

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO METABÓLITO CLORIDRATO DE HIDROXIBUPROPIONA *IN VITRO* NAS CÉLULAS HUMANAS TUMORAIS DE RIM (786-0)

Vinicius Rodrigues Camilo da Silva (PIBIC/FA), Veronica Elisa Pimenta Vicentini (Orientadora), e-mail: arbvepv@wnet.com.br

Universidade Estadual de Maringá/ Departamento de Biotecnologia,
Genética e Biologia Celular/ Maringá, PR.

Área/Subárea: Ciências Biológicas/Mutagênese

Palavras-chave: Citotoxicidade, Cloridrato de Hidroxibupropiona, Cultura celular.

Resumo:

A depressão tem afetado cerca de 350 milhões de indivíduos no mundo, sendo considerada pela OMS como um transtorno mental grave, que requer atenção médica (psiquiátrica) para controle da evolução do quadro clínico. Muitos fármacos são prescritos aos pacientes com essa doença, visando a diminuição dos sintomas clássicos da doença (tristeza profunda, perda de apetite e desânimo), um deles é o Cloridrato de Bupropiona (BUP). O BUP é indicado aos pacientes devido ao seu funcionamento no sistema nervoso central, atuando na inibição da recaptção de neurotransmissores como dopamina, serotonina e acetilcolina. A ação do BUP sobre os neurônios gera uma sensação de alegria e relaxamento nos pacientes que ingerem o fármaco, garantindo assim uma melhora do quadro depressivo. No entanto, como muitos medicamentos, o BUP sofre metabolização hepática, sendo convertido em moléculas secundárias de ação farmacológica ativa. O principal é o Cloridrato de Hidroxibupropiona, uma molécula que age também no sistema nervoso e é excretada posteriormente pela urina. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico do Cloridrato de Hidroxibupropiona na linhagem celular humana de nefrocarcinoma (786-0), por meio do ensaio do MTT. Nossos resultados apontaram que o metabólito avaliado, na concentração de 500 μ M, foi citotóxico para as células de nefrocarcinoma, nos três tempos de exposição testados (24, 48 e 72 horas).

Introdução

A depressão, conforme aponta Meyers (2016), é atualmente considerada como uma das maiores causas de mortalidade nos países ocidentais. Os sintomas desse transtorno mental grave variam de sensação de tristeza duradoura, alterações no ciclo do sono, perda de apetite, diminuição dos níveis de energia, capacidade de concentração e da autoestima. Além disso, a presença de pensamento e quadros suicidas são recorrentes entre os pacientes depressivos, sendo necessário o devido acompanhamento médico

e psiquiátrico. Estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas no mundo sejam portadoras do distúrbio depressivo (MEYERS, 2016).

Por esses motivos, o uso de fármacos tem sido amplamente empregados no intuito de atenuar os sintomas dessa doença. Um desses fármacos é o Cloridrato de Bupropiona (BUP), antidepressivo que atua na recaptação de dopamina, noradrenalina, e também de serotonina, permitindo aos pacientes que o ingerem uma sensação de felicidade e relaxamento, além de diminuição do cansaço, dificuldade de concentração e, por fim, atenuação no quadro depressivo (ZHU et al., 2013).

No entanto, como a maior parte dos fármacos, o BUP sofre metabolização hepática, sendo convertido pelo citocromo P450 e pelas enzimas CYP2B6 e CYP3A4 em três metabólitos, sendo que todos eles possuem atividade farmacológica. No entanto, o metabólito formado em maior quantidade e que possui ação equivalente ou maior até do que o BUP é o Cloridrato de Hidroxibupropiona (CH) (ZHU et al., 2013).

Nesse âmbito, compreendendo que todo fármaco ao interagir com as células do corpo podem alterar o funcionamento das mesmas, é de extrema importância avaliar a real segurança desses medicamentos, realizando pesquisas que visem oferecer dados sobre a segurança ou toxicidade das substâncias presentes neles (MIYOSHI et al., 2015).

Por isso, esse trabalho teve como objetivo avaliar o possível potencial citotóxico do metabólito CH em células de nefrocarcinoma (786-0), a fim de garantir mais segurança aos indivíduos que ingerem o medicamento BUP.

Materiais e métodos

Linhagem celular – 786-0

As células da linhagem 786-0 foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm², contendo meio DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco), e mantidas em estufa com CO₂ a 5% e 37°C.

Ensaio de Citotoxicidade (MTT)

A avaliação do potencial citotóxico do Cloridrato de Hidroxibupropiona foi determinada pelo ensaio de citotoxicidade do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), segundo ensaio descrito por Mosmann (1983). Uma suspensão de 100µL, contendo 0,3x10⁴ células foi cultivada em placas de 96 poços, por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após a estabilização, as células foram tratadas com cinco concentrações do metabólito Cloridrato de Hidroxibupropiona: 25, 50, 100, 250 e 500 µM; um controle composto por meio de cultura (DMEM) suplementado com soro bovino fetal a 10%; um controle solvente composto por meio de cultura (DMEM) suplementado com soro bovino fetal à 10%, PBS à 9,01% e DMSO a 1,21%; e um grupo tratado com o agente citotóxico Doxorrubicina (DOX) [5µg/mL]. As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas. Posteriormente, os tratamentos foram descartados e em seguida uma solução de meio de cultura com MTT (0,15mg/mL) foi adicionada, incubando as placas por mais

4 horas. Após este período, o meio foi retirado e em cada poço foi feita a solubilização dos cristais de formazan com 100µL de DMSO. A absorbância foi obtida por meio da leitura das placas em espectrofotômetro a 550nm, e os dados foram expressos em absorbância.

