



AValiação CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DA NICOTINA E SEU METABÓLITO COTININA UTILIZANDO CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y).

Caroline Cardoso Nicolau¹
Daiana Dalberto²
Juliana da Silva³

Resumo

A nicotina é o principal constituinte do tabaco e a cotinina é seu principal metabólito. Estes compostos podem causar toxicidade aguda e apresentar riscos à saúde. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos, de diferentes doses da nicotina e da cotinina, assim como a oxidação de bases nitrogenadas, utilizando a linhagem celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). Para a avaliação da citotoxicidade foi utilizado o ensaio de MTT e o ensaio com azul de tripan. Os danos genotóxicos foram avaliados através do ensaio cometa alcalino e ensaio cometa modificado com as enzimas FPG, OGG1 e ENDO III. Os resultados encontrados no ensaio de MTT demonstraram citotoxicidade acima de 70% para as concentrações acima de 0,5 µg/mL para a nicotina e 0,25 mg/mL para a cotinina para as células tratadas. No ensaio com azul de tripan as células apresentaram viabilidade acima de 80% em todas as doses expostas. No ensaio cometa, todas as concentrações de nicotina e de cotinina, apresentaram aumentos significativos quanto ao índice de danos ao DNA. O ensaio cometa modificado por enzimas demonstrou aumento significativo de lesões totais ao DNA nas células expostas a nicotina e cotinina para todas as concentrações, exceto para as concentrações 0.500 mg/mL (Endo III) e 2 mg/mL (OGG1) para a cotinina. Estes dados demonstram que a nicotina e o seu principal metabólito a cotinina são capazes de induzir danos genotóxicos em células SH-SY5Y, conforme foi observado no ensaio cometa e que esses danos genotóxicos podem estar associados ao estresse oxidativo conforme observado no ensaio cometa modificado com enzimas.

Palavras chave: Nicotina; Cotinina; Células SH-SY5Y; Citotoxicidade; Genotoxicidade.

INTRODUÇÃO

A nicotina é o principal alcaloide vegetal encontrado na composição da planta do tabaco e responsável pela toxicodependência (BENOWITZ, 2010; FOWLER et al., 2011; MAITY et al., 2014). Resultados sobre o consumo do tabaco apontam para milhões de mortes por ano, sendo 90% por câncer de pulmão (FOWLER et al., 2011). Segundo Luttrell e Vogel (2014), embora não haja evidências de que a nicotina por si só cause câncer; em animais tem sido demonstrado que ela inibe a apoptose, podendo funcionar como promotora de tumores. Outra forma de exposição à nicotina acontece no cultivo do tabaco. Devido a sua fácil absorção pela pele a toxicidade sistêmica da nicotina pode ocorrer através de sua manipulação. Segundo Mishra et al. (2015), Fassa et al. (2014) e Da Silva et al. (2010), os produtores de tabaco quando entram em contato com as folhas de tabaco no período da colheita, muitas vezes ainda úmidas de orvalho, correm risco de intoxicação. Essa intoxicação é conhecida como doença da folha verde (*Green Tobacco Sickness*, GTS), que é um

1 Aluna do curso de graduação de Biomedicina – Bolsista PIBIT/CNPq – caroline_nicolau@hotmail.com

2 Aluna mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – daianapru@yahoo.com.br

3 Professor do curso de graduação de Ciências Biológicas e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – juliana.silva@ulbra.br

envenenamento agudo da nicotina causado pela absorção transdérmica da mesma. A nicotina também pode penetrar na corrente sanguínea, passando a interagir com o DNA e gerar um potencial toxicológico, que em longo prazo pode levar a efeitos no comportamento humano, sistema nervoso central e periférico, além do sistema cardiovascular, e sistema endócrino entre outros (SASSONE, 2011).

A metabolização da nicotina acontece principalmente no fígado, através de enzimas do citocromo P450. Cerca de 70-80% da nicotina é metabolizada em cotinina, um alcaloide considerado tóxico (HUKKANEN et al., 2005, HENNINGFIELD et al., 2009). Devido à semelhança estrutural da nicotina e da cotinina, elas são apontadas por apresentarem os mesmos efeitos (BACH et al., 2016). Evidências apoiam a teoria de que a cotinina pode levar aos mesmos efeitos da nicotina no sistema nervoso central, no sistema cardiovascular e também estar envolvido na dependência do hábito de fumar (GRIZZEL; ECHEVERRIA, 2015).

Devido aos estudos de neurotoxicidade pelo uso da nicotina ainda apresentarem contradição e como não se tem muitas informações sobre a cotinina, este estudo teve como objetivos avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos da nicotina e da cotinina pela linhagem celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), bem como detectar bases oxidadas através do ensaio cometa modificado por endonucleases.

