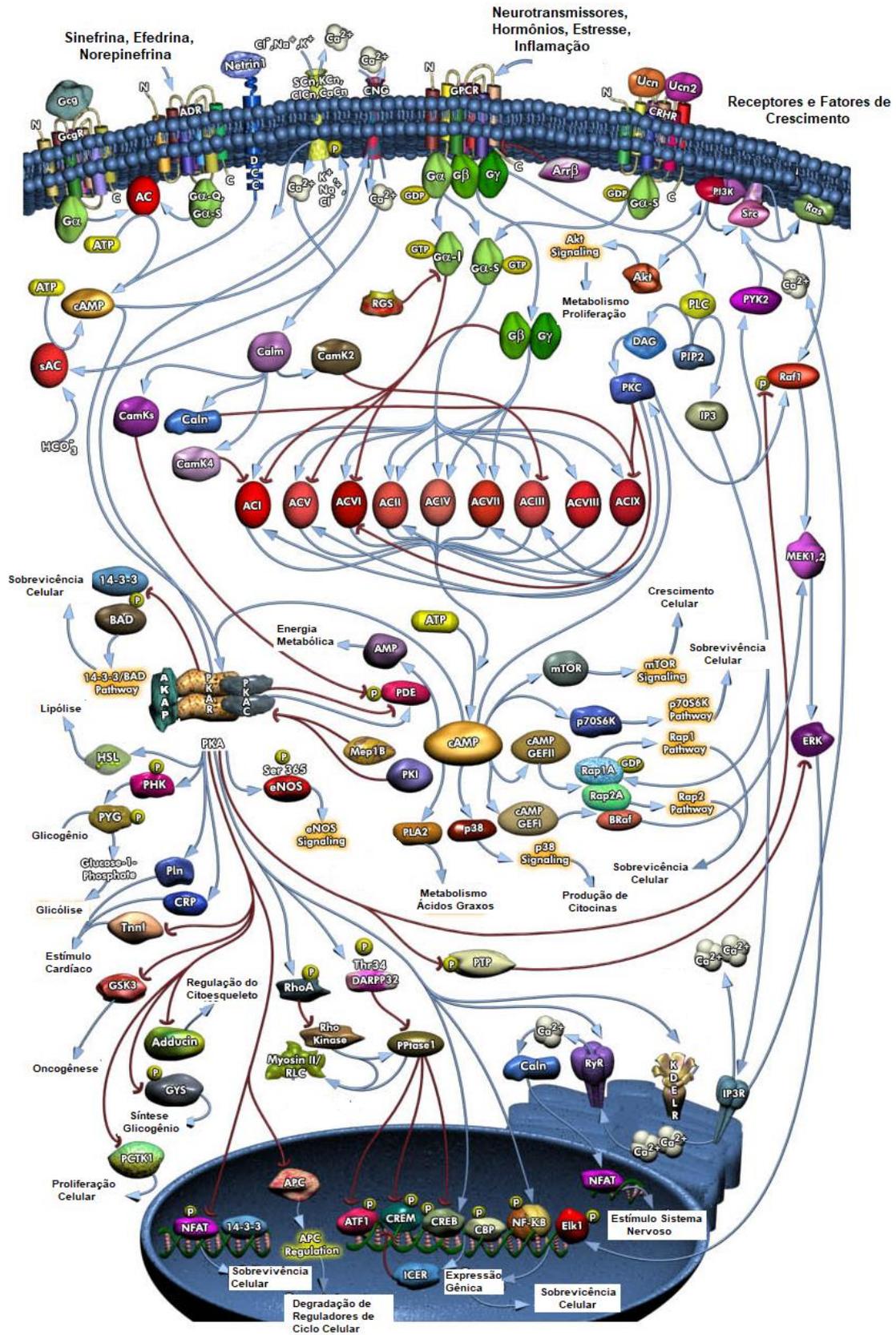
A técnica de transcrição reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) em tempo real (RT-qPCR), uma variante metodológica da PCR convencional, revolucionou os estudos de expressão gênica, e tem sido uma das principais tecnologias elucidatórias da era pós-genômica, garantindo inúmeras vantagens sobre outras técnicas (DEEPAK et al., 2007; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). A RT-qPCR possibilitou o estudo quantitativo da expressão de genes a nível de transcritos em várias áreas do conhecimento, entre elas a de genética toxicológica, e tornou-se o método usualmente escolhido para analisar, caracterizar ou confirmar a expressão de um gene ou vários genes, validar experimentos de microarranjos (*microarrays*), comparar níveis de mRNA (RNA mensageiro) e miRNA (microRNAs) em diferentes amostras e quantificar transcritos raros (ex: RNAs não codificadores e circulantes) e pequenas alterações na expressão de genes, ou seja, na quantificação de RNA, onde as vezes quantidades limitadas destas moléculas estão disponíveis. Sendo assim, a técnica de RT-qPCR é considerada de alto padrão para quantificação de vários tipos de RNAs (DEEPAK et al., 2007; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008).

A avaliação dos efeitos da sinefrina sobre a expressão gênica de células humanas *in vitro* utilizando-se da metodologia de RT-qPCR também é limitada. Entre os estudos disponíveis, apenas Roh et al. (2014) analisaram os efeitos da sinefrina sobre os níveis de transcritos do gene *Ccl11*, que codifica o mediador crítico no desenvolvimento da inflamação eosinofílica *eotaxin-1*, na linhagem de fibroblastos de ratos NIH/3T3. Porém, resultados dos efeitos da sinefrina sobre a expressão gênica de diversas vias de sinalização intracelular para obtenção dos seus possíveis mecanismos de ação em células humanas ainda estão indisponíveis.

Devido à estrutura química semelhante a agentes simpaticomiméticos e a sua ação farmacológica similar ao de anfetaminas e aminas adrenérgicas (SCHMITT et al., 2016), uma possibilidade é que esta substância altere a expressão gênica em vias comumente estudadas nos seus análogos. Suplementos termogênicos que possuem agentes simpaticomiméticos em suas composições geralmente promovem a expressão de genes do metabolismo energético para aumentar o gasto de calorias, estimular o aumento de absorção de glicose, promover a oxidação de ácidos graxos e a glicólise (HONG et al., 2012).

Neste caso, uma das alternativas é estudar os efeitos da sinefrina sobre a via de sinalização de “Proteínas Quinases Ativadoras de Adenosina Monofosfato Cíclica” (cAMP), ou do inglês AMPK (*Adenosine Monophosphate-activated protein kinase*) *Signaling Pathway*. A via de sinalização de AMPK atua como regulador central do metabolismo de lipídios e glicose, pois estimula processos catabólicos como a oxidação de ácidos graxos e glicólise para fornecimento de suprimento para obtenção de energia e, de forma contrária, age inibindo a síntese de glicogênio (gluconeogênese), lipídios e proteínas (HARDIE, 2014). Além disso, as quinases efetoras de AMPK são responsáveis por coordenar uma ampla variedade de processos celulares como: (I) proliferação, estimulando por fosforilação a cascata de PI3K/AKT/mTOR e aumentando a transcrição de proto-oncogenes (ex: *RAS*); (II) biogênese mitocondrial; (III) autofagia e diferenciação celular, por meio de aumento de transcrição de sirtuinas (ex: *SIRT1*); e (IV) regulação de transcrição, por meio de inibição de enzimas histonas desacetilases (MIHAYLOVA; SHAW, 2011). A cascata de sinalização desta via e a possível cascata de sinalização estimulada por sinefrina e seus análogos estão resumidos abaixo na Figura 4.

Figura 4. Cascata de sinalização da via de AMPK, suas respectivas funções em células humanas e possível mecanismo de ação da sinefrina nesta via em células humanas.



Fonte: Imagem adaptada de QIAGEN (2017).

Outra possibilidade interessante, para complementação de dados obtidos em ensaios de genotoxicidade, mutagenicidade e estresse oxidativo, seria avaliar a expressão de genes relacionados com a via de sinalização de respostas à danos no DNA (*DNA damage response Signaling*). Nesta via, genes codificadores de proteínas quinases sinalizadoras são prontamente ativados e expressos quando danos na molécula de DNA são detectadas. Então, estas quinases fosforilam outras proteínas a jusante que estimulam parada de ciclo celular e promovem a ativação de genes supressores tumorais, como por exemplo, o gene *TP53* que atua nas respostas aos diversos estresses celulares causando induzindo a expressão de genes que promovem parada de ciclo celular, morte celular e principalmente, o reparo de DNA (SPEIDEL, 2015).

Desta forma, com as problemáticas apresentadas em todos os tópicos dessa introdução, fica evidente a necessidade da realização de estudos que executem ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e estresse oxidativo em associação com experimentos que avaliem a modulação de expressão gênica, para o entendimento dos possíveis perigos causados pela sinefrina, principalmente em linhagens celulares humanas oriundas de órgãos alvos da ação dessa substância quando consumida por usuários de suplementos termogênicos, como o estômago, intestino e fígado. Sendo assim, a hipótese básica examinada neste projeto foi a de que sinefrina, por meio de ação indireta promovida pela geração de EROs e consequente geração de estresse oxidativo, tenha causado citotoxicidade, danos ao DNA (efeitos genotóxicos), instabilidade cromossômica (efeitos mutagênicos) e alterações na expressão de transcritos de genes envolvidos nas vias de metabolismo energético e resposta a danos no DNA em linhagens de células humanas hepáticas (HepG2), gástricas (GAS) e intestinais (Caco-2) *in vitro*.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo investigar as propriedades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas da sinefrina em células hepáticas tumorais (HepG2), células colorretais humanas (Caco-2) e em células gástricas não tumorais (GAS) *in vitro*. Além disso, também foram avaliados parâmetros bioquímicos associados ao estado redox intracelular e alterações no perfil de expressão gênica por RT-qPCR.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade citotóxica da sinefrina em diferentes concentrações em células hepáticas, gástricas e intestinais humanas *in vitro*;
- Investigar os possíveis efeitos antiproliferativos da sinefrina;
- Determinar a ação genotóxica da sinefrina;
- Estudar o possível efeito mutagênico da sinefrina;
- Avaliar a atividade pró-oxidativa da sinefrina;
- Realizar a mensuração das enzimas antioxidantes Glutathione (GSH), Catalase (CAT), Superóxido Dismutase mitocondrial (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx) e quantificar o produto de peroxidação lipídica Malondialdeído (MDA) para verificação de alterações no estado redox intracelular causados pela sinefrina;
- Determinar o perfil de expressão de genes relacionados com vias de sinalização de resposta a danos no DNA e do metabolismo energético após tratamentos com sinefrina para melhor compreensão dos mecanismos de ação dessa substância.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes Químicos

Sinefrina (*p*-sinefrina - $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}[\text{CH}_2\text{NHCH}_3]\text{OH}$; CAS: 94-07-5), metil metanosulfonato (MMS - CAS: 66-27-3), MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio – CAS: 57360-69-7), vermelho neutro (CAS: 553-24-2), azul de bromofenol (CAS: 34725-61-6), ácido tricloroacético (CAS: 76-03-9), citocalasina-B (CAS: 14930-96-2), benzo[a]pireno (CAS: 50-32-8), citrato de sódio (CAS: 6132-04-3), ácido perclórico (CAS: 7601-90-3), formaldeído (CAS: 50-00-0), laranja de acridina (CAS: 494-38-2), metanol (CAS: 67-56-1), ácido acético (CAS: 64-19-7), triton X-100 (CAS: 9002-93-1), 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA) (CAS: 4091-99-0), ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (CAS: 504-17-6) e 1,1,3,3-tetraetoxipropano (MDA) (CAS: 122-31-6) foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Reagentes utilizados para cultivo celular como meios de cultura, soro bovino fetal (SBF), tripsina e antibióticos são provenientes de Gibco (Grand Island, EUA). Os reagentes para execução do ensaio cometa (agarose, gel red e sais de lise) foram obtidos de Invitrogen (Eugene, EUA). Para análise de ciclo celular o kit CycleTest™ Plus DNA Reagent Kit (Cat. Nº 340242) foi obtido de Becton Dickinson (Franklin Lakes, EUA). Para as quantificações de glutathiona reduzida (GSH), catalase (CAT) e superóxido dismutase mitocondrial (SOD) foram utilizados os kits ThiolTracker™ Violet (Glutathione Detection Reagent) (Cat. Nº T10095), Amplex Red Catalase Assay (Cat. Nº A22180) e MitoSOX™ Mitochondrial Superoxide Indicator (Cat. Nº M36008), respectivamente, e todos foram obtidos de Invitrogen Molecular Probes (Eugene, EUA). Na quantificação de glutathiona peroxidase (GPx), o kit Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay (Cat. Nº K762-100) foi obtido de Biovision Inc. (Milpitas, EUA). Na realização dos experimentos de expressão gênica por RT-qPCR, o kit PureLink® RNA Mini Kit (Cat. Nº 12183018A) e o reagente DNase I Amplification Grade (Cat. Nº 18068015) foram obtidos de Invitrogen Molecular Probes (Eugene, EUA). Já o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Cat. Nº 4368814), o reagente PowerUp SYBR Green Master Mix (Cat. Nº 4368577) e os materiais MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Cat. Nº 4346907) e MicroAmp® Clear Adhesive Film (Cat. Nº 4306311) foram obtidos de Applied Biosystems (Carlsbad, EUA).

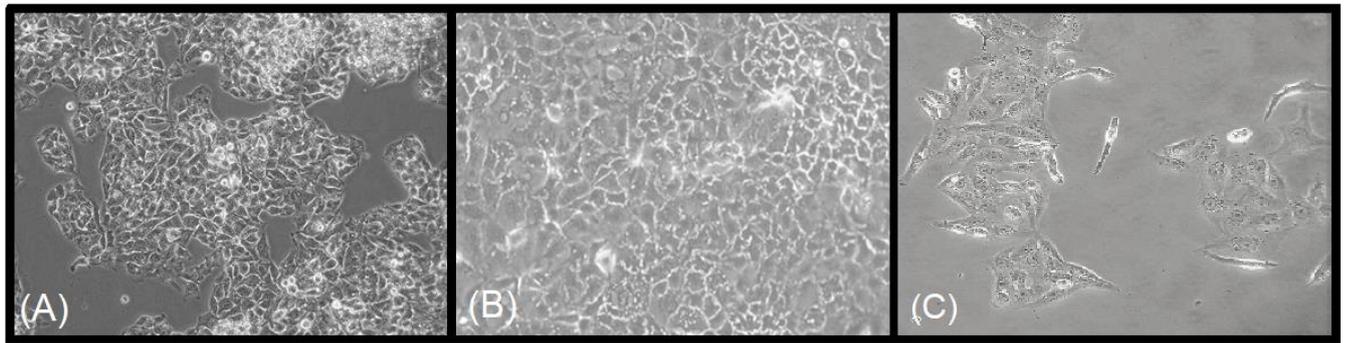
3.2. Linhagens Celulares e Condições de Cultivo

Todos os procedimentos de cultura de células *in vitro* foram realizados em capelas de fluxo laminar da Classe II e tipo 1A do modelo Bioprotector VSFL-09 (VecoFlow Ltda. – Campinas, Brasil). Os procedimentos para manutenção de linhagens celulares seguiram as recomendações propostas por Bal-Price e Coecke (2011).

Células de hepatocarcinoma humano (HepG2) foram obtidas de ATCC (*American Type Culture Collection*; Cat. N° HB-8065) e gentilmente cedida pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). As células HepG2 foram mantidas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Gibco - Carlsbad, EUA) com 10% de SBF, 1% de mix antibiótico/antimicótico (10000 unidades/mL penicilina, 10000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL anfotericina B) e 0,024% de bicarbonato de sódio. A linhagem de células de adenocarcinoma colorretal humana (Caco-2) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ; Cat. N° 0059) e foi mantida em DMEM (+) *High Glicose* com 20% de SBF, 1% de mix antibiótico/antimicótico (10000 unidades/mL penicilina, 10000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL anfotericina B) e 0,024% de bicarbonato de sódio.

Adicionalmente, cultura de células do epitélio gástrico não tumorais (células GAS) foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará. As células GAS são provenientes de material endoscópico e consiste em um “*pool*” oriundo de 10 amostras (5 homens e 5 mulheres) com idade entre 18-26 anos em que o exame histopatológico revelou a presença de mucosa normal sem qualquer tipo de lesão aparente. Para esta linhagem, as manutenções foram feitas em DMEM (+) *High Glicose* com 10% de SBF, 1% de mix antibiótico/antimicótico (10000 unidades/mL penicilina, 10000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL anfotericina B) e 0,024% de bicarbonato de sódio. Todas as linhagens celulares utilizadas (HepG2, Caco-2 e GAS – Figura 5) foram mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C e com umidade relativa de 96%. Para a realização de experimentos, somente alíquotas de células entre a terceira e a oitava passagem foram utilizadas.

Figura 5. Fotomicrografia das linhagens celulares utilizadas para experimentos *in vitro*.



Legenda: (A) Células HepG2; (B) Células Caco-2; (C) Células gástricas não tumorais (GAS). Aumento original de 1.000 x. Fonte: A/B = *American Type Culture Collection* (ATCC), 2015. C = Laboratório de Mutagênese e Oncogenética – UEL. Captura: Katuska Tuttis Rodrigues, 2016.

3.3. Concentrações de Sinefrina

O solvente utilizado e as concentrações de sinefrina testadas em ensaios de citotoxicidade foram baseadas em estudos prévios publicados na literatura (ROSSATO et al., 2010). A sinefrina (pureza $\geq 98\%$) foi mantida em estoque a temperatura de 2-8°C e diluída antes dos experimentos em ácido perclórico (HClO₄) a 0,05%. Posteriormente, 10 diferentes concentrações foram obtidas para ensaios de citotoxicidade: 25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 400 μM , 800 μM , 1000 μM , 2000 μM , 4000 μM e 5000 μM .

3.4. Ensaio do MTT

O ensaio de redução do sal de tetrazólio (ensaio do MTT) seguiu o protocolo descrito por Mosmann (1983). Inicialmente, 1×10^4 células (HepG2, Caco-2 e GAS) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços com meio de cultura completo e incubadas durante 24 horas antes da exposição para estabilização. Posteriormente, as placas foram tratadas por 24 horas com 10 concentrações de sinefrina (25 - 5000 μM) e os respectivos controles de solvente (HClO₄ - 0,05%) e negativo (PBS; pH 7,4) para avaliação da citotoxicidade. Após a exposição às diversas concentrações os tratamentos foram removidos, 100 μL de solução de MTT (5 mg/mL) dissolvido em meio de cultura completo foi adicionado a cada poço e, então, foi realizada uma incubação de 4 horas. Finalmente, o meio contendo a solução de MTT foi removido, 200 μL de DMSO (dimetilsulfóxido) foi adicionado a cada poço e a absorbância foi medida usando espectrofotômetro (Biotek Elx800 – Winooski, EUA) com um

comprimento de onda de 570 nm. Experimentos adicionais com o uso de controle positivo para cada linhagem celular com o agente Metil Metanosulfonato (MMS) foram realizados nas mesmas condições. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e 6 poços foram feitos em paralelo para cada tratamento. A porcentagem (%) de viabilidade celular foi obtida pela relação entre as absorbâncias dos poços de cada tratamento e as absorbâncias dos poços do controle negativo, que foi considerado com 100% de viabilidade celular.

3.5. Ensaio de Captação do Vermelho Neutro (VN)

O ensaio de captação de VN seguiu o protocolo descrito por Repetto, Del Peso e Zurita (2008) com algumas modificações. Inicialmente, 5×10^4 células (HepG2, Caco-2 e GAS) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços com meio de cultura completo e incubadas durante 24 horas antes da exposição para estabilização. Posteriormente, as placas foram tratadas por 24 horas com dez concentrações da sinefrina (25 - 5000 μM) e os respectivos controles de solvente (HClO_4 - 0,05%), positivo (MMS - 300 μM) e negativo (PBS; pH 7,4) para avaliação da citotoxicidade. Após os tratamentos, o meio de cultura foi removido, 100 μL da solução de VN (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionado a cada poço e incubou-se a placa durante 2 horas. Posteriormente, o meio contendo a solução de VN foi retirado, as células foram lavadas com PBS e 150 μL da solução de extração de VN [50 mL:49 mL:1 mL v/v/v (etanol 96%/água destilada/ácido acético glacial)] foi adicionado a cada poço. Por fim, a placa foi rapidamente homogeneizada em agitador de microplacas até o VN ser extraído e formar uma solução homogênea, que foi analisada por espectrofotômetro (Biotek Elx800 – Winooski, EUA) em comprimento de onda de 540 nm para obtenção da absorbância. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e 4 poços foram feitos em paralelo para cada tratamento. A porcentagem (%) de viabilidade celular foi obtida pela relação entre as absorbâncias dos poços de cada tratamento e as absorbâncias dos poços do controle negativo, que foi considerado com 100% de viabilidade celular.

3.6. Curva de Proliferação Celular

A proliferação celular foi avaliada pelo teor total de proteínas utilizando o método preconizado por Wei, Li e Tong (1996) e descrito por Da Costa Lopes et al. (2000), sendo padronizada no Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP-USP. Inicialmente, $2,5 \times 10^4$ células (HepG2, Caco-2 e GAS) foram semeadas em placas de cultura de 24 poços com meio de cultura completo e incubadas durante 24 horas antes da exposição para estabilização. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura completo contendo três concentrações não citotóxicas da sinefrina escolhidas a partir dos ensaios de MTT e VN (2, 20 e 200 μM) e os respectivos controles de solvente (HClO_4 - 0,05%), positivo (MMS - 300 μM) e negativo (PBS; pH 7,4). As células foram tratadas por 3, 24, 48 e 72 horas e após esses períodos, o meio de cultura foi removido e as proteínas foram precipitadas com 200 μL de ácido tricloroacético (TCA - 5%) durante 15 minutos. Depois de remover o TCA, 200 μL de azul de bromofenol (1%) dissolvido em ácido acético (1%) foi adicionado em cada poço para coloração por 30 minutos. As placas foram lavadas três vezes com água destilada e vertidas sobre papel absorvente para secar. Em seguida, 400 μL de Tris base (10 mM) foram adicionados para extração do corante. O homogeneizado de cada poço da placa de 24 poços foi transferido para uma nova placa de 96 poços para determinação da absorbância em espectrofotômetro (Biotek Elx800 – Winooski, EUA) com comprimento de onda de 570 nm. Para cada tratamento foram realizadas três culturas em paralelo e uma mensuração proteica foi executada para cada cultura. Os dados estão apresentados em forma de absorbância, os quais representam a quantidade de proteína total.

3.7. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi realizada de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante do kit CycleTest™ Plus DNA Reagent Kit (Becton Dickinson - Franklin Lakes, USA). Inicialmente, 1×10^5 células (HepG2, Caco-2 e GAS) foram semeadas em placas de culturas de 24 poços e incubadas com meio de cultura completo durante 24 horas antes da exposição para estabilização. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura contendo três concentrações da sinefrina (2, 20 e 200 μM) e os respectivos controles de solvente (HClO_4 - 0,05%), positivo (MMS - 300 μM) e negativo (PBS; pH 7,4) por 24 horas. Após os tratamentos, as culturas foram lavadas

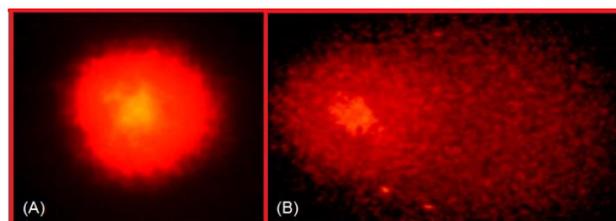
duas vezes em PBS, tripsinizadas e inativadas com meio completo. A suspensão celular foi centrifugada a 400 xg durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e adicionados 250 μL de solução A (tampão de tripsina), que foram levemente homogeneizados para lise das células e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado a cada tubo 200 μL de solução B (inibidor de tripsina e tampão de RNase em concentração de 1 mg/mL), os quais foram levemente homogeneizados e também incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Por fim, 200 μL de solução C (solução de iodeto de propídeo na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$) gelada (2 - 8°C) foram colocadas em cada tubo, os quais foram homogeneizados e incubados por 10 minutos em ausência de luz e em gelo até a análise das amostras. As amostras foram submetidas ao separador de células com fluorescência ativada (BD FACSCanto I, Becton Dickinson – Franklin Lakes, USA), localizado no Centro de Citometria de Fluxo da FCFRP-USP. Os dados foram analisados utilizando o software Cell Quest (Becton Dickinson - Franklin Lakes, USA) e os perfis de ciclo celular foram desenhados com ajuda do software FlowJo (Tree Star Incorporation - Ashland, USA). Para cada tratamento foram realizadas três culturas em paralelo e, para cada cultura, uma mensuração do perfil de ciclo celular da população de células foi executada. Os resultados estão expressos como a porcentagem (%) de células em cada fase do ciclo celular.

3.8. Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado segundo a metodologia proposta por Tice et al. (2000). Inicialmente, 3×10^5 células (HepG2, Caco-2 e GAS) foram semeadas em placas de culturas de 24 poços e incubadas com meio de cultura completo durante 24 horas para estabilização antes da exposição. Depois da estabilização, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura contendo três concentrações da sinefrina (2, 20 e 200 μM) e os respectivos controles de solvente (HClO_4 - 0,05%), positivo (MMS - 300 μM) e negativo (PBS; pH 7,4) por 4 horas. Após os tratamentos, as culturas foram lavadas duas vezes em PBS, tripsinizadas e inativadas com meio de cultura completo. Em seguida, foi determinada a viabilidade celular das culturas pela técnica de exclusão por azul de trypan, utilizando o equipamento de contagem de células Countess® Automated Cell Counter (Life Technologies - Carlsbad, EUA). As culturas que apresentaram viabilidade celular superior a 70% foram submetidas ao ensaio

cometa. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 174 $\times g$ durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e 100 μL do *pellet* resuspendido. No preparo das lâminas, foram utilizados 20 μL de suspensão celular com 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), sendo esse material depositado sobre lâminas previamente revestidas com agarose normal (1,5%). As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a 4°C por 30 minutos. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução de lise recém-preparada (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris, pH 10) e mantidas por 1 hora a 4°C. Após a lise, as lâminas foram submersas em solução alcalina (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos a 4°C e levadas à cuba de eletroforese. A eletroforese foi conduzida em solução alcalina (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos, com voltagem (0,87 V/cm) e amperagem (300 mA) constantes. Após a eletroforese, as lâminas foram imersas em solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos. Depois de secarem à temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto (99%) por 5 minutos. No momento da análise, as lâminas foram coradas com o agente intercalante de DNA GelRed™ [1:10.000 v/v (Gel Red: PBS)] (Biotium - Fremont, EUA) por 3 minutos e examinadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-AxioStar Plus - Alemanha), acoplado a uma câmera usando filtro 515-560 nm e barreira de filtro de 590 nm, em objetiva de 200 x. Para cada tratamento foram realizadas três culturas em paralelo. Para cada cultura, 100 nucleoides (Figura 6A e 6B) foram analisados (300 nucleoides no total por tratamento) com o auxílio do software CometAssay IV (Perceptive Instruments® Bury St Edmunds – Suffolk, Inglaterra), sendo analisados os parâmetros *Tail Intensity* (referente à porcentagem de DNA na cauda) e *Tail Moment* (que considera a migração do material genético, bem como a quantidade relativa de DNA na cauda).

Figura 6. Imagens de nucleoides de células gástricas (GAS) capturadas com o software CometAssay IV.



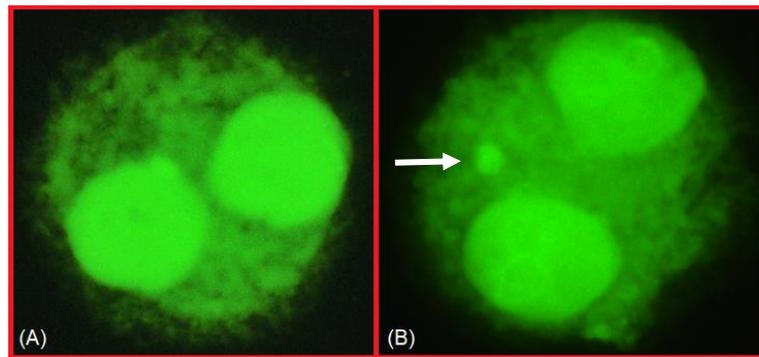
Legenda: (A) Nucleoide sem presença de danos no DNA e (B) Nucleoide com elevado grau de danos no DNA após tratamento com MMS. Fonte: Laboratório de Nutrigenômica - FCFRP. Captura: Diego Luís Ribeiro.

3.9. Ensaio Citoma do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN-Cyt)

A instabilidade cromossômica foi avaliada por meio do CBMN-Cyt de acordo com o método descrito por Fenech (2007) com modificações. Em resumo, 5×10^5 células (HepG2, Caco-2 e GAS) foram semeadas em placas de culturas de 6 poços e incubadas com meio de cultura completo durante 24 horas antes da exposição para estabilização. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura contendo três concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) e os respectivos controles de solvente (HClO_4 - 0,05%), positivo (MMS - 300 μM) e negativo (PBS; pH 7,4) por 24 horas. Após os tratamentos, as culturas foram lavadas com PBS e 5 mL de meio de cultura completo foi adicionado em cada poço juntamente com 50 μL de citocalasina-B (concentração final de 4,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 30 horas. Na etapa de fixação, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS, tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 174 $\times g$. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em solução hipotônica (citrato de sódio, 1% à 4°C) com 30 μL de formaldeído (25%) por 8 minutos. As células foram centrifugadas novamente e homogeneizadas duas vezes em fixador Carnoy [3 mL:1 mL v/v (metanol/ácido acético)]. As células fixadas foram transferidas para lâminas previamente lavadas e mantidas em água destilada gelada (4°C) para formação de um filme. Após a fixação, as lâminas foram preparadas e coradas com solução de laranja de acridina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e analisadas em microscopia de fluorescência no aumento de 400 x. Para cada tratamento foram realizadas três culturas em paralelo e, para cada cultura, 1000 células binucleadas (3000 células binucleadas no total por tratamento) foram analisadas.

Para a análise, foram contabilizadas as frequências de micronúcleos (MNis) (Figura 7), as pontes nucleoplasmáticas (NPBs), as quais representam quebras mal reparadas ou fusões teloméricas, e brotos nucleares (NBUDs), os quais representam ampliações gênicas. O critério de identificação de células binucleadas e MNs seguiu o descrito por Kirsch-Volders et al. (2000). O índice de divisão nuclear (IDN) foi determinado pela contagem de 500 células por cultura (1500 células no total por tratamento) na mesma lâmina, de acordo com a fórmula proposta por Eastmond e Tucker (1989): $\text{IDN} = [(1 \times M1) + (2 \times M2) + (3 \times M3) + (4 \times M4)]/N$, em que: M1-M4 representa o número de células com um a quatro núcleos, e N é o número total de células viáveis analisadas.

Figura 7. Fotomicrografia obtida no ensaio citoma micronúcleo em células HepG2.



Legenda: (A) Célula binucleada (B) Célula binucleada com micronúcleo (indicado pela seta branca). Coloração com laranja de acridina e aumento original de 1.000 x. Fonte: Laboratório de Nutrigenômica – FCFRP. Captura: Diego Luís Ribeiro.

3.10. Determinação dos Níveis Intracelulares de Espécies Reativas (ERs)

As espécies reativas (ERs) intracelulares foram medidas utilizando o marcador fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA), seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. Inicialmente, 1×10^4 células (HepG2, Caco-2 e GAS) foram semeadas em placas de 96 poços com fundo escuro e incubadas com meio de cultura completo durante 24 horas antes da exposição para estabilização. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura contendo três concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μ M) e os respectivos controles de solvente (HClO₄ - 0,05%) e negativo (PBS; pH 7,4) por 6 e 24 horas. Após os tratamentos, os poços foram lavados com PBS; adicionou-se 100 μ L da solução de H₂DCFDA (10 μ M) e a placa foi incubada durante 30 minutos à 37°C. Em seguida, devido à capacidade das peroxidases celulares em catalisar a oxidação do marcador fluorescente, utilizou-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂ - 1,0 mM) como marcador de ERs intracelulares, sendo adicionado por 15 minutos (GOMES; FERNANDES; LIMA, 2005). Finalmente, 100 μ L de PBS foi adicionado a cada poço e a intensidade de fluorescência foi mensurada em espectrofluorímetro CaryEclipse (Agilent Technologies - Santa Clara, EUA) com excitação de 485 nm e emissão de 528 nm. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e três poços foram tratados em paralelo para cada tratamento avaliado. Os dados foram obtidos em intensidade de fluorescência e foram normalizados para porcentagem (%) de ERs geradas em relação ao controle negativo, que foi considerado como 100 %.

3.11. Quantificação de Malondialdeído (MDA) em Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para a quantificação do marcador de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA) foi utilizado uma modificação do ensaio de quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances* - TBARS), sendo seguido como base o protocolo publicado por Draper e Hadley (1990). Alterações no protocolo para as etapas de lise celular e de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para execução em culturas de células *in vitro* foram baseadas nas informações descritas por Leal et al. (2005). Em resumo, 1×10^6 células (HepG2, Caco-2 e GAS) foram semeadas em garrafas de culturas celulares de 25 cm² e incubadas com meio de cultura completo durante 24 horas para estabilização. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura contendo três concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 µM) e os respectivos controles de solvente (HClO₄ - 0,05%), positivo (MMS - 300 µM) e negativo (PBS; pH 7,4) por 24 horas. Após os tratamentos, as culturas foram lavadas duas vezes em PBS, tripsinizadas e inativadas com meio completo. Após isso, as células foram centrifugadas a 174 *xg* durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e 200 µL de PBS foram adicionados para resuspender o *pellet*. Inicialmente, foi realizada a contagem do número de células total das culturas pela técnica de exclusão por azul de trypan utilizando o equipamento de contagem de células Countess® Automated Cell Counter (Life Technologies – Carlsbad, EUA). Em seguida, 100 µL de Triton X-100 foram colocados nos tubos e homogeneizados em vortex por 15 segundos. O conteúdo obtido foi incubado por 1 hora à 37°C, e para completar o processo de lise celular, foram adicionados 400 µL de ácido perclórico (35%) com nova homogeneização em vortex por 15 segundos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 870 *xg* durante 10 minutos, 600 µL do sobrenadante foram retirados e 200 µL do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA - 1,2%) foram adicionados para resuspensão. Essa preparação permaneceu em banho-fervente a 95°C por 30 minutos seguido de choque-térmico em gelo e, por fim, a absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro (Rayleigh UV-1601, Beijing Beifen-Ruili Analytical Instrument - Beijing, China) com comprimento de onda de 535 nm. Para cada tratamento foram realizadas três culturas em paralelo e uma mensuração foi executada por cultura. As quantificações obtidas inicialmente como substâncias reativas ao TBA foram expressas como substâncias equivalentes

ao malondialdeído (MDA) por meio da realização de uma curva padrão feita com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (MDA) em seis diluições (0,93; 1,87; 3,75; 7,50; 15 e 30 μM). Por fim, as absorvâncias foram convertidas em micromolar (μM) de MDA e, para ajustar os valores e evitar variações causadas pelo diferente número de células em cada tratamento, os valores foram normalizados por $\times 10^6$ células de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{MDA } (\mu\text{M em } 10^6 \text{ células}) = \frac{\text{Resultado de MDA } (\mu\text{M/mL})}{\text{n}^\circ \text{ da contagem em } 10^6 \text{ células/mL}}$$

3.12. Quantificação de Glutathiona (GSH) Intracelular

A quantificação de glutathiona reduzida (GSH) intracelular foi realizada utilizando-se o kit ThiolTracker™ Violet (Glutathione Detection Reagent) seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. Inicialmente, 1×10^4 células (HepG2, Caco-2 e GAS) foram semeadas em placas de 96 poços com fundo escuro e incubadas com meio de cultura completo durante 24 horas para estabilização antes da exposição. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura contendo três concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) e os respectivos controles de solvente (HClO_4 - 0,05%), positivo (H_2O_2 - 1,0 mM) e negativo (PBS; pH 7,4) por 24 horas. Após este procedimento, o meio de incubação com os tratamentos foi removido, as células foram lavadas duas vezes com 100 μL de PBS, que foi removido, e então 100 μL da solução de trabalho do corante ThiolTracker™ Violet (20 μM) foi adicionado em cada poço. Finalmente, a placa foi incubada em estufa de cultura à 37°C durante 30 minutos e, em seguida, a solução de corante de trabalho ThiolTracker™ violeta foi substituída por 100 μL de PBS para a leitura. A intensidade de fluorescência foi obtida em espectrofluorímetro CaryEclipse (Agilent Technologies - Santa Clara, EUA) com excitação de 404 nm e emissão de 526 nm. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e três poços foram tratados em paralelo para cada tratamento. Os dados foram obtidos em intensidade de fluorescência e foram normalizados para porcentagem (%) de GSH em relação ao controle negativo, que foi considerado como 100 %.

