

AValiação IN VITRO DA SEGURANÇA DE NUTRACÊUTICO PARA ARTICULAÇÕES DE CAES

HILANA DOS SANTOS SENA BRUNEL, ANDRÊSSA ARAÚJO, PATRICIA FURTADO MALARD

BioInnova Testes e Soluções Biomoleculares – Laboratório de testes in vitro

Contato: hilana@bioinnova.com.br / Apresentador: HILANA DOS SANTOS SENA BRUNEL

Resumo: Testes de avaliação de segurança não são exigidos para nutracêuticos, porém, atestar que esses produtos são seguros para os animais que os consomem se torna um grande diferencial. Testes in vitro são inovadores e trazem boas respostas iniciais de segurança, incluindo a avaliação do potencial de substâncias causarem mutações em células de quem os consome. Entre esses testes estão o Teste de AMES e o Micronúcleos in vitro, os quais avaliam geno e mutagenicidade. No presente trabalho, um nutracêutico formulado para auxiliar o tratamento de problemas articulares foi testado in vitro. Foram realizados os testes de segurança AMES e micronúcleos in vitro. O produto apresentou frequência de micronúcleos semelhante ao controle negativo e índice de mutagenicidade baixo, indicando o seu baixo potencial mutagênico e genotóxico. Dessa forma, o nutracêutico testado se mostrou seguro quanto à possibilidade de causar danos em cromossomos e danos de mutações de ponto, sendo seguro para consumo.

Palavras-Chaves: alterações cromossômicas, mutação, suplemento alimentar.

IN VITRO SAFETY EVALUATION OF A NUTRACEUTICAL FOR JOINTS OF DOGS

Abstract: Safety assessment tests are not required for nutraceuticals, however, certifying that these products are safe for the animals that consume them is a major differentiator. In vitro tests are innovative and bring good initial safety answers, including the evaluation of the potential of substances to cause mutations in cells of those who consume them. Among these tests are the AMES Test and the in vitro Micronucleus, which evaluate geno and mutagenicity. In the present work, a nutraceutical formulated to help treat joint problems was tested in vitro. AMES and micronucleus in vitro safety tests were performed. The product showed a frequency of micronuclei similar to the negative control and a low mutagenicity index, indicating its low mutagenic and genotoxic potential. Thus, the tested nutraceutical proved to be safe regarding the possibility of causing damage to chromosomes and damage to point mutations.

Keywords: chromosomal alterations, mutation, food supplement.

Introdução: Modelos in vitro que permitem avaliar a segurança de produtos já são amplamente aceitos mundialmente (Doke & Dhawale, 2013). Entre esses testes, está o ensaio para avaliação de mutação gênica – Teste de AMES –, em que são utilizadas cepas específicas de Salmonella Typhimurium. O princípio deste teste é que ele detecta produtos que revertem as mutações presentes nessas cepas (OECD, 2020). Assim, colocando o nutracêutico em contato com essas cepas bacterianas, conclui-se se ele é capaz de causar mutações nos indivíduos que o consomem. Já o ensaio de micronúcleos in vitro é um teste que investiga o potencial de dano ao cromossomo causado pelo produto testado (OECD, 2016). Assim, esse é um teste sensível para avaliação do potencial de genotoxicidade de um nutracêutico ou qualquer produto que será consumido pelos pets. O objetivo desse estudo foi avaliar a segurança do consumo de um nutracêutico indicado para auxílio no tratamento de osteoartroses em cães.

Material e Métodos: Para o teste de AMES, foram utilizadas cinco cepas de Salmonella typhimurium (TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535) obtidas da Moltax. O nutracêutico foi diluído (10%) e cultivado juntamente com cada cepa para o teste de AMES, o qual foi realizado de acordo com o Guia OECD TG 471. As placas com as cepas e produto foram incubadas por 72h em estufa a 37°C. Após esse período, foram analisadas em contador automático de células (Scan 300 Interscience). Os dados foram tabulados e a contagem de colônias foi analisada em relação ao controle com água ultrapura. Para o ensaio de micronúcleos in vitro, células V79 foram obtidas de um banco de células comercial. As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) adicionado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,02% de amicacina (todos Sigma-Aldrich®). As células foram cultivadas na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/poço em placas de seis poços para realização do experimento e mantidas em incubadora a 37°C e 5% CO₂ por 24h. Após esse período, foram tratadas com o produto e mantidas em incubadora por três horas. O tratamento com o produto foi então retirado e foi adicionada a citocalasina B por 21 horas. Após esse último tempo de incubação as células foram tripsinizadas e colocadas em tubos de 15 ml para tratamento hipotônico com cloreto de potássio, pingadas em lâmina com pipeta de pasteur. Foi feita a contagem de núcleos e micronúcleos em microscópio óptico (Nikon). A análise de genotoxicidade foi feita com a utilização da Frequência de Micronúcleos.

Resultado e Discussão: No Teste de AMES, o índice de mutagenicidade apresentou todos os valores abaixo de 2 (Tabela 1), o que indica que o nutracêutico testado não apresenta potencial de causar mutações de ponto, sendo seguro para os animais que o consomem. Já no ensaio de micronúcleos in vitro, a frequência no aparecimento de micronúcleos nas células em contato com o produto foi baixa, semelhante à do controle negativo ($p < 0,005$), indicando que não há a interação do produto com o DNA capaz de causar danos de genotoxicidade (Figura 1). Esses ensaios (Teste de AMES e micronúcleos in vitro) são comumente utilizados para se testar a segurança de produtos para consumo humano (Omoruyi & Pohjanvirta, 2014), sendo uma inovação a utilização deles para testar produtos veterinários. O produto seria considerado mutagênico e genotóxico caso houvesse aumento no índice mutagenicidade e na frequência de micronúcleos, visto que esses são testes que avaliam o potencial do produto em causar mutações de ponto e quebras cromossômicas. Esses testes são importantes, visto que os

nutracêuticos de forma geral não precisam de comprovação de segurança, porém, faltam dados para fundamentar essas garantias de segurança no consumo desses produtos (Craig, 2021).

Tabela 1. Resultado do número de colônias do Teste de AMES e cálculo do índice de mutagenicidade.

Cepa	Tratamento	Concentração	Número de revertentes por placa (triplicata)			Média	DP	IM
TA 97a	Água Ultrapura	-	186	184	231	200,333	26,577	-
	Reversão	-	194	175	174	181,000	11,269	0,903
	Orto	10%	210	206	238	218,000	17,436	1,088
TA 98	Água Ultrapura	-	183	200	150	177,667	25,423	-
	Reversão	-	183	180	174	179,000	4,583	1,008
	Orto	10%	161	187	161	169,667	15,011	0,955
TA 1535	Água Ultrapura	-	15	21	19	18,333	3,055	-
	Reversão	-	21	20	17	19,333	2,082	1,055
	Orto	10%	25	13	16	18,000	6,245	0,982
TA100	Água Ultrapura	-	225	219	212	218,667	6,506	-
	Reversão	-	222	233	266	240,333	22,898	1,099
	Orto	10%	215	229	224	222,667	7,095	1,018
TA102	Água Ultrapura	-	485	390	253	376,000	116,632	-
	Reversão	-	483	487	465	478,333	11,719	1,272
	Orto	10%	470	521	474	488,333	28,361	1,299

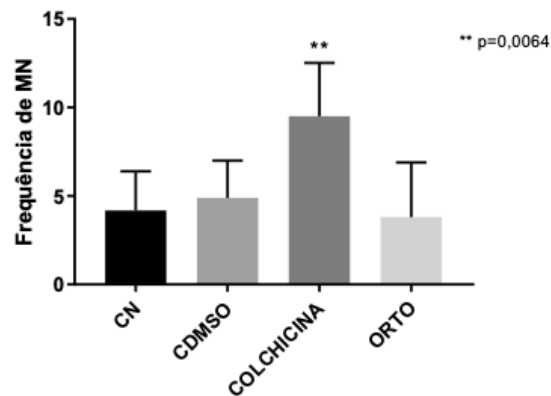


Figura 1. Frequência de micronúcleos in vitro com e sem o nutracêutico para articulações.

Conclusão: O produto testado, utilizado na rotina como auxiliar ao tratamento de problemas articulares em cães, não apresentou potencial para causar mutações ou alterações cromossômicas, mostrando ser seguro para o consumo pet.

Referências Bibliográficas: Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. 2ª Edição. Brasília. 2012. Craig, J. M. (2021). Additives in pet food: are they safe? *Journal of Small Animal Practice*, 62(8), 624–635. Doke SK, Dhawale SC. Alternatives to animal testing: a review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013;23:223-29. doi:10.1016/j.jsps.2013.11.0024. OECD Guideline for the testing of chemicals. In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test – 487. 2016. OECD Test Guideline No. 471. Bacterial Reverse Mutation Test. 2020. Omoruyi, I. M., & Pohjanvirta, R. (2014). Genotoxicity of processed food items and ready-to-eat snacks in Finland. *Food Chemistry*, 162, 206–214.