

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO ANTIDEPRESSIVO CLORIDRATO DE HIDROXIBUPROPIONA EM LINFÓCITOS HUMANOS

Gabrielle Aparecida Affonso (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Mariane Aparecida Franco de Godoy (Coorientador), Veronica Elisa Pimenta Vicentini (Orientador). E-mail: vepvicentini@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas/Genética e Mutagênese

Palavras-chave: Ensaio do Cometa; Ensaio do Micronúcleo; Mutagênese.

RESUMO

O uso de antidepressivos, como o Cloridrato de Bupropiona, tem crescido nos últimos anos para tratar depressão, cessar o tabagismo e aliviar sintomas de abstinência. No entanto, devido a possíveis efeitos adversos e dependência, é essencial monitorar seu uso com avaliações constantes. Este estudo analisou a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do metabólito Cloridrato de Hidroxibupropiona em linfócitos humanos usando o Teste do MTT, o Ensaio do Cometa e o Teste do Micronúcleo. Os resultados indicaram que apenas as maiores concentrações interferem na viabilidade celular e causam alterações nucleares.

INTRODUÇÃO

A depressão é uma das principais causas de incapacidade, caracterizada por alterações de humor e distúrbios emocionais como tristeza e irritabilidade, afetando o cotidiano do indivíduo. O Cloridrato de Bupropiona e seu metabólito, o Cloridrato de Hidroxibupropiona, são alternativas eficazes para aliviar esses sintomas e amplamente consumidos no país, sendo crucial o acompanhamento dos riscos associados ao seu uso.

Nesse contexto, estudos *in vitro* são essenciais para investigar os riscos que os fármacos podem representar às células humanas. Os linfócitos, células responsáveis pela resposta imune, podem ser utilizados em testes como o Teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-2H bromotetrazólio) que avalia o potencial citotóxico, o Ensaio do Cometa que avalia a genotoxicidade por meio da detecção de quebras no DNA, e o Teste do Micronúcleo utilizado para avaliar a mutagenicidade,

analisando danos nucleares e cromossômicos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do antidepressivo Cloridrato de Hidroxibupropiona em cultura de linfócitos humanos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Solução tratamento e Cultura de células

O fármaco Bup[®] foi adquirido comercialmente e dissolvido em tampão fosfato-salino com 0,1% de DMSO. A coleta de sangue, aprovada pelo Comitê de Ética da UEM, contou com o Termo de Consentimento Livre dos participantes. Foram coletados 40 mL de sangue periférico de três voluntários hígidos. Após isolar os linfócitos com Ficoll Paque Plus, as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 com 20% de SBF e 2% de fitohemaglutinina A e contadas na câmara de Neubauer para os experimentos.

Teste de citotoxicidade - MTT

O ensaio foi realizado conforme Mosmann (1983), com modificações. Em placas de 96 poços, foram semeadas 1×10^6 linfócitos por poço. Após estabilização, foi adicionado meio completo com os tratamentos: controle, controle com 0,1% de DMSO, metilmetanosulfonato (MMS) [100 μ M], e Cloridrato de Hidroxibupropiona [25, 50, 100 e 250 μ M/mL]. Após 24, 48 e 72 horas, o meio foi trocado por 100 μ L de MTT [2 mg/mL] e incubado por 4 horas. O meio foi então substituído por 100 μ L de DMSO (99,7%) para solubilizar os cristais de formazan, e a leitura foi feita em leitor de microplacas (Labtech) a 550 nm.