3.13. Quantificação de Catalase (CAT)

A quantificação de Catalase (CAT) foi realizada utilizando-se o kit Amplex Red Catalase Assay ThiolTracker™ Violet seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. Inicialmente, 1×10^4 células (HepG2, Caco-2 e GAS) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com meio de cultura completo durante 24 horas para estabilização antes da exposição. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura contendo três concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) e os respectivos controles de solvente (HClO_4 - 0,05%) e negativo (PBS; pH 7,4) por 24 horas. Antes do início do procedimento de leitura, uma curva padrão de CAT com concentrações de 0 – 4 U/mL foi executada. Logo após, em uma nova placa de 96 poços, 25 μL de tampão de reação foi adicionado nos poços referentes ao branco (somente tampão sem CAT), a curva padrão e as amostras experimentais. Em seguida, 25 μL de cada padrão de CAT e do homogenato celular previamente tripsinizado foram adicionados com mais 25 μL de H_2O_2 (40 μM) e a placa foi incubada em temperatura ambiente durante 30 minutos. Depois, 50 μL da solução de trabalho contendo o reagente Amplex Red (100 μM) foi adicionado a cada poço de controle e de amostras e, em seguida, a placa foi incubada protegida da luz em estufa de cultura à 37°C durante 30 minutos. Por fim, a placa contendo o branco, a curva padrão e as amostras tiveram a intensidade de fluorescência medida em espectrofluorímetro CaryEclipse (Agilent Technologies - Santa Clara, EUA) com excitação de 530 nm e emissão de 590 nm. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e três poços foram tratados em paralelo para cada tratamento. Os resultados são apresentados como unidades (U) de catalase (CAT) por mL de solução de reação (U/mL).

3.14. Quantificação de Superóxido Dismutase (SOD) Mitocondrial

A quantificação de Superóxido Dismutase (SOD) mitocondrial foi realizada com o kit MitoSOX™ Mitochondrial Superoxide Indicator seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. Inicialmente, 1×10^4 células (HepG2, Caco-2 e GAS) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com meio de cultura completo durante 24 horas para estabilização antes da exposição. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura contendo três concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) e os respectivos controles de solvente (HClO_4 - 0,05%) e negativo (PBS;

pH 7,4) por 24 horas. Após isso, o meio de incubação com os tratamentos foi removido e os poços com células foram lavados duas vezes com 100 µL de PBS, o qual foi removido. Em seguida, 100 µL da solução de trabalho do corante MitoSOX™ (5 µM diluído em PBS) foi adicionado. A placa foi incubada em estufa de cultura à 37°C durante 25 minutos, a solução de corante de trabalho MitoSOX™ foi retirada e os poços lavados 2 vezes com 100 µL de PBS. Por fim, mais 100 µL de PBS foram adicionados a cada poço e a intensidade de fluorescência foi medida em espectrofluorímetro CaryEclipse (Agilent Technologies - Santa Clara, EUA) com excitação de 510 nm e emissão de 580 nm. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e cinco poços foram feitos em paralelo para cada tratamento. Os dados foram obtidos em intensidade de fluorescência e foram normalizados para porcentagem (%) de SOD quantificada em relação ao controle negativo, que foi considerado como 100 %.

3.15. Quantificação de Glutathione Peroxidase (GPx)

A quantificação de Glutathione Peroxidase (GPx) foi realizada com o Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. Inicialmente, 1×10^6 células (HepG2, Caco-2 e GAS) foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas com meio de cultura completo durante 24 horas para estabilização antes da exposição. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura contendo três concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 µM) e os respectivos controles de solvente (HClO₄ - 0,05%) e negativo (PBS; pH 7,4) por 24 horas. Logo após, as células foram tripsinadas, homogeneizadas em Buffer Assay à 4°C e centrifugadas por 10.000 *xg* por 15 minutos para a coleta do sobrenadante. Antes do início do procedimento de leitura, uma curva padrão de GPx com concentrações de 0 – 100 nmol/mL, controle positivo da reação (GPx – 1 mM) e branco foram diluídos em uma nova placa de 96 poços. Em seguida, foi realizada uma primeira leitura em espectrofotômetro (Biotek Elx800 – Winooski, EUA) com comprimento de onda de 340 nm para obtenção da curva padrão. Posteriormente, 50 µL do sobrenadante oriundo das amostras foram colocados na placa juntamente com 40 µL de mix de reação contendo NADPH, Glutathione Redutase (GR) e Glutathione (GSH). O mesmo mix foi adicionado ao branco e ao controle positivo. As amostras foram homogeneizadas e duas leituras em espectrofotômetro (Biotek Elx800 –

Winooski, EUA) com comprimento de onda de 340 nm foram realizadas: (I) no tempo 0 para obtenção da leitura 1 (A1) e (II) após 20 minutos para obtenção da leitura 2 (A2). Com a obtenção das leituras de absorbâncias (ABS) nos tempos A1 e A2 para amostras, controle, branco e curva padrão, a seguinte equação foi aplicada para a obtenção do $\Delta 340$ nm: (ABS Amostra A1 – ABS Amostra A2) – (ABS Branco A1 – ABS Branco A2).

Com a obtenção do $\Delta 340$ nm de cada amostra, a atividade de GPx foi calculada de acordo com a seguinte equação abaixo fornecida pelo fabricante do kit:

$$GPx \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mL}} \right) = \frac{B}{(T2 - T1) \times V} \times \text{ABS Amostra (340 nm)}$$

Onde B = quantidade de NADPH que diminuiu entre T1 e T2; T1 = Tempo da primeira leitura em minutos (T1 = 0); T2 = Tempo da segunda leitura em minutos (T2 = 20); V = Volume de amostra adicionado em cada poço em mL (50 μ L = 0,05 mL). Para cada tratamento, foram realizadas duas culturas em paralelo e de cada cultura foram executadas duas mensurações em placa de leitura. Todos os valores de GPx são apresentados em nmol/mL.

3.16. Extração de RNA, Síntese de cDNA e PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Para os ensaios de expressão gênica, os procedimentos descritos no protocolo de Nolan, Hands e Bustin (2006) foram utilizados como base. Inicialmente $0,5 \times 10^6$ células (HepG2, Caco-2 e GAS) foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas com meio de cultura completo durante 24 horas para estabilização antes da exposição. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura completo contendo três concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μ M) e os respectivos controles de solvente (HClO_4 - 0,05%) e negativo (PBS; pH 7,4) por 6 horas. Decorrido o tempo de tratamento, as alíquotas foram retiradas para a extração do RNA total. Foram realizadas triplicatas biológicas independentes de cada tratamento. A extração do RNA total foi realizada com PureLink® RNA Mini Kit (Ambion – Eugene, EUA) segundo as especificações do fabricante. A quantidade e qualidade do RNA total foram determinadas por espectrofotometria NanoDrop 2000 (Thermo Scientific – Wilmington, EUA), levando em consideração a razão de absorbância 260/280 entre

1,8 e 2,2. A razão de absorvância 230/260 entre 1,7 e 2,3 também foi verificada para análise de possíveis contaminações com ácidos ou substâncias orgânicas. A integridade do RNA foi mensurada por eletroforese em gel de agarose denaturante segundo Aranda; Lajoie e Jorcyk (2012). As amostras de RNA foram tratadas com DNase I Amplification Grade (Invitrogen – Eugene, EUA) para eliminar contaminações com DNA genômico seguindo as recomendações do fabricante. 2 µg (2000 ng) de RNA foram tratadas em um volume final de reação de 10 µL, composto por 1U/µg de DNase Amplification Grade I (Invitrogen – Eugene, EUA), 10% de tampão de reação (200 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl) e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Foi adicionado a cada amostra 1 µL de EDTA (25 mM), as quais foram incubadas à 65°C por 10 minutos em termociclador Eppendorf Mastercycler DNA Engine Thermal Cycler PCR (Eppendorf – Mittelsachsen, Alemanha) para inativação da DNase.

Posteriormente, O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg (1000 ng) de RNA total extraído com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems – Carlsbad, EUA) e seguindo as recomendações do fabricante. O volume final da reação de 20 µL composto por 10% de tampão de reação 10X, 10% de Random Primers 10X (100 pmol), 4% de dNTPs Mix 25X, 5 U (unidades) da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase e 20% de H₂O DEPC Nuclease Free foi submetido ao termociclador Eppendorf Mastercycler DNA Engine Thermal Cycler PCR (Eppendorf – Mittelsachsen, Alemanha) à incubações de (I) 10 minutos à 25°C; (II) 120 minutos à 37°C e (iii) 5 minutos à 85°C para finalizar com choque térmico em gelo. Os cDNAs sintetizados foram quantificados novamente por espectrofotometria com NanoDrop 2000 (Thermo Scientific – Wilmington, EUA), obedecendo as razões 230/260 e 260/280 citadas anteriormente. Por fim, as amostras tiveram alíquotas diluídas em novos tubos com H₂O DEPC Nuclease Free onde sua concentração final foi ajustada para 2,5 ng/µL.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram obtidos de KiCqStart® SYBR® Green Primers (Sigma-Aldrich – St. Louis, EUA) e a lista completa de genes avaliados contendo as funcionalidades estão descritos na Tabela 1. Os dados referentes à expressão gênica foram obtidos pelo emprego da técnica de PCR em tempo real, com a utilização do aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System e o sistema StepOnePlus™ Software v2.3 (Applied Biosystems – Carlsbad, EUA). Para tal, foi utilizado o kit PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems – Carlsbad,

EUA), seguindo recomendações do fabricante, para um volume final de reação 10 μ L, utilizando-se 500 nM de cada oligonucleotídeo iniciador (forward e reverse) e 10 ng de cDNA molde. A mistura de reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 50°C por 2 minutos; 95°C por 2 minutos; 40 repetições de ciclos de 3 segundos à 95°C (desnaturação) e 30 segundos em 58-60°C (anelamento/extensão). A especificidade da amplificação foi avaliada para cada amostra assegurando que apenas o produto de interesse fosse amplificado em cada reação, por meio da curva de fusão (*melting curve*), variando-se a temperatura de 58-60°C à 98°C em 0,15°C/segundo por 15 segundos. Foram considerados apenas valores de *Ct* (*cycle threshold*) com uma variação de $\pm 1,0$ entre as triplicatas e valores de *Ct* ≥ 35 ciclos foram desconsiderados da análise final. Os valores obtidos na situação controle negativo foram utilizados como referência para comparação e os cálculos de normalização foram feitos subtraindo-se o valor *Ct* do gene de interesse do valor médio de *Ct* de três genes de referência (*GAPDH*, *HPRT1* e *GUSB* para as células HepG2 e Caco-2 e *GAPDH*, *HPRT1* e *ACTB* para células GAS). Para determinação da expressão relativa dos genes de interesse nas diferentes condições avaliadas foi utilizado o modelo matemático de expressão relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ desenvolvido por Pfaffl, Horgan e Dempfle (2002). Para melhor comparação e compreensão das alterações no perfil de expressão gênica induzidas por sinefrina após 6 horas de tratamento em células hepáticas, gástricas e colorretais, um Heat Map de expressão foi construído utilizando a plataforma online da University of Alberta (Canadá) e o do National Institute for Nanotechnology (Canadá) publicados por Babicki et al. (2016) e disponibilizados em <http://www.heatmapper.ca>.

Tabela 1 - Lista de genes avaliados nos experimentos de expressão gênica por RT-qPCR e suas respectivas funcionalidades

Gene (Símbolo)	Descrição do Gene	Sequência de Referência (Gene Bank)	Grupo Funcional (Vias)
<i>ATM</i>	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	NM_000051	Quinase de resposta a danos no DNA
<i>ATR</i>	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>	NM_001184	Quinase de resposta a danos no DNA
<i>CHEK1</i>	<i>Checkpoint Kinase 1</i>	NM_001244846	Quinase de controle do ciclo celular e ativação de reparo de DNA
<i>CHEK2</i>	<i>Checkpoint Kinase 2</i>	NM_001005735	Quinase de controle do ciclo celular e ativação de reparo de DNA
<i>TP53</i>	<i>Tumor Protein P53</i>	NM_000546	Supressor tumoral
<i>SIRT1</i>	<i>Sirtuin 1</i>	NM_001142498	Regulação transcricional de ciclo celular, resposta ao dano de DNA, metabolismo, apoptose e autofagia
<i>ADRB3</i>	<i>Adrenoceptor Beta 3</i>	NM_000025	Receptor de tecido adiposo envolvido na regulação da lipólise e termogênese
<i>AKT1</i>	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>	NM_005163	Quinase de regulação do metabolismo, proliferação, sobrevivência celular, crescimento e angiogênese
<i>CDK1</i>	<i>Cyclin Dependent Kinase 1</i>	NM_001170406	Quinase de controle do ciclo celular eucariótico (promove a transição de G2/M e regula transição de G1/S)
<i>FOXO3</i>	<i>Forkhead Box O3</i>	NM_001455	Ativador transcricional que desencadeia a apoptose na ausência de fatores de sobrevivência
<i>FOS</i>	<i>Fos Proto-Oncogene</i>	NM_005252	Proto-oncogene que codifica fator de transcrição que regulam a proliferação celular, diferenciação e transformação
<i>HRAS</i>	<i>Harvey Rat Sarcoma Viral Proto-Oncogene</i>	NM_001130442	Proto-oncogene que regula transdução de sinais via atividade intrínseca de GTPase
<i>PRKACA</i>	<i>Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Alpha</i>	NM_002730	Quinase de regulação do metabolismo de lipídios e glicose importante para diferenciação, proliferação e apoptose
<i>PRKAR2A</i>	<i>Protein Kinase CAMP-Dependent Type II Regulatory Subunit Alpha</i>	NM_004157	Quinase de regulação do metabolismo de lipídios e glicose e componente do mecanismo de transdução de sinal
<i>SHC1</i>	<i>SHC Adaptor Protein 1</i>	NM_001202859	Proteínas adaptadoras implicadas na propagação citoplasmática de sinais mitogênicos
<i>ADCY3</i>	<i>Adenylate Cyclase 3</i>	NM_004036	Enzima associada à membrana que catalisa a formação de cAMP e desempenha regulação dos níveis de insulina e acumulação de gordura corporal
<i>GNAS</i>	<i>Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Alpha Stimulating</i>	NM_001077488	Proteína transdutora em inúmeras vias de sinalização e promove níveis aumentados da molécula de sinalização cAMP após estímulos de receptores adrenérgicos
<i>JUN</i>	<i>Jun Proto-Oncogene</i>	NM_002228	Fator de transcrição que interage diretamente com sequências específicas de DNA alvo para regular a expressão gênica
<i>LIPE</i>	<i>Lipase E, Hormone Sensitive Type</i>	NM_005357	Proteína responsável pela conversão de ésteres de colesterol ao colesterol livre para a produção de hormônio esteroide. Em tecido adiposo, hidrolisa os triglicerídeos armazenados em ácidos graxos livres
<i>PIK3C2A</i>	<i>Phosphatidylinositol-4-Phosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Type 2 Alpha</i>	NM_002645	Quinase de estímulo nas vias de sinalização envolvidas na proliferação celular, transformação oncogênica, sobrevivência celular, migração celular e no transporte de proteínas intracelulares

<i>PIK3R1</i>	<i>Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1</i>	NM_001242466	Quinase importante nas ações metabólicas da insulina
<i>MAPK1</i>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>	NM_002745	Quinases extracelulares reguladas por sinal que estimula múltiplos sinais bioquímicos envolvidos em processos celulares de proliferação, diferenciação e regulação e alongação da transcrição
<i>RELA</i>	<i>Avian Reticuloendotheliosis Viral Proto-Oncogene (NF-KB Subunit)</i>	NM_021975	Subunidade do fator de transcrição NF-kappa-B, responsável por eventos de transdução de sinal de estímulos relacionados a inflamação, imunidade, diferenciação, crescimento celular, tumorigênese e apoptose
<i>TNF</i>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	NM_000594	Citocina pró-inflamatória multifuncional liberada em processos biológicos de proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo lipídico e coagulação

3.17. Análise dos Resultados

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade (MTT e NR), curva de crescimento proteico, citometria de fluxo, ensaio cometa, ensaio citoma micronúcleo (incluindo o IDN), quantificações de ERs intracelulares e mensurações enzimáticas de GSH, CAT, SOD mitocondrial, GPx e MDA tiveram a normalidade de distribuição de dados analisados pelo Teste de Shapiro-Wilk. Para ensaios em que os resultados demonstraram distribuição não-paramétrica (MTT, VN, proliferação celular, teste do cometa e CBMN-Cyt), o teste de Kruskal-Wallis foi executado para análise de resultados, considerando valores de $p \leq 0,05$ como significativos. Para amostras com distribuição paramétrica (determinação de ERs, GSH, CAT, SOD mitocondrial, GPx, MDA e citometria de fluxo) os dados foram analisados pelo teste de ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett, considerando valores de $p \leq 0,05$ como significativos. Todos os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas com os *softwares* IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corp. - New York, USA) e GraphPad Prism 6 (La Jolla – EUA). Nos experimentos de expressão gênica por RT-qPCR os valores médios de expressão relativa ($FC - Fold Change - 2^{-\Delta\Delta Ct}$) foram submetidos ao teste *t* - *Student* e somente genes que foram estatisticamente diferentes do controle negativo ($p \leq 0,05$) e mostraram $FC \geq 1,5$ ou $\leq 0,5$ em relação ao controle negativo foram considerados nas análises. Para a confecção do HeatMap de expressão, os valores de FC foram convertidos para logaritimos (base \log^2) para obtenção de escalas negativas e positivas. Por usar FC , o valor de CN é sempre 1.0, ou seja, mantém a mesma cor no heatmap em todos os genes. O Método de Clusterização utilizado foi o *Average Linkage* (Ligação Média) e o método de distância de mensuração foi o Euclideano.

Resultados

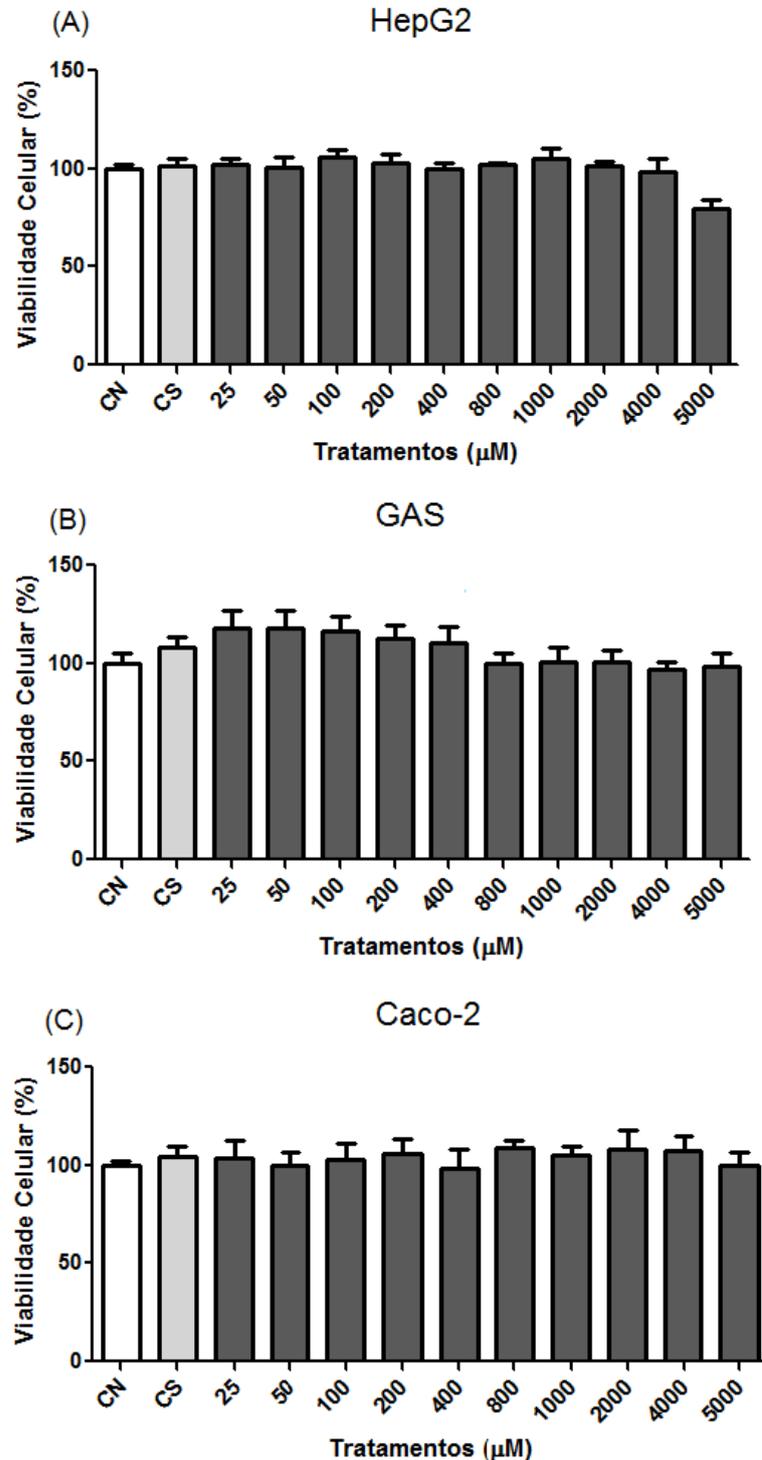
4. RESULTADOS

4.1. Citotoxicidade

A Figura 8 mostra os resultados obtidos no ensaio do MTT para determinação da citotoxicidade da sinefrina nas três linhagens celulares utilizadas. Para células HepG2, Caco-2 e GAS, todas as dez concentrações avaliadas de sinefrina (25 - 5000 μM) não demonstraram potencial citotóxico em comparação ao controle negativo (PBS; pH 7,4).

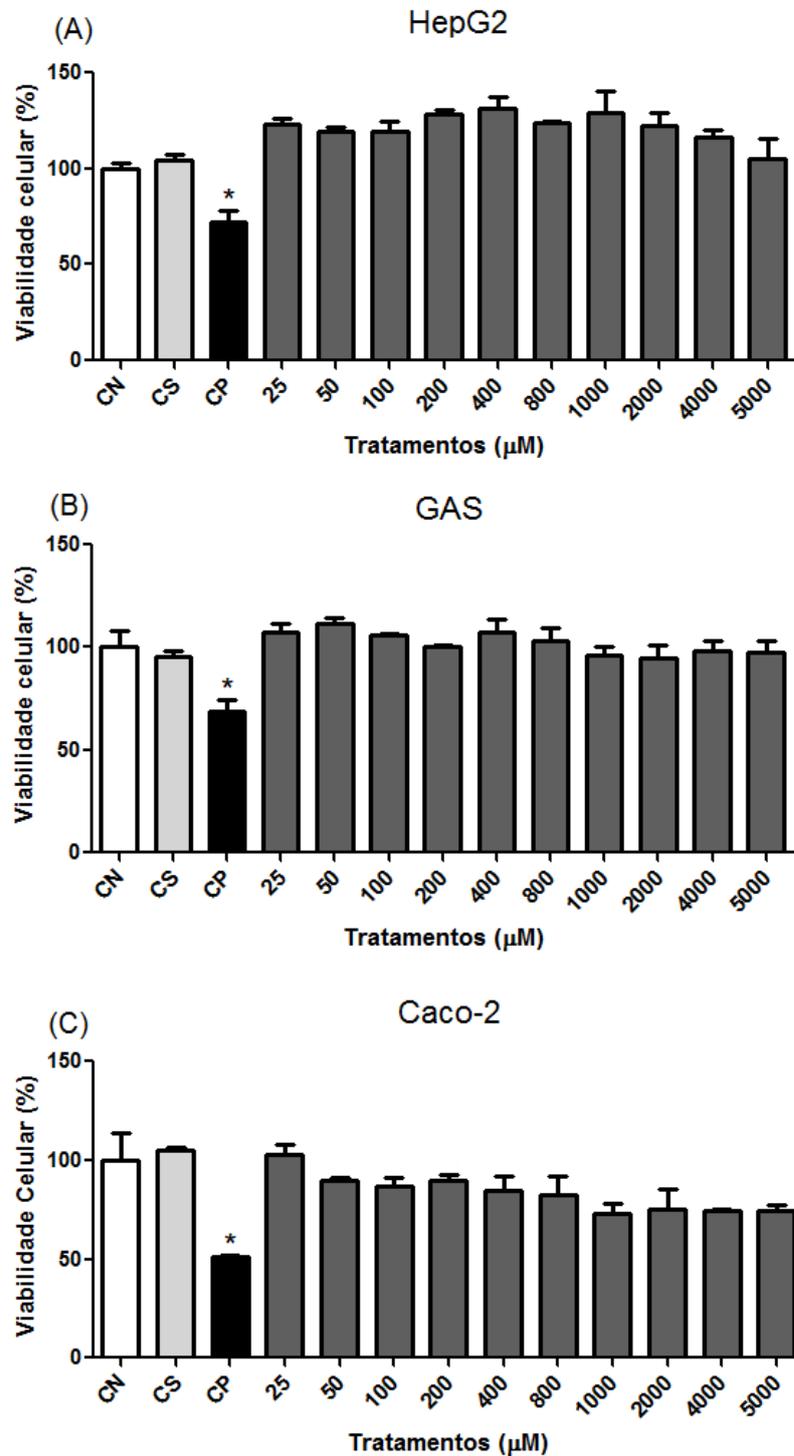
A Figura 9 mostra os resultados de citotoxicidade obtidos pelo ensaio de captação de VN na avaliação do potencial citotóxico de sinefrina. Assim como observado no ensaio do MTT, nos experimentos realizados com linhagens HepG2, GAS e Caco-2 nenhuma concentração de sinefrina diminuiu a viabilidade celular. Apenas o controle positivo selecionado (MMS - 300 μM) diminuiu estatisticamente o número de células viáveis, sendo assim utilizada para validação do experimento.

Figura 8. Viabilidade celular de células HepG2, GAS e Caco-2 obtidas no ensaio do MTT para determinação da citotoxicidade da sinefrina.



Legenda: Porcentagem (%) de células viáveis em células (A) HepG2, (B) gástricas (GAS) e (C) Caco-2 após tratamento com dez diferentes concentrações de sinefrina (25 - 5000 µM) e seus respectivos controles no tempo de 24 horas no Ensaio do MTT. As barras representam a média \pm desvio padrão. CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle de Solvente (HClO₄ - 0,05%). Os valores de viabilidade celular foram comparados estatisticamente em relação ao CN após análise por ANOVA seguido pelo pós-teste de Kruskal-Wallis.

Figura 9. Viabilidade celular em células HepG2, GAS e Caco-2 obtidas no ensaio do VN para determinação da citotoxicidade da sinefrina.



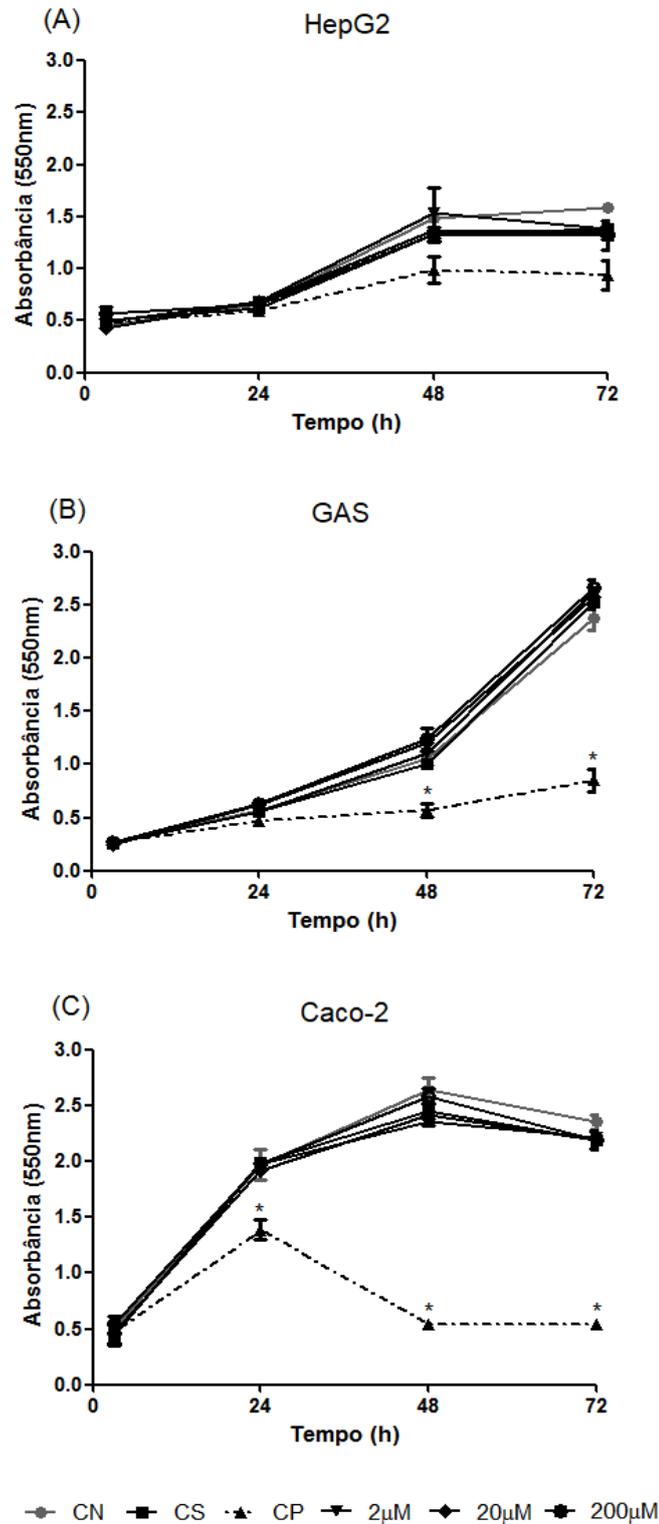
Legenda: Porcentagem (%) de células viáveis em células (A) HepG2, (B) gástricas (GAS) e (C) Caco-2 após tratamento com dez diferentes concentrações de sinefrina (25 - 5000 μM) e seus respectivos controles no tempo de 24 horas no ensaio de captação do VN. As barras representam a média ± desvio padrão. CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle de Solvente (HClO₄ - 0,05%); CP: Controle Positivo (MMS - 300 μM). *Valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise por ANOVA seguido pelo pós-teste de Kruskal-Wallis.

4.2. Proliferação e Cinética de Ciclo Celular

As curvas de proliferação celular baseadas no conteúdo proteico total foram realizadas para avaliar os efeitos antiproliferativos de três concentrações não citotóxicas de sinefrina (2, 20 e 200 μM) baseadas nos resultados obtidos no ensaio do MTT e ensaio do VN (Figuras 8 e 9). Conforme detalhado na Figura 10, as três concentrações de sinefrina não reduziram ou aumentaram significativamente o crescimento celular quando comparadas aos seus respectivos controles negativos nas três linhagens celulares avaliadas. Apenas os resultados observados nos controles positivos (MMS - 300 μM) reduziram a proliferação de todas as células nos tempos de tratamento após 48 horas. Em células GAS foi observado entre os tempos de 48 e 72 horas, um aumento da proliferação celular em todos os tratamentos, exceto no controle positivo.

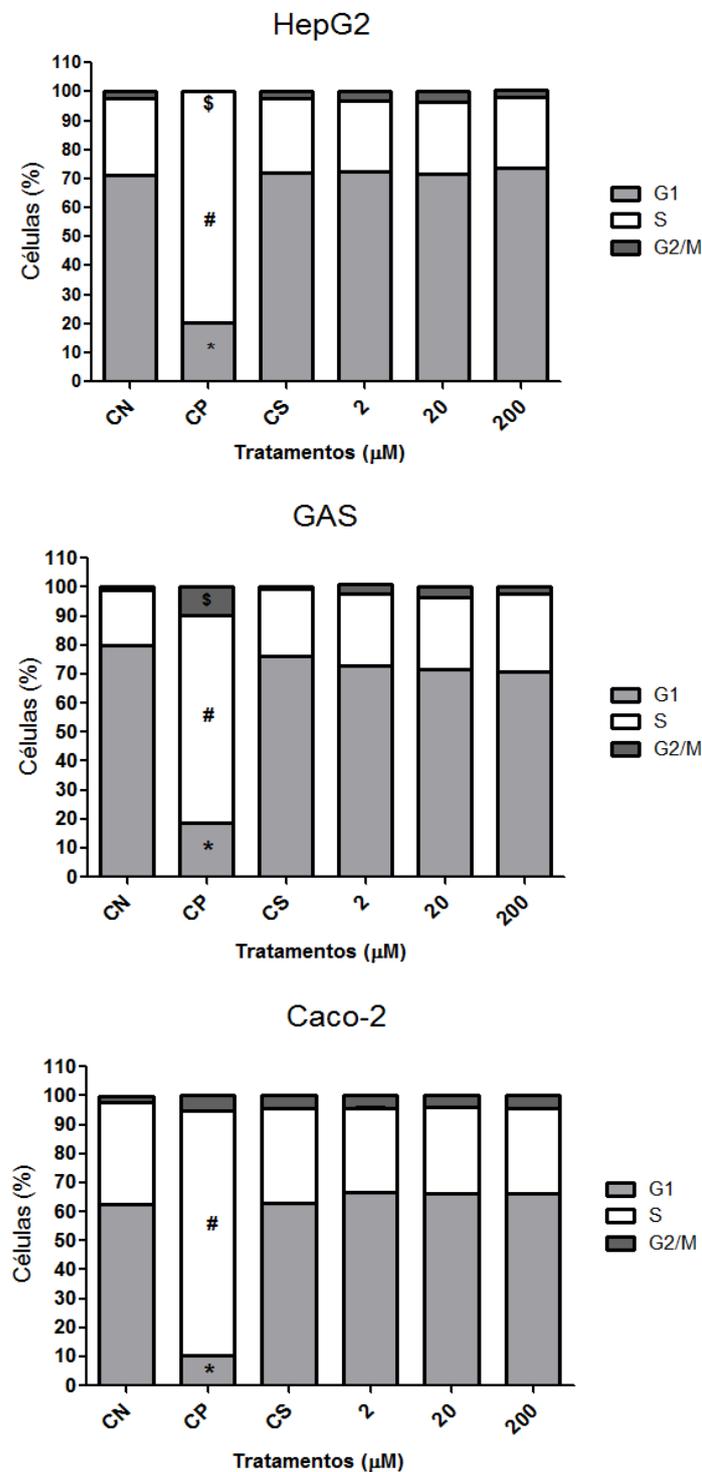
Os resultados das análises de cinética de ciclo celular realizadas por citometria de fluxo utilizando coloração diferencial com iodeto de propídeo estão demonstrados na Figura 11. Neste resultado foi observado que sinefrina, nas três concentrações avaliadas (2, 20 e 200 μM) em HepG2, GAS e Caco-2, não causou alterações significativas nas populações de células em fase G1, S e G2/M quando comparadas com os respectivos tratamentos de controle negativo (PBS; pH 7,4). O único tratamento a alterar a cinética de ciclo celular das três linhagens foi o MMS (controle positivo), o qual diminuiu significativamente a população de células na fase G1 e aumentou a população de células em fase S das linhagens HepG2, GAS e Caco-2, demonstrando bloqueio de ciclo celular e diminuição da proliferação. Além disso, o MMS diminuiu de forma significativa em células HepG2 a população em fase G2/M. Já para a linhagem de células GAS foi observado um aumento significativo de células nesta fase do ciclo.

