

# Toxicologia *in vitro*: Principais modelos utilizados

Alexandre Bella Cruz

Rilton Alves de Freitas



# Toxicologia *in vitro*: Principais modelos utilizados

## Objetivo

Conhecer Métodos para Avaliação de Genotoxicidade

## Conteúdo

Introdução

Testes

- Micro-organismos
- Eletroforese para célula única em gel (SCGE)  
“Teste do Cometa”
- Micronúcleo

V Simpósio Iberoamericano  
de Plantas Medicinais



# Qualidade MP ≠

- Eficácia
- Segurança
- Qualidade final



# Qualidade MP ≠

- Eficácia

Comprovação de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos

- Segurança

Ensaio que comprovem ausência de efeitos tóxicos

- Ausência de contaminantes

Metais pesados, Agrotóxicos, Produtos de degradação, Micro-organismos e metabólitos, etc.



# Qualidade MP ≠

- Eficácia

Comprovação de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos

- Segurança

Ensaio que comprovem ausência de efeitos tóxicos

- Ausência de contaminantes

Metais pesados, Agrotóxicos, Produtos de degradação, Micro-organismos e metabólitos, etc.



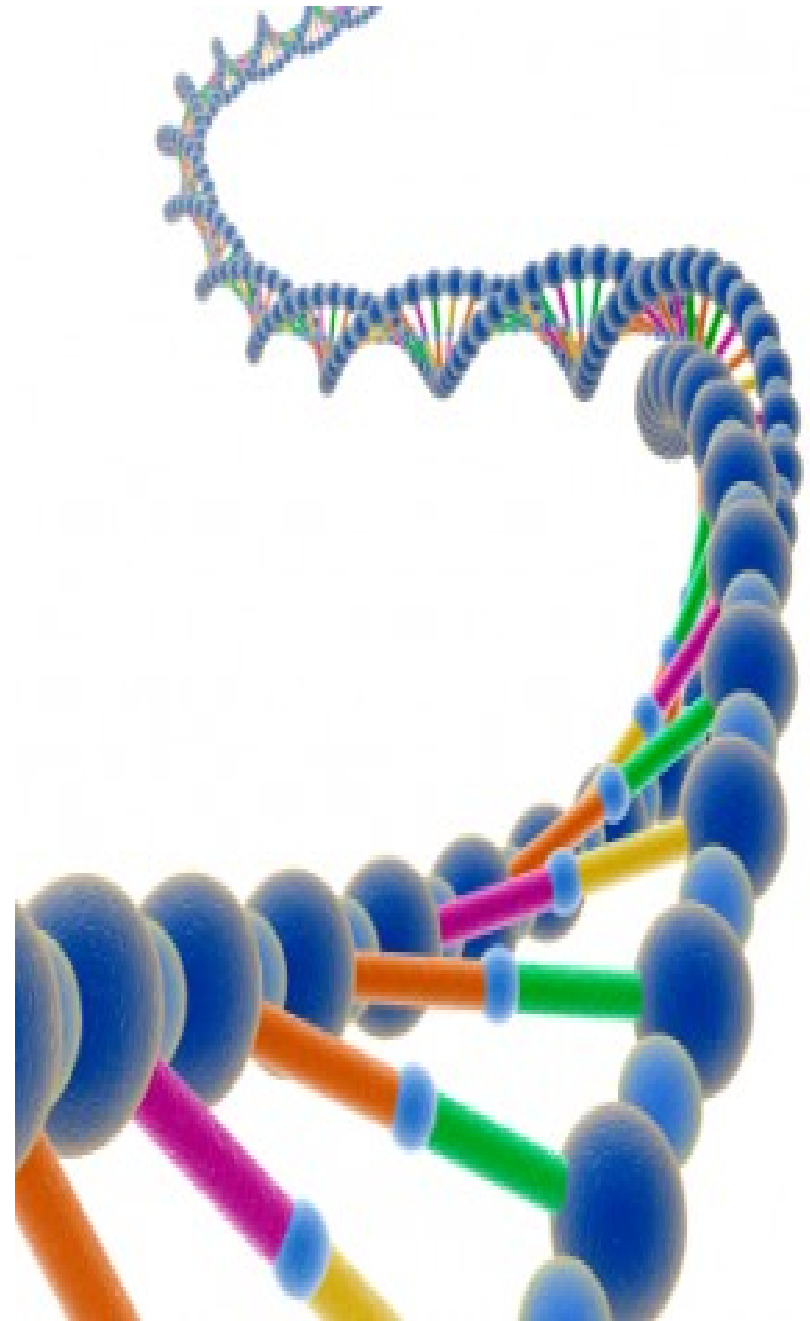
**n ensaios toxicológicos ⇒ GENOTOXICIDADE**

# Testes de produtos farmacêuticos para a toxicidade genética

União Europeia (1987)

Japão (1989)

EUA (1993)



# Testes de produtos farmacêuticos para a toxicidade genética

Resolução RE n.90 (16/03/2004)

"Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos"

- Toxicidade aguda,
- Toxicidade de doses repetidas (longa duração),
- Estudo especial - Genotoxicidade

# Testes de produtos farmacêuticos para a toxicidade genética

"Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos"

## → Estudo especial - Genotoxicidade

1 - Genotoxicidade: Avaliação *in vitro* da reversão de mutação em bactérias incluindo ativação metabólica ou de dano a cromossomas de células de mamíferos ou de linfoma de camundongo.

2 - Avaliação *in vivo* do dano em cromossoma em células hematopoiéticas de roedores (teste de micronúcleo).