A análise das absorbâncias médias e a análise estatística foram realizadas por análise de variância (*one-way ANOVA*), seguida pelo teste de Dunnett ($\alpha=0,05$, $p<0,05$, $n=3$). As análises foram realizadas com auxílio do programa GrafPad InStat versão 3.02.

Resultados e Discussão

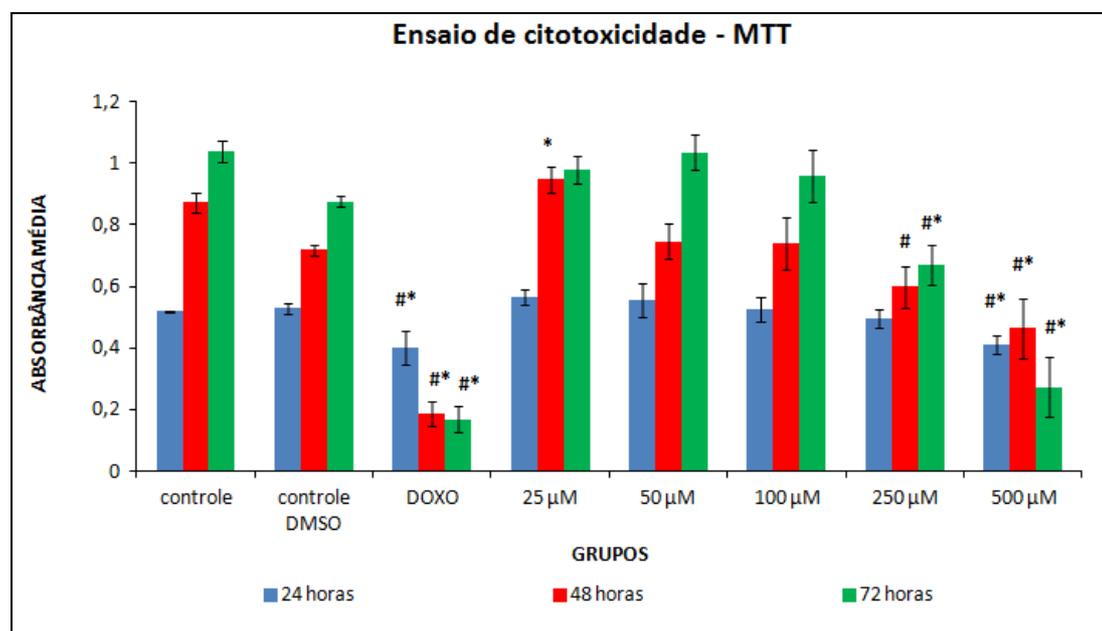


Gráfico 1 – Absorbância Média obtida com o Ensaio de Citotoxicidade do MTT, em células humanas de nefrocarcinoma (786-0), expostas a um grupo controle; cinco concentrações de Cloridrato de Hidroxibupropiona (CH) [25, 50, 100, 250 e 500 µM]; e um tratamento com um agente citotóxico Doxorubicina (DOXO), por 24, 48 e 72 horas.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle DMSO, $p<0,05$.

Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, $p<0,05$.

Pouco se sabe ainda a respeito dos possíveis potenciais citotóxicos que tanto o Cloridrato de Bupropiona (BUP), quanto o seu principal metabólito Cloridrato de Hidroxibupropiona (CH), podem apresentar. Uma avaliação do potencial citotóxico do BUP, foi realizada por meio do ensaio do MTT, em células neuronais corticais humanas e linfócitos, mostrando que esse fármaco causou a morte das células neuronais corticais na concentração de 100µM, após 48 horas de exposição ao tratamento. Por outro lado não se identificou morte celular significativa nos linfócitos em nenhuma das concentrações testadas (BHATTACHARYA et al., 2013).

Os resultados aqui obtidos mostram que esse metabólito foi citotóxico, para a linhagem de nefrocarcinoma (786-0), nos tempos de exposição de 48 e 72 horas para a concentração de 250µM e para os três tempos testados (24, 48 e 72 horas) para a concentração mais elevada de 500µM.

Conclusões

Esse trabalho corrobora para um melhor conhecimento sobre a interação dessa substância com as células humanas, e indicou que o Cloridrato de Hidroxibupropiona deve ainda ser mais avaliado, em relação a seus potenciais citotóxicos e vias de citotoxicidade, em outras linhagens celulares, no intuito de gerar informações sólidas a respeito de sua segurança para a população que o consome por meio da ingestão do antidepressivo BUP.

Agradecimentos

Ao pessoal do Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental que me auxiliaram na realização do trabalho, em especial à minha orientadora, Prof^a Dr^a. Veronica Elisa Pimenta Vicentini e à Fundação Araucária.

Referências

BHATTACHARYA, S. K. et al. Assessment of potential in vitro genotoxic and cytotoxic effects of bupropion hydrochloride (wellbutrin) in human peripheral lymphocytes and human cortical neuron. **Toxicology international**, v. 20, n. 1, p. 11, 2013.

MEYERS, B. S. Assessing Late Life Major Depression: Does Brain Disease Affect Measurement of Severity and Treatment Response? **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 24, n. 10, p. 879–880, 2016.

MIYOSHI, J. et al. Serum diamine oxidase activity as a predictor of gastrointestinal toxicity and malnutrition due to anticancer drugs. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 30, n. 11, p. 1582–1590, 2015.

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

ZHU, A. Z. X. et al. CYP2B6 and Bupropion's Smoking-Cessation Pharmacology: The Role of Hydroxybupropion. **Clin Pharmacol Ther**, v. 92, n. 6, p. 771–777, 2013.