



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

Caroline Cardoso Nicolau, Daiana Dalberto, Juliana da Silva

### INTRODUÇÃO

A nicotina é o principal constituinte da planta do tabaco e responsável pela toxicod dependência. A função farmacológica da nicotina é exercida ligando-se a receptores colinérgicos nicotínicos que facilita a liberação de neurotransmissores como dopamina e noradrenalina. Esse efeito da nicotina pode afetar diversos sistemas do organismo. O principal metabólito da nicotina é a cotinina. Devido à semelhança estrutural da nicotina e cotinina, elas são apontadas por apresentarem os mesmos efeitos, embora não existam dados sobre a genotoxicidade da cotinina.

### OBJETIVOS

Assim, 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

Para a avaliação da citotoxicidade foi utilizado o ensaio de MTT, que quantifica a atividade mitocondrial, e o ensaio com azul de tripan que avalia integridade da membrana plasmática. Os danos genotóxicos foram avaliados através do ensaio cometa alcalino e o modificado com o uso das enzimas FPG, OGG1 e ENDO III. A linhagem celular foi exposta por 3 horas às diferentes concentrações de nicotina (2.0 µg/mL, 1.0 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.125 µg/mL) e cotinina (2.0 mg/mL, 1.0 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL).

### RESULTADOS

Os resultados para o ensaio de MTT demonstraram citotoxicidade nas células de neuroblastoma acima de 70% para as concentrações maiores que 0,5 µg/mL para nicotina e maiores que 0,25 mg/mL para cotinina (Fig. 1A). Para o ensaio de viabilidade celular com azul de tripan foi possível observar que as células apresentaram viabilidade celular acima de 80% para todas as concentrações, tanto para nicotina como para cotinina (Fig. 1B). O ensaio cometa alcalino apresentou resultados significativos no índice de danos, para ambos os compostos nicotina e cotinina. Estes resultados demonstram indução de genotoxicidade nas células de neuroblastoma humano ( $P < 0,05$ ; ANOVA, Tukey) (Tabela 1). 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. 2A) e cotinina (Fig. 2B) para todas as concentrações, exceto para as concentrações 0.500 mg/mL (Endo III) e 2 mg/mL (OGG1) para a cotinina.

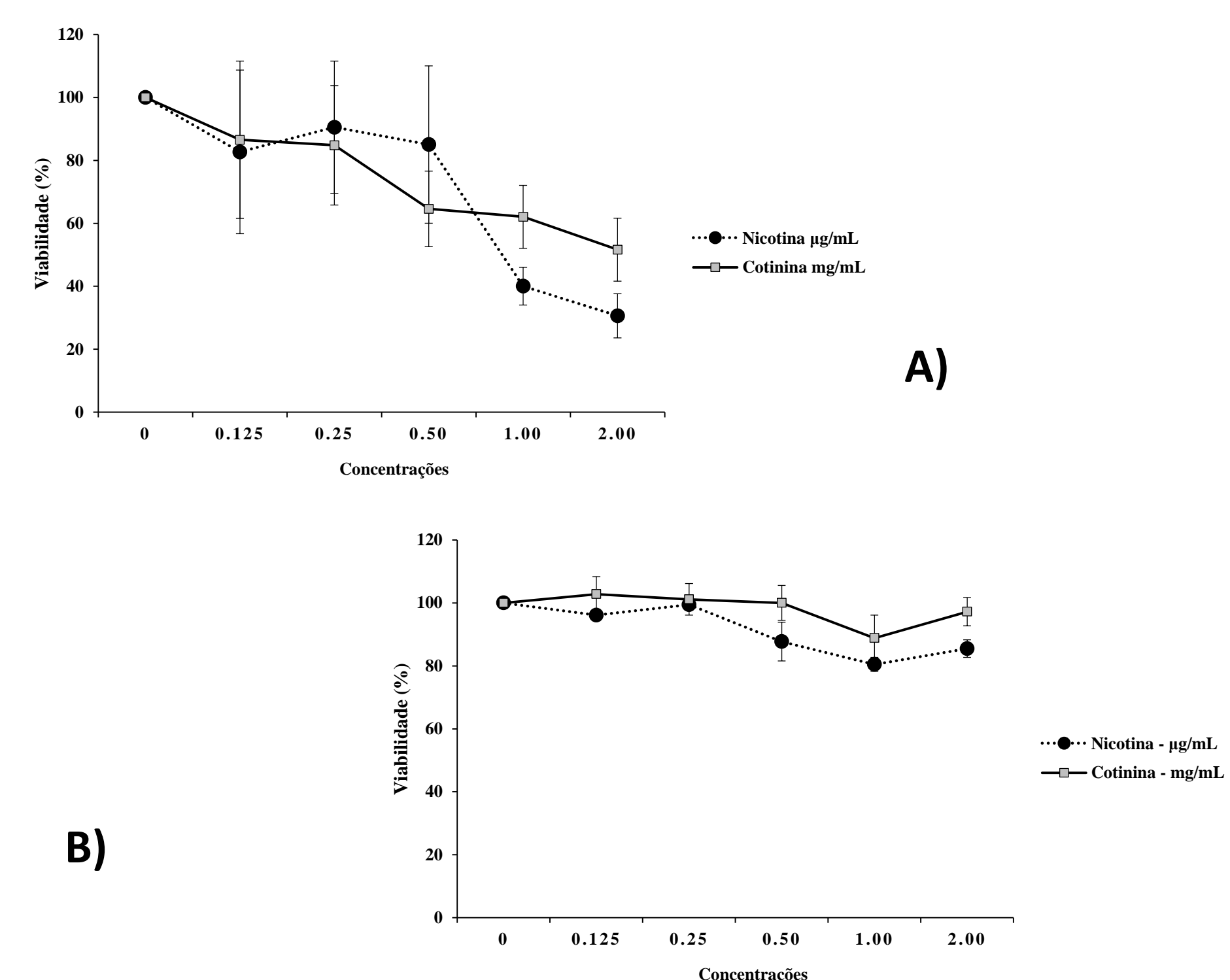


Figura 1: Avaliação da viabilidade celular de SH-SY5Y, utilizando o ensaio de MTT (A) e o ensaio azul de tripan (B).