Relação:

## **Agentes genotóxicos X efeitos nocivos à saúde**

- incidência de cânceres
- problemas reprodutivos

**Ocupacional:** laboratórios químicos, clínicos, toxicológicos e indústrias em geral

**Agentes químicos:** medicamentos, inseticidas, fungicidas, herbicidas, fertilizantes e outros produtos

# DNA

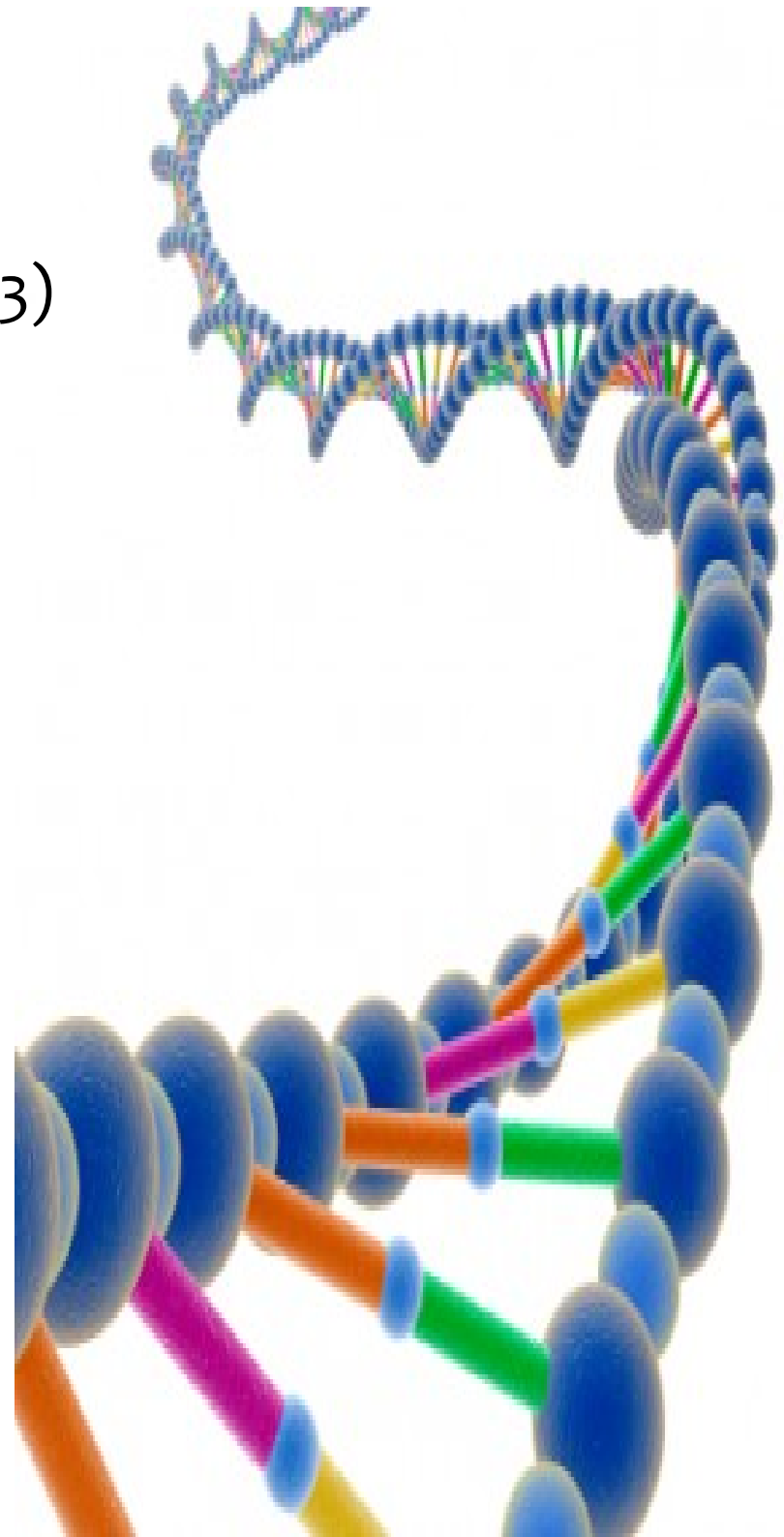
James D. Watson & Francis Crick (1953)