METODOLOGIA

A linhagem celular foi cultivada em meio DMEM/F12, mantidas a 37°C em atmosfera umidificada com CO₂ a 5%. Para a realização dos ensaios de MTT, azul de tripan, cometa alcalino e cometa modificado, as células foram semeadas em meio de cultivo e distribuídas em placas de 24 poços. A determinação das concentrações seguiu a norma OECD 487 (2014). Em cada um dos poços foi adicionado as concentrações 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 de nicotina (µL/mL) e de cotinina (mg/mL), e um controle negativo e um positivo. Para o ensaio cometa modificado com enzimas, foram utilizadas apenas as concentrações 2.0, 0.5 e 0.125 nicotina (µL/mL) e de cotinina (mg/mL).

Para determinação da citotoxicidade foi realizado o ensaio colorimétrico de MTT seguindo a norma ISO/EN10993-5 (2009). A técnica de MTT quantifica a atividade mitocondrial, medindo a formação de cristais de formazan, produto formado pela redução de tetrazolium MTT. O ensaio com azul de tripan avalia integridade da membrana plasmática. As células foram homogeneizadas com o corante azul de tripan 0,4%, na proporção 1:1 (corante: homogeneizado de células) e posteriormente foi avaliando a integridade de membrana através da leitura de um contador de células automático.

O ensaio cometa alcalino foi realizado como descrito por Singh et al. (1988) e modificado por Da Silva et al. (2000). As células foram embebidas em agarose e foram dispostas em lâminas, após foram mergulhadas em tampão de lise. Após as lâminas foram cobertas por solução tampão alcalina por 20 min. E então foram submetidas à eletroforese por 15 minutos a 25 volts e 300 mA. Ao término, as lâminas foram neutralizadas e então coradas com solução de nitrato de prata. A análise foi realizada em 100 células por tratamento, utilizando microscópio óptico e células foram classificadas nas classes de danos de 0 a 4.

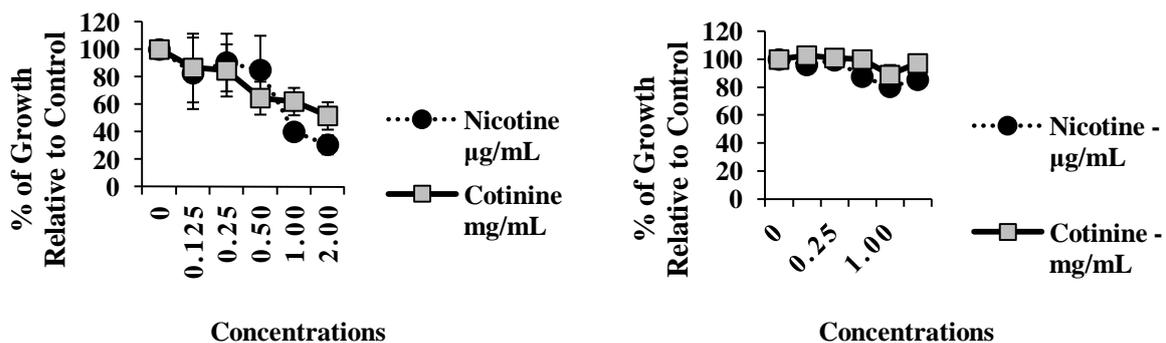
Para a realização do ensaio cometa modificado com enzimas, as células foram preparadas da mesma maneira que foram preparadas para o ensaio cometa alcalino até a retirada das lâminas da solução de lise. Quando as lâminas foram retiradas da solução de lise, foram lavadas com a solução tampão e após foram incubadas a 37° C com tampão enzimático suplementado com FPG por 45 minutos, OGG1 e Endo III por 30 minutos de incubação em câmara úmida. Após, as lâminas foram dispostas em cuba de eletroforese horizontal, cobertas por solução tampão por 40 min. Após as lâminas foram submetidas à eletroforese por 15

minutos a 25 volts e 300 mA (COLLINS et al, 1993). A neutralização, coloração e avaliação dos danos ocorreram da mesma forma que o cometa alcalino.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para o ensaio de MTT demonstraram citotoxicidade nas células de neuroblastoma acima de 70% para as concentrações maiores que 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para nicotina e maiores que 0,25 mg/mL para cotinina (Fig. 1A). A citotoxicidade foi capaz de reduzir a viabilidade celular de maneira dose dependente, quanto maior a dose maior a toxicidade do composto, sendo a maior citotoxicidade nas maiores concentrações de nicotina (2,0 $\mu\text{g/mL}$ e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) e nas maiores concentrações de cotinina (2,0 mg/mL , 1,0 mg/mL e 0,5 mg/mL). No ensaio de viabilidade celular com azul de tripan foi observado que as células SH-SY5Y apresentaram viabilidade celular acima de 80% em todas as concentrações, tanto para nicotina como para cotinina (Fig. 1B). Estes resultados demonstram que os compostos apresentaram toxicidade para a mitocondria, mas não para a membrana celular, que permaneceu íntegra durante a exposição as diferentes concentrações de nicotina e de cotinina.