Ensaio de genotoxicidade

O teste seguiu o protocolo de Tice *et al.* (2000), com modificações. Foram semeadas 1×10^6 células/poço em placas de 6 poços, e após 24 horas, as células foram tratadas com Cloridrato de Hidroxibupropiona [25, 50, 100 e 250 μ M/mL] por 3 horas. O indutor de danos ao DNA foi o Metilmetanosulfonato (MMS) [100 μ M]. Após a colheita, a suspensão foi depositada em lâminas com agarose normal, cobertas por lamínulas e refrigeradas por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas em solução de lise celular por 1:30h, submetidas a eletroforese e depois, neutralizadas, fixadas e refrigeradas até a análise. Para a análise, foram contabilizadas 100 células por lâmina, classificando-as de acordo com os danos de classes 0 a 3, excluindo células apoptóticas.

Teste do Micronúcleo

O teste seguiu Fenech (2000), com modificações. Após 44 horas de cultura foi adicionado o Cloridrato de Hidroxibupropiona [25, 50, 100 e 250 µM/mL], e após 48 horas, a citocalasina B [5 µg/mL] foi usada para inibir a citocinese. As células foram coletadas, fixadas em metanol-ácido acético e coradas com Giemsa a 5%. Foram analisadas 1.000 células binucleadas para avaliar micronúcleos (MN), ponte núcleo plasmática (PNP) e broto nuclear (NBUD), e 500 células para o índice de proliferação com bloqueio de citocinese (CBPI) que foi calculado pela fórmula $[M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/1.000$.

As análises estatísticas dos três testes foram realizadas utilizando a análise de variância (*Oneway ANOVA*), seguido do Teste de Dunnet ($\alpha=0,05$; $p<0,05$) com o auxílio do programa *GraphPad Prism 5.01*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os três ensaios realizados, foram avaliadas as concentrações de 25, 50, 100 e 250 µM/mL de Cloridrato de Hidroxibupropiona. No ensaio de citotoxicidade do MTT apenas a concentração de 250 µM mostrou efeito citotóxico, estatisticamente significativo, após 48 e 72 horas de tratamento. No Ensaio do Cometa, não houve diferença significativa, indicando ausência de genotoxicidade. Enquanto no Ensaio do Micronúcleo, apesar de não haver indução de micronúcleos ou pontes, foram observados brotos em células tratadas com concentrações de 100 e 250 µM/mL. Isso sugere que em concentrações mais elevadas o fármaco pode causar citotoxicidade e induzir alterações nucleares como brotos.

Os resultados do presente estudo sobre o Cloridrato de Bupropiona diferem dos encontrados por Bhattacharya *et al.* (2013), que relataram alta citotoxicidade e genotoxicidade em linfócitos humanos tratados. No entanto, a principal diferença pode estar no uso excessivo do solvente DMSO, pois, os autores do estudo usaram 8% de DMSO, enquanto a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) recomenda não ultrapassar 1%. Isso pode ter influenciado nos resultados. Além disso, a literatura sobre os efeitos do Cloridrato de Bupropiona *in vitro* é limitada, e futuros estudos devem considerar essas variáveis e explorar mais profundamente as ações deste fármaco.

CONCLUSÕES

Dado o papel crucial dos antidepressivos e especificamente, do Cloridrato de Hidroxibupropiona no tratamento da depressão, este estudo avaliou a segurança citotóxica, genotóxica e mutagênica do fármaco em linfócitos humanos. As concentrações testadas mostraram que apenas as mais altas causaram diminuição da proliferação celular e também alterações nucleares. Esses resultados ressaltam a

importância de testes de toxicidade *in vitro* e a necessidade de estudos adicionais sobre a toxicidade deste e de outros antidepressivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária pelo financiamento deste projeto, a SETI e a Capes responsável por outras pesquisas, à Universidade Estadual de Maringá, ao DBC, a minha Orientadora e aos colegas de laboratório.

REFERÊNCIAS

BHATTACHARYA, S. K., NATHAWAT, L. S., DAMANI, P., CHOKSI A. P., BANIK, A., SINHA, K., BHATTACHARYA, A. S. 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. 11-18, 2013.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

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

OECD. (2023). Test guidelines for In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (No. 487). Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en. Acesso em: 20 agosto 2024.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.