Não é uma molécula estável

Para “garantir” integridade

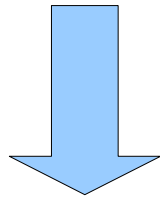
Sistemas de reparo

Sistemas de tolerância

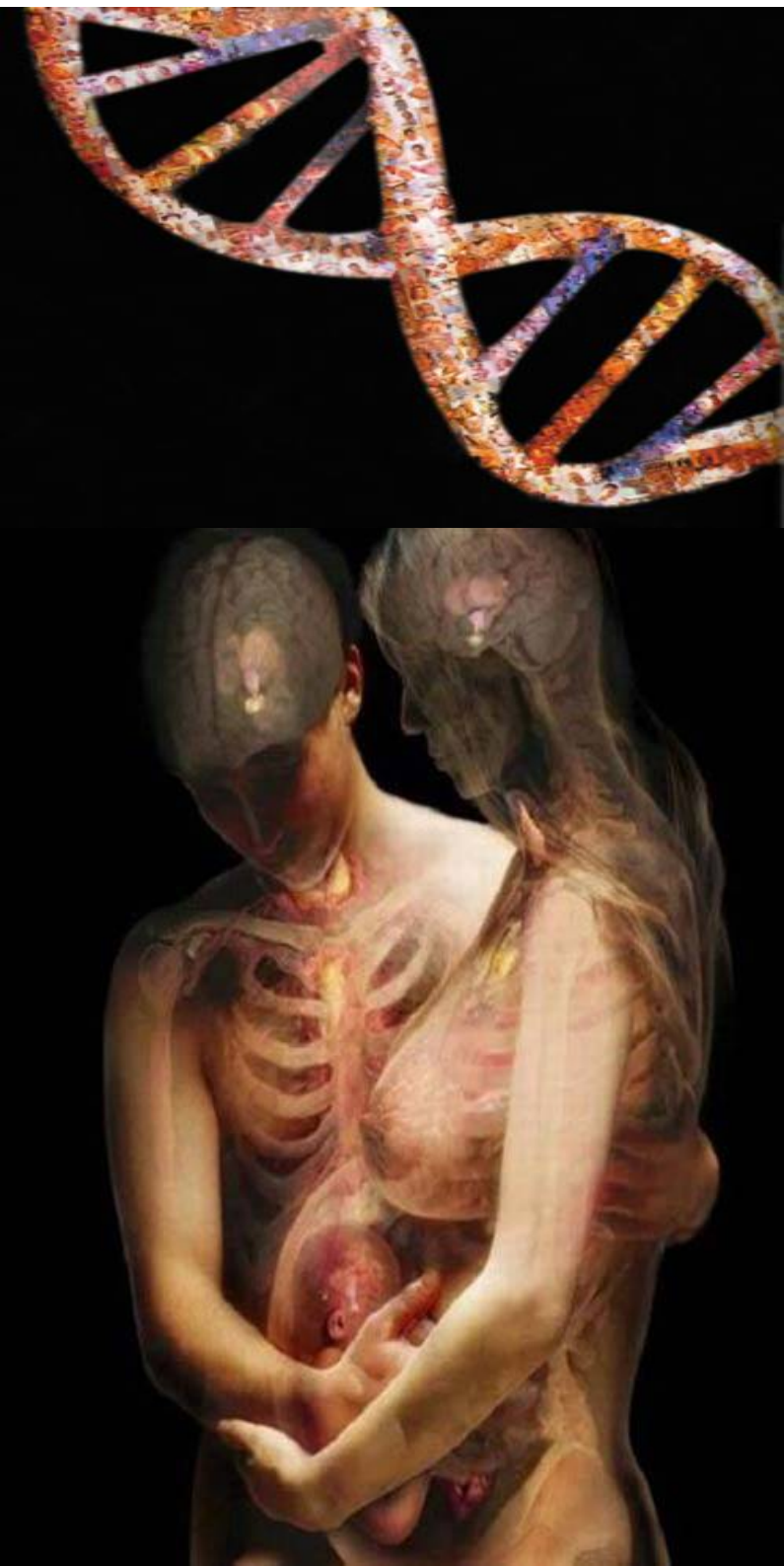


# DNA

Lesões (Humanos)



Processos degenerativos  
(envelhecimento, câncer)



# Definições

## **Genotoxicidade:**

O estudo dos efeitos adversos de agentes físicos e químicos no material genético de células (DNA ou cromossomos) e a subsequente expressão de tais mudanças.

## **Mutagenicidade:**

Mudança ou dano gênico ou inibição ou dano do mecanismo de reparo ao DNA resultando em uma célula alterada.

# Definições

## **Mutação:**

Processo pelo qual um gene sofre mudança estrutural

Indica mudança fenotípica resultante de um gene mutado

O termo mutante é usado para designar um indivíduo que expressa a alteração do genótipo resultante de mutação

# Definições

## Mutação:

É uma mudança na sequência do DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica

Os agentes que mudam a sequência do DNA são “tóxicos” para o gene e são, então, chamados de “**genotóxicos**”

**Genotoxicidade** não é uma medida de carcinogenicidade

Indicador para o câncer

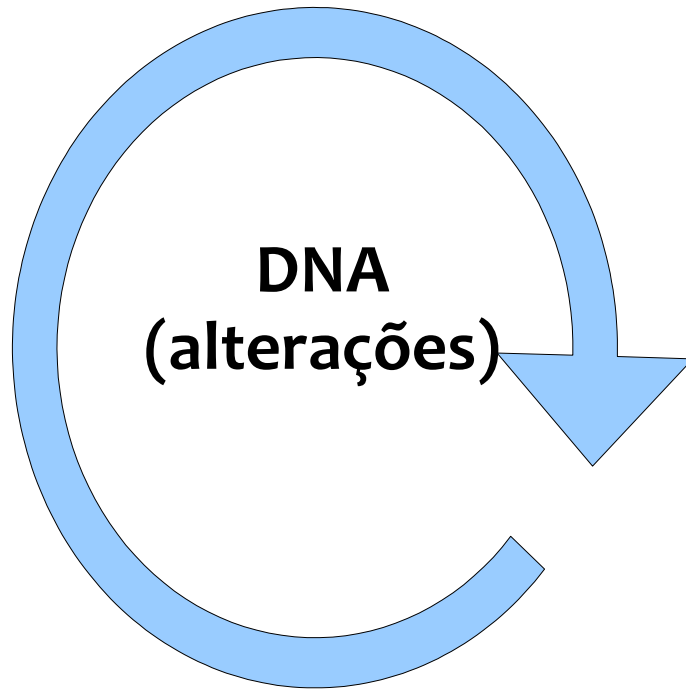
Testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese

### **Alta associação**

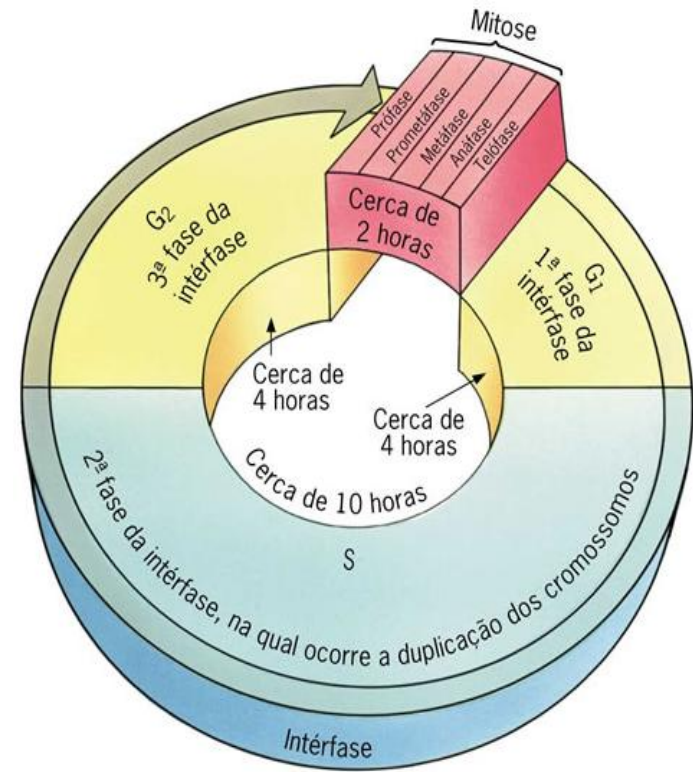
Testes de genotoxicidade X Carcinogenicidade

Por isso são utilizados avaliação do espectro toxicológico

**Vida**



**Erros durante duplicação**

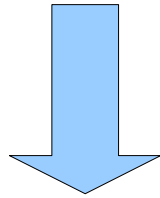


**Todos seres vivos → Mutação**

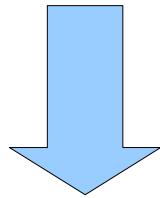
**Evolução e diversidade das espécies**

# Agentes mutagênicos

Alteração da seqüência das bases (DNA)

