

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO METABÓLITO CLORIDRATO DE HIDROXIBUPROPIONA *IN VITRO* NAS CÉLULAS HUMANAS TUMORAIS DE FÍGADO HepG2/C3A

Luma Medina Volpato (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Mariana Yoshimoto, Veronica Elisa Pimenta Vicentini (Orientadora), e-mail: lumamedina1@hotmail.com

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

Ciências Biológicas I / Mutagênese

Palavras-chave: Antidepressivo, BUP, Ensaio do MTT.

Resumo

Alguns antidepressivos possuem em sua composição um composto chamado de Cloridrato de Bupropiona que quando metabolizado nos hepatócitos gera um metabólito mais ativo chamado de Cloridrato de Hidroxibupropiona (CH), que tem por finalidade reverter o caso clínico do paciente com depressão, atenuando os sintomas e gerando nele bem-estar, além disso, também é utilizado na cessação tabágica. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação do CH em células de hepatoma humano HepG2/C3A pelo ensaio de citotoxicidade (MTT). Para a realização do teste, uma suspensão de 1×10^4 células/poço foi semeada em placas de cultura celular de 96 poços. Os grupos avaliados foram o Controle (meio DMEM suplementado com soro bovino fetal (10%); agente citotóxico Doxorubicina ($5 \mu\text{g/mL}$); e as concentrações de 25, 50, 100 e $250 \mu\text{M}$ de CH. As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas e a leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 550nm. Foram realizados três experimentos independentes e os resultados da absorbância foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnet ($\alpha=0,05$, $p<0,05$, $n=3$). Os resultados apontaram que todas as concentrações de CH avaliadas, em todos os tempos de exposição, foram tóxicas para as células de hepatocarcinoma humano, interferindo na atividade mitocondrial e viabilidade celular das HepG2/C3A.

Introdução

Segundo a Organização Mundial da saúde (OMS), a depressão afeta mais de 300 milhões de pessoas e estas apresentam sintomas como ansiedade, insônia, inquietação, concentração reduzida e falta de apetite. A cada ano que passa está tendo uma crescente alta da depressão na população mundial (FIGUEIREDO et al., 2017).

Com a intenção de atenuar os sintomas da depressão, alguns medicamentos antidepressivos estão sendo utilizados para o tratamento

desses pacientes, tal como o Cloridrato de Hidroxibupropiona (CH) que, além de auxiliar nos sintomas da depressão também ajuda na cessação tabágica, diminuindo a abstinência (KHAN et al., 2016). O CH é o principal metabólito ativo derivado do Cloridrato de Bupropiona (BUP), e esse metabólito é encontrado no plasma em concentrações mais elevadas que o próprio BUP, sendo mais ativo (BUP, 2016). Esse composto tem propriedades terapêuticas que inibem a recaptção da dopamina e norepinefrina, atenuando o quadro de depressão (BROWN; CROUCH, 2017).

Devido ao intenso uso farmacológico do antidepressivo BUP pela população em geral, principalmente no tratamento da depressão, e ainda pela falta de estudos toxicológicos do medicamento, objetivou-se neste trabalho avaliar a possível toxicidade do CH, o principal metabólito ativo do BUP, em células de hepatocarcinoma humano HepG2/C3A.

Materiais e métodos

Agentes químicos

O Cloridrato de Hidroxibupropiona (CH – 2S,3S-Hydroxybupropion Hydrochloride, CAS: 106083-71-0, 98%) foi adquirido da Sigma (St. Louis, MO, EUA) e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO – CAS: 67-68-5, 99,7%) e solução fosfato-salino (PBS). Para o experimento, a solução estoque foi diluída em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF – CAS: 12657029, Gibco – Invitrogen). A concentração final de DMSO nas culturas celulares não ultrapassou 1% e testes prévios não indicaram indícios de toxicidade. A Doxorrubicina (Doxo – CAS: 25316-40-9) também foi adquirida da Sigma. O meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Cat. N.º. 12800-017), o MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-il) - 2,5dipheniltetrazolium bromide] (98%, Cat. N.º. M-6494) e o Antibiótico/Antimicótico (Cat. N.º. 15240-062) foram adquiridos da Gibco® Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

Linhagem celular e condições de cultivo

As células de hepatocarcinoma (HepG2/C3A), livres de micoplasmas, foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ. Para o experimento, a linhagem HepG2/C3A foi cultivada em meio de cultura DMEM contendo 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

Ensaio de Citotoxicidade – MTT

Foram semeados 1x10⁴ células HepG2/C3A por poço em placas de cultura celular de 96 poços. Os grupos avaliados, foram: Controle (meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal); agente citotóxico Doxorrubicina (Dox, 5µg/mL) e Cloridrato de Hidroxibupropiona, nas concentrações de 25, 50, 100 e 250 µM.

Após 24, 48 e 72 horas, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura sem soro contendo o sal MTT (0,167mg/mL). Depois de 4 horas, o meio foi

descartado e aos poços foram adicionados 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para diluição dos cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 550nm. Três experimentos independentes foram realizados e os resultados da absorbância foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de *Dunnnett* ($\alpha=0,05$, $p<0,05$, $n=3$) com auxílio do programa *GraphPad INSTAT*.