Figura 1: Avaliação da viabilidade celular de SHSY-5Y, utilizando o ensaio de MTT (A) e o ensaio azul de tripan (B).



O ensaio cometa alcalino apresentou resultados significativos no índice de danos, para ambos os compostos. Estes resultados demonstram indução de genotoxicidade nas células de neuroblastoma humano ($P < 0,05$; ANOVA, Tukey) (Tabela 1). Em diferentes estudos utilizando o ensaio cometa, como o de Ginskey et al. (2012; 2014), observou-se que a nicotina causou danos ao DNA em diferentes concentrações em que as células foram expostas, inclusive com maiores efeitos nas maiores doses, confirmando os resultados encontrados nesse estudo.

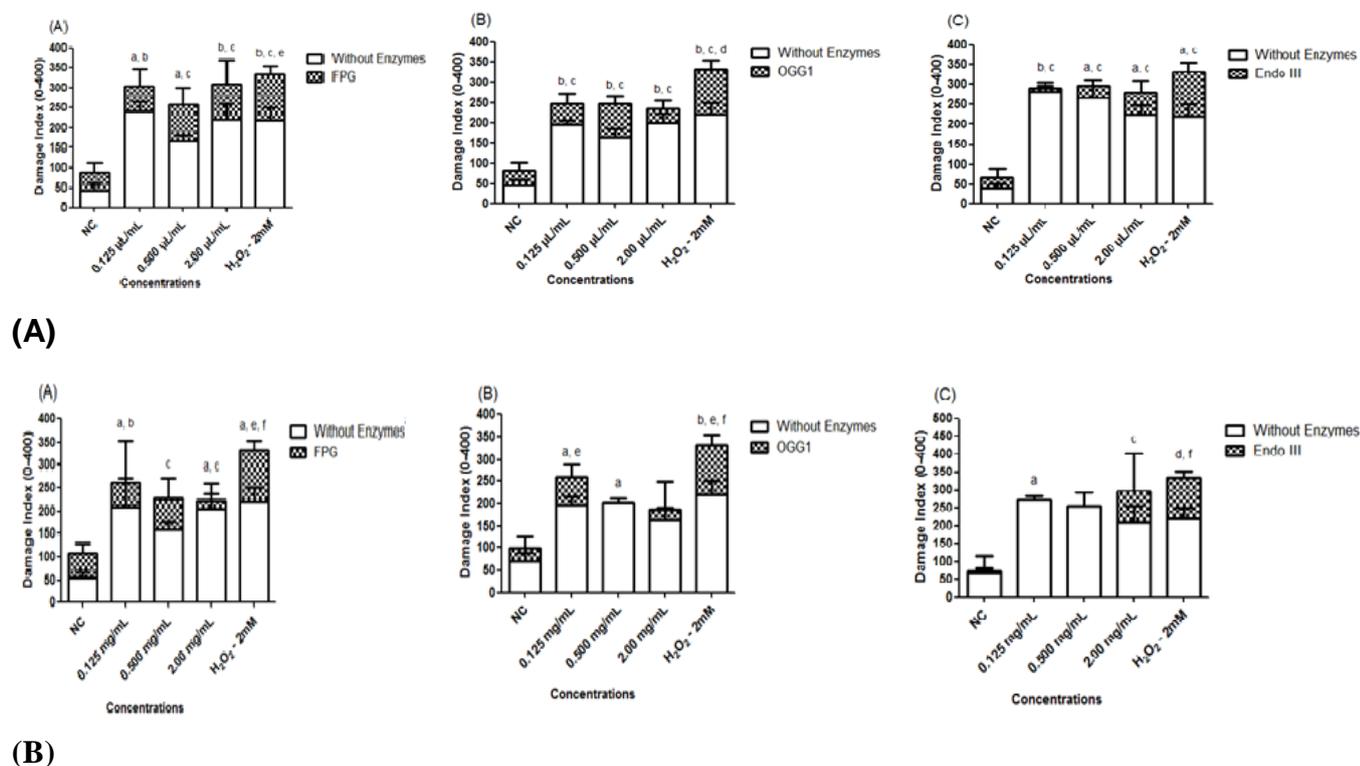
O ensaio cometa modificado por enzimas (FPG, OGG1 e Endo III), demonstrou aumento significativo de lesões totais ao DNA nas células SH-SY5Y expostas as ao composto nicotina (Fig. 2) e cotinina (Fig. 3) para todas as concentrações, exceto para as concentrações 0,500 mg/mL (Endo III) e 2 mg/mL (OGG1) para a cotinina. Com a enzima FPG, é possível detectar a presença de purinas alteradas (LANGIE et al., 2015), a enzima OGG1 reconhece 8-oxo-G e a enzima Endo III detecta lesões originadas de pirimidinas oxidadas (KUZNETSOV et al., 2015). Ainda foi possível observar uma leve diferença entre os resultados para a linhagem celular de neuroblastoma humano expostas a diferentes concentrações de nicotina e de cotinina quando utilizada a enzima FPG, podendo os danos ao DNA estarem relacionados principalmente a purinas oxidadas.