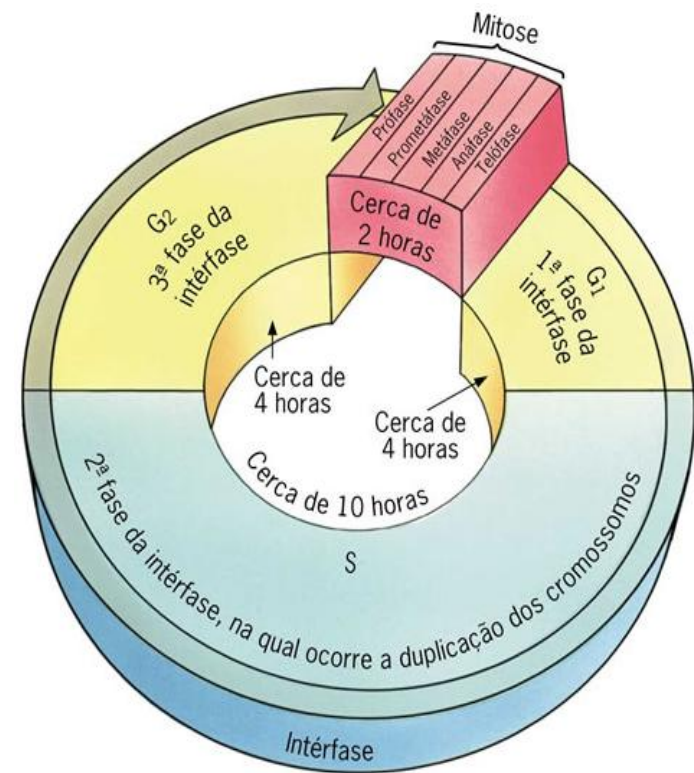


Acelera ou aumenta → mutações



**Neoplasias**

(câncer)



# Testes de genotoxicidade

- Diversas metodologias
- Importante pesquisa para avaliação da toxicidade celular
- Identificar potencial carcinogênico e a mutagenicidade
- Proteger o material genético humano

## **Genotoxicidade - Sistema experimental (4 Níveis):**

**Primeiro nível:** engloba ensaios moleculares e em bactérias  
(mutação em gene bacteriano)

**Segundo:** provas *in vitro* em células de cultivo  
(aberrações cromossômicas)

**Terceiro:** compreende análises *in vivo*  
(mutação gênica em células de mamíferos)

**Quarto:** corresponde a estudos em populações expostas

# Genotoxicidade - Sistema experimental (4 Níveis):

Outras técnicas:

- coeficiente DNA/proteína
- atividade das enzimas mitocondriais
- proliferação celular
- índices mitóticos
- identificação de danos
- quebras e reparos no DNA
- aberrações cromossômicas
- não disjunções
- a detecção de apoptose e necrose

Sistema de avaliação de novos agentes químicos:

Testes de Genotoxicidade !

Sistema apropriado e protocolo:

Em construção

### **Testes**

- Micro-organismos
- Eletroforese para célula única em gel (SCGE)  
“Teste do Cometa”
- Micronúcleo

# Mutagenicidade

## Teste de Ames

Bruce Ames, 1970

Cepas (estirpes) *Salmonella typhimurium*

Mede a indução de mutações reversas em cepas auxotróficas (*His-*) para o aminoácido histidina que revertem as mesmas à prototrofia (*His+*) (selvagem).

# Teste de Ames

**Resultados de um teste sobre as bactérias têm algum significado na detecção de agentes tóxicos para os humanos?**

1. A natureza genética e química do DNA é idêntica em todos os organismos
2. Ames e Colaboradores desenvolveram uma forma de simular o metabolismo humano no sistema bacteriano.

# Teste de Ames

Mamíferos → maior parte do processamento de produtos químicos ocorre no fígado (onde são decompostos)

Em alguns casos, a ação de enzimas do fígado pode criar um composto tóxico ou mutagênico de uma substância que não era originalmente perigosa.

Ames incorporou enzimas do fígado de mamífero (rato) em seu sistema de teste de bactérias.

# Teste de Ames

Realizado em presença e ausência de sistema de metabolização exógeno (mistura S9)

Permite monitorar:

- ação direta sobre o material genético
- atividade positiva ou negativa metabólitos biotransformação

Semelhante o que ocorreria nos fígados de mamíferos.

## Culturas auxotróficas (exigência nutricional)

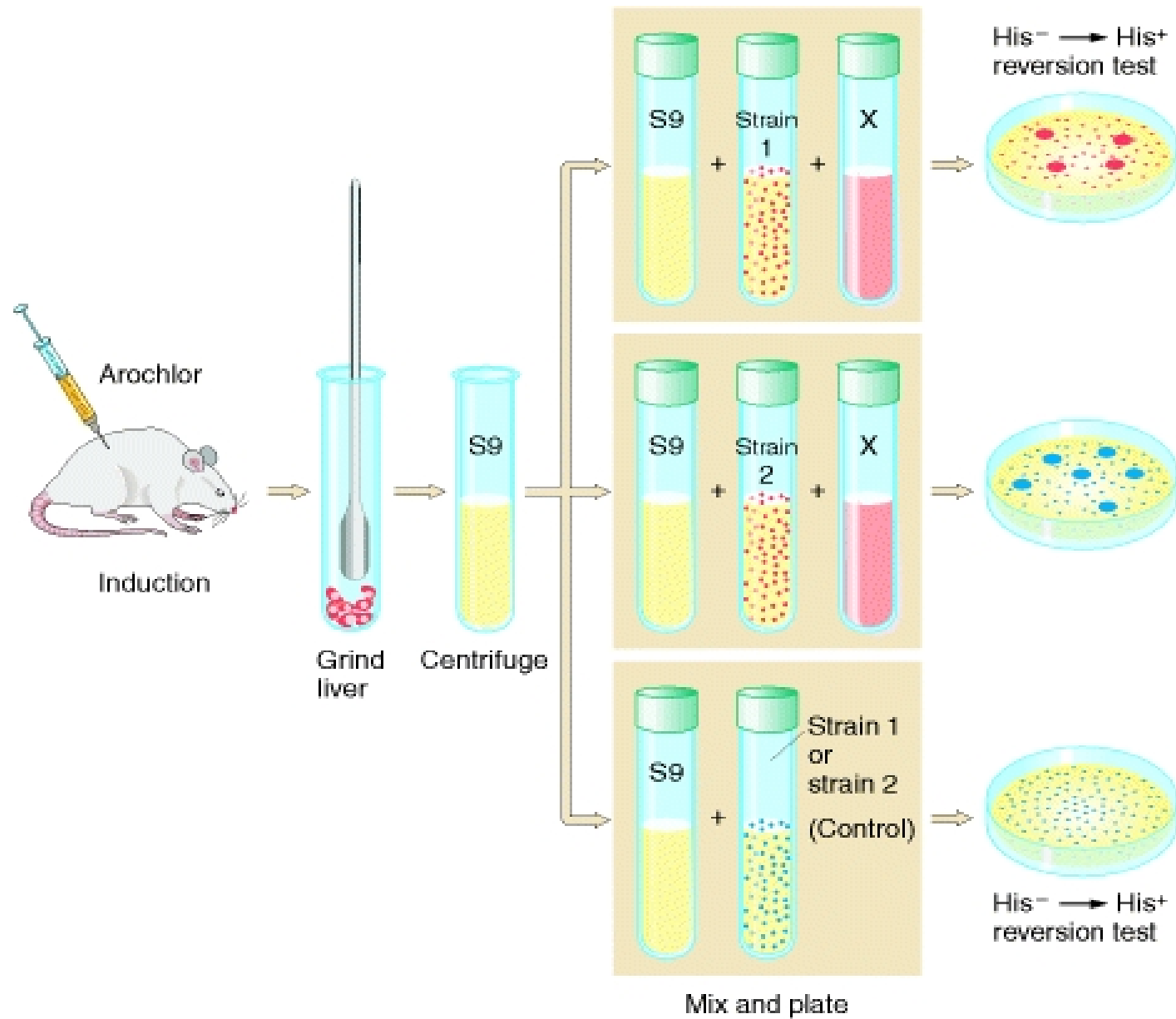
Strain	Amino acid Mutation	Type of mutation	DNA target	Cell wall mutation	DNA-repair	Plasmid
TA1535	His G46	Base-pair substitution	GC	rfa	uvrB	-
TA100	His G46	Base-pair substitution	GC	rfa	uvrB	pKM101
TA1537	His C3076	Frame-shift	GC	rfa	uvrB	-
TA1538	His D3052	Frame-shift	GC	rfa	uvrB	-
TA98	His D3052	Frame-shift	GC	rfa	uvrB	pKM101
TA97	His D6610	Frame-shift	GC	rfa	uvrB	pKM101
TA102	His G428	Base-pair substitution	AT	rfa	+	pKM101 pAQ1