Figura 10. Proliferação celular baseada em conteúdo proteico de células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para avaliação de efeitos antiproliferativos.



Legenda: Conteúdo proteico total em células (A) HepG2, (B) gástricas (GAS) e (C) Caco-2 após tratamento com três diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 ou 200 μM) e seus respectivos controles no tempo de 24 horas. As linhas representam a média \pm desvio padrão das absorvâncias obtidas. CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle de Solvente (HClO₄ - 0,05%); CP: Controle Positivo (MMS - 300 μM). *Valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise por ANOVA seguido pelo pós-teste de Kruskal-Wallis.

Figura 11. Análise de citometria de fluxo em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para determinação dos efeitos sobre a cinética de ciclo celular.



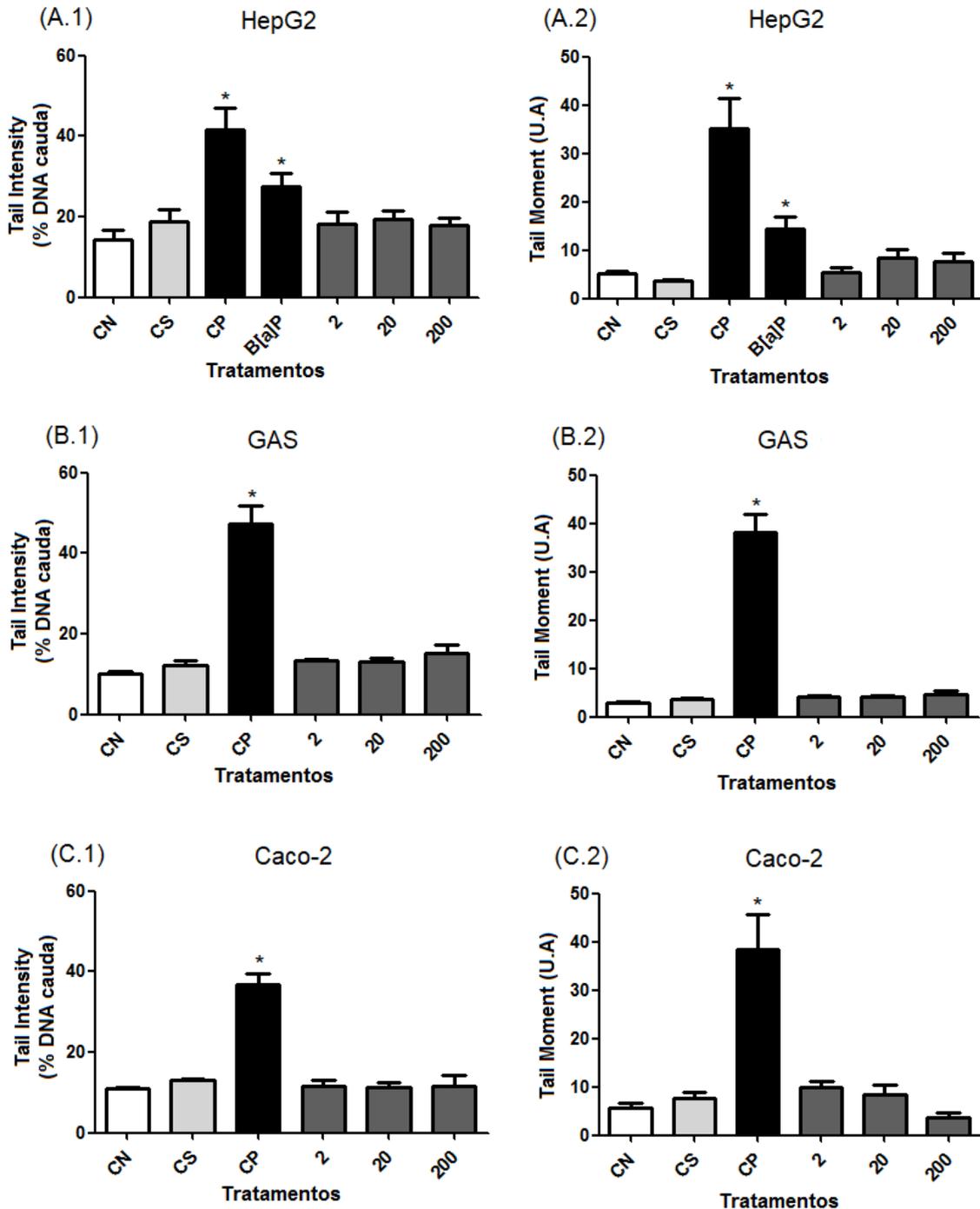
Legenda: Frequência (%) de células observadas em cada fase do ciclo celular utilizando-se citometria de fluxo em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) e seus respectivos controles no tempo de 24 horas. As barras representam a média ± desvio padrão. CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle de Solvente (HClO₄ - 0,05%); CP: Controle Positivo (MMS - 300 μM). *,#,\$ Valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN em cada fase do ciclo celular após análise por ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett.

4.3. Genotoxicidade

No ensaio cometa, a determinação dos possíveis danos ao DNA causados pela sinefrina (2, 20 e 200 μM) em células HepG2, Caco-2 e GAS, foram realizados por meio da utilização dos parâmetros *Tail Intensity* e *Tail Moment*. *Tail Intensity* refere-se a porcentagem relativa de DNA na cauda (% DNA cauda), e, *Tail Moment* é definido como uma média aritmética em unidades arbitrárias (U.A) que considera o tamanho da migração da cauda bem como a quantidade relativa de DNA nessa cauda (ASHBY et al., 1995). Os resultados obtidos para as três linhagens celulares testadas estão apresentados na Figura 12.

Nas células HepG2, GAS e Caco-2, as concentrações avaliadas de 2, 20 e 200 μM não aumentaram de forma significativa as quantidades de danos causados ao DNA quando comparados aos respectivos controles negativos (PBS: pH 7,4). O controle positivo (MMS - 300 μM), aumentou o *Tail Moment* e a % de danos na cauda (*Tail Intensity*) de forma estatisticamente significativa quando comparado aos respectivos controles negativos de células hepáticas, gástricas e intestinais. Para validação do sistema metabolizador de células HepG2, no ensaio cometa também foi utilizado como controle positivo o benzo[a]pireno (B[a]P) na concentração de 40 μM , onde a concentração final de DMSO não excedeu 1% em meio de cultura. Conforme apresentado na Figura 12, B[a]P foi capaz de induzir danos ao DNA de forma significativa quando comparado ao controle negativo, confirmando o funcionamento do sistema metabolizador de células HepG2.

Figura 12. Determinação dos danos causados ao DNA em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina por meio do ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade.



Legenda: Porcentagem (%) de DNA na cauda (Intensity) e unidades arbitrárias de danos ao DNA (Moment) de 300 nucleotídeos avaliados pelo ensaio cometa em células (A) HepG2, (B) gástricas (GAS) e (C) Caco-2 após tratamento com três diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 ou 200 μM) e seus respectivos controles no tempo de 4 horas. A1, B1 e C1 representam os valores de Tail Intensity. A2, B2 e C2 representam os valores de Tail Moment. As barras representam a média ± desvio padrão. CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle de Solvente (HClO₄ - 0,05%); CP: Controle Positivo (MMS - 300 μM); B[a]P: benzo[a]pireno - 40 μM). *Valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise por ANOVA seguido pelo pós-teste de Kruskal-Wallis.

4.4. Mutagenicidade

Os resultados obtidos a partir da análise de MNi, NPBs e NBUDs em células binucleadas que podem refletir a possível atividade mutagênica de sinefrina, estão apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4. As frequências de MNi em células tratadas com sinefrina nas três concentrações avaliadas não foram estatisticamente maiores quando comparadas ao grupo controle negativo (PBS; pH 7,4) para as três linhagens celulares (Tabelas 2, 3 e 4), demonstrando ausência de efeitos mutagênicos. Células tratadas com MMS na concentração de 300 μM (controle positivo) apresentaram frequências de MNi estatisticamente maiores nas três linhagens celulares testadas (HepG2, Caco-2 e GAS) quando comparadas com o controle negativo. Com relação a formação de pontes nucleoplasmáticas (NPBs) e brotos nucleares (NBUDs), nenhuma alteração significativa foi observada em tratamentos com sinefrina. Apenas o controle positivo aumentou a frequência dos parâmetros em questão na linhagem HepG2 (Tabela 2). Em células hepáticas (HepG2), a sinefrina na concentração de 200 μM apresentou efeitos citostáticos diminuindo o parâmetro de % de células binucleadas (% BN) e o IDN (Tabela 2). Em células GAS (Tabela 3), houve uma diminuição estatisticamente significativa nas concentrações de 20 e 200 μM apenas para a % de células binucleadas (% BN), entretanto, efeitos no IDN não foram verificados nessas concentrações, indicando ausência de possíveis efeitos citostáticos. Por fim, para células Caco-2 (Tabela 4), nenhuma concentração avaliada demonstrou efeitos significativos para esses parâmetros analisados.

Tabela 2 - Frequência de micronúcleos (MNi), brotos nucleares (NBUDs) e pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células binucleadas; porcentagens de células binucleadas (% BN) e índices de divisão nuclear (IDN) em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de sinefrina (SNF)

CBMN-Cyt – HepG2					
TRATAMENTOS	MNi	NBUDs	NPBs	%BN	IDN
CN	14,00 ± 1,00	5,00 ± 1,73	3,67 ± 1,15	67,87 ± 0,99	1,74 ± 0,02
CP	37,70 ± 3,51*	13,00 ± 1,00	14,00 ± 3,60*	43,13 ± 2,20*	1,43 ± 0,02*
CS	14,00 ± 1,00	0,68 ± 1,15	2,67 ± 1,53	62,87 ± 4,74	1,67 ± 0,06
SNF 2 µM	14,70 ± 3,51	2,33 ± 1,53	7,00 ± 2,65	62,67 ± 2,33	1,65 ± 0,03
SNF 20 µM	18,70 ± 0,58	4,67 ± 1,53	6,67 ± 0,58	57,93 ± 2,76	1,63 ± 0,04
SNF 200 µM	19,00 ± 1,73	7,33 ± 1,15	7,33 ± 1,58	51,33 ± 0,94*	1,54 ± 0,01*

Os valores representam a média ± desvio padrão de resultados obtidos em três culturas por tratamento. Um total de 3000 células binucleadas (1000 células por replicata) foram analisadas por tratamento para avaliação de diferentes anomalias nucleares. Os valores de IDN e %BN foram calculados utilizando como base a análise de 1500 células (500 células por replicata), CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle de Solvente (HClO₄ - 0,05%); CP: Controle Positivo (MMS - 300 µM). *Valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise por ANOVA seguido pelo pós-teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 3 - Frequência de micronúcleos (MNi), brotos nucleares (NBUDs) e pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células binucleadas; porcentagens de células binucleadas (% BN) e índices de divisão nuclear (IDN) em células gástricas não tumorais (GAS) tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de sinefrina (SNF)

CBMN-Cyt – GAS					
TRATAMENTOS	MNi	NBUDs	NPBs	%BN	IDN
CN	9,00 ± 1,00	2,33 ± 0,58	2,66 ± 0,58	71,20 ± 1,29	1,75 ± 0,02
CP	37,00 ± 7,00*	4,66 ± 3,05	9,00 ± 4,36*	34,93 ± 3,94*	1,37 ± 0,04*
CS	9,67 ± 0,58	2,00 ± 2,65	3,00 ± 1,00	69,20 ± 1,76	1,74 ± 0,01
SNF 2 µM	12,70 ± 1,53	5,00 ± 1,73	2,33 ± 1,53	68,60 ± 0,47	1,74 ± 0,01
SNF 20 µM	14,30 ± 1,15	4,66 ± 1,15	3,33 ± 1,15	65,87 ± 0,57*	1,70 ± 0,02
SNF 200 µM	14,70 ± 3,05	6,67 ± 1,15	4,67 ± 0,58	64,13 ± 3,72*	1,70 ± 0,05

Os valores representam a média ± desvio padrão de resultados obtidos em três culturas por tratamento. Um total de 3000 células binucleadas (1000 células por replicata) foram analisadas por tratamento para avaliação de diferentes anomalias nucleares. Os valores de IDN e %BN foram calculados utilizando como base a análise de 1500 células (500 células por replicata), CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle de Solvente (HClO₄ - 0,05%); CP: Controle Positivo (MMS - 300 µM). *Valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise por ANOVA seguido pelo pós-teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 4 - Frequência de micronúcleos (MNi), brotos nucleares (NBUDs) e pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células binucleadas; porcentagens de células binucleadas (% BN) e índices de divisão nuclear (IDN) em células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2) tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de sinefrina (SNF)

CBMN-Cyt – Caco-2					
TRATAMENTOS	MNi	NBUDs	NPBs	%BN	IDN
CN	14,33 ± 1,15	6,66 ± 2,08	3,33 ± 1,53	60,67 ± 0,58	1,69 ± 0,001
CP	32,00 ± 2,65*	10,67 ± 3,05	11,67 ± 4,04*	30,27 ± 3,72*	1,30 ± 0,04*
CS	18,00 ± 3,00	8,33 ± 3,21	5,33 ± 0,58	61,30 ± 3,20	1,67 ± 0,03
SNF 2 µM	13,67 ± 1,15	6,66 ± 1,53	6,66 ± 1,53	62,53 ± 0,90	1,68 ± 0,02
SNF 20 µM	13,67 ± 1,15	6,33 ± 2,08	5,66 ± 0,58	61,10 ± 3,20	1,65 ± 0,03
SNF 200 µM	17,33 ± 1,53	6,00 ± 1,00	5,66 ± 1,53	56,40 ± 2,50	1,58 ± 0,03

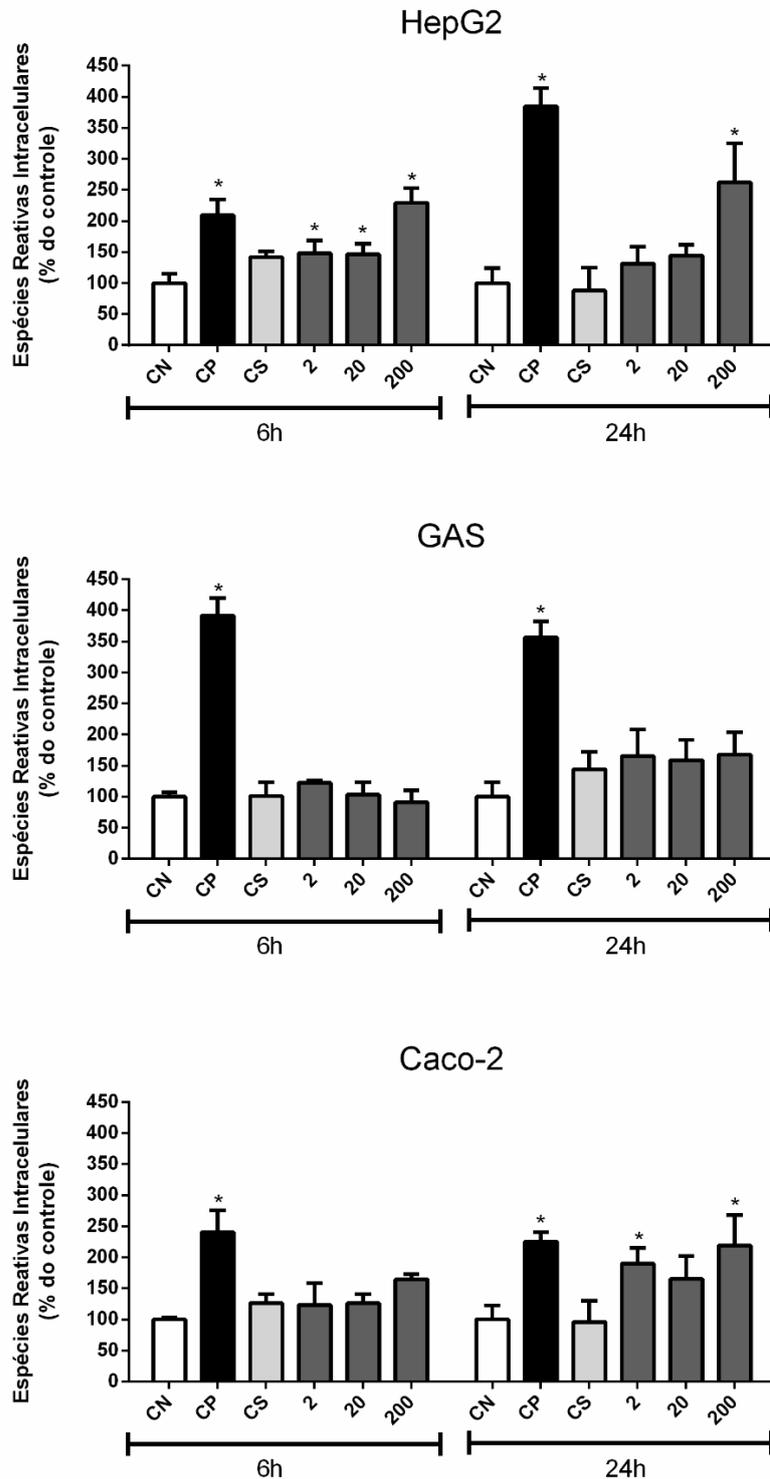
Os valores representam a média ± desvio padrão de resultados obtidos em três culturas por tratamento. Um total de 3000 células binucleadas (1000 células por replicata) foram analisadas por tratamento para avaliação de diferentes anomalias nucleares. Os valores de IDN e %BN foram calculados utilizando como base a análise de 1500 células (500 células por replicata), CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle de Solvente (HClO₄ - 0,05%); CP: Controle Positivo (MMS - 300 µM). *Valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise por ANOVA seguido pelo pós-teste de Kruskal-Wallis.

4.5. Estresse Oxidativo e Quantificações Enzimáticas

4.5.1. Determinação de Espécies Reativas (ERs)

A quantificação das ERs intracelulares produzidas após tratamentos com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) em linhagens celulares hepáticas (HepG2), gástricas (GAS) e colorretais (Caco-2) estão apresentadas na Figura 13. As intensidades de fluorescência observadas com as células tratadas foram normalizadas e comparadas em porcentagem (%) de ERs geradas em relação ao controle negativo (PBS; pH 7,4). Como resultado, em células HepG2 todas as concentrações testadas de sinefrina (2, 20 e 200 μM) produziram aumentos de ERs intracelulares de forma significativa quando comparadas ao controle negativo (PBS; pH 7,4) após tratamentos de 6 horas. Nesta mesma linhagem, após 24 horas, somente a concentração mais elevada de 200 μM aumentou significativamente a produção de ERs em 2,62 vezes em relação ao controle. Em células gástricas não tumorais (GAS), nenhuma das concentrações avaliadas de sinefrina aumentou os níveis de ERs intracelulares. Para células Caco-2, somente após 24 horas de tratamento, aumentos significativos de ERs foram demonstrados para as concentrações de 2 e 200 μM . Por fim, os tratamentos com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 - 1,0 mM) aumentaram os níveis de ERs nas três linhagens celulares estudadas (HepG2, GAS e Caco-2) com valores que variaram de 2,09 à 3,91 vezes, independentemente do tempo de tratamento.

Figura 13. Determinação dos níveis intracelulares de ERs em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para avaliação do potencial pró-oxidativo.



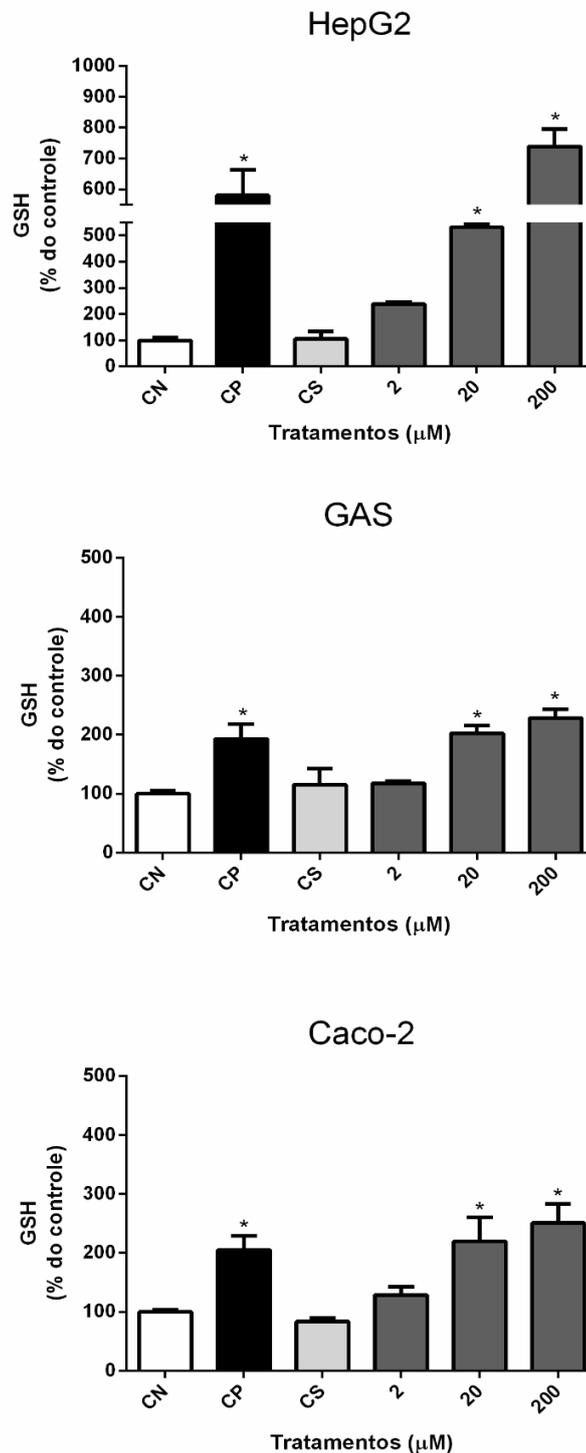
Legenda: Formação de espécies reativas (ERs) intracelulares após tratamento de células HepG2, GAS e Caco-2 com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) e seus respectivos controles nos tempos de 6 e 24 horas. Os dados estão apresentados em porcentagem (%) de ERs geradas em relação ao controle negativo. As barras representam a média ± desvio padrão. CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle de Solvente (HClO₄ - 0,05%); CP: Controle Positivo (H₂O₂ - 1 mM). *Valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise por ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett.

4.5.2. Quantificações Enzimáticas

4.5.2.1. Glutathiona (GSH) Intracelular

As concentrações de GSH obtidas após tratamentos de 24 horas com três diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 ou 200 μM) em células HepG2, GAS e Caco-2 estão apresentados na Figura 14. De acordo com os resultados obtidos, as concentrações de 20 e 200 μM de sinefrina aumentaram significativamente os níveis enzimáticos intracelulares de GSH em todos os tipos de células (HepG2, GAS e Caco-2) quando comparado com o controle negativo (PBS; pH 7,4). Também é importante destacar que a menor concentração estudada de 2 μM não aumentou os níveis de GSH em nenhuma das três linhagens celulares estudadas. Os efeitos mais pronunciados de sinefrina foram em células HepG2 onde a concentração de 200 μM aumentou 7,38 vezes os níveis enzimáticos de GSH em comparação ao controle negativo. O controle positivo (H_2O_2 - 1mM) também aumentou as concentrações intracelulares de GSH após 24 horas de tratamento.

Figura 14. Determinação dos níveis enzimáticos de GSH em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para análise de alterações no estado redox intracelular.

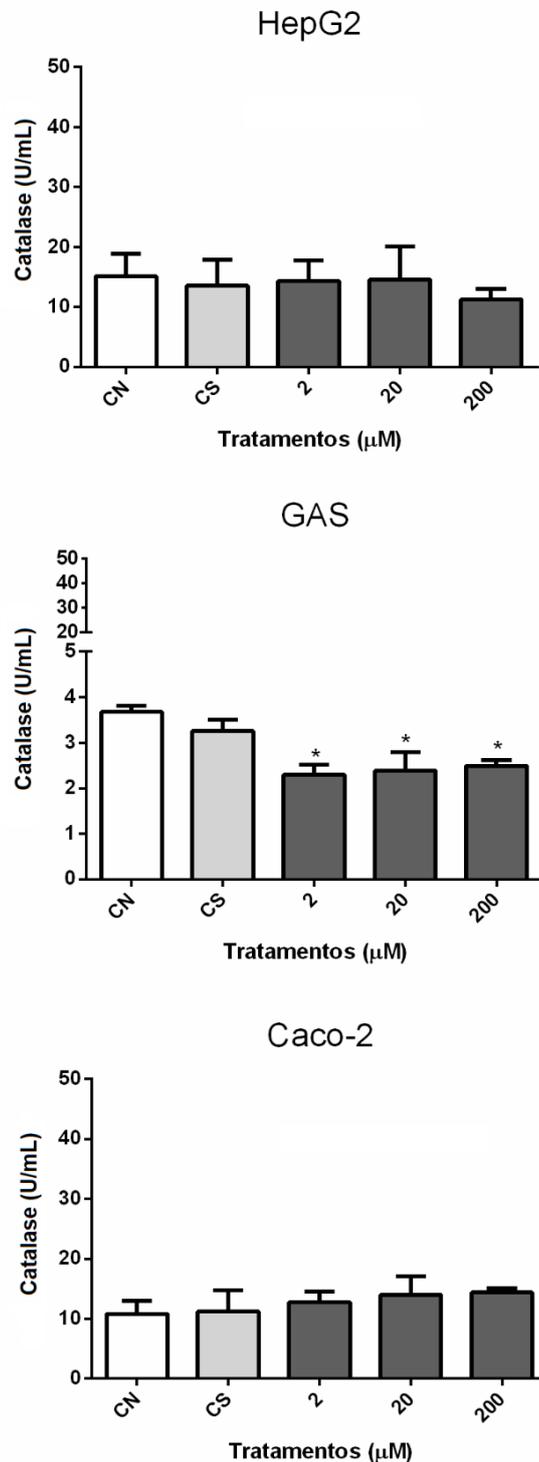


Legenda: Quantificações enzimáticas de GSH em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) e seus respectivos controles no tempo de 24 horas. As barras representam a média ± desvio padrão da porcentagem (%) de fluorescência de GSH em relação ao controle negativo (% relação controle). CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle Solvente (HClO₄ - 0,05%); CP: Controle Positivo (H₂O₂ - 1 mM). *Valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise por ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett.

4.5.2.2. Catalase (CAT)

As concentrações enzimáticas de CAT obtidas após tratamentos de 24 horas com três diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) em células HepG2, GAS e Caco-2 estão apresentadas na Figura 15. Os resultados deste ensaio demonstraram que somente em células gástricas (GAS) a sinefrina diminuiu de forma estatisticamente significativa, quando comparado ao controle negativo (PBS; pH 7,4), os níveis de CAT nas três concentrações avaliadas (2, 20 e 200 μM). Para células hepáticas e colorretais (HepG2 e Caco-2, respectivamente), as três concentrações de sinefrina utilizadas não alteraram significativamente os níveis enzimáticos de CAT quando comparadas com o controle negativo. Pode ser evidenciado também na Figura 15 a diferença no perfil de expressão de enzimas do sistema de defesa antioxidante entre as células do trato gastrointestinal humano. Em células gástricas não tumorais (GAS) a expressão basal de CAT (U/mL) no controle negativo foi menor que 4 U, enquanto que em células hepáticas (HepG2) e intestinais (Caco-2) o mesmo tratamento obteve níveis enzimáticos de CAT iguais ou maiores que 10 U.

Figura 15. Determinação dos níveis enzimáticos de CAT em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para análise de alterações no estado redox intracelular.

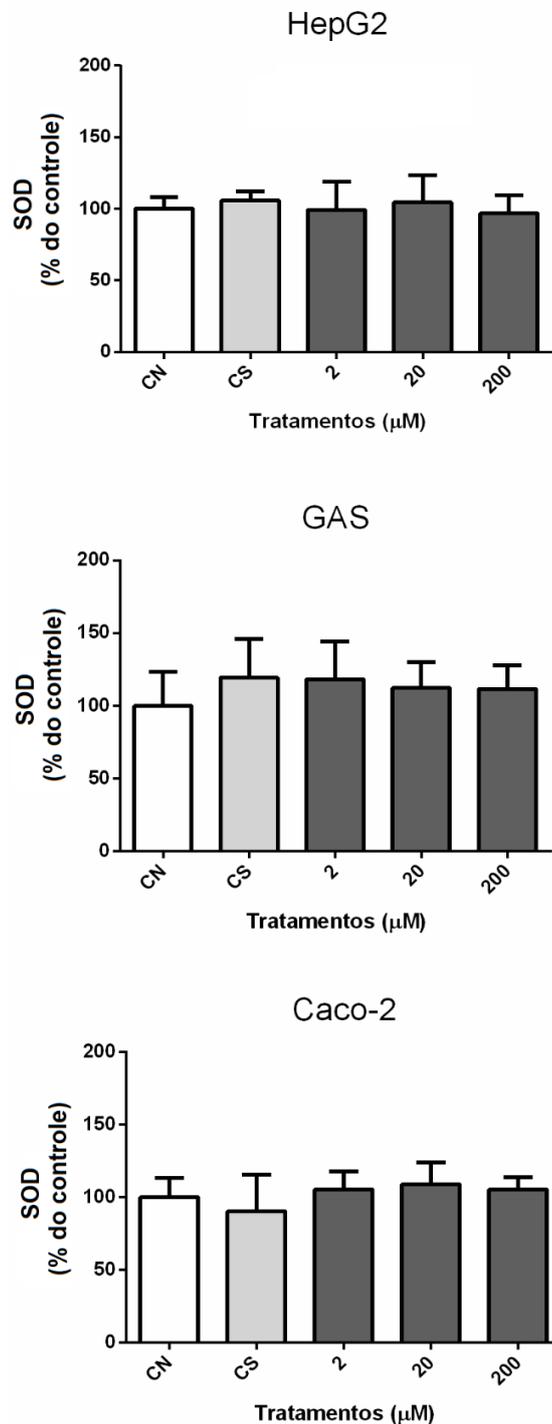


Legenda: Quantificações enzimáticas de CAT em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) e seus respectivos controles no tempo de 24 horas. As barras representam a média ± desvio padrão. CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle Solvente (HClO₄ - 0,05%). *Valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise por ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett.

4.5.2.3. Superóxido Dismutase (SOD) Mitocondrial

As concentrações enzimáticas de SOD mitocondrial obtidas após tratamentos de 24 horas com três diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 ou 200 μM) em células HepG2, GAS e Caco-2 estão apresentados na Figura 16. É possível observar que, diferentemente dos resultados obtidos no ensaio de quantificação enzimática de CAT, a sinefrina nas três concentrações avaliadas (2, 20 e 200 μM) não alterou os níveis de SOD presentes na mitocôndria de forma significativa em nenhuma das linhagens celulares.

Figura 16. Determinação dos níveis enzimáticos de SOD mitocondrial em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para análise de alterações no estado redox intracelular.

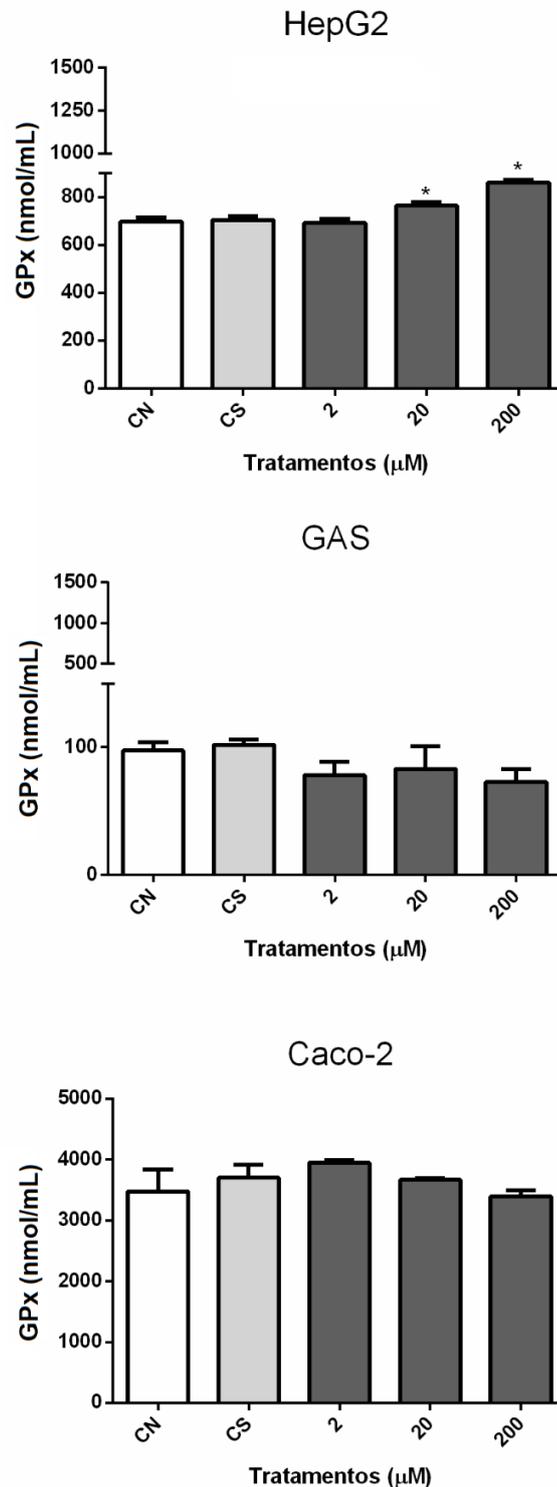


Legenda: Quantificações enzimáticas de SOD mitocondrial em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) e seus respectivos controles no tempo de 24 horas. As barras representam a média \pm desvio padrão da porcentagem (%) de fluorescência de SOD em relação ao controle negativo (% relação controle). CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle Solvente (HClO₄ - 0,05%). *Valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise por ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett.