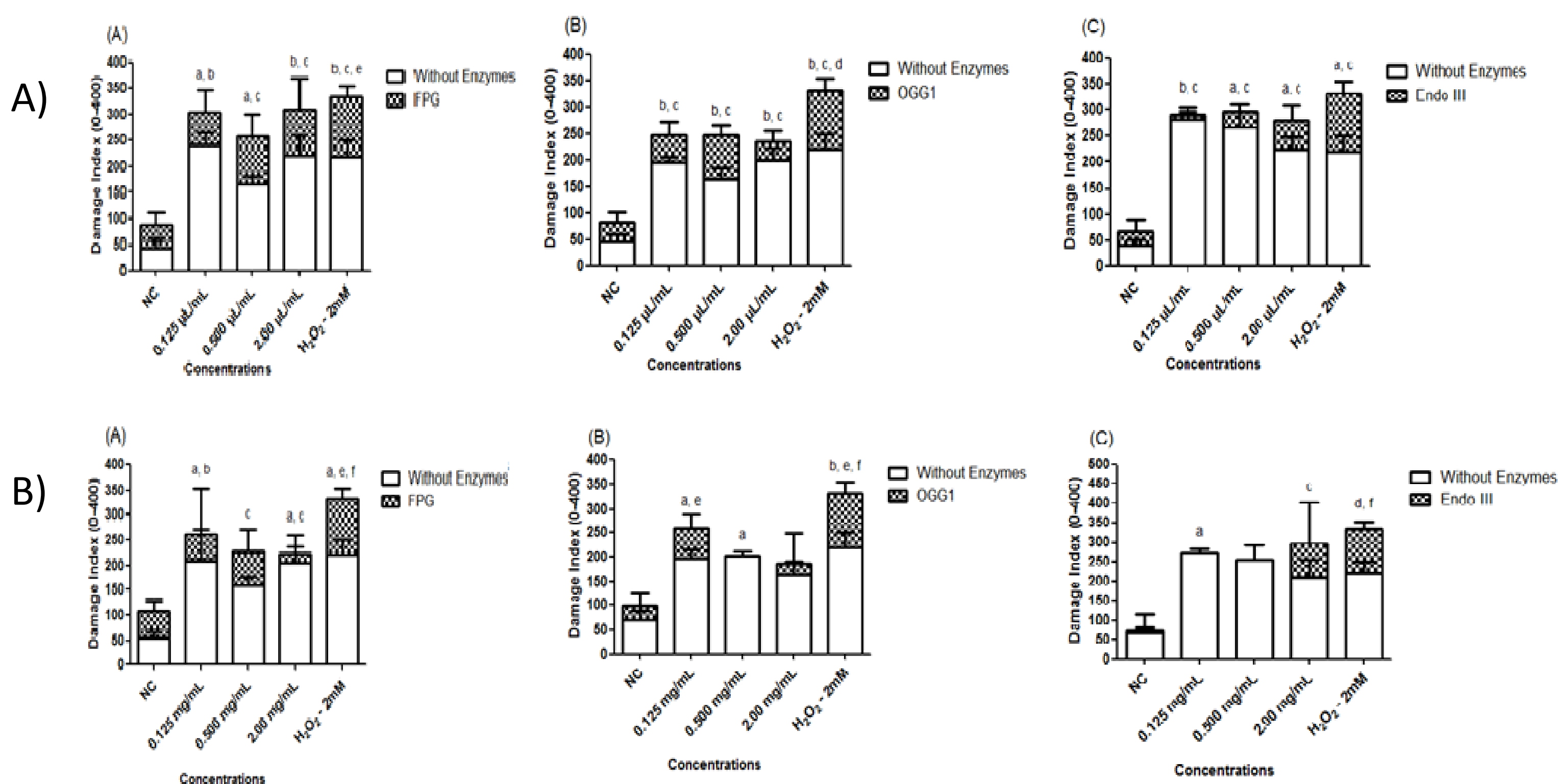


Figura 2. Resultados do índice de danos das células expostas a nicotina (A) e cotinina (B) através do ensaio cometa alcalino (branco) e ensaio de cometa modificado utilizando as enzimas FPG, OGG1 e Endo III.

Tabela 1. Avaliação da lesão ao DNA em células de SH-SY5Y tratadas com nicotina e cotinina. Resultados expressos em Média ± Desvio Padrão \* $P < 0,05$  em relação ao controle.

Concentrações	Índice de Danos
Controle Negativo	75.82 ± 64.17
Nicotina 0.125 µg/mL	171.00 ± 38.93*
0.250 µg/mL	139.75 ± 15.92*
0.500 µg/mL	208.25 ± 59.35*
1.00 µg/mL	250.75 ± 71.62*
2.00 µg/mL	308.00 ± 88.54*
Cotinina 0.125 mg/mL	151.25 ± 30.39*
0.250 mg/mL	176.50 ± 32.14*
0.500 mg/mL	171.50 ± 46.26*
1.00 mg/mL	151.50 ± 19.36*
2.00 mg/mL	201.25 ± 66.77*
Controle Positivo - H2O2 - 2 mM	253.60 ± 104.38*

### CONCLUSÃO

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. 2014; 47: 307-315.  
 BENOWITZ, N.L. Nicotine Addiction. N Engl J Med. 2010; 362(24): 2295-2303.  
 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. 2010; 35: 220 - 231.  
 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. 2000; 470: 39 - 51.  
 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. 2014; 28: 838 - 846.  
 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. 2012; 208: 23 - 29.  
 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. 2016. 46. NO. 8: 701-734.