Resultados e Discussão

Ainda há poucos dados na literatura sobre os possíveis potenciais tóxicos que o BUP e o seu principal metabólito ativo Cloridrato de Hidroxibupropiona podem causar as células.

Os resultados obtidos pelo ensaio do MTT apontaram que o composto Cloridrato de Hidroxibupropiona, nas concentrações de 25, 50, 100 e 250 µM, em todos os tempos de exposição (24, 48 e 72 horas) foi tóxico para as células de hepatoma humano HepG2/C3A, indicando que o CH causa interferência na atividade mitocondrial desta célula, pois todos os tratamentos com o composto apresentaram diferença estatisticamente significativa entre a média da absorbância do tratamento em relação ao Controle (Figura 01).

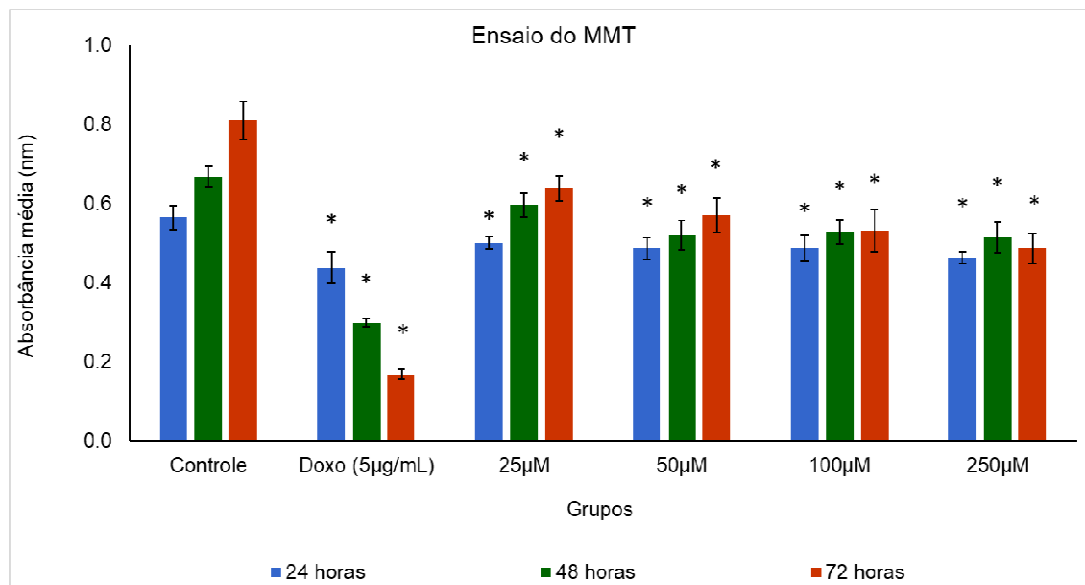


Figura 01 – Efeito do Cloridrato de Hidroxibupropiona sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial de células HepG2/C3A, após 24, 48 e 72 horas, de tratamento com quatro concentrações. Os valores correspondem a Média ± Desvio Padrão, $n=3$.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ($p<0,05$).

No estudo realizado por Jang et al. (2011), células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) foram expostas a diversas concentrações de BUP por 24 horas e os autores observaram que esse fármaco foi citotóxico nas

concentrações de 50 e 100 μM , porém, em concentrações mais baixas (1 e 10 μM) não foi observado toxicidade significativa.

Conclusões

A análise da atividade mitocondrial pelo ensaio do MTT nas células HepG2/C3A apontou que o CH interfere sobre o metabolismo mitocondrial, indicando efeitos citotóxicos e apontando para uma possível atividade antiproliferativa nesta linhagem tumoral.

Portanto, esse trabalho colabora para o conhecimento da interação desse fármaco com a célula de hepatoma humano, indicando a necessidade de desenvolver mais estudos relacionados ao composto, testes de genotoxicidade e mutagenicidade, com a finalidade de garantir o consumo do BUP pelo paciente de forma mais segura.

Agradecimentos

A Fundação Araucária, órgão financiador deste projeto; a minha amiga doutoranda Mariana Yoshimoto, a minha orientadora Professora Dr^a. Veronica Elisa Pimenta Vicentini, a minha família que me deu apoio e aos meus amigos do Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental.

Referências

BROWN, K. M.; CROUCH, B. I. Bupropion Overdose: Significant Toxicity in Pediatrics. Salt Lake City: **Clinical Pediatric Emergency Medicine**, v. 18, n. 3, p. 212-217, 2017.

BUP: Cloridrato de Bupropiona. **Eurofarma**. Itapevi – SP, [2016]. Bula de remédio.

FIGUEIREDO, I. R. et al. Farmacodermia induzida por Bupropiona em paciente com transtorno depressivo maior. Brasília: **Med Saude Brasilia**, v. 6, n. 3, p. 334-340, 2017.

JANG, E.; PARK, C.; KANG, J. Bupropion, an atypical antidepressant, induces endoplasmic reticulum stress and caspase-dependent cytotoxicity in SH-SY5Y cells. Republic of Korea: **Toxicology**, v. 285, n. 2, p. 1-7, 2011.

KHAN, S. R. et al. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology: Bupropion Hydrochloride**. 1 ed. v. 41, p. 1-30, 2016.