## Teste de Ames

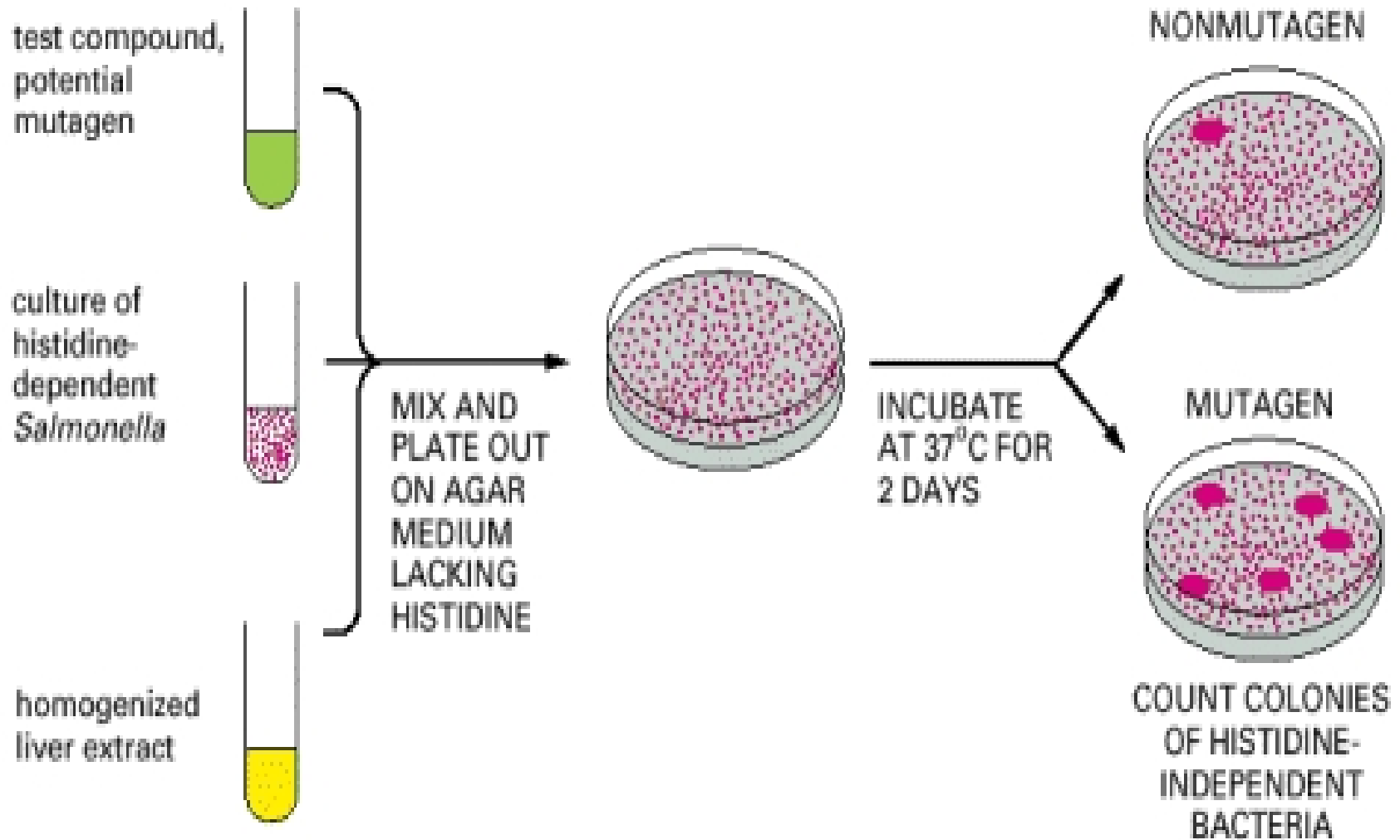
Fundamenta-se na restauração ou compensação de um defeito genético específico que causa exigência a um determinado nutriente.

A frequência de mutação reversa é facilmente medida pela contagem do número de colônias que crescem em meio mínimo após exposição de uma população a um agente mutagênico.

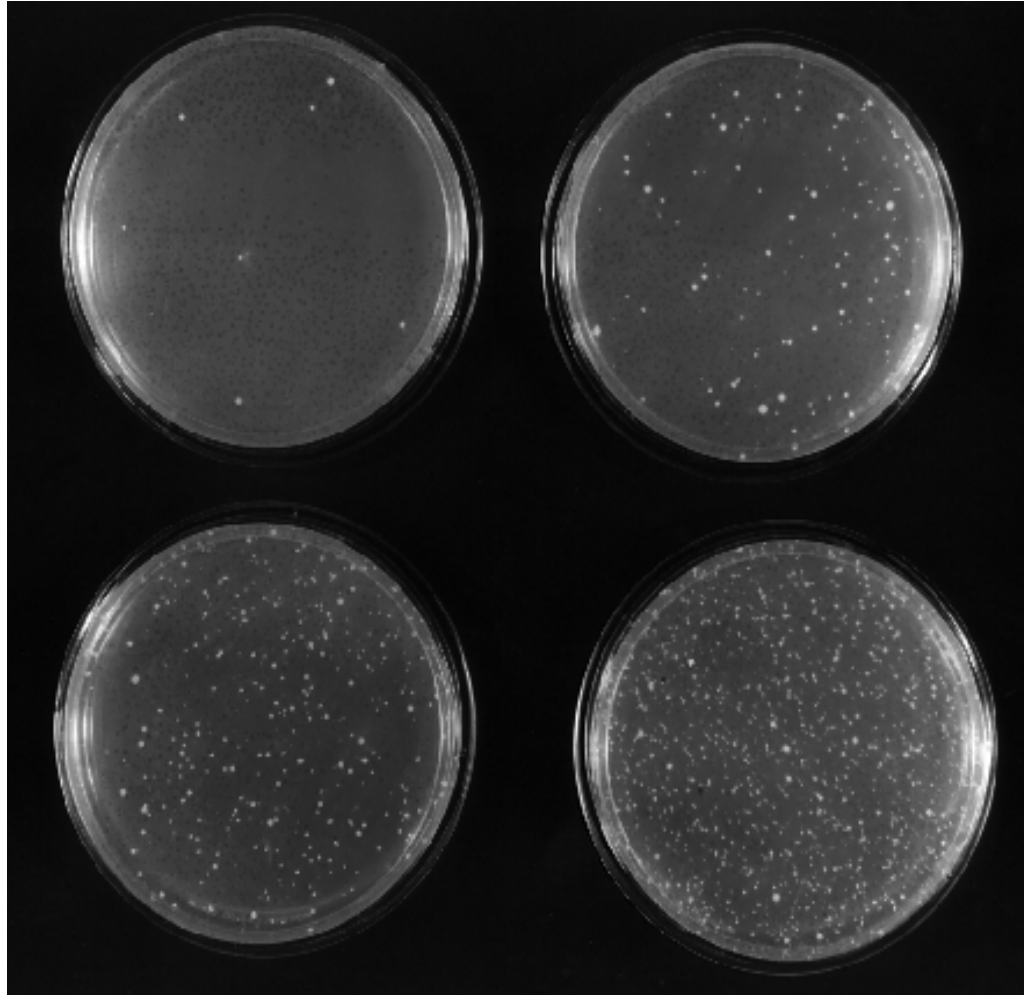
# Teste de Ames - Procedimento



# Teste de Ames - Procedimento



# Teste de Ames - Índice de Mutagenicidade



# Teste de Ames - Índice de Mutagenicidade

$$IM = \frac{\text{n. revertentes induzidos}}{\text{n. revertentes espontâneos}}$$

IM = 1,0 (indica não houve indução de revertentes)

IM entre <0,6 e 0,7 (pode ser indicativo de toxicidade)

IM > 1,0 (pode indicar indução de revertentes)

IM ≥ 2,0 (substância considerada mutagênica)

Fonte: Invitox, 2004; Borgo, Rosa, Vargas, 2004; Jayaprakasha, Negi, Jena, 2006

# Mutagenicidade

## Teste alternativo: *Saccharomyces cerevisiae*

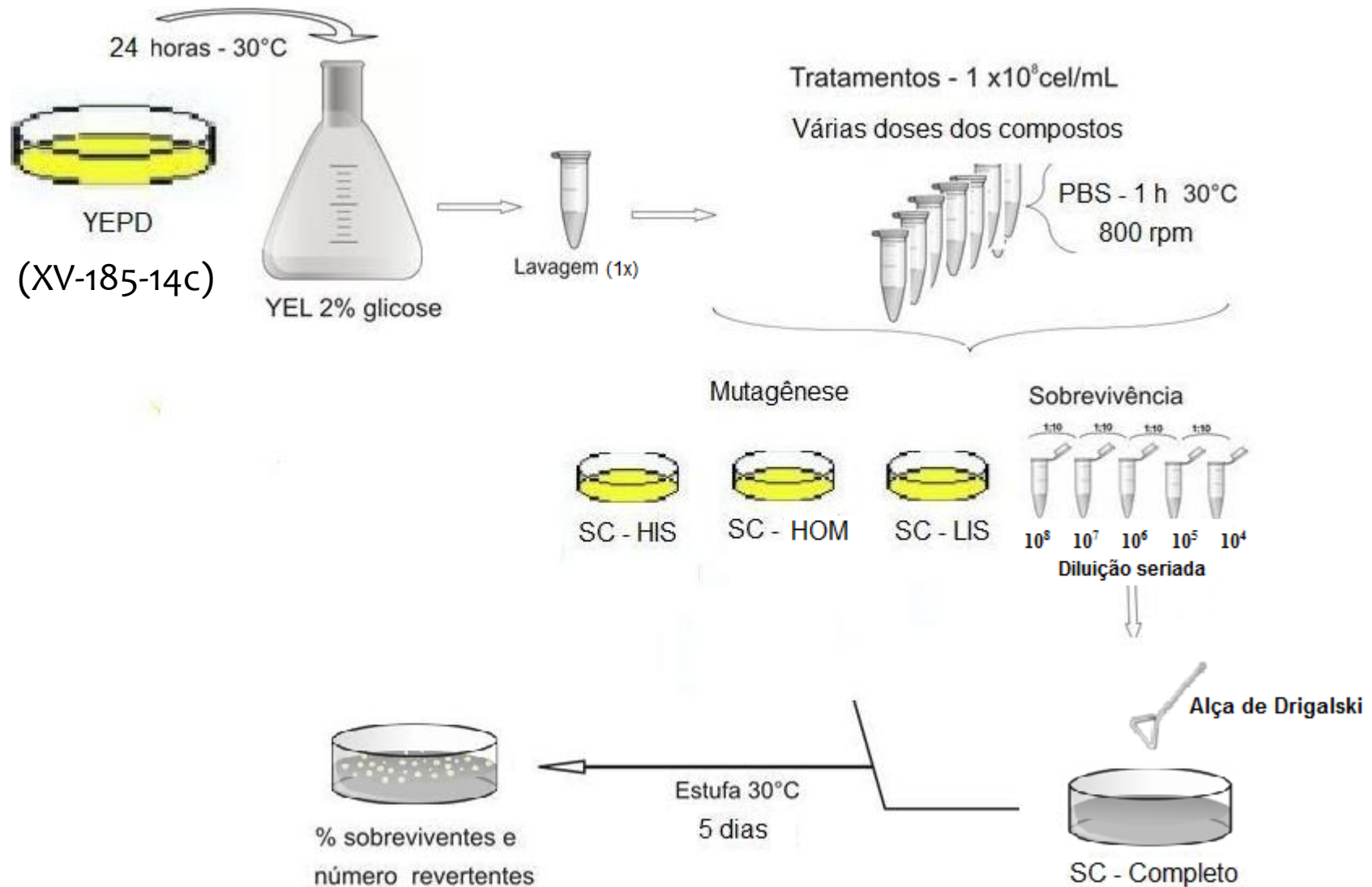
Levedura (fungo unicelular) - Eucarioto

Ferramenta importante em pesquisas

- mutagenicidade
- reparo de DNA
- mecanismos estresse oxidativo

Complementam os ensaios realizados em bactérias

# Teste de mutagenicidade em *Saccharomyces cerevisiae*



# Dano genético

## Ensaio Cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis - SCGE*)

Rydberg & Johanson:

### Quantificação danos DNA em células em agarose

- não detecta mutações
- detecta lesões genômicas → mutação
- Lesões genômicas são passível de correção .!.

estudo de reparo do DNA

# **Ensaio Cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis* - SCGE)**

Rydberg & Johanson:

## **Quantificação danos DNA em células em agarose**

Danos DNA são célula e tecido-específicos .!

Permite detecção danos e reparo em uma única célula

Relevante para avaliação de compostos genotóxicos.

# Cometa - Vias de reparo DNA

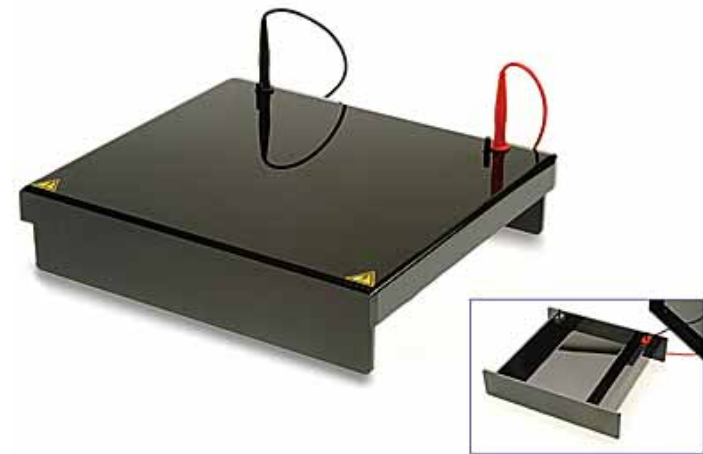
- reversão da lesão
- reparo por excisão
- reparo recombinacional
- tolerância a lesões

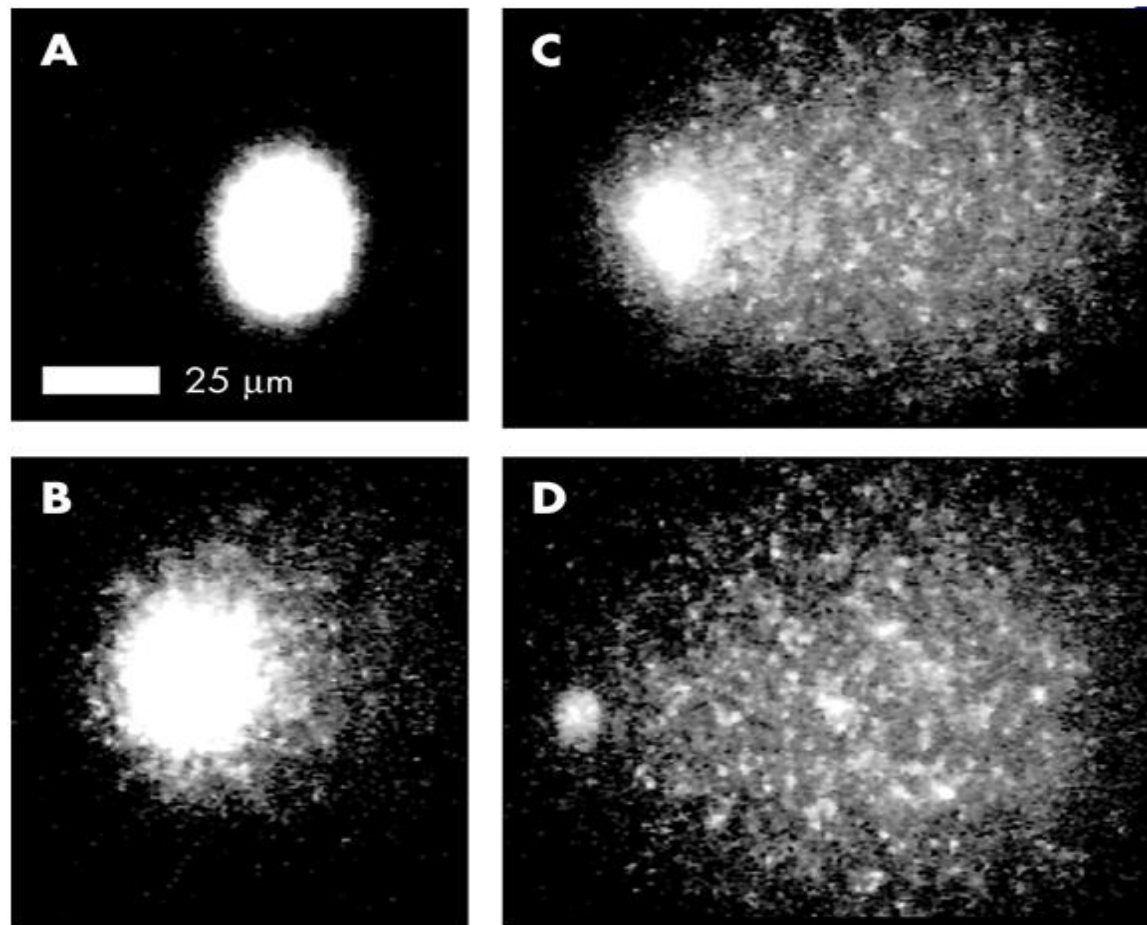
Atuam em conjunto → garantir a manutenção genética  
(sobrevivência dos organismos)

# Ensaio Cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis - SCGE*)

## Procedimento

- 1- Células embebidas em gel de agarose (lâminas)
- 2- Lisar sob condições alcalinas (ou neutras)
- 3- Eletroforese
- 4- Segmentos DNA livres migram → fora do núcleo
- 5- Observação microscópica
- 6- Classificação das células em classes (0-4)





### **Teste cometa com vários graus de dano ao DNA:**

A - célula sem dano

B - célula com leves danos

C - célula danificada ou clássico cometa

D - célula altamente danificada

# Ensaio Cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis - SCGE*)

Tipo de dano detectado

<b>Versão</b>	<b>Dano detectado</b>
Alcalina (pH>13)	Quebras de fita simples, sítios álcali-lábeis, sítios incompletos de reparo, sítios não básicos, quebras de fita dupla e ligações cruzadas.
Alcalina (2,1-12,5)	Quebras de fita simples, sítios incompletos de reparo, quebras de fita dupla e ligações cruzadas.
Neutra (pH 7,5-9,0)	Quebras de fita dupla e ligações cruzadas.

Fonte: Junqueira, A.P.F., 2006

# Ensaio Cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis - SCGE*)

## Condições de ensaio

Versão	Observações
Alcalina (pH>13)	1 h de lise; 20-60 min. relaxamento; 10-40 min. eletroforese; 5 min. neutralização. Tampão eletroforese: 1-2 mM Na <sub>2</sub> EDTA, 300mM NaOH, pH> 13. Condições de eletroforese: 300 mA, 0,5-1,0 V/cm temp. constante (<10C).
Alcalina (2,1-12,5)	1 h de lise; 20-60 min. relaxamento; 10-40 min. eletroforese; 5 min. neutralização. Tampão eletroforese: 1-2mM Na <sub>2</sub> EDTA, 300mM NaOH, ajustados para o pH 12,1-12,5 com HCl. Condições eletroforese: 250 mA, 0,5-1,0 V/cm à temp. constante (<10C).
Neutra (pH 7,5-9,0)	24 h de lise, 20 min. descanso; 1-2 h eletroforese; 5 min. neutralização. Tampão eletroforese: 300 mM acetato de sódio, 100 mM Tris pH 9 com ác. acético glacial. Condições eletroforese: 50-60 mA, 0,4-0,6 V/cm temp. constante (<10C).

Fonte: Junqueira, A.P.F., 2006

# Teste do Micronúcleo

Ensaio *in vivo* → para a detecção de agentes

- clastogênicos

  - (quebram cromossomos);

- aneugênicos

  - (induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal)

Teste desenvolvido em eritrócitos de medula óssea

(camundongos, ratos)

# Teste do Micronúcleo

## Procedimento

1- Camundongos jovens machos (4-5 semanas)

Grupos 10

Controle positivo: ciclofosfamida 50 mg/kg

Controle negativo

Teste

Dieta, Temp. Umidade, Ciclo de luz

2- Administração substância (12 - 30 h)

3- Sacrificio (medula óssea fêmur, lava, centrifuga 1000 rpm / 5 min.)

4- Sedimento (duas lâminas, seca ambiente)

# Teste do Micronúcleo

## Procedimento

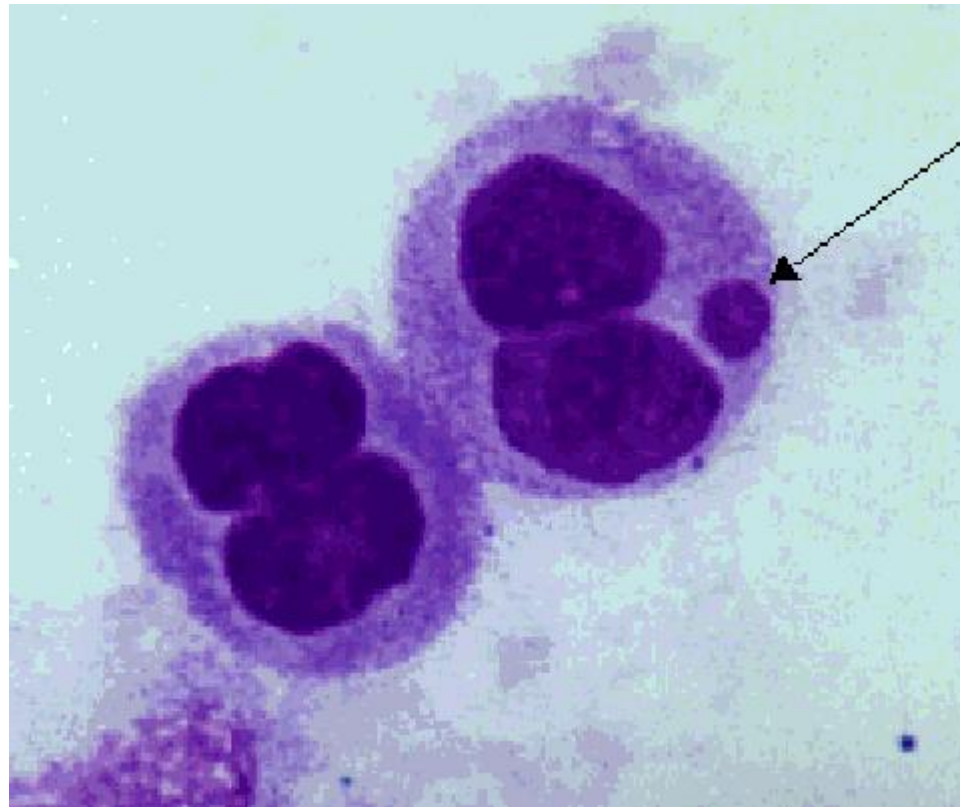
5- Coloração Leishmann

6- Microscopia de fluorescência

7- Contagem dos eritroblastos policromáticos com micronúcleo em relação ao total (mínimo 1000 EP/lâmina)

Pode ser corado com Giemsa ou fluoresceína

# Teste Micronúcleo



# Teste de carcinogenicidade

*in vivo* → Empregando roedores

*in vitro* → Transformação celular BALB/C<sub>3</sub>T<sub>3</sub> (OECD)\*