4.5.2.4. Glutathione Peroxidase (GPx)

As concentrações enzimáticas de GPx obtidas após tratamentos de 24 horas com três diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) em células HepG2, GAS e Caco-2 estão apresentadas na Figura 17. Para células hepáticas (HepG2), a concentração de 200 μM aumentou de forma significativa os níveis de GPx quando comparada ao controle negativo (PBS; pH 7,4). Em células GAS, nenhuma das três concentrações estudadas de sinefrina demonstrou alterar significativamente os níveis enzimáticos de GPx. Resultados similares foram encontrados em células intestinais (Caco-2), onde as concentrações de 2, 20 e 200 μM também não alteraram os níveis desta enzima. Assim como observado em CAT, os níveis enzimáticos basais de GPx foram diferentes entre os tipos celulares, sendo que células intestinais (Caco-2) e hepáticas (HepG2) apresentaram quantidades de 10 a 30 vezes maiores desta enzima quando em comparação com células gástricas (GAS).

Figura 17. Determinação dos níveis enzimáticos de GPx em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para análise de alterações no estado redox intracelular.

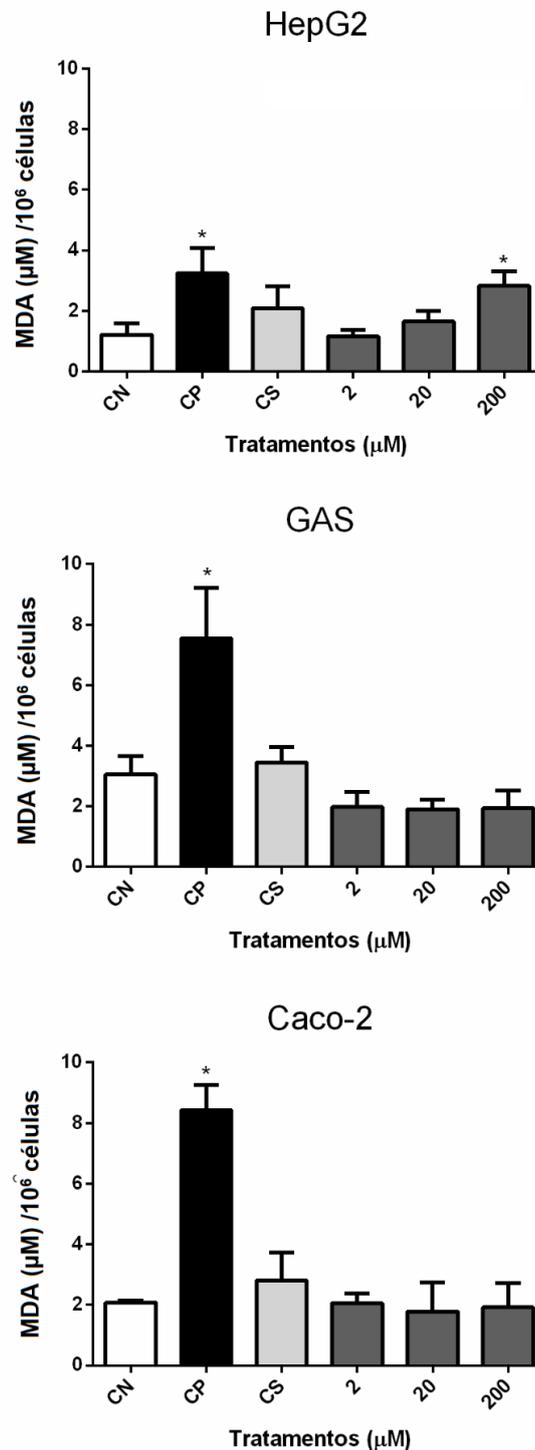


Legenda: Quantificações enzimáticas de GPx em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) e seus respectivos controles no tempo de 24 horas. As barras representam a média ± desvio padrão. CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle Solvente (HClO₄ - 0,05%); CP: Controle Positivo (H₂O₂ - 1 mM). *Valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise por ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett.

4.5.2.5. Malondialdeído (MDA)

Os níveis do produto de peroxidação lipídica MDA equivalentes em TBARS que foram quantificados após tratamentos de 24 horas com três concentrações diferentes de sinefrina (2, 20 e 200 μM) em células HepG2, GAS e Caco-2 estão apresentados na Figura 18. Em células GAS e Caco-2, sinefrina nas concentrações de 2, 20 e 200 μM demonstrou não promover aumentos significativos nas concentrações de MDA. Em células hepáticas HepG2, assim como demonstrado nos dados obtidos no ensaio de mensuração de ERs intracelulares, a concentração de 200 μM de sinefrina promoveu aumento significativo nas concentrações de MDA em TBARS. Como controle positivo foi utilizado o H_2O_2 (1mM), que nas três linhagens celulares demonstrou aumentar significativamente as concentrações de MDA após tratamentos de 24 horas.

Figura 18. Determinação dos níveis intracelulares de MDA presentes em TBARS em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para análise de alterações no estado redox intracelular.



Legenda: Quantificações de MDA presentes em TBARS em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 µM) e seus respectivos controles no tempo de 24 horas. As barras representam a média ± desvio padrão. CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle Solvente (HClO₄ - 0,05%); CP: Controle Positivo (H₂O₂ - 1 mM). *Valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise por ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett.

4.6. Expressão Gênica (RT-qPCR)

Os experimentos de expressão gênica por RT-qPCR demonstraram que todas as amostras de RNA total extraídas de controles e tratamentos com células HepG2, GAS e Caco-2 tiveram bom rendimento, com razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} entre 1,8 a 2,2, indicando a pureza das amostras após a etapa de extração. Além disso, as integridades das amostras de RNA total também foram avaliadas em gel de agarose (1%) e todas apresentaram grau de integridade satisfatória para a realização dos experimentos de RT-qPCR (Apêndice 1).

Os resultados dos experimentos de RT-qPCR para células HepG2, GAS e Caco-2 são demonstrados, respectivamente, nas Tabelas 5, 6 e 7. Somente genes que foram diferencialmente expressos no *fold change* ($\geq 1,5$ ou $\leq 0,5$) e estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste *t* – *Student* do controle negativo (PBS; pH 7,4) foram descritos nestas tabelas. Os valores de *fold change* foram convertidos para *fold regulation*, que representa o número de vezes que o gene foi alterado em relação ao grupo controle negativo (PBS; pH 7,4). Os controles de solvente (HClO₄ - 0,05%) não alteraram significativamente a expressão de todos os genes avaliados nestes experimentos em todas as linhagens celulares e, por isso, não foram apresentados nas tabelas abaixo. Os valores de significância (*p-value*) após teste *t* – *Student* e os valores médios de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) obtidos em células HepG2, GAS e Caco-2 para os controles do solvente (CS) e os tratamentos, estão disponíveis, respectivamente, nos Apêndices 2, 3 e 4.

Em células hepáticas (HepG2), os resultados observados na Tabela 5 demonstraram que a sinefrina, de acordo com as concentrações avaliadas, alterou a expressão de um total de 6 genes. As concentrações de 2, 20 e 200 μM , ao mesmo tempo, induziram significativamente a expressão do gene *TNF* e diminuíram a expressão relativa de *LIPE*. Já as concentrações de 20 e 200 μM , aumentaram significativamente os níveis de transcritos (RNAm) dos genes *MAPK1* e *JUN*. Por fim, a maior concentração estudada de sinefrina (200 μM) em células HepG2 demonstrou diminuir a expressão dos genes *RELA* e *AKT1* em 2,28 e 3,49 vezes, respectivamente, em relação ao controle negativo.

Em células gástricas (GAS), os resultados dos efeitos de sinefrina sobre a expressão gênica estão representados na Tabela 6. Nesta linhagem celular, sinefrina na menor concentração avaliada (2 μM), aumentou em 1,63 e 4,11 vezes a expressão

dos genes *AKT1* e *ADCY3*, respectivamente, em relação ao controle. A concentração de 20 μM de sinefrina mostrou regular positivamente em 2,62 e 1,67 vezes a expressão relativa dos genes *MAPK1* e *JUN*. Além disso, na maior concentração estudada dessa substância (200 μM), *AKT1* e *MAPK1* obtiveram aumentos significativos em sua expressão após tratamentos de 6 horas. Por fim, o gene *TNF* foi o único que teve sua expressão relativa significativamente diminuída quando células GAS foram tratadas com a maior concentração de sinefrina.

Em células intestinais colorretais (Caco-2), os resultados dos efeitos de sinefrina sobre a expressão gênica desta linhagem são demonstrados na Tabela 7. Sinefrina, nas três concentrações avaliadas, induziu de forma significativa a expressão do gene *MAPK1*. As duas maiores concentrações estudadas de sinefrina (20 e 200 μM) promoveram aumento na expressão do gene *JUN* em 2,89 e 2,80 vezes, respectivamente, em relação ao controle negativo. Outro gene que obteve aumentos de expressão relativa em duas concentrações diferentes avaliadas foi *AKT1*, onde 2 e 200 μM regularam positivamente a expressão desse gene.. Além disso, somente na menor concentração avaliada de sinefrina (2 μM) os genes *ATM*, *ATR*, *CHEK1*, *PRKACA*, *RELA* e *GNAS* obtiveram regulação positiva significativa em relação ao controle negativo.

Por fim, a Figura 19 demonstra as diferenças entre os padrões de expressão gênica obtidos nas diferentes linhagens celulares (HepG2, GAS e Caco-2) estudadas após tratamentos de 6 horas com três concentrações diferentes de sinefrina (2, 20 e 200 μM). De acordo com o mapa de clusterização, é possível observar que células HepG2 e GAS demonstram respostas mais similares, onde principalmente as duas maiores concentrações de sinefrina alteraram a expressão de genes envolvidos no metabolismo celular. Já em células Caco-2, além das alterações nos genes de metabolismo celular nas maiores concentrações, a menor concentração de sinefrina (2 μM) demonstrou alterar também os níveis de transcritos de genes da via de sinalização de danos no DNA, sendo este padrão só observado em células colorretais.

Tabela 5 - Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo energético e à danos no DNA que foram significativamente alterados em células HepG2 após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) no tempo de 6 horas. *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1* foram utilizados como genes de referência para a normalização

Gene (Símbolo)	Descrição do Gene	Sequência de referência (GeneBank)	SNF 2 μM^a	SNF 20 μM^a	SNF 200 μM^a
<i>AKT1</i>	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>	NM_005163	NA	NA	- 3,49
<i>LIPE</i>	<i>Lipase E, Hormone Sensitive Type</i>	NM_005357	- 2,22	- 3,66	- 2,97
<i>MAPK1</i>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>	NM_002745	NA	+ 2,70	+ 3,05
<i>JUN</i>	<i>Jun Proto-Oncogene</i>	NM_002228	NA	+ 2,89	+ 2,80
<i>RELA</i>	<i>Avian Reticuloendotheliosis Viral Proto-Oncogene (NF-KB Subunit)</i>	NM_021975	NA	NA	- 2,28
<i>TNF</i>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	NM_000594	+ 2,27	+ 1,57	+ 2,10

NA: Não Alterado. ^aOs valores representam a média referente ao número de vezes que o gene foi alterado (*fold regulation*) em relação ao grupo controle negativo (CN; PBS). Nesta tabela estão apresentados somente genes que obtiveram valores com expressão relativa $\geq 1,5$ ou $\leq 0,5$ e que foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise pelo teste *t - Student*. Os dados com todos os valores médios de expressão relativa obtidos $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ e valor de significância (*p-values*) após teste *t - Student* estão disponíveis no apêndice 2.

Tabela 6 - Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo energético e à danos no DNA que foram significativamente alterados em células GAS após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) no tempo de 6 horas. *GAPDH*, *ACTB* e *HPRT1* foram utilizados como genes de referência para a normalização

Gene (Símbolo)	Descrição do Gene	Sequência de referência (GeneBank)	SNF 2 μM^a	SNF 20 μM^a	SNF 200 μM^a
<i>AKT1</i>	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>	NM_005163	+ 1,63	NA	+ 1,92
<i>ADCY3</i>	<i>Adenylate Cyclase 3</i>	NM_004036	+ 4,11	NA	NA
<i>MAPK1</i>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>	NM_002745	NA	+ 2,62	+ 2,32
<i>JUN</i>	<i>Jun Proto-Oncogene</i>	NM_002228	NA	+ 1,67	NA
<i>TNF</i>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	NM_000594	NA	NA	- 2,00

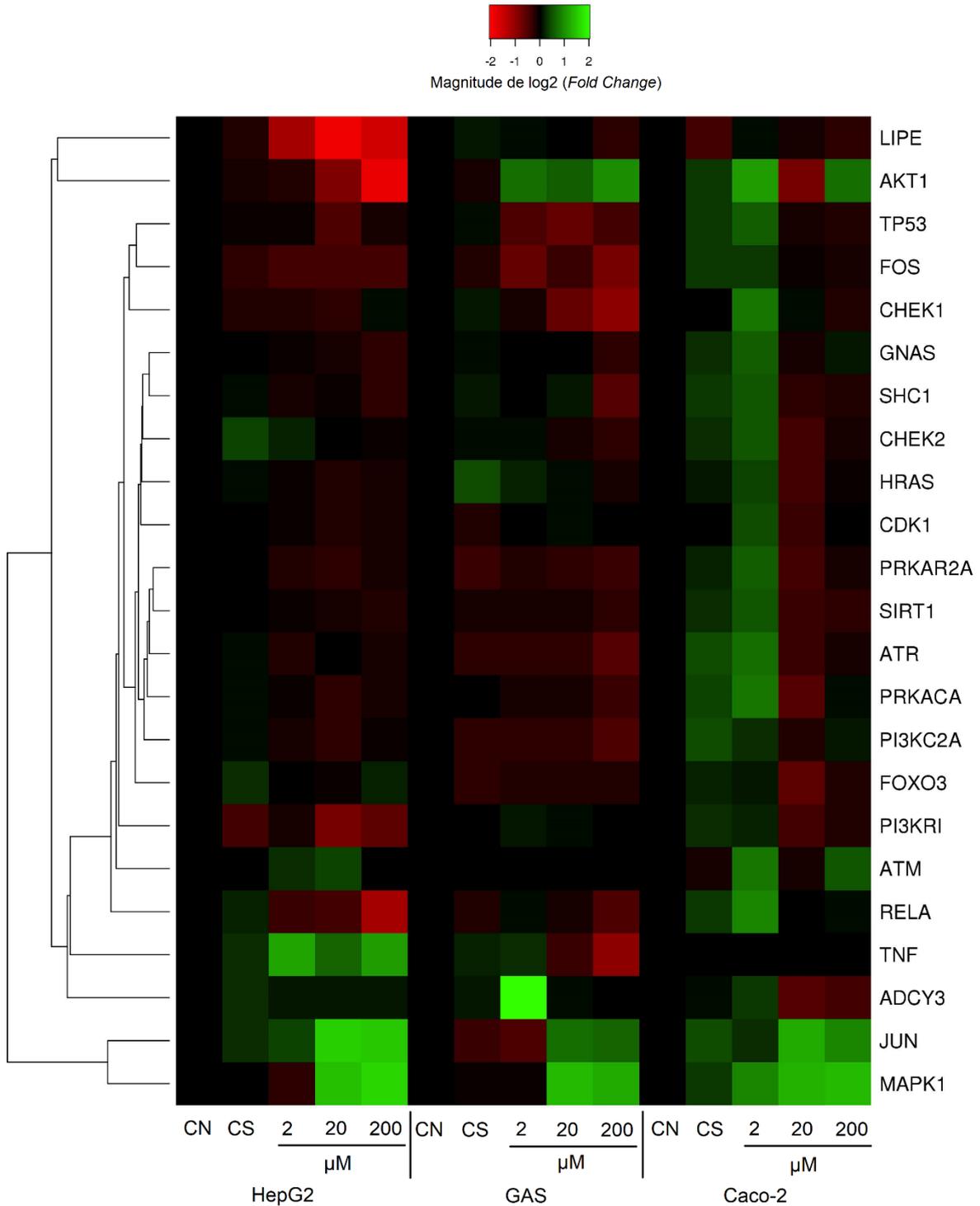
NA: Não Alterado. ^aOs valores representam a média referente ao número de vezes que o gene foi alterado (*fold regulation*) em relação ao grupo controle negativo (CN; PBS). Nesta tabela estão apresentados somente genes que obtiveram valores com expressão relativa $\geq 1,5$ ou $\leq 0,5$ e que foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise pelo teste *t - Student*. Os dados com todos os valores médios de expressão relativa obtidos $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ e valor de significância (*p-values*) após teste *t - Student* estão disponíveis no apêndice 3.

Tabela 7 - Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo energético e à danos no DNA que foram significativamente alterados em células Caco-2 após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) no tempo de 6 horas. *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1* foram utilizados como genes de referência para a normalização

Gene (Símbolo)	Descrição do Gene	Sequência de referência (GeneBank)	SNF 2 μM^a	SNF 20 μM^a	SNF 200 μM^a
<i>AKT1</i>	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>	NM_005163	+ 2,16	NA	+ 1,64
<i>GNAS</i>	<i>Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Alpha Stimulating</i>	NM_001077488	+ 1,50	NA	NA
<i>MAPK1</i>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>	NM_002745	+ 1,87	+ 2,50	+ 2,62
<i>JUN</i>	<i>Jun Proto-Oncogene</i>	NM_002228	NA	+ 2,36	+ 1,88
<i>ATM</i>	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	NM_000051	+ 1,68	NA	NA
<i>ATR</i>	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>	NM_001184	+ 1,61	NA	NA
<i>CHEK1</i>	<i>Checkpoint Kinase 1</i>	NM_001244846	+ 1,72	NA	NA
<i>PRKACA</i>	<i>Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Alpha</i>	NM_002730	+ 1,70	NA	NA
<i>RELA</i>	<i>Avian Reticuloendotheliosis Viral Proto-Oncogene (NF-KB Subunit)</i>	NM_021975	+ 1,85	NA	NA

NA: Não Alterado. ^aOs valores representam a média referente ao número de vezes que o gene foi alterado (*fold regulation*) em relação ao grupo Controle Negativo (CN; PBS). Nesta tabela estão apresentados somente genes que obtiveram valores com expressão relativa $\geq 1,5$ ou $\leq 0,5$ e que foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do CN após análise pelo teste *t - Student*. Os dados com todos os valores médios de expressão relativa obtidos $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ e valor de significância (*p-values*) após teste *t - Student* estão disponíveis no apêndice 4.

Figura 19. Perfil de expressão gênica em células HepG2, GAS e Caco-2 após tratamentos com sinefrina para análise comparativa.



Legenda: Heat Map com os diferentes perfis de expressão gênica obtidos em células hepáticas (HepG2), gástricas (GAS) e intestinais (Caco-2) após 6 horas de tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 µM) e seus respectivos controles. CN: Controle Negativo (PBS; pH 7,4); CS: Controle Solvente (HClO₄ - 0,05%). Os valores de *fold change* foram convertidos para escala logarítmica (log²). Valores em vermelho representam diminuição da expressão e em verde aumento de expressão. A clusterização foi organizada baseando-se em ligação média e as distâncias de ligação calculadas com o método euclidiano.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Inicialmente, para a realização deste estudo, uma revisão detalhada e extensiva dos dados publicados foi executada para selecionar as concentrações de sinefrina a serem avaliadas nos ensaios de citotoxicidade. O trabalho de Rossato et al. (2010), que avaliou o efeito de sinefrina em células Caco-2 utilizando o teste do LDH (enzima lactato desidrogenase), foi usado como base para a escolha das concentrações (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 2000, 4000 e 5000 μM) e do solvente (HClO_4 - 0,05%) para a solubilização da sinefrina.

Os primeiros ensaios realizados foram os de citotoxicidade, com um amplo espectro de concentrações avaliadas (de 25 a 5000 μM). De acordo com os resultados obtidos no ensaio do MTT, o termogênico sinefrina não demonstrou possuir efeito citotóxico ou causar diminuição significativa na viabilidade celular de linhagens humanas hepáticas (HepG2), gástricas (GAS) e intestinais (Caco-2) *in vitro*. Adicionalmente, seguindo as recomendações de agências regulatórias para estudos de citotoxicidade *in vitro* onde a execução de pelo menos dois ensaios com diferentes *endpoints* é sugerida (VINKEN; BLAAUBOER, 2017), para a complementação dos resultados obtidos no ensaio do MTT, foi realizado o ensaio de captação de VN que, diferentemente do primeiro ensaio, tem como parâmetro a avaliação da viabilidade celular baseada na atividade lisossomal das células. Assim como no ensaio do MTT, os resultados encontrados após tratamentos com sinefrina nas três linhagens celulares estudadas também demonstraram ausência de citotoxicidade em todas as concentrações empregadas.

Dados disponíveis demonstram que estes resultados obtidos são similares aos relatados por outros autores na avaliação de citotoxicidade de sinefrina. No trabalho de Cui et al. (2015) que avaliou os possíveis efeitos citotóxicos da sinefrina em linhagem celular hepática de rato (H4IIE) após realizar o ensaio do MTT com concentrações de 1 a 100 μM , também não foram observadas diminuições na viabilidade celular desta linhagem hepática *in vitro*. Em outro estudo, Roh et al. (2014) após realizarem o ensaio do MTT para analisar o potencial citotóxico da sinefrina nas concentrações de 10, 100 e 200 μM , novamente não observaram diminuição na viabilidade celular de fibroblastos embrionários normais de ratos (células NIH/3T3). Hong et al. (2012), ao avaliarem o efeito da sinefrina sobre células normais musculares

esqueléticas L6 de ratos, também não constatarem efeitos citotóxicos em concentrações até 100 μM no ensaio do MTT. Por fim, mesmo com a utilização de uma linhagem celular modelo para avaliar a absorção intestinal de compostos, como as células intestinais Caco-2, Rossato et al. (2010) ao executarem o ensaio de citotoxicidade do LDH em concentrações de 500 e 1000 μM com estas células, relataram não encontrar efeitos citotóxicos de sinefrina após 3 horas de tratamento. Estudos que analisaram o potencial citotóxico de sinefrina utilizando o ensaio de captação do VN em linhagens celulares *in vitro* não foram encontrados em literatura científica até o presente momento para comparação.

Nos ensaios de citotoxicidade foram testadas desde concentrações mais baixas até concentrações que poderiam estar presentes nas cápsulas de suplementos termogênicos que são ingeridas pelos consumidores em geral. Os suplementos alimentares que contêm sinefrina em sua composição, geralmente apresentam quantidades que variam de 6 a 10% desta substância, contudo, existem relatos de suplementos contendo até 95% de sinefrina (DWYER; ALLISON; COATES, 2005). Um estudo realizado recentemente por Viana et al. (2016) validou um método de análise para 46 produtos adquiridos em 30 diferentes websites brasileiros (*e-commerce*) e estes métodos analíticos identificaram que as concentrações ingeridas de sinefrina pelos brasileiros estavam entre 59,1 (3535 μM) e 217 mg (7595 μM) diárias. Vale enfatizar que no estudo de Viana et al. (2016), a sinefrina foi quantificada nos comprimidos de suplementos alimentares, ou seja, ela ainda não havia sido ingerida e também não havia passado por absorção, distribuição e metabolização.

Para selecionar as concentrações a serem avaliadas em ensaios posteriores de proliferação celular, genotoxicidade, mutagenicidade, alterações enzimáticas e de expressão gênica, rotineiramente são escolhidas concentrações próximas das concentrações plasmáticas, que no caso de sinefrina variam de 2 a 3 ng/mL (HALLER et al., 2005). Entretanto, é preciso levar em consideração que se trata de um estudo que utilizou modelos de cultura de células *in vitro* de órgãos alvos na absorção e metabolização de sinefrina. De acordo com os resultados previamente descritos por Da Silva-Pereira et al. (2016), após a sua ingestão, a sinefrina tem passagem rápida pelo estômago e vai para o intestino onde a maior fração do composto é absorvido (30-90%), em seguida, segue para uma transformação hepática rápida porque chega ao fígado por meio da veia porta.

Geralmente, substâncias que são absorvidas no intestino e transportadas para o fígado rapidamente via veia porta, podem estar presentes em concentrações mais elevadas nesses órgãos quando em comparação à concentração na circulação sistêmica. Demonstrou-se que estas diferenças entre concentrações nos órgãos de absorção e metabolização podem atingir fatores de 5 vezes ou mais em relação as concentrações plasmáticas (YAMANO et al., 2001). Além disso, pode se esperar também que, em termos metabólicos, o fígado seja o principal local de ação de sinefrina. Em ratos Wistar, por exemplo, foram encontradas concentrações variando de 10 a 500 μM na veia porta do fígado após infusão de sinefrina (DA SILVA-PEREIRA et al., 2016). Portanto, as concentrações no estômago, intestino e fígado de usuários de suplementos termogênicos, dependendo da quantidade de sinefrina ingerida diariamente nas cápsulas, podem atingir níveis entre os intervalos de concentração de 2 a 200 μM , que não demonstraram ter efeitos citotóxicos nesta faixa e, portanto, foram selecionadas para serem avaliadas neste presente estudo em experimentos posteriores.

Apesar de apresentar ausência de efeitos citotóxicos em células HepG2, GAS e Caco-2 *in vitro*, esses resultados ainda não asseguram ausência total de efeitos antiproliferativos induzidos por sinefrina. Os ensaios de citotoxicidade podem apresentar fatores de confusão na avaliação de perigo de compostos, isso porque, outros mecanismos de ação como, por exemplo, o estresse oxidativo, podem levar a danos no DNA ou causar efeitos antiproliferativos mesmo sem induzir a morte celular em células humanas (JUDSON et al., 2016). Para analisar estes tipos de efeitos da sinefrina, ensaios de proliferação celular utilizando o conteúdo de proteína total em tempos de 3, 24, 48 e 72 horas foram realizados juntamente com os experimentos de citometria de fluxo, que avaliaram os efeitos da ação de sinefrina em cada fase do ciclo celular (G1, S e G2/M) de células hepáticas, gástricas e intestinais *in vitro*.

Os resultados utilizando o conteúdo de proteína total após tratamentos com três concentrações da sinefrina, demonstraram a ausência de aumento ou diminuição significativa da proliferação celular quando comparado aos controles negativos em todos os tempos avaliados, indicando provável ausência de efeitos antiproliferativos desta substância em tratamentos com tempos maiores ao de 24 horas. Para a complementação desses resultados citados, possíveis alterações na cinética do ciclo celular das linhagens após tratamentos de 24 horas com sinefrina utilizando-se de citometria de fluxo também foram executadas e, nas três concentrações estudadas (2,

20 ou 200 μM), não houve alterações significativas na população de células nas fases G1, S e G2/M quando comparado com o tratamento controle.

Resultados para ensaios de proliferação e cinética de ciclo celular com sinefrina em células humanas *in vitro* não foram encontrados para comparação destes resultados. Uma alternativa foi comparar os resultados de sinefrina com os de substâncias análogas a sua estrutura química e farmacológica como, por exemplo, aminas adrenérgicas e anfetaminas. Assim como sinefrina, catinona e norefedrina em concentrações de 0 até 10000 μM entre tempos de tratamento de 6 a 96 horas não exerceram efeitos negativos sobre a proliferação de células mononucleares de sangue periférico humanas *in vitro*. Além disso, no caso específico da norefedrina, aumentos significativos na proliferação de linfócitos T humanos *in vitro* foram observados (BREDHOLT et al., 2013).

Conforme descrito anteriormente, existem muitos trabalhos sobre a presença e ausência de efeitos adversos causados pela sinefrina, especialmente em seres humanos. Por outro lado, apenas alguns resultados de experimentos que executaram ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade com sinefrina estão disponíveis no momento para avaliação de seu perigo. Mais relevante ainda é que as propriedades genotóxicas e mutagênicas desta substância não foram investigadas em estudos anteriores, de acordo com nosso conhecimento, em linhagens celulares gástricas, intestinais e hepáticas humanas *in vitro*.

Os resultados observados na Figura 13 e nas Tabela 2, 3 e 4 mostraram a ausência de danos primários causados ao DNA no ensaio cometa e de indução de MNs causados por quebras ou perdas cromossômicas após tratamentos com três concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) em células HepG2, GAS e Caco-2. Com relação ao ensaio citoma do MN (CBMN-Cyt), os resultados obtidos principalmente em células hepáticas HepG2 para os parâmetros de % de células BN e no IDN sugerem que em concentrações de 200 μM a sinefrina tenha exercido possível ação citostática.

Os resultados obtidos nos ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade estão de acordo com os poucos dados apresentados em literatura até o presente momento. Dados obtidos por McGregor et al. (1988), também não demonstraram a atividade genotóxica de sinefrina após tratamentos em células de linfoma de rato (L5178Y) em concentrações de 120 μM a 21,5 mM. Em outro trabalho, Ekhlis (2014) ao estudar os possíveis efeitos mutagênicos do extrato da casca de *Citrus aurantium* (laranja

amarga) com o teste do MN em cultura de linfócitos humanos *in vitro*, relata que a laranja amarga e a sinefrina não possuem efeitos mutagênicos em concentrações correspondentes a 1,2 µg/mL ou 0,07 µM.

Em uma revisão recente publicada por Stohs (2017), o autor cita outros dois estudos que avaliaram os efeitos genotóxicos e mutagênicos da sinefrina. No primeiro, sinefrina e seus produtos metabólicos também não induziram a formação de MNs em cultura celular de leucócitos *in vitro* até a maior concentração testada de 100 ng/mL (0,6 µM). No segundo estudo, quando a potencial mutagenicidade do extrato de laranja amarga (Advantra Z[®]) contendo 50% de sinefrina foi analisada pelo ensaio de mutação reversa bacteriano de *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) utilizando as cepas TA1535, TA97a, TA98, TA100 e TA102 e na presença/ausência do sistema de ativação metabólica S9, os resultados de Deshmukh et al. (2017) também indicaram que o extrato de laranja amarga (contendo 50% de sinefrina) não promovia efeitos citotóxicos e mutagênicos. Em adição, neste último trabalho citado, os autores relatam que “esses resultados afirmam e estendem o conhecimento sobre a segurança do extrato de laranja amarga e da sinefrina”.

Todavia, para a afirmação completa sobre a segurança de sinefrina muitos estudos ainda devem ser realizados. Isso porque, além dos efeitos genotóxicos e mutagênicos desta substância não terem sido investigados em linhagens celulares gástricas, intestinais e hepáticas humanas *in vitro*, estudos sobre os efeitos pró-oxidativos e distúrbios no estado redox intracelular dessas linhagens celulares oriundas de órgãos alvos na absorção e metabolização de sinefrina também não foram executados. Possíveis alterações no estado redox celular poderiam, por exemplo, evidenciar e sugerir uma explicação para os efeitos citostáticos encontrados em células HepG2.

Um dos primeiros passos para a avaliação de possíveis efeitos pró-oxidativos gerados por uma substância está em quantificar a produção de espécies reativas (ERs) intracelulares. Essas ERs intracelulares foram mensuradas inicialmente neste trabalho com a utilização do marcador fluorescente diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA). O ensaio com o marcador fluorescente H₂DCFDA é hoje um dos métodos mais utilizados mundialmente para medir o nível de formação de ERs, pois após a penetração na membrana celular, o H₂DCFDA é desacetilado por esterases celulares no composto não fluorescente diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF),

que é oxidado por ERs no produto fluorescente dihidrofluoresceína (DCF), o qual pode ser quantificado (SZYCHOWSKI et al., 2016).

Os resultados dos ensaios com H₂DCFDA demonstrados na Figura 13, indicam aumento na formação de ERs em células hepáticas HepG2 após 6 horas de tratamento em todas as concentrações testadas de sinefrina (2, 20 e 200 µM). Após 24 horas de tratamento, a concentração 200 µM de sinefrina demonstrou aumentos significativos em relação ao controle negativo em células hepáticas e intestinais (HepG2 e Caco-2) e, a concentração de 2 µM, promoveu aumentos na geração de ERs somente em células Caco-2. De forma similar, por exemplo, Silva, Silva e Carmo (2014) também observaram aumentos nos níveis de ERs geradas no ensaio H₂DCFDA em células hepáticas HepG2 tratadas por 24 horas com 4 diferentes classes de anfetaminas.

Para a obtenção de dados mais robustos sobre os efeitos pró-oxidativos de sinefrina, outras opções para a avaliação de estresse oxidativo de uma substância podem ser ou por meio da mensuração de enzimas da defesa antioxidante ou então, por meio da quantificação de produtos metabólicos gerados em consequência do desbalanço redox causado, como por exemplo, o malondialdeído (MDA) que é resultado de lipídios oxidados de membranas celulares. Por isso, foi realizado neste estudo a mensuração de enzimas da defesa antioxidante como Glutathione (GSH), Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD) mitocondrial e Glutathione Peroxidase (GPx). Além disso, também foi quantificado o produto de peroxidação lipídica Malondialdeído (MDA).

Os resultados obtidos após as quantificações enzimáticas revelaram que as concentrações de 20 e 200 µM aumentaram de forma significativa a concentração intracelular de GSH em todos os tipos de células (HepG2, GAS e Caco-2) quando comparado com o controle negativo (PBS). Para CAT os resultados encontrados mostraram que em células gástricas (GAS) os níveis enzimáticos diminuíram em todas as concentrações testadas (2, 20 e 200 µM). Quando os níveis de GPx foram mensurados, os resultados demonstram que somente em células HepG2 após tratamentos com as concentrações de 20 e 200 µM, os níveis de GPx aumentaram significativamente. Por fim, um aumento na quantificação de MDA na maior concentração de sinefrina avaliada (200 µM) foi específico em células hepáticas.

Em resumo, os resultados observados nos ensaios de mensuração de ERs intracelulares e nas quantificações enzimáticas podem sugerir diferentes efeitos do

modo de ação da sinefrina e também da sua especificidade em cada tipo de linhagem celular, principalmente em células hepáticas. Possivelmente, o aumento de GSH em todas as linhagens celulares podem estar relacionados não somente aos efeitos pró-oxidativos da sinefrina, mas sim aos seus efeitos no metabolismo endógeno intracelular de células de mamíferos. O GSH é conhecidamente uma das proteínas mais importantes do sistema antioxidante na detoxificação de peróxidos gerados pois é considerada a primeira linha de defesa contra danos oxidativos onde está enzima funciona como um eliminador e cofator na detoxificação metabólica (NOZAL et al., 1997; LEI et al., 2016). No caso de aminas simpaticomiméticas e anfetaminas, após sua ligação aos receptores adrenérgicos para a ativação dos efeitos biológicos, substâncias químicas dessas classes elevam sua afinidade de ligação a grupos tióis intracelulares e tendem a se conjugar com GSH (CARVALHO et al., 2004). Esse conjugado pode ou facilitar a excreção dos metabólitos por outras enzimas antioxidantes ou então, se não detoxificado, pode haver a formação de aductos de proteínas e a indução de estresse oxidativo dependendo do tipo de célula envolvida (CARVALHO et al., 2012).

Como em nossos estudos foram realizados tratamentos com duração de 24 horas, a sinefrina pode ter se conjugado com GSH e aumentado os níveis enzimáticos em células hepáticas, gástricas e intestinais. Dados com células humanas *in vitro* ainda se encontram indisponíveis para melhor comparação com nossos resultados com sinefrina. Em animais, Arbo et al. (2009) ao avaliarem a toxicidade subcrônica de sinefrina em camundongos após tratamentos com 30 ou 300 mg/kg (correspondente a 1792 e 17942 μM , respectivamente) também verificaram aumentos dos níveis enzimáticos de GSH.

Em células gástricas (GAS), foi observado uma diminuição significativa nos níveis enzimáticos de CAT após tratamentos com todas as concentrações de sinefrina. Todavia, os resultados do ensaio de formação de ERs intracelulares com H_2DCFDA , demonstraram que não houve geração de radicais livres neste tipo de células. Assim como para GSH, os resultados significativos de CAT em GAS possivelmente podem estar relacionados aos efeitos pró-oxidativos da sinefrina em associação com a ação do biometabolismo de detoxificação. Normalmente em células oriundas do epitélio gástrico, enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GSH e GPx, geralmente estão expressas para contribuir com o equilíbrio oxidativo/antioxidante gástrico (XU et al., 2016). As anfetaminas demonstram tendência a diminuir a

atividade ou a expressão de enzimas antioxidantes, incluindo CAT, em sua fase de detoxificação (KRASNOVA; CADET, 2009; CARVALHO et al., 2012). Neste caso, assim como as anfetaminas, pode ser proposto que sinefrina ao se conjugar com GSH e aumentar os seus níveis de expressão tenha, por *feedback* negativo, diminuído os níveis enzimáticos de CAT no mecanismo/auxílio de detoxificação desta substância em células gástricas. Esse mecanismo pode explicar, por exemplo, a ausência de resultados no ensaio de H₂DCFDA em células GAS nos tratamentos de 6 e 24 horas.

Porém, nesta mesma avaliação do estado redox intracelular, observamos a ação e efeitos específicos de sinefrina em células hepáticas. De acordo com Haller et al. (2005), a sinefrina é transformada por enzimas mitocondriais monoamina oxidases (MAOs) em ácido *p*-hidroximandélico e experimentos com mitocôndrias isoladas, e estudos de farmacocinética mostraram que esta reação é exercida predominantemente no fígado (DA SILVA-PEREIRA et al., 2016), sendo esse considerado o principal órgão de metabolização da sinefrina. A ação específica de sinefrina em células hepáticas e sua metabolização pelas MAOs de mitocôndrias principalmente dessas células, podem sugerir a explicação do porque boa parte dos resultados foram observados em células hepáticas HepG2.

Inicialmente, a especificidade de ação e o maior número de mitocôndrias em células hepáticas, já que demandam maiores quantidades de produção de energia para respiração celular e metabolização (VELTRI; ESPIRITU; SINGH, 1990) em comparação com células gástricas e intestinais, sugerem o maior número de resultados positivos em HepG2, uma menor quantidade em células intestinais Caco-2 e a ausência em células GAS. Como exemplo, aumento significativo nas quantificações de ERs intracelulares, na enzima antioxidante GPx e no produto de peroxidação lipídica MDA foi demonstrado somente em HepG2.

A formação de ERs intracelulares em células HepG2 e Caco-2 e as alterações no estado redox de células HepG2 podem estar relacionadas também com a consequente formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) resultante da metabolização de sinefrina pelas MAOs. De acordo com Grandy (2007), a oxidação de sinefrina por MAOs para a geração do produto metabólico ácido *p*-hidroximandélico tem como consequência a formação de H₂O₂. Inicialmente, os efeitos mais significativos observados na indução de ERs após 6 horas de tratamento em células HepG2 podem estar relacionados, por exemplo, a meia-vida da sinefrina que é de aproximadamente 3 horas (HALLER et al., 2005). Em seguida, a formação de ERs na concentração de

200 μM de sinefrina após 24 horas, poderia ser o fator que estaria causando os efeitos citostáticos observados em células hepáticas humanas *in vitro*.

Aliados a estes resultados, se sinefrina ao ser metabolizada pelas MAOs de células HepG2 possivelmente induziu a produção de H_2O_2 , justifica-se as consequentes alterações no estado redox com os aumentos de GPx, enzima antioxidante que tem ação específica de detoxificação de H_2O_2 (TAPPEL, 1978). Em primeiro lugar, o aumento de GPx e não de CAT para detoxificar as ERs observadas no ensaio de H_2DCFDA em células HepG2 já poderia ser esperado, visto que especificamente em hepatócitos, as mitocôndrias dessas células são especialmente vulneráveis aos efeitos de EROs, pois não possuem a enzima CAT expressa nessa organela e sim nos peroxissomos (DELEVE; KAPLOWITZ, 1991). Nesse tipo de células humanas, a enzima GPx é, geralmente, a primeira linha de defesa contra a ação de peróxidos como o H_2O_2 (MARÍ et al., 2009) gerados na mitocôndria e, justificaria o porque do aumento de GPx e não de CAT em células HepG2.

Os aumentos nos níveis enzimáticos de GPx indicam uma resposta de defesa das células à indução de EROs em células HepG2, pois a ação de aumentar a enzima antioxidante GPx provavelmente pode explicar o aumento significativo de MDA demonstrado na Figura 18 somente para esta linhagem de células. Especificamente, como relatado acima para o sistema de defesa antioxidante de células hepáticas, a detoxificação de H_2O_2 é realizada pela ação das enzimas GPx/GSH e pela reação de Fenton, que gera como produto de metabolização o radical hidroxila (OH^\bullet), um grande indutor de peroxidação lipídica em membranas celulares (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014), cujos efeitos foram provavelmente refletidos nas quantificações de MDA somente para a concentração de 200 μM .

Com isto, devido à ausência de resultados com células humanas *in vitro* e também de trabalhos que realizaram tratamentos em tempos iguais aos executados neste estudo, os resultados observados na geração de ERs intracelulares com H_2DCFDA e nos ensaios enzimáticos, podem sugerir a indução de estresse oxidativo em células humanas hepáticas causadas por sinefrina. Atualmente, é de conhecimento que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na etiologia de diversas doenças humanas como diabetes *mellitus*, aterosclerose, alterações cardiovasculares, envelhecimento e câncer (GALADARI et al., 2017). No processo carcinogênico, os radicais livres gerados durante o estresse oxidativo contribuem interagindo com o DNA de duas formas. A primeira forma é a direta, onde

radicais livres ocasionam efeitos extremamente deletérios como aductos, *crosslinks* e quebras de fita simples e duplas (FEDERICO et al., 2007). A segunda forma é a indireta, onde a interação das espécies reativas pode resultar na formação de bases oxidadas na estrutura de dupla hélice ou as ERs podem modificar o “*pool*” de nucleotídeos livres presentes no meio intracelular para depois serem incorporados erroneamente no DNA (HAGHDOOST et al., 2005).

Apesar dos resultados de ensaios que envolvem o estado redox demonstrarem efeitos pró-oxidativos, aparentemente as ERs geradas no processo de metabolização de sinefrina não promoveram danos significativos ao DNA e, conseqüentemente, não ocasionaram a indução de instabilidade cromossômica em células HepG2 *in vitro*. Existem, atualmente, várias possíveis hipóteses para justificar esses resultados contraditórios, onde aumentos na geração de radicais pró-oxidativos intracelulares foram observados, mas não houveram detecções de efeitos como citotoxicidade, genotoxicidade ou mutagenicidade.

Uma das possibilidades pode estar justamente envolvida com o mecanismo de ação indireta das ERs no DNA durante o processo de estresse oxidativo que foi descrito acima, porém é menos provável. A interação das ERs indiretamente com o DNA por meio da formação de bases oxidadas na estrutura de dupla hélice ou da modificação de bases no “*pool*” de nucleotídeos livres no meio intracelular, como a 8-oxo-dihidroguanossina (8-OHdG), podem não ter sido detectados nesta versão do ensaio cometa (VALAVANIDIS; VLACHOGIANNI; FIOTAKIS, 2009). O ensaio cometa com células humanas *in vitro* utilizando o pH alcalino ($\text{pH} \geq 13$) permite a detecção de danos ao DNA como, por exemplo, quebras de fita simples e duplas e também de sítios álcali-lábeis. Entretanto, danos oxidativos que geram bases oxidadas no DNA não são especificamente identificados por essa versão do método (COLLINS, 2009).

As bases oxidadas no DNA podem causar diferentes efeitos deletérios ao material genético de células humanas. Após incorporadas, se não houver eficiente reparo de DNA, as bases oxidadas podem causar substituições de nucleotídeos do tipo transversões de G:C para T:A, enquanto que a incorporação de nucleotídeos oxidados livres no citoplasma conduzirá para transversões de A:T para C:G. Quando o processo de replicação está em acontecimento, os nucleotídeos erroneamente incorporados citados anteriormente podem provocar também quebras simples e duplas na cadeia de DNA e, consecutivamente, ocasionar eventos de rearranjos cromossômicos, segregação cromossômica anormal e diminuição dos telômeros

(VODICKA et al., 2016). O ensaio do MN é uma da metodologia que permite identificar esses tipos de danos cromossômicos (FENECH et al., 2011), porém, caso as ERs resultantes do metabolismo de sinefrina em células hepáticas (HepG2) tenham promovido a formação de bases oxidadas, efeitos da incorporação dessas bases oxidadas no DNA ou não resultaram em mutações cromossômicas, ou então, foram detectadas e removidas por sistemas de defesa intracelular como o reparo de DNA, pois aumentos nas frequências de MNs não foram observadas nesta linhagem celular.

Uma outra hipótese mais coerente é a de que sinefrina pode estar induzindo o chamado "estresse oxidativo agudo". Neste tipo de mecanismo, Lushchak (2016) sugere que determinadas substâncias promovem aumento nas quantidades ERs geradas que (I) ou não são suficientes para se ter um nível de estresse oxidativo danoso para as estruturas celulares ou (II) a quantidade de ERs produzidas acontecem apenas por um certo/curto período de tempo. Nesta revisão abrangente, o autor relata que nesses casos ocorrem três consequências principais nas células humanas que são: (I) uma expressão aumentada de enzimas antioxidantes como GPx, GSH, SOD ou CAT; (II) ausência de danos celulares mais pronunciados, isto é, citotoxicidade e morte celular, danos primários ao DNA ou efeitos mutagênicos; e (III) possível presença de alguns efeitos considerados moderados como, por exemplo, atrasos no ciclo celular ou na atividade mitogênica das células. Estas consequências relatadas para este mecanismo de ação foram observadas em células HepG2 com a diminuição de IDN, aumento de ERs, aumento nos níveis de enzimas antioxidantes e indução significativa, porém não elevada, na quantificação de MDA na maior concentração estudada de sinefrina, todavia, sem indução de morte celular, genotoxicidade e mutagenicidade. Além do mais, a sinefrina é uma substância com meia-vida curta e metabolização rápida, o que reforçaria essa hipótese.

A indução de ERs sem a ocorrência de genotoxicidade e mutagenicidade pode também estar relacionada com a própria ação das enzimas antioxidantes e do metabolismo de fase II, que podem estar reduzindo a ação de EROs produzidas durante o processo de metabolização de sinefrina em ácido *p*-hidroximandélico. Em células HepG2, GAS e Caco-2, por exemplo, a ação de aumentar a produção de GSH e a sua conjugação com sinefrina ou seus metabólitos pode ter contribuído para a detoxificação de radicais livres produzidos, facilitando a excreção dos metabólitos por outras enzimas antioxidantes, como por exemplo o GPx em células HepG2 e a CAT em GAS.

Da mesma forma, as enzimas de metabolização de xenobióticos de fase II podem conferir às células humanas duas capacidades importantes. A primeira é a de realizar a conjugação metabólica de um pró-mutágeno evitando a formação do agente mutagênico final e, a segunda, de conseguir a inativação de um metabólito ativo após a sua formação, evitando a ação no material genético da célula (KIRKLAND et al., 2007). Assim, as células eucarióticas podem estar eliminando os metabólitos intermediários reativos que poderiam ser a causa de efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos. As células HepG2, por exemplo, são conhecidas por possuírem algumas enzimas de fase II como GSTs (Glutationas Transferases), NATs (N-acetiltransferase), SULTs (Sulfotransferases) e UGTs (Difosfoglucoronosil Transferases) (BRANDON et al., 2006). A linhagem de células intestinas Caco-2 possui menor expressão de enzimas de biometabolização da fase II, mas ainda assim expressam GSTs (Glutationas Transferases) e UGTs (ODENTHAL et al., 2012). Segundo Ibrahim et al. (1983), sinefrina é principalmente detoxificada em fase II por glucuronidação (UGTs) e sulfatação (SULTs), e estas enzimas são expressas em células HepG2 e Caco-2, que podem ter contribuído para os efeitos observados nos resultados.

Alternativamente, é válido destacar que as células HepG2 possuem sistema de reparo de DNA eficiente, principalmente no reparo de excisão de base (*Base Excision Repair* - BER), que é responsável pela remoção de danos oxidativos causados ao DNA (oxidação de base e sítios abásicos) (WHITAKER et al., 2017). De acordo com Halliwell e Whiteman (2004), o reparo de DNA além de agir diretamente na remoção de danos causados ao DNA, também pode atuar estimulando um mecanismo de "adaptação" da célula ou organismo por meio da regulação positiva dos sistemas de defesa, como o antioxidante, que pode proteger as células completamente contra danos pró-oxidativos, proteger as células contra danos em certa medida, mas não completamente ou promover uma "super proteção", como no exemplo de células tumorais, em que as células adquirem resistência atípica em condições de estresse oxidativo e hipóxia.

Essa sugestão da ação do sistema de reparo de DNA atuando como mecanismo de proteção contra danos oxidativos causados por sinefrina provavelmente pode ter sido observado nos experimentos de expressão gênica por RT-qPCR. Como demonstrado na Tabela 7 e na Figura 19, em células Caco-2 foi possível observar após os tratamentos com sinefrina que a menor concentração

avaliada de 2 μ M aumentou significativamente a expressão de 3 genes relacionados com a via de sinalização de respostas a danos no DNA (*DNA damage response Signaling*) ainda em 6 horas de tratamento.

ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) e *ATR (Ataxia Telangiectasia Rad3-Related)* são genes codificadores de proteínas quinases sinalizadoras intimamente relacionadas e que são importantes nos vários pontos de *checkpoints* de controle do ciclo celular (JACKSON; BARTEK, 2009). Tanto *ATM* quanto *ATR* são ativadas quando danos causados ao DNA são detectados e fosforilam outras proteínas a jusante incluindo as “*checkpoints kinases*” (CHEKs). O gene *CHEK1 (Checkpoint Kinase 1)* é um desses *checkpoints* quinases que atuam nos pontos de controle do ciclo celular e que são necessários para a parada de ciclo celular mediada pela resposta ao dano no DNA ou à presença de DNA não replicado (ROOS; THOMAS; KAINA, 2016). A quinase de *CHEK1* é também responsável pela fosforilação da região C-terminal de *TP53 (Tumor Protein 53)*, promovendo sua ativação (SHIEH et al., 2000). A ativação posterior do gene *TP53*, que transcreve a proteína supressora de tumor *p53*, atua na resposta a diversos estresses celulares causando induzindo a expressão de genes que promovem parada de ciclo celular, morte celular e principalmente, o reparo do DNA (ZLOTORYNSKI, 2016).

Em relação a indução de ERs e a correspondente expressão de genes de reparo do DNA, em células Caco-2, a concentração de 2 μ M aumentou significativamente os níveis de ERs somente após 24 horas de tratamento. Em 6 horas de tratamento, os resultados obtidos com H₂DCFDA não demonstraram resultados estatisticamente significativos de ERs. Yan, Sorrell e Berman (2014) descrevem que o mecanismo de detecção de danos ao DNA causados por ERs e mediado por *ATM/ATR* na ativação de *TP53*, é um dos mais rápidos e eficientes na indução de resposta à danos e de reparo do DNA. Alguns autores relatam que células em cultura expostas a concentrações não tóxicas que podem gerar estresse oxidativo, necessitam apenas de 15 a 30 minutos para recrutar proteínas a ficarem concentradas no núcleo e assim promover reparo de DNA em uma possível resposta a danos (MITRA et al., 2001; BARZILAI; YAMAMOTO, 2004).

Após obter, apresentar e discutir os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de sinefrina nestas linhagens humanas, outro objetivo desse estudo foi buscar compreender os possíveis efeitos da sinefrina sobre o metabolismo celular para tentar relacionar com suas consequências geradas no estado redox intracelular.

A sinefrina, em tratamentos com concentrações de 20 e 200 μM , induziu alterações no estado redox intracelular, principalmente de células hepáticas (HepG2). Além disso, foram observados efeitos no estado redox de células intestinais (Caco-2) e de células gástricas (GAS) *in vitro*. Entretanto, ainda é observado em literatura científica, uma lacuna sobre o possível mecanismo de ação de sinefrina no metabolismo celular e, mais especificamente, na forma de ação desta substância sobre o estado redox para explicar os resultados obtidos no ensaio de ERs e nas quantificações enzimáticas.

Conforme descrito na introdução, uma das alternativas é analisar as possíveis alterações nos níveis de transcritos de genes candidatos das vias de metabolismo energético pelo método de RT-qPCR. Estudos e resultados de ensaios prévios demonstraram que sinefrina, devido a sua estrutura química semelhante a agentes simpaticomiméticos (ex: efedrina e norepinefrina) e por possuir ação farmacológica similar à anfetaminas e aminas adrenérgicas, pode causar efeitos adversos ou alterar parâmetros de forma similar aos seus análogos. As classes de estimulantes promovem principalmente, a indução da via de sinalização de “Proteínas Quinases Ativadoras de Adenosina Monofosfato Cíclica (cAMP), ou do inglês *AMPK Signaling Pathway*. Os resultados obtidos nos ensaios de expressão gênica por RT-qPCR evidenciaram e confirmaram que, de forma geral, sinefrina também age alterando a expressão de genes da via de AMPK, conforme demonstrado na Figura 4 deste trabalho.

Os resultados de expressão gênica revelaram que na concentração de 20 μM de sinefrina, houve aumento de transcritos dos genes *MAPK1* e *JUN* nas três linhagens celulares estudadas (HepG2, GAS e Caco-2). Na concentração de 200 μM , o aumento de expressão do gene *MAPK1* novamente foi observado nas três linhagens celulares avaliadas e, para o gene *JUN*, só não foi observado sua expressão em células GAS nesta concentração. O gene *MAPK1* (*Mitogen-Activated Protein Kinase 1*) é transcrito e traduzido em uma proteína quinase envolvida em uma ampla variedade de processos celulares como proliferação, diferenciação e regulação de transcrição de outros genes por meio de sua translocação para o núcleo das células estimuladas, e por isso são chamadas de “Quinases Reguladas por Sinal Extracelular” (*Extracellular Signal Regulated Kinases – ERKs*), onde fosforilam regiões promotoras de genes alvos (LI; TUERGAN; ABULIZI, 2015). Uma dessas regiões promotoras estimuladas e fosforiladas por quinases mitogênicas e pelo aumento de cAMP é o

proto-oncogene *JUN* (*c-JUN*), responsável pela produção de um fator de transcrição, que no caso de ação de anfetaminas, por exemplo, é responsável pelos efeitos de hiperexcitabilidade de neurônios do hipocampo (GAO et al., 2017).

A via de sinalização AMPK atua como um sensor de níveis energéticos intracelulares, e é responsável por regular e estimular a expressão de genes que promovem a produção de ATP e por inibir a expressão de genes cujos produtos consomem ATP em vários tecidos. O AMPK existe como um complexo heterotrimérico que é ativado em resposta à tensões que empobrecem os suprimentos celulares de ATP, como baixa glicose, hipóxia, isquemia e choque térmico. Como um sensor dos níveis energéticos intracelulares respondendo aos baixos níveis de ATP, a ativação de AMPK regula positivamente as vias de sinalização que reabastecem os suprimentos ATP celulares. Por exemplo, a ativação do AMPK aumenta tanto a transcrição quanto a translocação de GLUT4 (Transportador de Glicose 4), resultando em aumento na absorção de glicose estimulada pela insulina (LAGE et al., 2008).

AMPK é o principal responsável por estimular processos catabólicos de oxidação de ácidos graxos e glicólise para fornecimento de suprimento para obtenção de energia (HARDIE, 2014). Ainda no processo de manutenção da homeostase, AMPK também pode agir inibindo a síntese de glicogênio (gluconeogênese), lipídios e proteínas quando a falta de suprimento energético celular é detectada. Devido a este seu papel fundamental como regulador central do metabolismo de lipídios e glicose, o AMPK é considerado um alvo terapêutico chave para o tratamento da obesidade, diabetes *mellitus* tipo II e câncer (HARDIE, 2013).

Todavia, é também a via de sinalização alvo para ação dos suplementos alimentares termogênicos que, por meio da adição de agentes simpaticomiméticos como a sinefrina, estimulam a via de sinalização de AMPK para aumentar o gasto de calorias por meio do metabolismo energético, induzir o aumento de absorção de glicose intracelular e promover a oxidação de ácidos graxos e a glicólise (HONG et al., 2012). Gannon, Conn e Vaughan (2015), em revisão dos possíveis efeitos de suplementos alimentares oriundos de frutas cítricas, como sinefrina, relataram que essas substâncias agem exatamente por esse mecanismo, com o aumento da captação de glicose por meio da maior abertura de transportadores de membrana como GLUT4 (Transportador de Glicose 4), bem como a fosforilação de AMPK.

Com base na possível significância desta substância sobre o metabolismo energético de células humanas, os resultados de experimentos realizados por

Maldonado et al. (2018) com sinefrina em modelos *in vivo* podem ser classificados em 3 grupos: (I) Confirmam que sinefrina estimula glicogênio fosforilase e a indução de glicogenólise (quebra de glicogênio) em animais, (II) indicam que a transformação hepática de carboidratos em lipídios (gluconeogênese) pode ser prejudicada ou inibida pela sinefrina em ratos, e (III) sugerem que a sinefrina é capaz de aumentar os *pools* celulares de mononucleotídeos de adenina, fenômeno esse que pode ser observado como possível efeito benéfico de sinefrina para o estado energético celular.

Sinefrina, além de ter estimulado a expressão de genes da via de sinalização de AMPK com o aumento de transcritos dos genes *MAPK1* e *JUN* em todos os tipos celulares estudados, teve ações específicas em células HepG2, GAS e Caco-2 em diferentes genes ligados a esta via de sinalização. Em células hepáticas (HepG2), os resultados observados na Tabela 5 mostraram que a sinefrina, de acordo com a concentração avaliada, alterou a expressão de outros 4 genes diferentes. As concentrações de 2, 20 e 200 μM ao mesmo tempo, induziram significativamente a expressão do gene *TNF* e diminuíram a expressão relativa de *LIPE*. Enquanto isso, a maior concentração estudada de sinefrina (200 μM) em células HepG2 demonstrou diminuir a expressão dos genes *RELA* e *AKT1*.

O gene *LIPE* (*Lipase E*) transcreve uma lipase do tipo sensível a hormônio que no tecido adiposo é responsável por hidrolisar principalmente os triglicerídeos armazenados em ácidos graxos livres. No caso de tratamentos com sinefrina por 24 horas, a regulação negativa desse gene variou de 2,22 (2 μM) até 3,66 (20 μM) vezes menos em relação ao controle negativo conforme demonstrado na Tabela 5. Provavelmente, a indução de AMPKs por sinefrina diminuiu a transcrição desse gene pelo fato de que “lipases sensíveis a hormônios (HSL)” são inibidas inicialmente para promover o processo de glicólise e obter ATPs, aumentando novamente a expressão desse gene para estimular o processo de lipólise e oxidação de gorduras na obtenção de fontes para geração de energia (FORETZ et al., 2005).

O produto gênico de *TNF* (*Tumor Necrosis Factor*) é uma citocina pró-inflamatória multifuncional envolvida na regulação de um amplo espectro de processos biológicos, incluindo o metabolismo lipídico, e está *downstream* na via de sinalização de AMPK (AGGARWAL, 2003). Sinefrina, assim como outros agentes simpaticomiméticos, demonstrou produzir, por meio de AMPK, efeitos na resposta imune estimulando seu aumento transcricional, que hora pode produzir condições protetivas em casos de doenças e infecções, e em outros momentos, sugere-se que

seja fator de toxicidade, como no caso de células neuronais (BAICY; LONDON, 2007; MACCIONI et al., 2009).

Os transcritos do gene *RELA* (*Avian Reticuloendotheliosis Viral Proto-Oncogene*) codificam uma das subunidades do “Fator Nuclear *Kappa Beta*” ou *NF-kappa-B*, o qual é um fator de transcrição que promove uma série de eventos de transdução de sinal responsável por induzir estímulos relacionados aos processos de inflamação, imunidade, diferenciação e apoptose (MAURO et al., 2011). Resultados de estudos prévios indicam que substâncias que estimulam a sinalização por AMPK podem inibir as respostas inflamatórias induzidas especificamente pelo *NF-kappa-B*, isso porque muitas proteínas alvo de AMPK, como *SIRT1* e *TP53*, aumentam a resistência ao estresse metabólico e agem por *feedback* negativo diminuindo a expressão de *NF-kappa-B* (SALMINEN; HYTTINEN; KAARNIRANTA, 2011).

AKT1 (*AKT Serine/Threonine Kinase 1*), também referido como “Proteína Quinase B” (*Protein Kinase B* - PKB), é um conhecido oncogene. A ativação de *AKT* depende da via Fosfatidilinositol-3-quinase (*Phosphoinositide-3-Kinase* - PI3K) e PKB regula muitos processos celulares, incluindo metabolismo, proliferação, sobrevivência celular, crescimento e angiogênese (KAHN et al., 2005). Normalmente, a via de sinalização de PI3K/AKT é estimulada juntamente com a via de sinalização de AMPK. Entretanto, em alguns casos onde altas concentrações de determinadas substâncias levam ao estímulo excessivo de AMPK, essa proteína quinase promove aumento significativo da “Quinase Alvo de Rapamicina” (*Mechanistic Target of Rapamycin Kinase* - mTOR), que por meio de *feedback* negativo pode ocasionar uma redução na expressão do efator *AKT1* (PKB) para contenção do processo proliferativo (SARBASSOV et al., 2005). Por isso, o aumento de 3,05 vezes na expressão de *MAPK1* em concentração de 200 µM de sinefrina pode ser correlacionado com a diminuição de 3,49 vezes de *AKT1* em relação ao controle em células HepG2.

O estímulo excessivo de genes envolvidos na atividade de AMPK também podem ser cofator no desenvolvimento do processo de estresse oxidativo em células humanas. Estudos relatam que o aumento da atividade de AMPK ocasionada por suplementos alimentares termogênicos elevam a produção de EROs mitocondrial, isso pela estimulação do metabolismo e expressão de genes via fosforilação de várias proteínas intracelulares e coativadores, como o Receptor Coativador de Proliferação de Peroxissomos 1 (*Coactivator-Related Peroxisome Proliferator Receptor 1* - PGC-1), da biogênese mitocondrial (CETRULLO et al., 2015). Por isso, além do processo

de metabolização pelas enzimas MAOs mitocondriais que podem induzir a produção de H_2O_2 , a produção de EROs via aumento da biogênese mitocondrial estimulada por AMPK pode ser um possível mecanismo de compreensão dos efeitos pró-oxidativos de sinefrina em células hepáticas (HepG2).

Em células do epitélio gástrico (GAS), assim como já demonstrado nos ensaios de estresse oxidativo, os resultados dos efeitos de sinefrina sobre a expressão gênica dessa linhagem celular também diferem dos efeitos observados em células HepG2. Nessa linhagem celular, a sinefrina nas concentrações avaliadas de 2 e 200 μM demonstrou induzir de forma significativa em relação ao controle negativo a expressão do gene *AKT1*, conforme esperado para substâncias que promovem estímulo da via de sinalização de AMPK. Corroborando a hipótese que sinefrina possui ação principalmente na via de sinalização de proteínas quinases ativadoras de Adenosina Monofosfato Cíclica (cAMP), além do aumento de transcritos nos genes *MAPK1* e *JUN*, o gene *ADCY3* (*Adenilato Ciclase 3*) que transcreve uma enzima associada à membrana que catalisa a formação de cAMP secundário no citoplasma, teve aumento de 4,11 vezes nos níveis de expressão gênica em relação ao controle negativo na menor concentração estudada em células GAS. Resultados diferentes dos observados com células HepG2 também foram encontrados para a expressão do gene *TNF*. Neste caso, em células GAS, a maior concentração estudada de 200 μM diminuiu significativamente em 2,00 vezes a transcrição desse gene, o que sugere que, assim como para *RELA* em células HepG2, sinefrina por meio do estímulo da sinalização por AMPK inibiu a expressão gênica de *TNF*.

Em células intestinais (Caco-2), adicionalmente aos aumentos de expressão relativa dos genes *MAPK1* e *JUN*, a menor concentração de sinefrina também aumentou significativamente a expressão dos genes *PRKACA* e *GNAS*. O gene *PRKACA* (*Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Alpha*) codifica uma das subunidades catalíticas da “Proteína Quinase A” (*Protein Kinase A* - PKA), também conhecida como proteína quinase dependente de cAMP, que está envolvida na regulação do metabolismo de lipídios e de glicose (SARWAR et al., 2014). A norepinefrina, substância com estrutura química similar a sinefrina, já demonstrou modular diferencialmente a ativação da via cAMP/PKA por meio da ação nos receptores adrenérgicos em macrófagos THP-1 humanos *in vitro* (YANG et al., 2012).

No caso de *GNAS* (*Guanine Nucleotide Binding Protein Alpha Stimulating*), este gene codifica proteínas que levam o seu nome e são chamadas de “Proteínas de

Ligação a Nucleotídeos de Guanina” ou Proteínas G, que funcionam como transdutores em inúmeras vias de sinalização controladas por “Receptores Acoplados a Proteína G” (*G protein-coupled receptors* - GPCRs). Esta sinalização estimulada promove a ativação de adenilato ciclases, resultando em níveis aumentados da molécula de sinalização cAMP. O *GNAS* funciona a jusante de vários GPCRs, incluindo receptores beta-adrenérgicos, que são os alvos de ação de substâncias como efedrina, noradrenalina, anfetaminas (WEINSTEIN et al., 2010) e de sinefrina na membrana plasmática ao ativar principalmente os receptores β_3 .

Para células Caco-2, o gene *AKT1* nas concentrações de 2 e 200 μ M também demonstrou aumento de expressão significativa em relação ao controle negativo e, provavelmente, o mecanismo de ação de sinefrina por estímulo da via de AMPK seja o mesmo do observado em células GAS. A via de sinalização de PI3K/AKT geralmente é estimulada juntamente com a via de sinalização de AMPK, pois esta via regula muitos processos, incluindo metabolismo, proliferação, sobrevivência celular, crescimento e angiogênese (KAHN et al., 2005). Agentes simpaticomiméticos como efedrina, anfetaminas e norepinefrina, da mesma forma que a sinefrina, classicamente exercem seus efeitos estimulantes por meio da cascata de sinalização de PIK3/AKT (RAU et al., 2011).

Adicionalmente aos resultados especificamente discutidos acima, de forma geral, também é possível discutir os efeitos de sinefrina sobre os padrões de expressão gênica de cada linhagem celular. O HeatMap de expressão gênica apresentado na Figura 19 demonstrou os seguintes padrões de ligações de genes: (I) somente na via de AMPK, devido ao aumento de expressão nos genes *MAPK1* e *JUN* nas mesmas concentrações testadas, as células hepáticas, gástricas e colorretais possuem padrão de expressão gênica similar em resposta aos tratamentos com sinefrina; (II) para outras vias e genes avaliados, células hepáticas (HepG2) demonstraram possuir maior similaridade de resposta com as células GAS, visto que genes como *TP53*, *FOS* e *CHEK1* apresentaram diminuição na sua expressão em ambas linhagens celulares, todavia, esta diminuição não foi significativa em relação aos seus respectivos controles negativos; (III) na via de genes relacionados com respostas aos danos no DNA, Caco-2 obteve um padrão de expressão particular entre as linhagens sendo a única que demonstrou aumento de expressão gênica após tratamentos com sinefrina nesta via; (IV) células GAS e Caco-2 se assimilam por terem aumentado a expressão de *AKT1*, o que pode sugerir os mesmos efeitos de sinefrina

na cascata de sinalização da via de PIK3/AKT em células gástricas e intestinais humanas. Em resumo, os padrões de ligações do HeatMap apontaram que a exposição a sinefrina promove efeitos basicamente por meio da ação na via de AMPK, porém, seus efeitos em outras vias gênicas como resposta a danos ao DNA, variam de acordo com os tipos celulares.

Após análise de todos os experimentos realizados, este estudo demonstrou que sinefrina não causou efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em células humanas hepáticas (HepG2), gástricas (GAS) e intestinais (Caco-2) humanas *in vitro* em concentrações relevantes para usuários de suplementos termogênicos. No entanto, sinefrina demonstrou induzir algumas alterações enzimáticas do estado redox intracelular em células hepáticas, gástricas e intestinais humanas. Essas alterações parecem estar envolvidas com o mecanismo de ação ou a forma de metabolização dessa substância de acordo com o tipo ou o tecido de origem em que a linhagem celular é proveniente.

Especificamente, as células hepáticas (HepG2), por possuírem um maior potencial metabolizador em relação as outras células estudadas e por serem o principal sítio de ação do metabolismo da sinefrina por enzimas mitocondriais MAOs, demonstraram aumento na geração de ERs intracelulares que, possivelmente, ocasionaram as maiores alterações no estado redox intracelular. A ausência de efeitos genotóxicos e mutagênicos nessas células pode estar relacionada a vários fatores como estresse oxidativo agudo, defesa antioxidante, potencial de detoxificação, reparo de DNA e a forma de ação das ERs produzidas. Além disso, devido a semelhança química e estrutural com outros estimulantes e agentes simpaticomiméticos, sinefrina de forma abrangente mostrou induzir e ativar a expressão de genes envolvidos na via de sinalização de AMPK, que promovem aumento de metabolismo intracelular e biogênese. Os resultados de RT-qPCR, assim como observado nos resultados de parâmetros bioquímicos, também comprovaram que sinefrina promove a expressão diferenciada de alguns genes em células hepáticas quando comparadas, por exemplo, com células colorretais e gástricas *in vitro*.

Portanto, para representar a ausência de perigo desta substância devem ser realizados ainda mais estudos utilizando ensaios de genética toxicológica com exposições crônicas em modelos *in vivo* para conclusões afirmativas sobre o possível perigo aos usuários de termogênicos. Além disso, outros trabalhos que utilizem os

mesmos modelos *in vivo* também devem analisar os efeitos de exposição de sinefrina sobre células oriundas de órgãos alvo da absorção, metabolização e distribuição desta substância. Por fim, visto que esse foi o primeiro trabalho a analisar a forma de ação a nível molecular de sinefrina, novos experimentos de RT-qPCR para análise dos efeitos de sinefrina na expressão gênica devem ser realizados em modelos *in vivo* e em humanos para confirmar se, de forma geral, esta substância age principalmente estimulando a cascata de sinalização da via de AMPK.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Com base nas condições empregadas nesse estudo e nos resultados finais obtidos, podemos concluir que:

- No Ensaio do MTT e no Ensaio de Captação do Vermelho Neutro (VN), nenhuma concentração de sinefrina avaliada (25 - 5000 μM) diminuiu efetivamente a viabilidade celular em células HepG2, GAS e Caco-2 quando comparadas ao controle negativo, indicando ausência de citotoxicidade.

- Após realizar o ensaio de proliferação celular utilizando o conteúdo total de proteínas e o ensaio de cinética do ciclo celular por citometria de fluxo, concluímos que sinefrina nas três concentrações testadas (2, 20 ou 200 μM) não reduziu a proliferação celular após vários tempos de tratamentos e não alterou o ciclo celular de células humanas hepáticas, gástricas e intestinais *in vitro*.

- Quando testada sua possível ação genotóxica nas três linhagens celulares estudadas (HepG2, GAS e Caco-2) por meio do ensaio cometa, sinefrina nas concentrações estudadas não induziu aumento de danos ao DNA.

- Em avaliação da possível instabilidade cromossômica causada pela sinefrina após 24 horas de exposição, por meio do ensaio citoma micronúcleo, nenhum aumento na frequência de MNs foi observado em células humanas hepáticas, gástricas e colorretais quando comparada ao controle negativo, indicando ausência de efeito mutagênico. Todavia, em células HepG2 a concentração de 200 μM demonstrou efeitos citostáticos ao reduzir o IDN e a % de BN.

- Na possível geração de espécies reativas intracelulares (ERs) causadas por sinefrina utilizando a sonda H₂DCFDA, os resultados demonstram que após 6 horas de tratamento em células HepG2 todas as concentrações de sinefrina aumentaram a quantidade de ERs intracelulares. Após 24 horas de tratamento, a concentração de 200 μM aumentou de forma significativa a quantidade de ERs em células HepG2 e em 2 e 200 μM em células Caco-2.

- Quando realizadas as quantificações intracelulares das enzimas antioxidantes Glutathione (GSH), Superóxido Dismutase (SOD) mitocondrial, Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx), sinefrina induziu aumento significativo de GSH nas concentrações de 20 e 200 μM nas três células humanas estudadas, aumentou os níveis de GPx na concentração de 20 e 200 μM em células HepG2 e diminuiu significativamente nas três concentrações avaliadas (2, 20 e 200 μM) a enzima CAT em células GAS.

- Quando analisados possíveis danos causados às membranas celulares por meio da quantificação do produto de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA), sinefrina promoveu aumento de MDA apenas na maior concentração avaliada (200 μM) e somente em células hepáticas.

- Em experimentos de RT-qPCR para análise dos efeitos de sinefrina na expressão gênica, de forma geral para células hepáticas, gástricas e intestinais, esta substância agiu similarmente a análogos simpaticomiméticos e estimulantes, promovendo principalmente a expressão de genes da via de sinalização de “Proteínas Quinases Ativadoras de Adenosina Monofosfato Cíclica (cAMP) ou AMPK, responsável por regular o metabolismo de lipídios e glicose. Especificamente, em células Caco-2, a menor concentração avaliada (2 μM) aumentou a expressão de genes relacionados com a via de sinalização de respostas à danos no DNA.

Referências

7. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 3, n. 9, p. 745-756, 2003.

ALIEV, G. et al. Oxidative stress mediated mitochondrial and vascular lesions as markers in the pathogenesis of Alzheimer disease. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 21, n. 19, p. 2208-2217, 2014.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Mexico City, v. 2014, p. 1-31, 2014.

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.

ARBO, M. D. et al. Subchronic toxicity of *Citrus aurantium* L, (Rutaceae) extract and *p*-Synephrine in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Nova Iorque, v. 54, n. 2, p.114-117, 2009.

ASHBY, J. et al. The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. **Mutagenesis**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 85-90, 1995.

BABICKI, S. et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 44, n. W1, p. W147-W153, 2016.

BAICY, K.; LONDON, E. D. Corticolimbic dysregulation and chronic methamphetamine abuse. **Addiction**, Londres, v. 102, n. s1, p. 5-15, 2007.

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, n. 6, p. 1-17, 2017.

BAL-PRICE, A.; COECKE, S. Guidance on good cell culture practice (GCCP). **Cell Culture Techniques**, Nova Iorque, v. 56, p. 1-25, 2011.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K-I. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 3, n. 8, p. 1109-1115, 2004.

BENICIO, L. M. **Avaliação do potencial citotóxico de uma nova indolin-3-ona e de seus efeitos sobre a modulação gênica em células HepG2**. 2014. 72 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

BERNHARD, D. et al. Enhanced MTT - reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. **Cancer Letters**, Virginia, v. 195, n. 2, p. 193-199, 2003.

BFR. FEDERAL INSTITUTE OF RISK ASSESSMENT GERMANY (BFR). Health assessment of sports and weight loss products containing synephrine and caffeine. **BFR Opinion N. 004/2013**. Disponível em: < <http://www.bfr.bund.de/cm/349/health-assessment-of-sports-and-weight-loss-products-containing-synephrine-and-caffeine.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

BLUMENTHAL, M. Bitter orange peel and synephrine, part 1. **Whole Foods**, Nova Iorque, p. 77-79, 2005.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro Cytotoxicity Assays - The Neutral Red (NR) and Tetrazolium MTT Tests. **Toxicology in Vitro**, Nova Iorque, v. 2, n. 1, p. 1-6, 1988.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução De Diretoria Colegiada – RDC Nº 18, de 27 De Abril de 2010. Suplementos Alimentares para Atletas**. Brasília, 2010. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_18_2010_COMP.pdf/1f6e1baf-fd83-4408-8e97-07578fe3db18> Acesso em: 20 jan. 2018.

BRASIL (a). MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Obesidade no Brasil**. Brasília, 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/04/obesidade-cresce-60-em-dez-anos-no-brasil>>. Acesso em: 12 out. 2017.

BRASIL (b). MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Suplementos alimentares: Documento de base para discussão regulatória**. Brasília, 2017. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/3322895/Documento+de+base+sobre+regulamenta%C3%A7%C3%A3o+de+suplementos+alimentares/2e334a9e-a456-48ef-981e-ef54f3b9029a>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 625-631, 2007.

BOUCHARD, N. C. et al. Ischemic stroke associated with use of an ephedra-free dietary supplement containing synephrine. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, Rochester, 2005. p. 541-545.

BRANDON, E. F. A. et al. Validation of in vitro cell models used in drug metabolism and transport studies; genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporter polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian carcinoma (IGROV-1) and colon carcinoma (Caco-2, LS180) cell lines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Nova Iorque, v. 211, n. 1, p. 1-10, 2006.

BREDHOLT, T. et al. Distinct single cell signal transduction signatures in leukocyte subsets stimulated with khat extract, amphetamine-like cathinone, cathine or norephedrine. **BMC Pharmacology and Toxicology**, Londres, v. 14, n. 1, p. 35, 2013.

BUI, L. T.; NGUYEN, D. T.; AMBROSE, P. J. Blood pressure and heart rate effects following a single dose of bitter orange, **Annals of Pharmacotherapy**, Cincinnati, v. 40, n. 1, p. 53-57, 2006.

CALLE, E. E. et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 2003, n. 348, p. 1625-1638, 2003.

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, placebocontrolled, cross-over trial. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, Woodland, v. 13, n. 1, p. 14, 2016.

CARVALHO, M. et al. Hepatotoxicity of 3, 4-methylenedioxyamphetamine and α -methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates. **Archives of Toxicology**, Berlim, v. 78, n. 1, p. 16-24, 2004.

CARVALHO, M. et al. Toxicity of amphetamines: an update. **Archives of Toxicology**, Berlim, v. 86, n. 8, p. 1167-1231, 2012.

CETRULLO, S. et al. mTOR, AMPK, and Sirt1: key players in metabolic stress management. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, Danbury, v. 25, n. 1, p. 59-75, 2015.

CLOTHIER, R. et al. Comparative analysis of eight cytotoxicity assays evaluated within the ACuteTox Project. **Toxicology in Vitro**, Nova Iorque, v. 27, n. 4, p. 1347-1356, 2013.

COLDITZ, G. A.; PETERSON, L. L. Obesity and Cancer: Evidence, Impact, and Future Directions. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 64, n. 1, p. 154-162, 2018.

COLLINS, A. R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 681, n. 1, p. 24-32, 2009.

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

CUI, Z. et al. p-Synephrine Suppresses Glucose Production but Not Lipid Accumulation in H4IIE Liver Cells. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 18, n. 1, p. 76-82, 2015.

DA COSTA, L. A.; BADAWI, A.; EL-SOHEMY, A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. **Annals of Nutrition and Metabolism**, Basel, v. 60, n. 3, p. 27-36, 2012.

DA COSTA LOPES, L. et al. Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 116, n. 3, p. 189-198, 2000.

DEEPAK, S. A. et al. Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. **Current Genomics**, Paris, v. 8, n. 4, p. 234-251, 2007.

DA SILVA-PEREIRA, J. F. et al. Fast hepatic biotransformation of p-synephrine and p-octopamine and implications for their oral intake. **Food & Function**, Cambridge, v. 7, n. 3, p. 1483-1491, 2016.

DELEVE, L. D.; KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 287-305, 1991.

DE OLIVEIRA, A. L. et al. The action of p-Synephrine on hepatic carbohydrate metabolism and respiration occurs via Ca²⁺-metabolism and cAMP production. **Molecular Cell Biochemistry**, Hague, v. 388, n. 1-2, p. 135-147, 2014.

DESHMUKH, N. S. et al. Citrus aurantium (bitter orange) extract: Safety assessment by acute and 14-day oral toxicity studies in rats and the Ames Test for mutagenicity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Nova lorque, v. 90, p. 318-327, 2017.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, Nova lorque, v. 86, p. 421-431, 1990.

DWYER, J. T.; ALLISON, D. B.; COATES, P. M. et al. Dietary supplements in weight reduction. **Journal of the American Dietetic Association**, Chigago, v. 105, n. 5, p. 80-86, 2005.

EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Nova lorque, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1989.

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, n. 1, p. 73-77, 2013.

EKHLAS, M. F. The Cytogenetic Effects of some agricultural waste extracts on Cultured Human Lymphocytes. **International Journal of Innovation and Applied Studies**, Paris, v. 8, n. 2, p. 489, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry and Review Staff Recommended Approaches to Integration of Genetic Toxicology Study Results, 2006**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>. Acesso em: 15, Fev. 2017.

FEDERICO, A. et al. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, Nova lorque, v. 121, n. 11, p. 2381-2386, 2007.

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

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; GALAPAI, C. Adverse reaction to an adrenergic herbal extract (*Citrus aurantium*). **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 12, n. 3, p. 247-248, 2005.

FORETZ, M. et al. Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. **Diabetes**, Nova lorque, v. 54, n. 5, p. 1331-1339, 2005.

FOWLER, P. et al. Reduction of misleading (“false”) positive results in mammalian cell genotoxicity assays, I, Choice of cell type. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 742, n. 1, p. 11-25, 2012.

FUGH-BERGMAN, A.; MYERS, D. *Citrus aurantium*, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research. **Experimental Biology and Medicine**, Basel, v. 299, n. 8, p. 698–704, 2004.

FUKUSHIMA, T.; TANAKA, H.; YAMAMOTO, T. Comparative Study of Cigarette Smoke Cytotoxicity Using Two In Vitro Assay Systems. **Beiträge zur Tabakforschung/Contributions to Tobacco Research**, Sofia, v. 26, n. 3, p. 98-108, 2014.

FRÖHLICH, E.; SALAR-BEHZADI, S. Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: Role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, n. 3, p. 4795-4822, 2014.

GALADARI, S. et al. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? **Free Radicals and Biological Medicine**, Amsterdam, v. 104, p. 144-164, 2017.

GALLOWAY, S. M. International regulatory requirements for genotoxicity testing for pharmaceuticals used in human medicine, and their impurities and metabolites. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Nova lorque, v. 58, n. 5, p. 296-324, 2017.

GANGE, C. A. et al. Variant angina associated with bitter orange in a dietary supplement. **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, v. 84, n. 4, p. 545–548, 2006.

GANNON, N. P.; CONN, C. A.; VAUGHAN, R. A. Dietary stimulators of GLUT4 expression and translocation in skeletal muscle: A mini-review. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 59, n. 1, p. 48-64, 2015.

GAO, P. et al. Stable immediate early gene expression patterns in medial prefrontal cortex and striatum after long-term cocaine self-administration. **Addiction Biology**, Abingdon, v. 22, n. 2, p. 354-368, 2017.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 45-80, 2005.

GRANDY, D. K. Trace amine-associated receptor 1 – family archetype or iconoclast? **Pharmacology Therapy**, Basel, v. 116, n. 3, p. 355-390, 2007.

GUPTA, R. K. et al. Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 15, p. 4405-4409, 2015.

GURER-ORHAN, H.; SABIR, H. U.; ÖZGÜNEŞ, H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. **Toxicology**, Amsterdam, v. 195, n. 2, p. 147-154, 2004.

HAAZ, S. et al. Citrus aurantium and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update. **Obesity Reviews**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 79-88, 2006.

HAGHDOOST, S. et al. Extracellular 8-oxo-dG as a sensitive parameter for oxidative stress in vivo and in vitro. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 39, n. 2, p. 153-162, 2005.

HALLER, C. A. et al. Synephrine pharmacokinetics and cardiovascular changes after ingestion of citrus aurantium dietary supplements. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, Saint Louis, v. 77, n. 2, p. 5, 2005.

HALLER, C. A. et al. Human pharmacology of a performance-enhancing dietary supplement under resting and exercise conditions. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Londres, v. 65, n. 6, p. 833–840, 2008,

HALLIWELL, B. Commentary oxidative stress, nutrition and health, Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 25, n. 1, p. 57-74, 1996.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochemical Journal**, Londres, v. 401, n. 1, p. 1–11, 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British Journal of Pharmacology**, Londres, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HANSEN, D. K. et al. Developmental toxicity of Citrus aurantium in rats. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, Hoboken, v. 92, n. 3, p. 216-223, 2011.

HANSEN, D. K. et al. Physiological effects following administration of Citrus aurantium for 28days in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Nova Iorque, v. 261, n. 3, p. 236-247, 2012.

HANSEN, D. K. et al., Cardiovascular toxicity of Citrus aurantium in exercised rats. **Cardiovascular Toxicology**, Londres, v. 13, n. 3, p. 208-219, 2013.

HARDIE, D. G. AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. **Diabetes**, Nova lorque, v. 62, n. 7, p. 2164-2172, 2013.

HARDIE, D. G. AMPK—sensing energy while talking to other signaling pathways. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 20, n. 6, p. 939-952, 2014.

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

HWANG, E-S.; KIM, G-H. RETRACTED: Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. **Toxicology**, Amsterdam, v. 229, n. 5, p. 1-10, 2007.

IBRAHIM, K. E. et al. The mammalian metabolism of R-(-)-m-syneprine. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Londres, v. 35, n. 3, p. 144-147, 1983.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **ICH S2 R1: Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use**. Geneva, 2012. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/safety/safety-single/article/guidance-on-genotoxicity-testing-and-data-interpretation-for-pharmaceuticals-intended-for-human-use.html>>. Acesso em 20 mar. 2014.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, Londres, v. 461, n. 7267, p. 1071-1078, 2009.

JI, Z. et al. Global regulatory requirements for mutagenicity assessment in the registration of industrial chemicals. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Nova lorque, v. 58, n. 5, p. 345-353, 2017.

JUDSON, R. et al. Editor's highlight: analysis of the effects of cell stress and cytotoxicity on *in vitro* assay activity across a diverse chemical and assay space. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 152, n. 2, p. 323-339, 2016.

KAHN, B. B. et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 15-25, 2005.

KERN, P. A. et al. Adiponectin expression from human adipose tissue. **Diabetes**, Nova lorque, v. 52, n. 7, p. 1779-1785, 2003.

KIRKLAND, D. et al. How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 628, n. 1, p. 31-55, 2007.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Commentary: critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals—a HUMN project perspective. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 759, p. 49-58, 2014.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Nova Iorque, v. 35b, n. 3, p. 167-172, 2000.

KISS, L. et al. Sucrose Esters Increase Drug Penetration, But Do Not Inhibit P-Glycoprotein in Caco-2 Intestinal Epithelial Cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 103, n. 10, p. 3107-3119, 2014.

KNASMULLER, S. et al. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 198, n. 1, p. 315-328, 2004.

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

KOVACIC, P.; COOKSY, A. L. Unifying mechanism for toxicity and addiction by abused drugs: electron transfer and reactive oxygen species. **Medical Hypotheses**, Edinburgh, v. 64, n. 2, p. 357-366, 2005.

KRASNOVA, I. N.; CADET, J. L. Methamphetamine toxicity and messengers of death. **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 379-407, 2009.

KUSU, F. et al. Determination of synephrine enantiomers in food and conjugated synephrine in urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 235, n. 2, p. 191-194, 1996.

LAGE, R. et al. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 14, n. 12, p. 539-549, 2008.

LAUBY-SECRETAN, B. et al. Body fatness and cancer—viewpoint of the IARC Working Group. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 375, n. 8, p. 794-798, 2016.

LEAL, L. K. A. M. et al. Amburoside A, a glucoside from *Amburanacearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 388, n. 2, p. 86-90, 2005.

LEI, X. G. et al. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 96, n. 1, p. 307-364, 2016.

LI, X-W.; TUERGAN, M.; ABULIZI, G. Expression of MAPK1 in cervical cancer and effect of MAPK1 gene silencing on epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Hainan, v. 8, n. 11, p. 937-943, 2015.

LUSHCHAK, V. I. Time-course and intensity-based classifications of oxidative stresses and their potential application in biomedical, comparative and environmental research. **Redox Report**, Londres, v. 21, n. 6, p. 262-270, 2016.

LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 4, p. 1-17, 2013.

MACCIONI, R. B. et al. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Nova Iorque, v. 1153, n. 1, p. 240-246, 2009.

MAFFEI, F. et al. Micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes as a biomarker for the early detection of colorectal cancer risk. **Mutagenesis**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 221-225, 2014.

MAHADEVAN, B. et al. Genetic Toxicology in the 21st Century: Reflections and Future Directions. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Nova Iorque, v. 52, n. 5, p. 339-354, 2011.

MALDONADO, M. R. et al. Actions of p-synephrine on hepatic enzyme activities linked to carbohydrate metabolism and ATP levels in vivo and in the perfused rat liver. **Cell Biochemistry and Function**, Nova Iorque, v. 36, n. 1, p. 4-12, 2018.

MARÍ, M. et al. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. **Antioxidants & Redox Signaling**, Nova Iorque, v. 11, n. 11, p. 2685-2700, 2009.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 361-370, 2000.

MAURO, C. et al. NF- κ B controls energy homeostasis and metabolic adaptation by upregulating mitochondrial respiration. **Nature Cell Biology**, Londres, v. 13, n. 10, p. 1272-1279, 2011.

MCGREGOR, D. B. et al. Reactivity of catecholamines and related substances in the mouse lymphoma L5178Y cell assay for mutagens. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Nova Iorque, v. 11, n. 4, p. 523-544, 1988.

MIGLIORE, L. et al. Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. **Mutagenesis**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 85-92, 2011.

MIHAYLOVA, M. M.; SHAW, R. J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. **Nature Cell Biology**, Londres, v. 13, n. 9, p. 1016-1023, 2011.

MILIC, M. et al. DNA damage in non-communicable diseases: A clinical and epidemiological perspective. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 776, p.118-127, 2015.

MITRA, S. et al. Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Malden, v. 38, n. 2-3, p. 180-190, 2001.

MOADDEB, J.; TOFADE, T. S.; BEVINS, M. B. Hypertensive urgency associated with Xenadrine EFX use. **Journal of Pharmacy Practice**, Bruxelas, v. 24, n. 4, p. 400-403, 2011.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A. et al. Comparative In Vitro Cytotoxicity of 20 Potential Food Ingredients in Canine Liver, Kidney, Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, and Enterocyte-like Cells. **Applied in Vitro Toxicology**, Baltimore, v. 1, n. 4, p. 276-288, 2015.

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

NATOLI, M. et al. Good Caco-2 cell culture practices. **Toxicology in Vitro**, Nova Iorque, v. 26, n. 8, p. 1243-1246, 2012.

NERSESYAN, A. et al. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: past, present and future. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 770, Part. A, p. 1-11, 2016.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES (NTP/NIEHS). National Institutes of Health U.S.; Department of Health and Human Services. **Bitter Orange (Citrus aurantium var, amara) Extracts and Constituents (±)-p-Synephrine [CAS No, 94-07-5] and (±)-p-Octopamine [CAS No. 104-14-3]**. Research Triangle Park, 2004. Disponível em:

<https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/bitterorange_508.pdf> Acesso em: 15 out. 2016.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, Londres, v. 1, n. 3, p. 1559-1582, 2006.

NOZAL, M. J. et al. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). **Journal of Chromatography A**, Nova Iorque, v. 778, n. 1-2, p. 347-353, 1997.

ODENTHAL, J. et al. The influence of curcumin, quercetin, and eicosapentaenoic acid on the expression of phase II detoxification enzymes in the intestinal cell lines HT-29, Caco-2, HuTu 80, and LT97. **Nutrition and Cancer**, Hillsdale, v. 64, n. 6, p. 856-863, 2012.

O'FLANAGAN, C. H.; BOWERS, L. W.; HURSTING, S. D. A weighty problem: metabolic perturbations and the obesity-cancer link. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, Birmingham, v. 23, n. 2, p. 47-57, 2015.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline 432 in vitro 3T3 nru phototoxicity test (original guideline, adopted 13th April 2004). **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Berlim, 2004. Disponível em: PDF edition (ISSN 1607-310X).

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**. OECD Publishing, Berlim, 2014.

O'ROURKE, R. W. Obesity and cancer: at the crossroads of cellular metabolism and proliferation **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1208, 2014.

PETKOV, P. I. et al. A feasibility study: Can information collected to classify for mutagenicity be informative in predicting carcinogenicity?. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Nova Iorque, v. 72, n. 1, p. 17-25, 2015.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 30, n. 9, p. e36-e36, 2002.

POTTENGER, L. H.; GOLLAPUDI, B. B. Genotoxicity Testing: Moving Beyond Qualitative "Screen and Bin" Approach Towards Characterization of Dose-Response and Thresholds. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Malden, v. 51, n. 8-9, p. 792-799, 2010.

POTTERS, G.; HOREMANS, N.; JANSEN, M. A. The cellular redox state in plant stress biology—a charging concept. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 5, p. 292-300, 2010.

RANI, V. et al. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sciences**, Oxford, v. 148, p. 183-193, 2016.

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, v. 12, n. 1, p. 35, 2015.

RAU, T, F. et al. Low dose methamphetamine mediates neuroprotection through a PI3K-AKT pathway. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 61, n. 4, p. 677-686, 2011.

RENEHAN, A. G. et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **The Lancet**, Minneapolis, v. 371, n. 9612, p. 569-578, 2008.

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

ROH, K-B. et al. Synephrine inhibits Eotaxin-1 Expression via the STAT6 Signaling Pathway. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 8, p. 11883-11895, 2014.

ROTHEN-RUTISHAUSER, F. et al. In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, Londres, v. 4, n. 8, p. 1075–1089, 2008.

ROOS, W. P.; THOMAS, A. D.; KAINA, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. **Nature Reviews Cancer**, Londres, v. 16 n. 1, p. 20-33, 2016.

ROSSATO, L. G. et al. Development and validation of a GC/IT-MS method for simultaneous quantitation of para and meta-syneprine in biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 52, n. 5, 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, n. 1, p. 8-16, 2011.

SALMINEN, A.; HYTTINEN, J. M. T.; KAARNIRANTA, K. et al. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. **Journal of Molecular Medicine**, Heidelberg, v. 89, n. 7, p. 667-676, 2011.

SAMBUY, Y. et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. **Cell Biology and Toxicology**, Princeton, v. 21, n. 1, p. 1-26, 2005.

SARWAR, M. et al. Protein kinase A (PKA) pathway is functionally linked to androgen receptor (AR) in the progression of prostate cancer. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier, Nova Iorque, 2014. p. 25. e1-25. e12.

SARBASSOV, D. D. et al. Phosphorylation and regulation of AKT/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, Washington, v. 307, n. 5712, p. 1098-1101, 2005.

SVOBODA, P.; HARMS-RINGDAHL, M. Protection or sensitization by thiols or ascorbate in irradiated solutions of DNA or deoxyguanosine. **Radiation Research**, Nova Iorque, v. 151, n. 5, p. 605-616, 1999.

SCHERLIEß, R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 411, n. 1, p. 98-105, 2011.

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-syneprine, ephedrine, salicin, and caffeine. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 52, n. 1, p. 59-68, 2016.

SHIEH, S-Y. et al. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. **Genes & Development**, Harbor, v. 14, n. 3, p. 289-300, 2000.

SILVA, D. D.; SILVA, E.; CARMO, H. Combination effects of amphetamines under hyperthermia-the role played by oxidative stress. **Journal of Applied Toxicology**, Chinchester, v. 34, n. 6, p. 637-650, 2014.

SPEIDEL, D. The role of DNA damage responses in p53 biology. **Archives of Toxicology**, Berlim, v. 89, n. 4, p. 501-517, 2015.

STOHS, S. J. Assessment of the adverse event reports associated with *Citrus aurantium* (bitter orange) from April 2004 to October 2009. **Journal of Funcional Foods 2**, Houston, v. 2, n. 4, p. 235-238, 2010.

STOHS, S. J.; PREUS, H. G.; SHARA, M. The safety of *Citrus aurantium* (Bitter Orange) and its primary Protoalkaloid *p*-Synephrine. **Phytotherapy Research**, Londres, v. 25, n. 10, p. 1421-1428, 2011.

STOHS, S. J.; PREUS, H. G.; SHARA, M. A review of human clinical studies involving *Citrus aurantium* (Bitter Orange) extract) and its primary Protoalkaloid *p*-Synephrine. **International Journal of Medical Sciences**, Blue Haven, v. 9, n. 7, p. 527-538, 2012.

STOHS, S. J.; BADMAEV, V. A. Review of natural stimulant and non-stimulant thermogenic agents. **Phytotherapy Research**, Londres, v. 30, n. 5, p. 732-740, 2016.

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

SUZUKI, O. et al. Oxidation of synephrine by type A and type B monoamine oxidase. **Experientia**, Basel, v. 35, n. 10, p. 1283-1284, 1979.

SZYCHOWSKI, K. A. et al. Tetrabromobisphenol A (TBBPA)-stimulated reactive oxygen species (ROS) production in cell-free model using the 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate. **Environmental Science and Pollution Research**, Nova lorque, v. 23, n. 12, p. 12246-12252, 2016.

TASLIMI, P.; AKINCIOGLU, H.; GÜLÇİN, İ. Synephrine and phenylephrine act as α -amylase, α -glycosidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carbonic anhydrase enzymes inhibitors. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, Nova lorque, v. 31, n. 11, p. 1-6, 2017.

TAPPEL, A. L. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. **Methods in Enzymology**, Nova lorque, v. 52, p. 506-513, 1978.

TARANTINI, A. et al. Toxicity, genotoxicity and proinflammatory effects of amorphous nanosilica in the human intestinal Caco-2 cell line. **Toxicology in Vitro**, Nova lorque, v. 29, n. 2, p. 398-407, 2015.

THOMAS, J. E. et al. STEMI in a 24-year-old man after use of a synephrine-containing dietary supplement: a case report and review of the literature. **Texas Heart Institute Journal**, Houston, v. 36 n. 6, p. 586, 2009.

TICE, R. R. et al. The single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Nova lorque, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TRUJILLO, E.; DAVIS, C.; MILNER, J. Nutrigenomics, Proteomics, Metabolomics, and the Practice of Dietetics. **Journal of American Dietetic Association**, Chicago, v. 106, n. 3, p. 403-413, 2006.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. **Journal of Environmental Science and Health Part C**, Nova lorque, v. 27, n. 2, p. 120-139, 2009.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, Natick, v. 44, n. 5, p. 619, 2008.

VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. Duncan. et al. Limitations of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**, Londres, v. 8 n. 1, p. 1, 2015.

VELTRI, K. L.; ESPIRITU, M.; SINGH, G. Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. **Journal of Cellular Physiology**, Nova lorque, v. 143, n. 1, p. 160-164, 1990.

VIANA, C. et al. Liquid chromatographic determination of caffeine and adrenergic stimulants in food supplements sold in Brazilian e-commerce for weight loss and physical fitness. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Londres, v. 33 n. 1, p. 1-9, 2016.

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**, Nova lorque, v. 39, s/n, p. 104-110, 2017.

VODICKA, P. et al. DNA and chromosomal damage in medical workers exposed to anaesthetic gases assessed by the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay. A critical review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 770, p. 26-34, 2016.

XU, C. et al. A polysaccharide from Aloe vera L. var. chinensis (Haw.) Berger prevents damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa in vivo. **Journal of Functional Foods**, S/N, v. 24, p. 501-512, 2016.

YAMANO, K. et al. Prediction of midazolam—CYP3A inhibitors interaction in the human liver from in vivo/in vitro absorption, distribution, and metabolism data. **Drug Metabolism and Disposition**, Switzerland, v. 29, n. 4, p. 443-452, 2001.

YAN, S.; SORRELL, M.; BERMAN, Z. Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 71, n. 20, p. 3951-3967, 2014.

YANG, J. H. et al. Norepinephrine differentially modulates the innate inflammatory response provoked by amyloid- β peptide via action at β -adrenoceptors and activation of cAMP/PKA pathway in human THP-1 macrophages. **Experimental Neurology**, Nova lorque, v. 236, n. 2, p. 199-206, 2012.

ZLOTORYNSKI, E. DNA damage response: p53 curbs topological stress. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Londres, v. 17, n. 6, p. 332-332, 2016.

WEI, Y-J.; LI, K-A.; TONG, S-Y. The interaction of bromophenol blue with proteins in acidic solution. **Talanta**, Londres, v. 43, n. 1, p. 1-10, 1996.

WEINSTEIN, L. S. et al. The role of GNAS and other imprinted genes in the development of obesity. **International Journal of Obesity**, Londres, v. 34, n. 1, p. 6-17, 2010.

WILLIAMS, M. Dietary supplements and sports performance: herbals. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, Woodland Park, v. 3, n. 1, p. 1, 2006.

WHITAKER, A. M. et al. Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease. **Frontiers in Bioscience (Landmark edition)**, Tampa, v. 22, p. 1493, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and Overweight. **Fact sheet**. Zugegriffen, v. 26, 2014. Disponível em: <http://www.mclveganway.org.uk/publications/who_obesity_and_overweight.pdf> Acesso em: 14 dez. 2016.

8. APÊNDICES

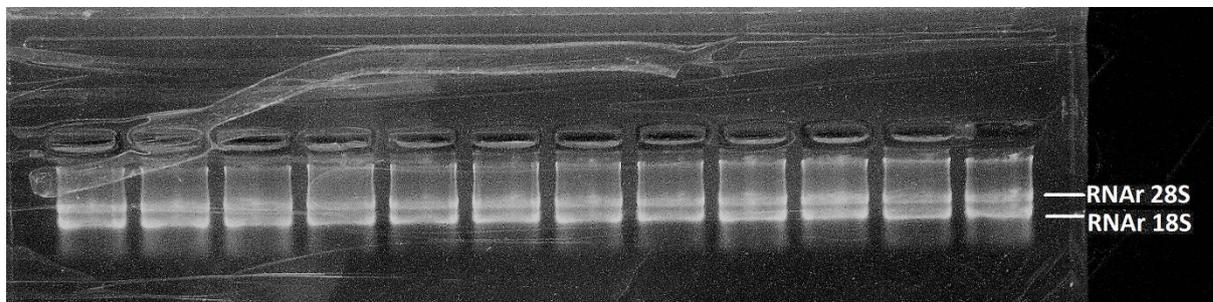
8.1. APÊNDICE 1. Micrografia de gel eletroforético em agarose a 1% para conferência da integridade do RNA total em células HepG2. A avaliação da integridade do RNA total consiste na observação das bandas correspondentes ao RNA ribossômico 28S (RNAr 28S) e ao RNA ribossômico 18S (RNAr 18S).

8.2. APÊNDICE 2. Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo energético e à danos no DNA em células HepG2 após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) no tempo de 6 horas. *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1* foram utilizados como genes de referência para a normalização.

8.3. APÊNDICE 3. Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo energético e à danos no DNA em células GAS após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) no tempo de 6 horas. *GAPDH*, *ACTB* e *HPRT1* foram utilizados como genes de referência para a normalização.

8.4. APÊNDICE 4. Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo energético e à danos no DNA em células Caco-2 após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 μM) no tempo de 6 horas. *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1* foram utilizados como genes de referência para a normalização.

8.1. APÊNDICE 1. Micrografia de gel eletroforético em agarose a 1% para conferência da integridade do RNA total em células HepG2. A avaliação da integridade do RNA total consiste na observação das bandas correspondentes ao RNA ribossômico 28S (RNAr 28S) e ao RNA ribossômico 18S (RNAr 18S).



8.2. APÊNDICE 2.

Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo energético e à danos no DNA em células HepG2 após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 µM) no tempo de 6 horas. *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1* foram utilizados como genes de referência para a normalização.

Gene (Símbolo)	Descrição do Gene	Sequência de referência (GeneBank)	CS (HClO ₄ - 0,05%)		SNF 2 µM ^a		SNF 20 µM ^a		SNF 200 µM ^a	
			FC	<i>p</i>	FC	<i>p</i>	FC	<i>p</i>	FC	<i>p</i>
<i>ATM</i>	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	NM_000051	1,01	0,401	1,18	0,078	1,31	0,031	1,00	0,48
<i>ATR</i>	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>	NM_001184	1,02	0,334	0,87	0,084	0,98	0,380	0,91	0,252
<i>CHEK1</i>	<i>Checkpoint Kinase 1</i>	NM_001244846	0,87	0,023	0,88	0,037	0,84	0,021	1,04	0,425
<i>CHEK2</i>	<i>Checkpoint Kinase 2</i>	NM_001005735	1,28	0,024	1,14	0,105	0,98	0,373	0,95	0,356
<i>TP53</i>	<i>Tumor Protein P53</i>	NM_000546	0,95	0,213	0,96	0,321	0,73	0,014	0,89	0,230
<i>SIRT1</i>	<i>Sirtuin 1</i>	NM_001142498	1,00	0,466	0,95	0,275	0,91	0,130	0,87	0,180
<i>ADRB3</i>	<i>Adrenoceptor Beta 3</i>	NM_000025	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>AKT1</i>	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>	NM_005163	0,89	0,074	0,87	0,076	0,55	0,002	0,28	0,001
<i>CDK1</i>	<i>Cyclin Dependent Kinase 1</i>	NM_001170406	0,99	0,463	0,97	0,344	0,88	0,079	0,92	0,283
<i>FOXO3</i>	<i>Forkhead Box O3</i>	NM_001455	1,22	0,034	1,00	0,488	0,94	0,203	1,12	0,243
<i>FOS</i>	<i>Fos Proto-Oncogene</i>	NM_005252	0,82	0,025	0,76	0,022	0,75	0,017	0,78	0,079
<i>HRAS</i>	<i>Harvey Rat Sarcoma Viral Proto- Oncogene</i>	NM_001130442	1,04	0,244	0,96	0,309	0,87	0,074	0,90	0,246

<i>PRKACA</i>	<i>Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Alpha</i>	NM_002730	1,06	0,120	0,94	0,238	0,85	0,052	0,93	0,304
<i>PRKAR2A</i>	<i>Protein Kinase CAMP-Dependent Type II Regulatory Subunit Alpha</i>	NM_004157	0,98	0,336	0,87	0,077	0,82	0,038	0,93	0,319
<i>SHC1</i>	<i>SHC Adaptor Protein 1</i>	NM_001202859	1,04	0,242	0,92	0,176	0,94	0,203	0,82	0,115
<i>ADCY3</i>	<i>Adenylate Cyclase 3</i>	NM_004036	1,20	0,039	1,09	0,179	1,07	0,197	1,07	0,328
<i>GNAS</i>	<i>Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Alpha Stimulating</i>	NM_001077488	0,99	0,496	0,95	0,258	0,92	0,149	0,83	0,122
<i>JUN</i>	<i>Jun Proto-Oncogene</i>	NM_002228	1,33	0,010	1,32	0,015	2,89	0,002	2,80	0,018
<i>LIPE</i>	<i>Lipase E, Hormone Sensitive Type</i>	NM_005357	0,86	0,039	0,45	0,001	0,27	0,001	0,34	0,002
<i>PIK3C2A</i>	<i>Phosphatidylinositol-4-Phosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Type 2 Alpha</i>	NM_002645	1,04	0,189	0,89	0,053	0,83	0,027	0,94	0,340
<i>PIK3R1</i>	<i>Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1</i>	NM_001242466	0,77	0,013	0,91	0,141	0,57	0,003	0,67	0,030
<i>MAPK1</i>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>	NM_002745	1,00	0,439	0,84	0,022	2,70	0,003	3,05	0,017
<i>RELA</i>	<i>Avian Reticuloendotheliosis Viral Proto-Oncogene (NF-KB Subunit)</i>	NM_021975	1,15	0,057	0,81	0,037	0,76	0,0186	0,43	0,004
<i>TNF</i>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	NM_000594	1,29	0,022	2,28	0,007	1,57	0,0138	2,10	0,027

SNF: Sinefrina; **CS:** Controle do Solvente; **NA:** Não amplificado; **FC:** *Fold Change* (expressão relativa dos genes de interesse em comparação aos genes de referência após cálculo matemático de $2^{-\Delta\Delta Ct}$); **p-value:** Valor estatístico de significância obtido após análise estatística pelo teste *t* - Student.

8.3. APÊNDICE 3.

Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo energético e à danos no DNA em células GAS após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 µM) no tempo de 6 horas. *GAPDH*, *ACTB* e *HPRT1* foram utilizados como genes de referência para a normalização.

Gene (Símbolo)	Descrição do Gene	Sequência de referência (GeneBank)	CS (HClO ₄ - 0,05%)		SNF 2 µM ^a		SNF 20 µM ^a		SNF 200 µM ^a	
			FC	<i>p</i>	FC	<i>p</i>	FC	<i>p</i>	FC	<i>p</i>
<i>ATM</i>	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	NM_000051	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>ATR</i>	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>	NM_001184	0,82	0,027	0,83	0,082	0,84	0,136	0,69	0,040
<i>CHEK1</i>	<i>Checkpoint Kinase 1</i>	NM_001244846	1,09	0,130	0,91	0,187	0,65	0,024	0,51	0,010
<i>CHEK2</i>	<i>Checkpoint Kinase 2</i>	NM_001005735	1,07	0,183	1,04	0,350	0,93	0,308	0,84	0,146
<i>TP53</i>	<i>Tumor Protein P53</i>	NM_000546	1,03	0,337	0,73	0,029	0,65	0,025	0,76	0,077
<i>SIRT1</i>	<i>Sirtuin 1</i>	NM_001142498	0,91	0,109	0,93	0,243	0,93	0,292	0,84	0,154
<i>ADRB3</i>	<i>Adrenoceptor Beta 3</i>	NM_000025	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>AKT1</i>	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>	NM_005163	0,93	0,154	1,63	0,028	1,50	0,058	1,92	0,037
<i>CDK1</i>	<i>Cyclin Dependent Kinase 1</i>	NM_001170406	0,89	0,072	0,98	0,431	1,05	0,377	1,00	0,489
<i>FOXO3</i>	<i>Forkhead Box O3</i>	NM_001455	0,84	0,037	0,89	0,161	0,88	0,190	0,88	0,215
<i>FOS</i>	<i>Fos Proto-Oncogene</i>	NM_005252	0,87	0,055	0,63	0,013	0,81	0,105	0,59	0,019
<i>HRAS</i>	<i>Harvey Rat Sarcoma Viral Proto-Oncogene</i>	NM_001130442	1,39	0,017	1,13	0,175	1,06	0,350	0,91	0,284

PRKACA	Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Alpha	NM_002730	0,98	0,374	0,92	0,235	0,92	0,276	0,81	0,115
PRKAR2A	Protein Kinase CAMP-Dependent Type II Regulatory Subunit Alpha	NM_004157	0,81	0,025	0,86	0,117	0,84	0,137	0,79	0,095
SHC1	SHC Adaptor Protein 1	NM_001202859	1,09	0,139	0,99	0,445	1,12	0,241	0,70	0,045
ADCY3	Adenylate Cyclase 3	NM_004036	1,11	0,106	4,11	0,008	1,04	0,391	1,00	0,488
GNAS	Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Alpha Stimulating	NM_001077488	1,04	0,287	0,99	0,469	0,98	0,434	0,84	0,146
JUN	Jun Proto-Oncogene	NM_002228	0,78	0,018	0,74	0,032	1,67	0,042	1,55	0,061
LIPE	Lipase E, Hormone Sensitive Type	NM_005357	1,08	0,144	1,05	0,328	1,00	0,487	0,82	0,131
PIK3C2A	Phosphatidylinositol-4-Phosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Type 2 Alpha	NM_002645	0,82	0,026	0,82	0,078	0,83	0,122	0,74	0,062
PIK3R1	Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1	NM_001242466	0,99	0,492	1,09	0,233	1,04	0,393	0,98	0,460
MAPK1	Mitogen-Activated Protein Kinase 1	NM_002745	0,96	0,285	0,94	0,299	2,62	0,019	2,32	0,027
RELA	Avian Reticuloendotheliosis Viral Proto-Oncogene (NF-KB Subunit)	NM_021975	0,89	0,088	1,03	0,390	0,90	0,216	0,74	0,058
TNF	Tumor Necrosis Factor	NM_000594	1,15	0,069	1,22	0,101	0,81	0,101	0,50	0,009

SNF: Sinefrina; **CS:** Controle do Solvente; **NA:** Não amplificado; **FC:** *Fold Change* (expressão relativa dos genes de interesse em comparação aos genes de referência após cálculo matemático de $2^{-\Delta\Delta Ct}$); **p-value:** Valor estatístico de significância obtido após análise estatística pelo teste *t* - Student.

8.4. APÊNDICE 4.

Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo energético e à danos no DNA em células Caco-2 após tratamento com diferentes concentrações de sinefrina (2, 20 e 200 µM) no tempo de 6 horas. *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1* foram utilizados como genes de referência para a normalização.

Gene (Símbolo)	Descrição do Gene	Sequência de referência (GeneBank)	CS (HClO ₄ - 0,05%)		SNF 2 µM ^a		SNF 20 µM ^a		SNF 200 µM ^a	
			FC	<i>p</i>	FC	<i>p</i>	FC	<i>p</i>	FC	<i>p</i>
<i>ATM</i>	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	NM_000051	0,93	0,258	1,68	0,025	0,93	0,226	1,40	0,018
<i>ATR</i>	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>	NM_001184	1,35	0,055	1,62	0,027	0,80	0,043	0,93	0,150
<i>CHEK1</i>	<i>Checkpoint Kinase 1</i>	NM_001244846	0,99	0,461	1,72	0,023	1,06	0,271	0,88	0,066
<i>CHEK2</i>	<i>Checkpoint Kinase 2</i>	NM_001005735	1,19	0,113	1,45	0,040	0,75	0,024	0,90	0,096
<i>TP53</i>	<i>Tumor Protein P53</i>	NM_000546	1,25	0,081	1,49	0,033	0,94	0,233	0,87	0,058
<i>SIRT1</i>	<i>Sirtuin 1</i>	NM_001142498	1,18	0,117	1,45	0,040	0,81	0,046	0,83	0,034
<i>ADRB3</i>	<i>Adrenoceptor Beta 3</i>	NM_000025	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>AKT1</i>	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>	NM_005163	1,23	0,092	2,17	0,014	0,57	0,005	1,64	0,010
<i>CDK1</i>	<i>Cyclin Dependent Kinase 1</i>	NM_001170406	0,98	0,434	1,35	0,055	0,80	0,043	1,02	0,398
<i>FOXO3</i>	<i>Forkhead Box O3</i>	NM_001455	1,14	0,154	1,11	0,193	0,67	0,012	0,87	0,055
<i>FOS</i>	<i>Fos Proto-Oncogene</i>	NM_005252	1,26	0,078	1,26	0,080	0,95	0,298	0,93	0,166
<i>HRAS</i>	<i>Harvey Rat Sarcoma Viral Proto-Oncogene</i>	NM_001130442	1,10	0,203	1,32	0,061	0,75	0,024	0,95	0,212

<i>PRKACA</i>	<i>Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Alpha</i>	NM_002730	1,33	0,059	1,70	0,024	0,70	0,015	1,03	0,308
<i>PRKAR2A</i>	<i>Protein Kinase CAMP-Dependent Type II Regulatory Subunit Alpha</i>	NM_004157	1,12	0,175	1,47	0,038	0,78	0,034	0,91	0,115
<i>SHC1</i>	<i>SHC Adaptor Protein 1</i>	NM_001202859	1,25	0,083	1,42	0,044	0,85	0,079	0,89	0,078
<i>ADCY3</i>	<i>Adenylate Cyclase 3</i>	NM_004036	1,06	0,296	1,23	0,089	0,69	0,014	0,76	0,015
<i>GNAS</i>	<i>Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Alpha Stimulating</i>	NM_001077488	1,19	0,115	1,50	0,035	0,90	0,136	1,12	0,098
<i>JUN</i>	<i>Jun Proto-Oncogene</i>	NM_002228	1,38	0,050	1,20	0,110	2,36	0,009	1,88	0,007
<i>LIPE</i>	<i>Lipase E, Hormone Sensitive Type</i>	NM_005357	0,77	0,043	1,06	0,293	0,92	0,197	0,85	0,045
<i>PIK3C2A</i>	<i>Phosphatidylinositol-4-Phosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Type 2 Alpha</i>	NM_002645	1,36	0,052	1,22	0,096	0,86	0,086	1,11	0,108
<i>PIK3R1</i>	<i>Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1</i>	NM_001242466	1,18	0,122	1,15	0,146	0,75	0,025	0,86	0,052
<i>MAPK1</i>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>	NM_002745	1,23	0,093	1,88	0,019	2,50	0,008	2,62	0,004
<i>RELA</i>	<i>Avian Reticuloendotheliosis Viral Proto-Oncogene (NF-KB Subunit)</i>	NM_021975	1,23	0,092	1,86	0,019	1,00	0,478	1,06	0,219
<i>TNF</i>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	NM_000594	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

SNF: Sinefrina; **CS:** Controle do Solvente; **NA:** Não amplificado; **FC:** *Fold Change* (expressão relativa dos genes de interesse em comparação aos genes de referência após cálculo matemático de $2^{-\Delta\Delta Ct}$); **p-value:** Valor estatístico de significância obtido após análise estatística pelo teste *t* – Student.

9. MANUSCRITO

Artigo a ser submetido para a revista **Chemico-Biological Interactions** (FI = 3,14).

Título: “**Genotoxicity, cytotoxicity and mutagenicity assessment of synephrine, a thermogenic supplement used to weight loss, in human hepatic cells *in vitro***”

Autores: **Diego Luis Ribeiro**, Ana Rita Thomazela Machado, Carla da Silva Machado, Lívia Cristina Hernandez, Alexandre Ferro Aissa, Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos e Lusânia Maria Gregg Antunes.

Genotoxicity, cytotoxicity and mutagenicity assessment of synephrine, a thermogenic supplement used to weight loss, in human hepatic cells in vitro

Diego Luis Ribeiro^a, Ana Rita Thomazela Machado^b, Carla da Silva Machado^a, Livia Cristina Hernandez^b, Alexandre Ferro Aissa^b, Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos^c and Lusânia Maria Greggi Antunes^{a,b*}

^aDepartament of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, University of São Paulo, Avenida dos Bandeirantes, 3900, CEP: 14040-901, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

^bDepartment 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.

^cDepartment of Biosciences, Institute of Health and Society, Federal University of São Paulo, Rua Silva Jardim, 136, CEP: 11015-020, Santos, São Paulo, Brazil.

***Corresponding author:** Lusânia Maria Greggi Antunes. Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Avenida do Café, s/n°, CEP: 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel: +55 16 3315-4294, e-mail: lusania@fcrp.usp.br

Highlights

- This study evaluated the toxic effects of the thermogenic synephrine (SN) in hepatic cells.
- SN causes cytostatic effects in micronucleus cytome.
- Intracellular ROS and increases of GPx/GSH enzymes indicate acute oxidative stress.
- SN does not induce cytotoxicity, DNA damage and alterations in gene expression.
- The findings indicate that acute SN treatments do not cause hazard effects in human liver cells.

Abstract

Synephrine (SN) is a substance contained in dietary supplements widely marketed for weight loss. The SN orally ingested in thermogenic supplements is fast absorbed and transformed in the liver, the main site of action. After metabolizing, the metabolites produced are related to the generation of reactive oxygen species (ROS) which could cause adverse health effects. However, studies about effects of SN on the DNA stability of human cells are fewer and not performed in hepatic cells. Using the *in vitro* model HepG2 cells, a human hepatocarcinoma cell, we investigated in this study the acute toxic properties of SN and its effects on the cell cycle, redox balance and on chromosomal stability. Results obtained in micronucleus (MNs) cytome experiments showed that SN at 200 μM induces cytostatic effects in HepG2 cells. When intracellular ROS (using H₂DCFDA probe) were measured all SN concentrations (2.0, 20.0 and 200 μM) increases ROS levels at 6 h and 24 h, only the higher SN concentration (200 μM) induced significant elevations. Furthermore, SN at 20.0 and 200 μM significantly increases the GPx/GSH enzymatic levels and confirms the ROS induced by SN. However, despite the ROS production induced by SN, the upregulation of defense systems (antioxidants and metabolizing enzymes) presents in hepatic cells were sufficient to protect HepG2 cells once no significant results of acute toxicity (2.00 – 5000 μM), cell cycle alterations and genotoxic/mutagenic effects (2.00 - 200 μM) were observed. In conclusion, SN after acute treatments in human hepatic HepG2 cells *in vitro* did not demonstrate cytotoxicity, cell cycle alterations, and genotoxic/mutagenic effects, although, studies in chronic exposures with SN are necessary to confirm the absence of hazard potential of this substance to thermogenic supplements users.

Keywords: acute toxicity, cell viability, DNA damage; micronucleus assay; redox status.

1. Introduction

Nowadays, due to lack of time for practicing physical exercises, one of the most frequently used strategies for weight loss is a caloric restriction and the ingestion of thermogenic and ergogenic supplements. Thermogenic supplements are widely consumed to decrease caloric intake and increase energy expenditure [1]. Many commercially available thermogenics contain substances such as synephrine (SN), caffeine, green tea and salicin in its composition [2-5].

SN is a proto-alkaloid naturally found in immature fruits and bark of *Citrus aurantium* (bitter orange) and is closely related to ephedrine and others catecholamines (i.e., epinephrine) [6]. This substance acts by activation of the β -3 adrenergic receptor and causes inhibition of appetite, induction of lipolysis and elevation in metabolic rates [6-8]. The SN usually added to thermogenic supplements can be prepared from plant extracts (which contains about 5–10% of SN) or as purified phytochemical (up to 95% of purity) [9]. However, early case reports published with humans have associated products containing SN with various adverse effects, such as myocardial infarction [10, 11], ischemic stroke [12], acute arterial hypertension [13] and tachycardia [14]. In addition to epidemiological reports with humans, others previous studies have been concerned reporting the absence of adverse effects of SN when tested in laboratory models [1, 3, 8, 9, 15-17].

After the ingestion, SN is highly absorbed (about 30-90% in 2 hours) by the gastrointestinal tract, and it is metabolized mainly in the liver, that receives this compound *via* the portal vein [18]. In liver, SN is a substrate for mitochondrial enzymes named monoamine oxidases (MAOs) that oxidizes SN to produces *p*- or *m*-hydroxymandelic acid [19]. The metabolite *p*-hydroxymandelic acid is related with the production of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H₂O₂), which can trigger disturbances in the redox status of the cells and induce oxidative stress [20, 21]. It is well established that ROS mediate direct

damage to the DNA causing single and double strand breaks, base oxidation, DNA adducts and crosslinks [22]. However, there are few reports concerning the assessment of the SN impact on induced DNA damage after acute exposures using human cells *in vitro*, and they are inconclusive. For example, in a recent review, Bakhiya et al. [9] listed only one study *in vitro* and founded that SN has no genotoxic activity when tested in L5178Y mouse lymphoma cells. Stohs et al. [23] described four different studies performed with *in vitro* models, and the results demonstrated that SN and its degradation products at plasmatic concentrations were no mutagenic, however, in human leukocytes increases in DNA damage (using comet assay) at concentrations $\geq 0.6 \mu\text{M}$ (100 ng/mL) were detected.

Therefore, to study and understand the impact of SN exposure in human cells is important using a cellular model derived from a “target organ” of SN action, such as the liver, where SN is metabolized mainly, and no studies were carried out concerning the impact on redox status and DNA stability. In this context, we used as a model the cell line HepG2, a hepatic cell line derived from human hepatocarcinoma, and considered a good experimental *in vitro* model for genotoxicity screening by presents some phase I and II metabolism enzymes, protein *p53* functionally active and efficient DNA repair system [24, 25]. Therefore, this study aimed to investigate the possible acute toxic properties of SN and its effects on the cell cycle, redox balance, chromosomal stability and on gene expression of gene involved in DNA damage signaling at concentrations which may be observed in the liver of users of thermogenic supplements and analyze the potential hazard of this substance.

2. Material and methods

2.1. Chemical reagents

SN (*p*-(±)synephrine; $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}(\text{CH}_2\text{NHCH}_3)\text{OH}$; purity $\geq 98\%$; CAS: 05-07-94; Figure 1), methyl methanesulfonate (MMS, CAS: 66-27-3), MTT (bromide [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-dipheniltetrazolium, CAS: 57360-69-7), neutral red (CAS: 553-24-2), cytochalasin-B (CAS: 14930-96-2), sodium citrate (CAS: 6132-04-3), perchloric acid (CAS: 7601-90-3), formaldehyde (CAS: 50-00-0), acridine orange (CAS: 494-38-2), hydrogen peroxide (CAS: 7722-84-1), ethanol (CAS: 64-17-5), methanol (CAS: 67-56-1), 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (CAS: 4091-99-0) and acetic acid (CAS: 64-19-7) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). GelRed came from Biotium (Fremont, CA, USA). Reagents for cell culture: DMEM (+) glucose, fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA 5X and antibiotic-antimycotic (streptomycin, amphotericin, and penicillin) mix 100 X came from Gibco (Carlsbad, CA, USA). For cell cycle analysis, was obtained the Cycle TEST PLUS DNA Reagent Kit (catalog #340242) from Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA). Glutathione Peroxidase (GPx) Activity Colorimetric Assay kit (catalog - #K762-100) was obtained from Biovision Inc. (Milpitas, CA, USA). The quantification of glutathione (GSH) (ThiolTracker Violet Kit - catalog #T10095); Catalase (CAT) (Amplex Red Catalase Assay kit – catalog #A22180); Superoxide Dismutase (SOD) (MitoSOX™ Mitochondrial Superoxide Indicator - catalog #M36008); low melting point (LMP) agarose (CAS: 39346-81-1), normal melting point (NMP) agarose (CAS: 9012-36-6), PureLink® RNA Mini Kit (catalog #12183018A), DNase I Amplification Grade (catalog #18068015) were obtained from Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR, USA). High Capacity cDNA Reverse Transcription (catalog #4368814), PowerUp SYBR Green Master Mix (catalog #4368577), MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate (catalog #4346907) and MicroAmp® Clear Adhesive Film (Cat. N° 4306311) were obtained of Applied Biosystems (Carlsbad, EUA). All other chemicals were analytical

grade products and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

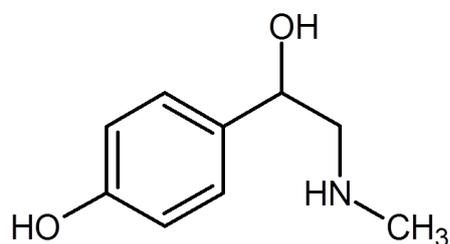


Fig. 1. Chemical structure of synephrine. Sigma-Aldrich®

2.2. Human cells and culture conditions

Cell culture procedures were performed according to Bal-Price and Coecke [26]. Human hepatocarcinoma cells (HepG2) line were obtained from the ATCC (American Type Culture Collection, catalog #HB-8065) and provided by the Hemocentre of the Hospital das Clínicas of the Ribeirão Preto Medical School – University of Sao Paulo. The cells were grown in DMEM (Gibco - Carlsbad, USA) with 10% of FBS and 1% of Antibiotic-Antimycotic (10000 units/mL penicillin, 10000 µg/mL streptomycin and 25 µg/mL amphotericin B) and 0.024% of sodium bicarbonate in a CO₂ incubator with 5% atmosphere at 37°C and 96% relative humidity. All experiments were conducted between the third and eighth cell passage.

2.3. Solution of the tested compound

SN (purity ≥ 98%) was diluted with perchloric acid (HClO₄) at 5.0%, as recommended by Rossato et al. [27] in a stock solution of 500 mM. Subsequently, different concentrations were made and used in the different experimental series.

2.4. Cytotoxicity assays

2.4.1. *MTT assays*

1×10^4 cells were seeded in 96 well culture plates (TPP; Trasadingen, Switzerland) for 24 h. Subsequently, the plates were treated with different SN concentrations (25 - 5000 μ M) for the period of 24 h. Experiments with the positive control (MMS) were also carried out, under the identical conditions. The MTT assays were performed according to the protocol described by Mosmann [28]. After exposure of the cells, MTT solution (5.0 mg/mL) was added to each well and incubated for further 4 h. Finally, the medium with the MTT solution was removed, and the absorbance was measured using a spectrophotometer (Biotek Elx800 – Winooski, USA; λ 570 nm). Values obtained with the negative control (PBS; pH 7.4) were considered as 100%. All experiments were done in duplicate, and 7 measurements were conducted in parallel per each experimental point. Results are expressed as the percentage (%) of viable cells mean \pm standard deviations (SD).

2.4.2. *Neutral Red (NR) assays*

The experiments were performed as previously described by Repetto et al. [29]. For NR uptake assays, 5×10^4 cells were seeded in 96 well culture plates (TPP; Trasadingen, Switzerland) and incubated for 24 h. Subsequently, the cells were treated with SN for 24 h. After the treatments, the culture medium was removed, and NR solution (40 μ g/mL) was added to each well and incubated for further 2 h. Subsequently, the cells were washed with PBS (pH 7.4), and NR extraction solution added to each well. Absorbance was measured with a spectrophotometer (Biotek Elx800 – Winooski, USA; λ 540 nm). The values of the negative control were considered as 100%. All experiments were run in duplicate, and 4 measurements were conducted in parallel per each experimental point. Results are expressed as the % of viable cells mean \pm standard deviations (SD).

2.5. *Cell cycle kinetics by flow cytometry*

1×10^5 cells (HepG2) were seeded in 24 well culture plates (TPP; Trasadingen, Switzerland) for 24 h, subsequently the culture medium was replaced by complete culture medium containing three different concentrations of SN (2.00, 20.0 and 200 μM), or by the respective controls, negative (PBS; pH 7.4), positive (MMS – 300 μM) and solvent (HClO_4 - 0.050%) for 24 h. Flow cytometry was performed according to the protocol described by the manufacturer. Data were analyzed using the Cell Quest software (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ, USA) and cell cycle profiles were designed using the FlowJo software (Tree Star Incorporation; Ashland, OR, USA). Results are expressed as % of cells in each cell cycle. For each experimental point, were performed three cultures in parallel.

2.6. Comet assay

Comet assay was performed according to the protocol of Tice et al. [30]. 3×10^5 cells (HepG2) were seeded in 24 well plates (TPP; Trasadingen, Switzerland) with complete culture medium and cultivated under standard conditions for 24 h. Cells were treated with SN (2.00, 20.0 and 200 μM) for the period of 4 h. Positive (MMS – 300 μM), solvent (HClO_4 - 0.050%) and negative (PBS; pH 7.4) controls in all experiments were included. Cell viability was determined by trypan blue exclusion technique using cell-counting equipment Countess Automated Cell Counter (Life Technologies; Carlsbad, CA, USA) and only the treatments that showed viability above 90% were subjected to the comet assay. 20 μL of the cell suspensions were transferred to agarose-coated slides which were coverslipped and cooled at 4°C for 20 min. Then, the coverslips were removed and slides immersed in freshly prepared lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10) and maintained for 1 h at 4°C . After that, they were transferred to an electrophoresis chamber with buffer (300 mM NaOH and 1.0 mM EDTA pH>13) and electrophoresis was conducted under standard conditions (25 V; 300 mA; 1.25 Vcm^{-1}) for 20 min. Subsequently, the slides were neutralized (0,4 M Tris, pH 7,5), air-

dried and fixed in absolute ethanol for 5 min. Slides were stained with GelRed [1: 10.000 v/v (GR/PBS); pH 7.4] and analyzed with a fluorescence microscopy (Carl Zeiss, Axiostar Plus, Jena, Germany). For each experimental point, three cultures in parallel were performed. For each culture, 100 nucleoids (300 nucleoids in total) were evaluated with CometAssay IV software (Perceptive Instruments, England, UK). The % of DNA in the tail (*Tail Intensity*) was used as parameter for analysis. Results are expressed as mean \pm SD.

2.7. Cytokinesis block micronucleus cytome (CBMN-Cyt) assays

Chromosomal instability was evaluated by CBMN-Cyt assay as described by Fenech [31] with minor modifications. 5×10^5 cells were seeded in 6-well (TPP; Trasadingen, Switzerland) cultures plates for 24 h; then the culture medium was replaced by solutions containing different concentrations of SN (2.00, 20.0 and 200 μ M) for further 24 h. Positive (MMS – 300 μ M), solvent (HClO₄ - 0.050%) and negative (PBS; pH 7.4) controls were included in all experiments. After the treatment, cultures were washed with PBS, and the fresh complete medium containing 4.5 μ g/mL of cytochalasin B was added for 30 h. Subsequently, the cells were washed, trypsinized and centrifuged for 5 min at 174 g. Then, the pellets were resuspended in 5 mL of hypotonic solution (sodium citrate 1% at 4°C) and formaldehyde (4%) for 8 min to avoid cell membrane disruption. The cells were centrifuged twice and fixed in with methanol and acetic acid (3:1) and then, the slides where prepared. The slides were stained with acridine orange solution (108 μ M) and analyzed by fluorescence microscopy (Carl Zeiss, Axiostar Plus, Jena, Germany).

The analysis was carried out according to the scoring criteria by Fenech [31]. Micronuclei (MNi), nucleoplasmic bridges (NPBs) and nuclear buds (NBUDs) were evaluated. For each experimental point, three cultures in parallel were performed. In total, 3000 binucleated cells (1000 cells per culture) were analyzed per experimental point. The Nuclear

Division Index (NDI) was determined in the 1500 cells (500 cells per culture) according to the formula proposed by Eastmond and Tucker [32]. The results are expressed as mean of MN frequencies (per 1000 cells) \pm SD.

2.8. Determination of intracellular ROS levels

Intracellular ROS levels were measured with H₂DCFDA according to the protocol described by Wang and Joseph [33] following the directions recommended by the manufacturer. 1×10^4 cells were seeded in 96 well culture sterile black plates for a period of 24 h. Subsequently, the cells were exposed to 2.00, 20.0 and 200 μ M of SN or to the respective negative (PBS; pH 7.4) and solvent (HClO₄ - 0.050%) controls for 6 and 24 h. After the treatment, the cells were washed with PBS (pH 7.4); then, H₂DCFDA working solution (10 μ M) was added and incubated at 37°C for 30 min. Due to the capacity of cellular peroxidases in catalyzing the probe oxidation, hydrogen peroxide (H₂O₂ - 1.0 mM) was used as a marker of cellular ROS and added for 15 min [34]. Finally, 100 μ L of PBS (pH 7.4) was added to each well and the fluorescence intensity (FI) was measured with a CaryEclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; excitation λ 485 nm and emission λ 528 nm). All experiments were carried in duplicate and 3 measurements were conducted in parallel per each experimental point. Results are presented as the fluorescence intensity \pm SD (arbitrary units). The FI obtained was converted in percentage (%) of intracellular ROS levels after normalization with the negative control group (PBS) where these was considered with FI (% Intracellular ROS levels) = 100%. The treatments were compared in relation to the control.

2.9. Enzymatic quantifications

The enzymatic levels of intracellular reduced glutathione (GSH), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) were monitored using the ThiolTracker Violet (Glutathione Detection Reagent) kit; Amplex Red Catalase Assay ThiolTracker Violet kit; MitoSOX Mitochondrial Superoxide Indicator kit and Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay kit, respectively, according to the manufacturer's instructions. Quantification of reactive substances to thiobarbituric acid (TBARs), and malondialdehyde (MDA) was carried out as described by Leal et al. [35]. In all procedures, the cells were exposed to 2.00, 20.0 and 200 μ M of SN or to the respective negative (PBS; pH 7.4) and solvent (HClO₄ - 0.050%) controls for 24 h. The complete description of methods, experimental procedures, treatments, and measurements are available in Supplementary Material I.

2.10. Statistical analysis

The results of cytotoxicity assays (MTT and NR), cell proliferation (flow cytometry), comet assay, CBMN-Cyt (including NDI experiments), ROS and enzymatic measurements (GSH, CAT, SOD, GPx, and MDA) were analyzed with the Shapiro-Wilk normality test. For assays that showed non-parametric distribution (MTT, NR, cell proliferation, comet assay and CBMN-Cyt) Kruskal-Wallis test were run ($p \leq 0.05$). For samples with parametric distribution (determination of ROS, GSH, CAT, SOD, GPx, MDA and flow cytometry), the data were analyzed with ANOVA followed by Dunnett test, considering values of $p \leq 0.05$ as significant. Statistical analyses were performed with the SPSS Statistics software 20 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp., USA) and figures were drawn using the GraphPad Prism 6.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA). All data are presented as means \pm SD.

3. Results

3.1. Acute toxicity

Fig. 2 depicts the impact of SN on the cell viability of HepG2 cells. No significant acute toxic effects were observed in the cell line in all experimental conditions (MTT and NR assays) after the period of 24 h.

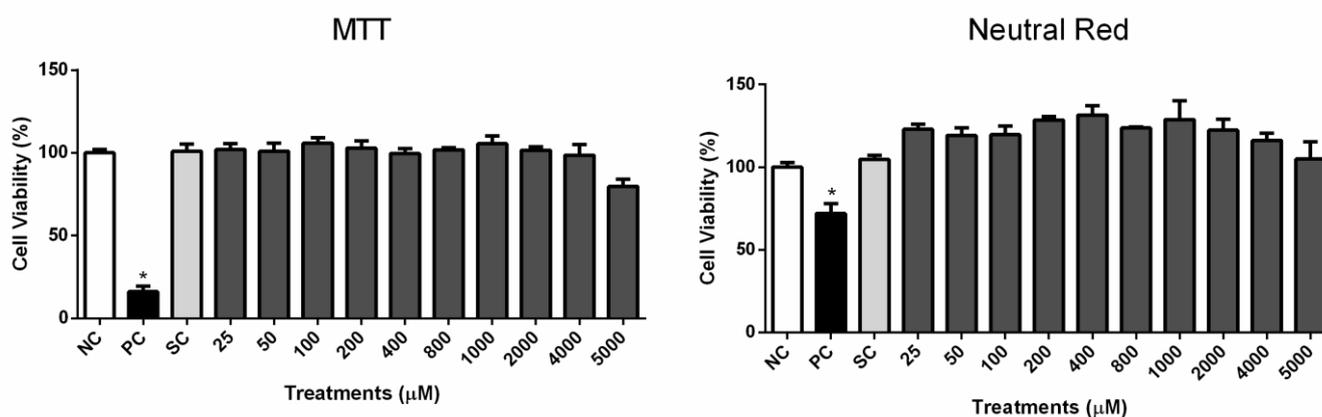


Fig. 2. Percentage (%) of viable HepG2 cells after treatment with different concentrations of SN for 24 h in MTT and NR uptake test. Values represent mean \pm standard deviations. The results are expressed as a percentage of cell viability compared to NC. NC: Negative Control (PBS; pH 7.4); SC: Solvent Control (HClO₄ - 0.05%); PC: Positive Control (MMS – 300 μ M); SN: Synephrine (μ M). *Indicate values which are statistically different from the NC (Kruskal-Wallis test; $p \leq 0.05$).

3.2. Impact of SN on cell division

Fig. 3 shows the analysis of the cell cycle kinetics by flow cytometry. SN (2.00, 20.0 and 200 μ M) had no impact on the cell cycle kinetics of the HepG2 cells. Treatment of the cells with MMS shifted the cell cycle, decreasing the number of cells in G1 and increasing in S phase.

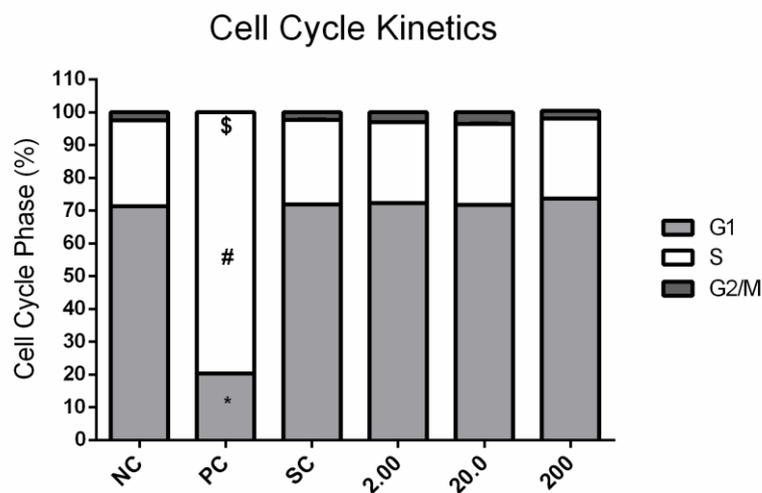


Fig. 3. Percentage (%) of HepG2 cells in each cell cycle phase after SN treatments. The cells were exposed to different concentration of SN for 24h. The bars represent the mean \pm standard deviations. In total, 30.000 cells were analyzed (10.000 cells per experimental point). NC: negative control (PBS; pH 7.4); SC: solvent control (HClO₄ - 0.05%); PC: positive control (MMS – 300 μ M); SN: Synephrine (μ M). *Indicate statistical significance compared to NC in G1 phase. #Indicate statistical significance compare to NC in S phase. \$Indicate statistical significance compared to NC in G2/M phase. In all statistical analysis was performed ANOVA followed by Dunnett test ($p \leq 0.05$).

3.3. Comet assay and CBMN-Cyt experiments

Results obtained from comet assays in HepG2 cells are shown in Fig. 4. It can be seen that cells treated with SN between 2.00 and 200 μ M did not induce DNA damage, while treatment with MMS (300 μ M) clearly increased comet formation. The results of the CBMN-Cyt experiments are summarized in Table 1. Treatments with SN also did not induce chromosomal instability in HepG2 cells; cells which were treated with MMS (300 μ M) had significantly higher MNi-frequencies compared to the negative controls (NCs). Moreover, in comparison with the NC, cells treated with SN at concentration of 200 μ M showed significant decrease in the percentage (%) of BN cells and in the NDI values by 24.4 and 11.5 %, respectively (Table 1); cultures which were exposed to MMS also had a lower % of BN cells; NDI value was also significantly reduced.

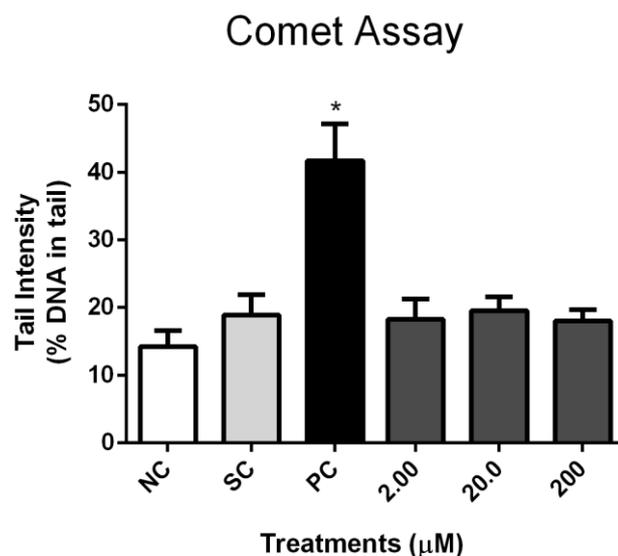


Fig. 4. Percentage (%) of DNA in the tail (*Tail Intensity*) in HepG2 cells after 4 h of treatment with SN in different concentrations. The bars represent the mean \pm standard deviations. NC: Negative Control (PBS; pH 7.4); SC: Solvent Control (HClO₄ - 0.05%); PC: Positive Control (MMS – 300 μ M); SN: Synephrine (μ M). *Indicate values which are statistically different from the NC (Kruskal-Wallis test; $p \leq 0.05$).

Table 1. Frequencies of micronuclei (MNi), nuclear buds (NBUDs), nucleoplasmatic bridges (NPBs) per 1000 binucleated cells; Nuclear Division Index (NDI) and percentage (%) of binucleated cells (BN) in HepG2 cells treated for 24 h with different concentrations of synephrine (SN)¹

CBMN-cyt – HepG2					
TREATMENTS	MNi	NBUDs	NPBs	BN (%)	NDI
SN 2.00 μ M	14.7 \pm 3.51	2.33 \pm 1.53	7.00 \pm 2.65	62.66 \pm 2.33	1.65 \pm 0.30
SN 20.0 μ M	18.6 \pm 0.57	4.68 \pm 1.53	6.67 \pm 0.58	57.93 \pm 2.74	1.63 \pm 0.03
SN 200 μ M	19.0 \pm 1.73	7.33 \pm 1.15	7.33 \pm 1.58	51.33 \pm 0.94*	1.54 \pm 0.01*
NC	14.00 \pm 1.00	5.00 \pm 1.73	3.67 \pm 1.15	67.87 \pm 0.99	1.74 \pm 0.02
SC	14.00 \pm 1.00	0.68 \pm 1.15	2.67 \pm 1.53	62.87 \pm 2.33	1.67 \pm 0.06
PC	37.7 \pm 3.51*	13.00 \pm 1.00	14.00 \pm 3.60*	43.13 \pm 2.20*	1.43 \pm 0.02*

¹Values indicate mean \pm standard deviations of results obtained with 3 cultures per experimental point. 3000 binucleated cells (1000 cells per replicate) were analyzed for the determination of the different nuclear anomalies. The NDI was calculated based on the evaluation of 1500 cells (500 cells per replicate). NC: Negative Control (PBS; pH 7.4); SC: Solvent Control (HClO₄ - 0.05%); PC: Positive Control (MMS – 300 μ M); SN: Synephrine (μ M). *Values statistically different of NC (Kruskal-Wallis test; $p \leq 0.05$).

3.4. Intracellular ROS formation

The formation of intracellular ROS in HepG2 cells is depicted in Fig. 5. An increase of intracellular ROS was seen after 6 h of treatment in all SN concentrations (2.00; 20.0 and 200 μM), while only the concentration of SN at 200 μM was able to increase the intracellular ROS formation after 24 h when compared to its respective negative control (NC).

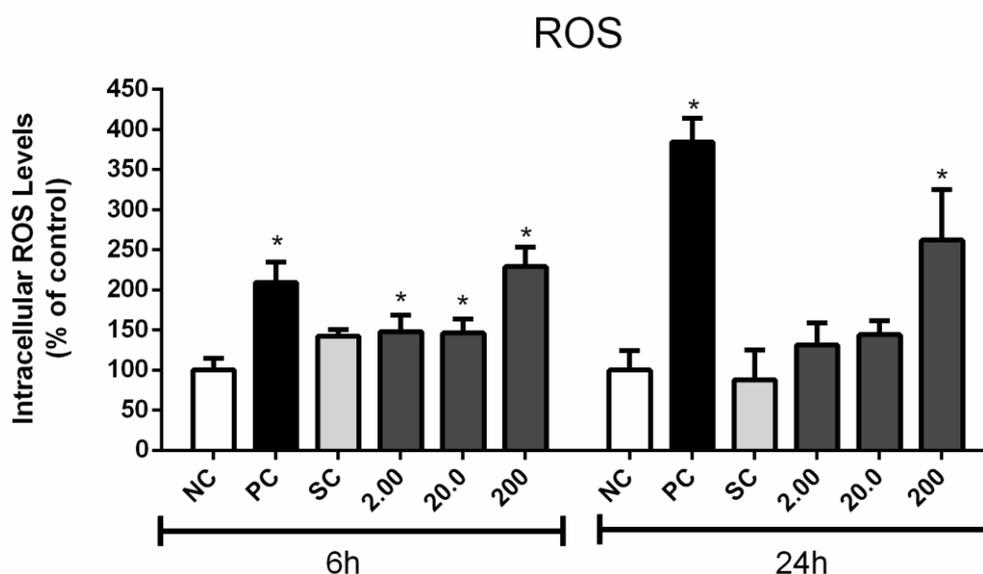


Fig. 5. Formation of intracellular reactive oxygen species (ROS) levels after treatments with different concentrations of SN for 6 or 24 h in HepG2 cells. The % of fluorescence intensity was calculated in relation to the NC and the bars represent the mean \pm standard deviations. NC: Negative Control (PBS; pH 7.4); SC: Solvent Control (HClO_4 - 0.05%); PC: Positive Control (H_2O_2 - 1 mM); SN: Synephrine (μM). *Indicate statistical significance compared to NC (ANOVA followed by Dunnett test; $p \leq 0.05$).

3.5. Biochemical parameters related to redox status of the cells

3.5.1. GSH

Determination of GSH concentrations detected after 24 h of treatment with SN (2.00 - 200 μM) are shown in Fig. 6(a). SN levels ≥ 20.0 μM increased the intracellular GSH concentration in HepG2 cells. Similar results were seen with the positive control (H_2O_2 - 1 mM), i.e., increases in GSH levels after 24 h of treatment.

3.5.2. *CAT*

The activity of the antioxidant enzyme CAT quantified after 24 h of treatment with SN (2.00 - 200 μ M) in HepG2 cells are shown in Fig. 6(b). SN concentrations of 2.00, 20.0 and 200 μ M did not cause significant alterations in CAT levels as compared to the negative control.

3.5.3. *SOD*

SOD activity was quantified after 24 h of treatment with SN (2.00 - 200 μ M) and the results showed in Fig. 6(c). Cells treated with SN at concentrations between 2.00 and 200 μ M showed no alterations in SOD activity when compared to negative control.

3.5.4. *GPx*

The GPx activity measured after 24 h treatment with SN (2.00 - 200 μ M) are shown in Fig. 6(d). SN levels ≥ 20.0 μ M were able to causes significant increases in the GPx enzymatic activity when compared to the negative control.

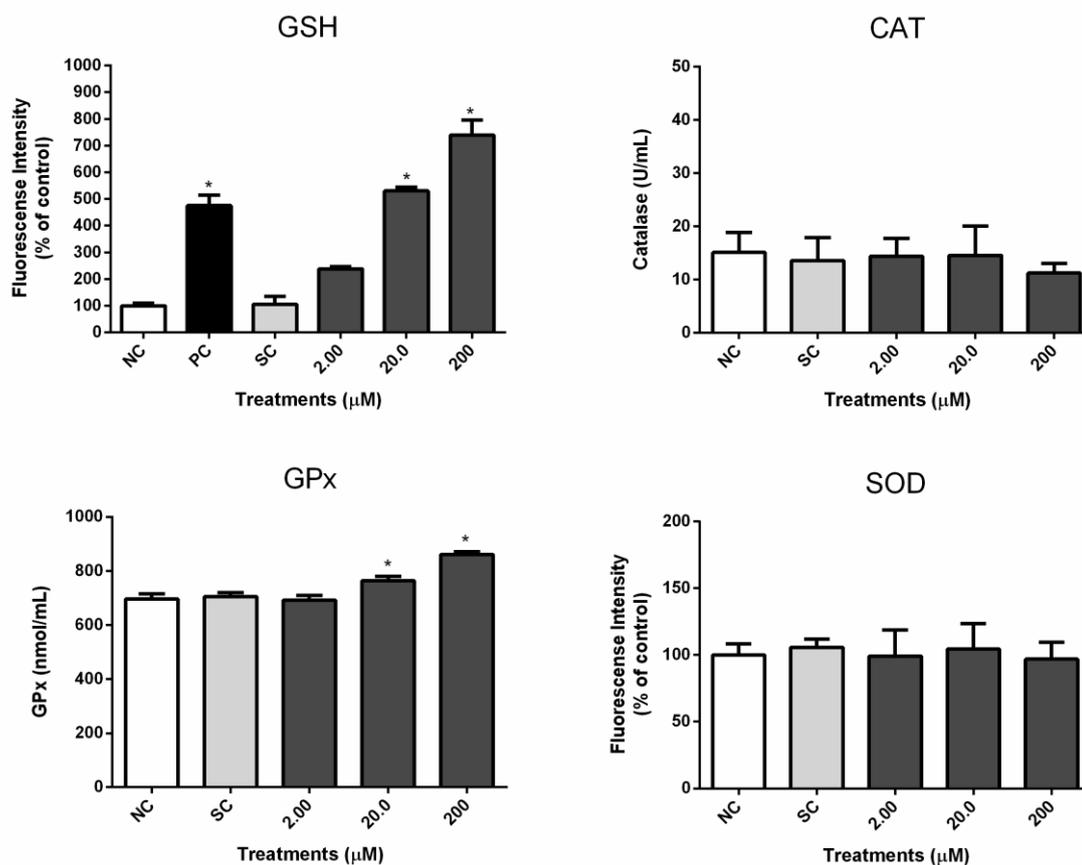


Fig. 6. Enzymatic measurement of GSH (a), CAT (b), SOD (c) and GPx (d) in HepG2 cells after treatments with different SN concentrations for 24h. The bars represent the mean \pm standard deviations. NC: Negative Control (PBS; pH 7.4); SC: Solvent Control (HClO₄ - 0.05%); PC: Positive Control (H₂O₂ - 1 mM); SN: Synephrine (μ M). *Indicate statistical significance compared to NC (ANOVA followed by Dunnett test; $p \leq 0.05$).

3. Discussion

The contents of SN in different thermogenic supplements can vary according to the formulation proposed by the company and by the legislation of regulatory agencies. In a recent study published by Viana et al. [36], for example, the SN content in thermogenic supplements have been analyzed and were founded concentrations which correspond to an uptake between 59.1 (3535 μ M) and 127 mg (7595 μ M)/day.

After the ingestion, SN has a fast hepatic transformation [18] because a greatest fraction of the compound absorbed in the intestine (30-90%) comes to the liver *via* the portal vein. It is normal that substances are absorbed in the intestine and channeled into the portal vein are present at higher concentrations in the latter when compared to the systemic circulation. It has been demonstrated that this difference may reach factors of 5 or more [37] and due to this can also expect that, in metabolic terms, the liver is the main site of action of SN [18]. In Wistar rats, for example, were found concentrations ranging from 10 to 500 μM in liver portal vein after SN infusion [18]. Therefore, the concentrations in the liver of thermogenic supplements users, depending on the amount of SN ingested daily in the pills, may reach levels between the concentration ranges from 2 to 200 μM that were evaluated in this study.

Conforming described, there are many reports about the presence and absence of adverse effects caused by SN, especially in humans. In another hand, only a few results of genotoxicity and mutagenicity experiments with SN are available at present. More relevant yet is that the genotoxic and mutagenic properties of SN have not been investigated in earlier studies according to our knowledge in human hepatic cell lines *in vitro*, such as HepG2 cells.

Initial results showed that SN does not induce cytotoxic effects (Fig. 2) and cell cycle alterations (Fig. 3). The lack of acute toxicity showed in the results is in agreement with data from earlier studies. No toxicity effects were observed in the rat liver cells [7], embryo fibroblasts [38], muscle cells [39], and also in human intestinal (Caco-2) cells, no evidence for an effect was found when the compound was tested at high concentrations (up to 1000 μM) in LDH assays [27].

In addition, the results in Fig. 4 and Table 1, showed the absence of DNA damage (comet assay) and MNs induction caused by chromosomal breaks/loses after SN treatments. These results are in accordance with McGregor et al. [40] that also showed no genotoxic activity of SN after treatment in mouse lymphoma cells (L5178Y) at concentrations of 120 μM to 21.5

mM. In a recent review published by Stohs et al. [23], the authors cited two reports about genotoxic and mutagenic effects of SN. In the first reporting, SN and its metabolic products also did not cause MNs induction in leukocytes cultured cells *in vitro* up to the highest tested concentration of 0.6 μM (100 ng/mL). However, under the same experimental conditions using the comet assay, small increases of DNA damages were observed at 0.6 μM . In the second study, when the potential mutagenicity of a bitter orange extract (Advantra Z®) containing 50% of SN was assessed by the *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay (using the tester strains TA1535, TA97a, TA98, TA100, and TA102) and in the presence/absence of an S9 metabolic activation system, the results also indicated that the bitter orange extract (50% of SN) did not induce cytotoxic and mutagenic effects.

However, in the MNs cytome results, the % of BN cells and NDI rates showed significant decreases in SN concentrations of 200 μM when compared to NC (Table 1) and indicate possible cytostatic effects in mitogenic activity caused by SN. Probably, these cytostatic effects identify in MNs cytome assay were not identified in the cell cycle assays by flow cytometry (Fig. 3) due to the fact that MN technique evaluates the cytostatic effects of substances after one cell cycle (cytokinesis blockade) of withdrawal from treatment [31].

The results of H₂DCFDA assay (Fig. 5) indicate ROS formation after 6 h of treatment in SN levels of 2.0 μM and, after 24 h (same treatment time of MNs experiments), only SN at 200 μM showed significant increases. The most significant effect observed on ROS induction after 6 h of treatment may be related to SN half-life which is approximately 3 h [15]. For 24 h, the ROS formation at SN levels of 200 μM may be explained and justify the cytostatic effects observed in hepatic human cells *in vitro*.

According to Haller et al. [19], SN is transformed by mitochondrial enzymes monoamine oxidases (MAOs) in *p*-hydroxymandelic acid. Suzuki et al. [41], for example, already demonstrated the capacity of MAOs in transforming SN by experiments with isolated

mitochondria and, pharmacokinetics studies showed that this reaction is exerted predominantly in the liver [18]. After this, still in the liver, SN also undergoes phase II metabolism, namely glucuronidation, and sulfation [42]. In humans, available data regarding excretion, 80% of the total oral dose of SN is eliminated within 24 h [43] in the urine and the presence of *p*-hydroxymandelic acid was the main metabolic product founded [41].

According to Grandy [21], the oxidation by MAOs and the metabolic product *p*-hydroxymandelic acid are related with the production of ROS (i.e. hydrogen peroxide - H₂O₂) and could contribute to explain the results in H₂DCFDA assay. To confirm these results and to find possible forms of action, results obtained in enzymatic measurements demonstrated that SN in levels of 20.0 μM induces significant increases in GSH (Fig. 6[a]) and GPx (Fig. 6[d]) levels when compared to the negative control (PBS) after 24 h of treatment.

The increases in the GSH/GPx levels clearly indicate a defense response of the cells to ROS induction. Arbo et al. [44] also showed increases in the GSH levels in mice after SN administration but observed an inhibition of GPx activity. The induction of oxidative stress plays a key role in etiology of various disease states such as *diabetes mellitus*, atherosclerosis, cardiovascular, aging and human cancer [45]. These results may be associated with the previous studies published where cardiotoxicity induced after SN consumption may also relate to oxidative stress [20].

However, despite cytostatic effects, the ROS induced by SN did not promote significant DNA damage and induction of chromosomal instability in hepatic derived cells *in vitro*. These events are called "acute oxidative stress" because in this case, it is not enough to have enhanced ROS level for certain period of time. A comprehensive review of Lushchak [46] showed some studies examples and provided such as a consequence an enhanced expression of antioxidants and related enzymes like GPx; GSH; SOD; CAT; GR, the absence of most pronounced cell

damages (i.e. DNA) and the possible presence of moderate effects like cell cycle delays. All consequences were observed in this study with SN.

HepG2 cells, as well as hepatocytes, have protein *p53* functionally active and efficient DNA repair system, mainly in the base excision repair (BER), which are responsible for the removal of oxidative damage caused to the DNA (base oxidation and abasic sites) [24]. According to Halliwell and Whiteman [47], this mechanism is an “adaptation” of the cell or organism by upregulation of defense systems, which may (I) completely protect against damage; (II) protect against damage to some extent but not completely; or (III) ‘overprotect’ (e.g. the cells is then resistant to higher levels of oxidative stress imposed subsequently).

Taken together, the present data show that SN did not cause acute toxic effects, genotoxic and mutagenic events in human liver cells *in vitro* at concentrations which are relevant for thermogenic users. However, it is important to remember that the contents of SN ingested in different thermogenic supplements can vary according to the number of pills ingested daily, the formulation proposed and the legislation present. Therefore, the safety of this compound should be further investigated in regard to its possible adverse effects since ROS induction, alterations in redox balance (increases in GPx/GSH enzymes) and cytostatic effects were observed. New studies with chronic treatments are necessary to may represent the total absence of hazard to the liver of thermogenic supplement users.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by the São Paulo Foundation Research (FAPESP; Proc. nº 2014/20344-9), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the National Council for Technological and Scientific Development (CNPq) for financial support. L.M.G.A. thanks CNPq for the productivity grant (302290/2015-0).

References

- [1] S.J. Stohs, V. Badmaev, A Review of Natural Stimulant and Non-stimulant Thermogenic Agents, *Phytother Res*, 30 (2016) 732-740.
- [2] S.J. Stohs, H.G. Preuss, M. Shara, A review of the human clinical studies involving *Citrus aurantium* (bitter orange) extract and its primary protoalkaloid p-synephrine, *Int J Med Sci*, 9 (2012) 527-538.
- [3] S.J. Stohs, H.G. Preuss, M. Shara, The safety of *Citrus aurantium* (bitter orange) and its primary protoalkaloid p-synephrine, *Phytother Res*, 25 (2011) 1421-1428.
- [4] C. Sale, R.C. Harris, S. Delves, J. Corbett, Metabolic and physiological effects of ingesting extracts of bitter orange, green tea and guarana at rest and during treadmill walking in overweight males, *Int J Obes (Lond)*, 30 (2006) 764-773.
- [5] G.C. Schmitt, M.D. Arbo, A.L. Lorensi, A.L.B. Jacques, S.N.D. Nascimento, K.D.C. Mariotti, S.C. Garcia, E. Dallegrave, M.B. Leal, R.P. Limberger, 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*, 2016, pp. 59-68.
- [6] A. Fugh-Berman, A. Myers, *Citrus aurantium*, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research, *Exp Biol Med (Maywood)*, 229 (2004) 698-704.
- [7] Z. Cui, Y. Lee, D. Park, p-Synephrine suppresses glucose production but not lipid accumulation in H4IIE liver cells, *J Med Food*, 18 (2015) 76-82.
- [8] N.A. Ratamess, J.A. Bush, J. Kang, W.J. Kraemer, S.J. Stohs, V.G. Nocera, M.D. Leise, K.B. Diamond, A.D. Faigenbaum, The effects of supplementation with P-Synephrine alone and in combination with caffeine on resistance exercise performance, *J Int Soc Sports Nutr*, 12 (2015) 35.
- [9] N. Bakhiya, R. Ziegenhagen, K.I. Hirsch-Ernst, B. Dusemund, K. Richter, K. Schultrich, S. Pevny, B. Schäfer, A. Lampen, Phytochemical compounds in sport nutrition: Synephrine and hydroxycitric acid (HCA) as examples for evaluation of possible health risks, *Mol Nutr Food Res*, 61 (2017).
- [10] D.L. Nykamp, M.N. Fackih, A.L. Compton, Possible association of acute lateral-wall myocardial infarction and bitter orange supplement, *Ann Pharmacother*, 38 (2004) 812-816.
- [11] J.E. Thomas, J.A. Munir, P.Z. McIntyre, M.A. Ferguson, STEMI in a 24-year-old man after use of a synephrine-containing dietary supplement: a case report and review of the literature, *Tex Heart Inst J*, 36 (2009) 586-590.
- [12] N.C. Boucharad, M.A. Howland, H.A. Greller, R.S. Hoffman, L.S. Nelson, Ischemic stroke associated with use of an ephedra-free dietary supplement containing synephrine, *Mayo Clin Proc*, 80 (2005) 541-545.
- [13] J. Moaddeb, T.S. Tofade, M.B. Bevins, Hypertensive Urgency Associated With Xenadrine EFX Use, *J Pharm Pract*, (2011).
- [14] F. Firenzuoli, L. Gori, C. Galapai, Adverse reaction to an adrenergic herbal extract (*Citrus aurantium*), *Phytomedicine*, 12 (2005) 247-248.
- [15] C.A. Haller, N.L. Benowitz, P. Jacob, Hemodynamic effects of ephedra-free weight-loss supplements in humans, *Am J Med*, 118 (2005) 998-1003.

- [16] C.A. Haller, M. Duan, P. Jacob, N. Benowitz, Human pharmacology of a performance-enhancing dietary supplement under resting and exercise conditions, *Br J Clin Pharmacol*, 65 (2008) 833-840.
- [17] M. Shara, S.J. Stohs, T.L. Mukattash, Cardiovascular Safety of Oral p-Synephrine (Bitter Orange) in Healthy Subjects: A Randomized Placebo-Controlled Cross-over Clinical Trial, *Phytother Res*, 30 (2016) 842-847.
- [18] J.F. da Silva-Pereira, G.A. Bubna, G.e.A. Gonçalves, F. Bracht, R.M. Peralta, A. Bracht, Fast hepatic biotransformation of p-synephrine and p-octopamine and implications for their oral intake, *Food Funct*, 7 (2016) 1483-1491.
- [19] L. Brunton, J. Lazo, K.G. Parker, *Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.*, 11th ed., Mc Graw-Hill, New York, 2005.
- [20] L.G. Rossato, V.M. Costa, R.P. Limberger, M.e.L. Bastos, F. Remião, Synephrine: from trace concentrations to massive consumption in weight-loss, *Food Chem Toxicol*, 49 (2011) 8-16.
- [21] D.K. Grandy, Trace amine-associated receptor 1-Family archetype or iconoclast?, *Pharmacol Ther*, 116 (2007) 355-390.
- [22] A. Federico, F. Morgillo, C. Tuccillo, F. Ciardiello, C. Loguercio, Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis, *Int J Cancer*, 121 (2007) 2381-2386.
- [23] S.J. Stohs, Safety, Efficacy, and Mechanistic Studies Regarding Citrus aurantium (Bitter Orange) Extract and p-Synephrine, *Phytother Res*, (2017).
- [24] S. Knasmüller, V. Mersch-Sundermann, S. Kevekordes, F. Darroudi, W.W. Huber, C. Hoelzl, J. Bichler, B.J. Majer, Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicology*, 198 (2004) 315-328.
- [25] S. Costantini, G. Di Bernardo, M. Cammarota, G. Castello, G. Colonna, Gene expression signature of human HepG2 cell line, *Gene*, 518 (2013) 335-345.
- [26] A. Bal-price, S. Coecke, Guidance on good cell culture practice (GCCP), in: M. Aschner, Suñol, C., & Bal-Price, A. (Ed.) *Cell Cultures Techniques, Neuromethods.* , Ed. Springer, New York, 2011, pp. 1-25.
- [27] L.G. Rossato, P.G. de Pinho, R. Silva, H. Carmo, F. Carvalho, M.e.L. Bastos, V.M. Costa, F. Remião, Development and validation of a GC/IT-MS method for simultaneous quantitation of para and meta-synephrine in biological samples, *J Pharm Biomed Anal*, 52 (2010) 721-726.
- [28] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods*, 65 (1983) 55-63.
- [29] G. Repetto, A. del Peso, J.L. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nat Protoc*, 3 (2008) 1125-1131.
- [30] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ Mol Mutagen*, 35 (2000) 206-221.
- [31] M. Fenech, Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay, *Nat Protoc*, 2 (2007) 1084-1104.
- [32] D.A. Eastmond, J.D. Tucker, Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ Mol Mutagen*, 13 (1989) 34-43.
- [33] H. Wang, J.A. Joseph, Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radic Biol Med*, 27 (1999) 612-616.
- [34] A. Gomes, E. Fernandes, J.L. Lima, Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species, *J Biochem Biophys Methods*, 65 (2005) 45-80.
- [35] L.K. Leal, H.V. Nobre Júnior, G.M. Cunha, M.O. Moraes, C. Pessoa, R.A. Oliveira, E.R. Silveira, K.M. Canuto, G.S. Viana, Amburoside A, a glucoside from *Amburanacearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity, *Neurosci Lett*, 388 (2005) 86-90.
- [36] C. Viana, G.M. Zemolin, L.S. Müller, T.R. Dal Molin, H. Seiffert, L.M. de Carvalho, Liquid chromatographic determination of caffeine and adrenergic stimulants in food supplements sold in Brazilian e-commerce for weight loss and physical fitness, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 33 (2016) 1-9.
- [37] K. Yamano, K. Yamamoto, M. Katashima, H. Kotaki, S. Takedomi, H. Matsuo, H. Ohtani, Y. Sawada, T. Iga, Prediction of midazolam-CYP3A inhibitors interaction in the human liver from in vivo/in vitro absorption, distribution, and metabolism data, *Drug Metab Dispos*, 29 (2001) 443-452.
- [38] K.B. Roh, I.H. Kim, Y.S. Kim, M. Lee, J.A. Lee, E. Jung, D. Park, Synephrine inhibits eotaxin-1 expression via the STAT6 signaling pathway, *Molecules*, 19 (2014) 11883-11895.

- [39] N.Y. Hong, Z.G. Cui, H.K. Kang, D.H. Lee, Y.K. Lee, D.B. Park, p-Syneprine stimulates glucose consumption via AMPK in L6 skeletal muscle cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 418 (2012) 720-724.
- [40] D.B. McGregor, C.G. Riach, A. Brown, I. Edwards, D. Reynolds, K. West, S. Willington, Reactivity of catecholamines and related substances in the mouse lymphoma L5178Y cell assay for mutagens, *Environ Mol Mutagen*, 11 (1988) 523-544.
- [41] O. Suzuki, T. Matsumoto, M. Oya, Y. Katsumata, Oxidation of synephrine by type A and type B monoamine oxidase, *Experientia*, 35 (1979) 1283-1284.
- [42] K.E. Ibrahim, J.M. Midgley, J.R. Crowley, C.M. Williams, The mammalian metabolism of R(-)-m-syneprine, *J Pharm Pharmacol*, 35 (1983) 144-147.
- [43] S. Haaz, K.R. Fontaine, G. Cutter, N. Limdi, S. Perumean-Chaney, D.B. Allison, Citrus aurantium and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update., *Obesity Reviews*, 2006, pp. 79-88.
- [44] M.D. Arbo, G.C. Schmitt, M.F. Limberger, M.F. Charão, A.M. Moro, G.L. Ribeiro, E. Dallegrave, S.C. Garcia, M.B. Leal, R.P. Limberger, Subchronic toxicity of Citrus aurantium L. (Rutaceae) extract and p-syneprine in mice, *Regul Toxicol Pharmacol*, 54 (2009) 114-117.
- [45] S. Galadari, A. Rahman, S. Pallichankandy, F. Thayyullathil, Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?, *Free Radic Biol Med*, 104 (2017) 144-164.
- [46] V.I. Lushchak, Time-course and intensity-based classifications of oxidative stresses and their potential application in biomedical, comparative and environmental research, *Redox Rep*, 21 (2016) 262-270.
- [47] B. Halliwell, M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *Br J Pharmacol*, 142 (2004) 231-255.

Supplementary material

2.9.1. Intracellular glutathione (GSH)

Intracellular Glutathione (GSH) was monitored with the ThiolTracker Violet (Glutathione Detection Reagent) kit according to the instructions of the manufacturer. 1×10^4 cells (HepG2) were seeded in 96 well culture black (TPP; Trasadingen, Switzerland) plates for a period of 24 h. Subsequently, the cells were exposed to SN (2.0, 20.0 and 200 μM) or by the respective controls, negative (PBS; pH 7.4) and solvent (HClO_4 - 0.050%) for 24 h. Thereafter, the cells were washed two times with PBS, which was removed before the dye solution (20 mM, Thiol Tracker™ Violet) was added. Finally, the plates were incubated at 37°C for 30 min, subsequently, ThiolTracker Violet dye solution was replaced by PBS (pH 7.4) for reading. The fluorescence intensity was measured with a CaryEclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA; excitation λ 404 nm and emission λ 526 nm). All experiments were run in duplicate and 3 measurements were conducted in parallel for each experimental point. The results are presented as fluorescence intensities (arbitrary units) in mean \pm standard deviations (SD).

2.9.2. Catalase (CAT)

Catalase (CAT) was monitored with the Amplex Red Catalase Assay ThiolTracker™ Violet kit according to the instructions of the manufacturer. The plating, stabilization and treatments procedures are the same as those mentioned in Intracellular Glutathione (GSH). Thereafter, 25 μL of each standard of CAT and the previously trypsinized cell homogenate with an additional 25 μL H_2O_2 (40 μM) was added and the plate incubated at room temperature for 30 min. Then, 50 μL of the working solution containing the Amplex Red reagent (100 μM) was added to each well of controls and samples, and then the plate was incubated protected from

light in a culture oven at 37°C for 30 min. Subsequently, the plate containing the blank, standard curve and samples had the fluorescence intensities measured with a CaryEclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA; excitation λ 530 nm and emission λ 590 nm). All experiments were run in duplicate and 3 measurements were conducted in parallel for each experimental point. The results are presented as units (U) of CAT per mL of reaction solution (U/mL) in mean \pm standard deviations (SD).

2.9.3. *Superoxide dismutase (SOD)*

Superoxide dismutase (SOD) levels were verified using the MitoSOX™ Mitochondrial Superoxide Indicator kit according to the instructions of the manufacturer. The plating, stabilization and treatments procedures are the same as those mentioned in Intracellular Glutathione (GSH). Thereafter, the incubation medium with the treatments was removed and the wells were washed twice with PBS, which was then removed and then 100 μ L of the MitoSOX™ dye solution (10 μ M) was added. The plate was incubated in culture oven at 37°C for 25 min and then the MitoSOX™ dye solution was removed and the wells washed 2 times with PBS. Finally, another 100 μ L of PBS (pH 7.4) was added to each well and the fluorescence intensity was measured with a CaryEclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA; excitation λ 510 nm and emission λ 580 nm). All experiments were run in duplicate and 5 measurements were conducted in parallel for each experimental point. The results are presented as fluorescence intensities (arbitrary units) in mean \pm standard deviations (SD).

2.9.4. *Glutathione peroxidase (GPx)*

Glutathione peroxidase (GPx) enzyme was quantified using the Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay kit according to the instructions of the manufacturer. 1×10^6 cells (HepG2) were seeded in 6 well culture plates (TPP; Trasadingen, Switzerland) for a period of 24 h. Subsequently, the cells were exposed to SN (2.0, 20.0 and 200 μM) or by the respective controls, negative (PBS; pH 7.4) and solvent (HClO_4 - 0.050%) for 24 h. Thereafter, the cells were removed from the plate with trypsin, homogenized in “Buffer Assay” at 4 °C and centrifuged for 10.000 g for 15 min to collect the supernatant. Prior to the initiation of the reading procedure, a standard GPx curve with concentrations of 0-100 nmol/mL, positive reaction control (GPx - 1 mM) and blank control were diluted in a new 96 well plate (TPP; Trasadingen, Switzerland). Next, a first spectrophotometer reading (Biotek Elx800 - Winooski, USA) with a wavelength of 340 nm was taken to obtain the standard curve. After that, 50 μL of the supernatant from the samples were placed on the plate along with 40 μL of reaction mix containing NADPH, Glutathione Reductase (GR) and Glutathione (GSH). The same mix was added to the white and positive control. The samples were homogenized and two spectrophotometer readings (Biotek Elx800 - Winooski, USA) with a wavelength of 340 nm were performed: (I) at time 0 min to obtain reading 1 (A1) and (II) after 20 min to obtain the reading 2 (A2). The following equation was applied to obtain the $\Delta 340 \text{ nm}$: (ABS Sample A1 - ABS Sample A2) - (ABS Blank A1 - ABS Blank A2).

With the $\Delta 340 \text{ nm}$ obtained from each sample, the GPx activity was calculated with the following equation below:

$$GPx \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mL}} \right) = \frac{B}{(T2 - T1) \times V} \times ABS \text{ Sample } (340 \text{ nm})$$

Where B = amount of NADPH that decreased between T_1 and T_2 ; T_1 = First reading time in min ($T_1 = 0$); T_2 = Second reading time in min ($T_2 = 20$); V = Sample volume added in each well in mL ($50 \mu\text{L} = 0.05 \text{ mL}$). Results are presented as nmol/mL of GPx in means \pm standard deviations (SD). For each experimental point, two cultures (1 measurement per culture) were performed in parallel.