

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO FÁRMACO ORLISTAT EM CULTURA DE CÉLULAS HUMANAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA (MCF-7) E NEUROBLASTOMA (SH-SY5Y)

Débora Elisa Antunes de Mendonça (bolsista); Lilian Capelari Soares (co-orientador); Veronica Elisa Pimenta Vicentini (orientador); e-mail: deeboraelisa@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas I; Mutagenese

Palavras-chave: Atividade mitocondrial, Xenical, MTT.

Resumo:

Uma das doenças altamente prevalente na população mundial é a obesidade, seu tratamento se baseia em exercícios físicos, mudanças de hábitos alimentares e uso de medicamentos. Dentre estes o Orlistat se destaca, pois, seu mecanismo é de base enzimática, ação diferente dos demais, por inibir reversivelmente as lipases gástricas e pancreáticas. Devido ao grande consumo de Orlistat pela população mundial, há necessidade de garantir a saúde e a segurança do paciente sendo fundamental a avaliação da sua citotoxicidade. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito citotóxico do Orlistat em linhagens de células humanas de adenocarcinoma de mama-MCF-7 e neuroblastoma-SH-SY5Y, usando o ensaio do MTT. O Orlistat apresentou um efeito citotóxico em células de MCF-7 na concentração de 100µg/mL no tempo de 72 horas e em células de SH-SY5Y demonstrou citotoxicidade nos tratamentos de 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µg/mL nos tempos de 48 e 72 horas.

Introdução

A preocupação com o corpo atravessa contemporaneamente os diferentes gêneros, faixas etárias e classes sociais. Um modelo de corpo magro é alvo de pessoas que se importam com padrões de beleza, estando esse vinculado ao sucesso (WITT e SCHNEIDER, 2011).

Antagonista aos padrões estéticos atuais do corpo esportivo tem-se uma doença de alta incidência e prevalência, a obesidade, um problema de morbidade mundial, caracterizado pelo acúmulo e excesso anormal de tecido adiposo no corpo, resultando em problemas de saúde, psicossociais e econômicos, no cerne desse problema, além do consumo excessivo de calorias estão os fatores genéticos, sociais, fisiológicos, ambientais, sociais e econômicos, os quais interagem em graus variados para o desenvolvimento dessa patologia, cuja principal preocupação é o desenvolvimento de diabetes mellitus e hipertensão (KWOK et al., 2016).

Modificação do estilo de vida, dieta e exercícios são necessários para que ocorra o tratamento contra a obesidade, e em alguns casos usa-se como adjuvante o tratamento farmacológico (WITT e SCHNEIDER, 2011). Um medicamento importante no tratamento contra a obesidade é o Orlistat ou Xenical (Roche Laboratories), de fórmula molecular $C_{29}H_{53}NO_5$, é um inibidor reversível da lipase gástrica e pancreática, que reduz em aproximadamente 30% a absorção de gordura da dieta, inibindo a hidrólise lipídica no lúmen destes órgãos através de ligações covalentes com resíduos ativos de serina da enzima, e como consequência ocorre *déficit* calórico podendo ter efeito positivo na redução e manutenção do peso (TAYLOR et al., 2013; KWOK et al., 2016).

O Orlistat encontra-se hoje aprovado pela ANVISA para comercialização no Brasil, sendo um medicamento utilizado como emagrecedor, de fácil aquisição e sem venda controlada em drogarias e farmácias, desta forma ele vem sendo utilizado de forma indiscriminada e inadequada pela população, com a finalidade de garantir um corpo escultural, além de ser um dos medicamentos mais prescritos por especialistas para o tratamento da obesidade. Visando prevenir danos posteriores à saúde dos consumidores, uma vez que, drogas podem possuir potencial citotóxico, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial citotóxico do Orlistat em células humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e de neuroblastoma (SH-SY5Y) pelo ensaio do MTT.

Materiais e métodos

As células das linhagens tumorais MCF-7 e SH-SY5Y foram cultivadas em frascos de cultura contendo meio DMEM, suplementado com soro bovino fetal e mantidas em estufa. O Ensaio do MTT foi realizado de acordo com o protocolo sugerido por Mossman (1983), com modificações. Foram utilizadas seis placas de cultura de 96 poços, nas quais foram semeadas as células. Após 24 horas de estabilização foram realizados os seguintes tratamentos: 1) Controle, contendo meio de cultura, suplementado com Soro Bovino Fetal; 2) Droga indutora de danos, a Doxorrubicina (DOX); 3) Cinco concentrações do medicamento Orlistat (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$). As seis placas foram mantidas em estufa por 24, 48 e 72 horas. Após estes tempos o tratamento foi descartado e uma solução contendo MTT foi adicionada, sendo as placas mantidas novamente por mais 4 horas em estufa. Após esse período foi adicionado aos poços DMSO e a leitura da absorbância ocorreu no espectrofotômetro a 550nm. Os dados obtidos foram registrados, calculadas a média das absorbâncias de cada grupo e submetidos à análise de variância (ANOVA) com $p < 0,05$, seguido pelo teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$). Os dados foram expressos como média da absorbância.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade do MTT encontram-se na figura 1:

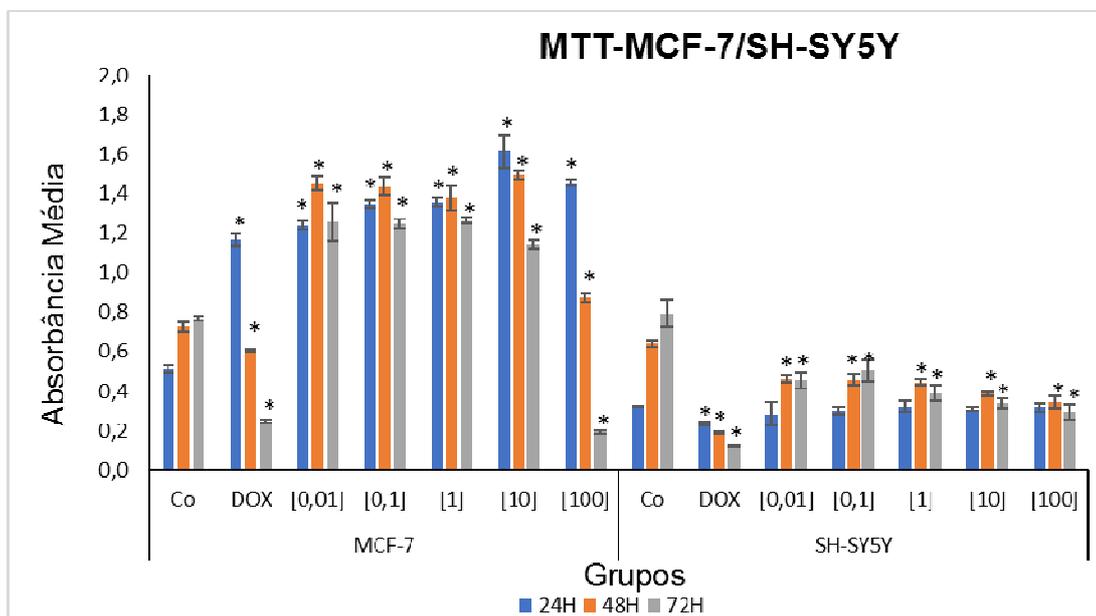


Figura 1. Absorbância média e desvio padrão dos grupos Controle (Co), tratamento com Doxorrubicina (DOX) e Orlistat nas concentrações de 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por 24, 48 e 72 horas, em duas linhagens celulares. * Resultado estatisticamente significativo em relação ao Controle ($p < 0,05$).

No tratamento utilizando em células de MCF-7, todos os grupos testados nos três tempos (24, 48 e 72 horas), apresentaram diferenças significativas quando comparados ao controle (Co), sendo que as concentrações de 0,01; 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nos tempos de 24, 48 e 72 horas, apresentaram uma maior viabilidade mitocondrial, devido ao seu maior valor de absorbância, já a maior concentração (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi a única a apresentar efeito citotóxico após 72 horas de tratamento, mesmo tendo um aumento da atividade mitocondrial nos tempos de 24 e 48 horas. A Doxorrubicina (DOX), conhecida como um agente químico que induz a morte celular, também demonstrou efeito citotóxico nas células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) nos tempos de 48 e 72 horas, e em neuroblastoma (SH-SY5Y) nos três tempos, viabilizando o teste. Já no experimento utilizando SH-SY5Y todos os tratamentos, nos tempos de 48 e 72 horas, apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, apresentando um efeito citotóxico.

Corroborando com este estudo, Chuang et al. (2011) observaram que o Orlistat também interferiu na proliferação de células tumorais do tipo HT-29/tk-luc, atuando em G1 do ciclo celular. Já Stolarz (2015), relatou que o Xenical apresentou efeito citotóxico em células de hepatoma humano (HepG2/C3A), utilizando também o Ensaio do MTT nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Sendo assim, pode-se dizer que o Orlistat possui efeito citotóxico em células MCF-7 em 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ após 72 horas de exposição e também demonstra uma redução da atividade

mitocondrial em células SH-SY5Y nas concentrações de 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µg/mL nos tempos de 48 e 72 horas.

Conclusões

Analisando os dados obtidos com os ensaios, conclui-se que o Orlistat possuiu um efeito citotóxico sobre as células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) no tempo de 72 horas na concentração de 100µg/mL. Já para o MTT com células de neuroblastoma (SH-SY5Y) o medicamento apresentou um efeito citotóxico, pois interferiu sobre a atividade mitocondrial após o tratamento com 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µg/mL de Orlistat, após 48 e 72 horas de exposição ao medicamento. Porém, outros estudos devem ser realizados para melhor conhecimento da ação do Orlistat.

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 ao CNPq.

Referências:

CHUANG, H.Y.; CHANG, Y.F.; HWANG, J.J. Antitumor effect of Orlistat, a fatty acid synthase inhibitor, is via activation of caspase-3 on human colorectal carcinoma-bearing animal. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, p. 286-292, 2011.

KWOK, K.H.M.; LAM, K.S.L.; XU, A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 48, n. 3, p. e215, 2016.

STOLARZ, I.C. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica do inibidor de apetite Orlistat em células de hepatoma humano (HepG2/C3A). **Trabalho de conclusão de curso de Tecnologia em Biotecnologia, Universidade Estadual de Maringá**; 2015.

TAYLOR, P.; TRIGUEROS, L.; PEÑA, S.; UGIDOS, A.V. Food Ingredients as Anti-Obesity Agents: A Review. **Critical Reviews in food science and nutrition**, v.53, n. 9, p. 929-942, 2013.

WITT, J.S.G.Z.; SCHNEIDER, A.P. Nutrição estética: valorização do corpo e da beleza através do cuidado nutricional. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.16, n. 9, p. 3909-3916, 2011.