Tabela 1. Avaliação da lesão ao DNA em células de SHSY-5Y tratadas com nicotina e cotinina. Resultados expressos em Média ± Desvio Padrão.

Concentrations		DI (0-400)
Negative Control ^f		75.82 ± 64.17
Nicotine	0.125 µg/mL	171.00 ± 38.93 ^{a,d}
	0.250 µg/mL	139.75 ± 15.92 ^e
	0.500 µg/mL	208.25 ± 59.35 ^b
	1.00 µg/mL	250.75 ± 71.62 ^c
	2.00 µg/mL	308.00 ± 88.54 ^c
Cotinine	0.125 mg/mL	151.25 ± 30.39 ^b
	0.250 mg/mL	176.50 ± 32.14 ^c
	0.500 mg/mL	171.50 ± 46.26 ^c
	1.00 mg/mL	151.50 ± 19.36 ^b
	2.00 mg/mL	201.25 ± 66.77 ^c
Positive Control ^g		253.60 ± 104.38 ^c

^asignificância estatística comparada ao controle negativo at P<0,05, ^b at P<0,01, and ^c at P<0,001); ^d significância estatística comparada entre as dose at P<0,01, and ^e at P<0,001 (Tukey's Multiple Comparison Test). ^f H₂O₂ - 2 mM.

Figura 2. Resultados do índice de danos das células expostas a nicotina (A) e cotinina (B) através do ensaio cometa alcalino (branco) e ensaio de cometa modificado utilizando as enzimas FPG, OGG1 e Endo III.



CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, nossos estudos demonstraram que a nicotina e a cotinina induziram citotoxicidade as células expostas e danos ao DNA, principalmente atuando sobre a atividade mitocondrial. Os mecanismos de ação da genotoxicidade aqui demonstrados parecem estar associados à indução de estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

AVELAR-FREITAS, B.A.; ALMEIDA, V.G.; PINTO, M.C.X.; MOURÃO, F.A.G.; MASSENSINI, A.R.; MARTINS-FILHO, O.A.; ROCHA-VIEIRA, E.; BRITO-MELO, G.E.A. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, p. 307-315, 2014.

BENOWITZ, N.L. Nicotine Addiction. **N Engl J Med**, v. 362, p. 2295–2303, 2010

BERRENDERO, F.; ROBLEDO, P.; TRIGO, J.M.; MARTÍN-GARCÍA; MALDONADO, R. Neurobiological mechanisms involved in nicotine dependence and reward: Participation of the endogenous opioid system. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 220 – 231, 2010.

DA SILVA, J.; DE FREITAS, O.R.T.; HEUSER, V.; MARINHO, R.J.; BITTENCOURT, F.; CERSKI, S.T.C.; KLIEMANN, M.L.E.; ERDTMANN, B. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 470, p. 39 – 51, 2000.

GINZKEY, C.; STEUSSLOFF, G.; KOEHLER, C.; BURGHARTZ, M.; SCHERZED, A.; HACKENBERG, S.; HAGEN, R.; KLEINSASSER, H.N. Nicotine derived genotoxic effects in human primary parotid gland cells as assessed *in vitro* by comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and chromosome aberrations test, **Toxicol In Vitro**, v. 28, p. 838 – 846, 2014.

GINZKEY, C.; STUEBER, T.; FRIEHS, G.; KOEHLER, C.; HACKENBERG, S.; RICHTER, E.; HAGEN, R.; KLEINSASSER, N.H. Analysis of nicotine-induced DNA damage in cells of human respiratory tract. **Toxicology Letters**, v. 208, p. 23 – 29, 2012.

HAUSSMANN, H.J. & FARISS, M.W. Comprehensive review of epidemiological and animal studies on the potential carcinogenic effects of nicotine per se. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 701–734, 2016.

HUKKANEN, J.; JACOB, III P.; BENOWITZ, L.N. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 79 – 115, 2005.

ISO/EN10993-5. (2009). International Standard ISO 10993-5 **Biological evaluation of medical devices** - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods.