

# AValiação DO EFEITO CITOTÓXICO DO MINOXIDIL NA LINHAGEM CELULAR L929

Carolina Bueno Luzardo  
Jessica Machado Miri  
Lismare da Silva Prado  
Jaqueline Nascimento Picada  
Ivana Grivicich

PPG EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR APLICADA À SAÚDE ULBRA - CANOAS

## Introdução

A alopecia ou queda de cabelo vem sendo objeto de estudo há vários anos, seja por afetar diretamente a qualidade de vida de muitos indivíduos, seja pela possibilidade de ser um parâmetro indicador de disfunção ou outra patologia. O minoxidil é um derivado da piperidino-pirimidina, com nome químico de 2,6-diamino-4-piperidinopirimidina-1-óxido ( $C_9H_{15}N_5O$ ) (Rossi et al., 2012). Originalmente, o minoxidil era usado por via oral para o tratamento da hipertensão, tendo sido notada hipertricose como um efeito secundário em homens sujeitos a este tratamento. Estes dados levaram ao desenvolvimento de uma formulação tópica com o objetivo de inibir a progressão da perda de cabelo e promover o seu crescimento (Sinclair, 1998; Ellis et al., 2002). A fórmula tópica de minoxidil foi aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento de alopecia. Além disso, tem sido usada para tratar vários distúrbios capilares, como alopecia areata, alopecia cicatricial e distúrbios do eixo capilar, além de melhorar o crescimento de pelos corporais em outras áreas, como sobrancelhas e barba (Olsen et al., 2007). Esse medicamento parece prolongar a fase anagênica de crescimento por um mecanismo ainda desconhecido, levando a uma diminuição da queda de cabelo (Santos et al., 2014). Embora o perfil de segurança e a eficácia da solução de minoxidil sejam favoráveis, diversos efeitos colaterais são descritos, como, sudorese, dermatite de contato, irritação da pele, cefaleia e hipotensão ortostática (Nantes et al., 2018). Devido ao seu uso em larga escala na medicina estética, a realização de mais estudos se mostram de suma importância para a verificação da segurança na sua utilização.

## Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico do minoxidil na linhagem L929.

## Material e Métodos

A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT ((3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) e o ensaio de migração celular. Para o MTT as células foram semeadas em uma densidade de  $5 \times 10^4$  por poço, em placas de 96 poços e foram tratadas com doses seriadas (0 -10  $\mu\text{mol/L}$ ) de minoxidil. O DMSO foi utilizado como controle positivo, com concentração de 10%. Após os tratamentos, as células foram coradas com MTT em meio de cultura sem soro e sem fenol, a  $37^\circ\text{C}$  por 3 h. Após a incubação, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e os cristais de formazan violeta foram solubilizados em 100  $\mu\text{L}$  de DMSO. A leitura do ensaio foi realizada em um leitor de microplacas (Multiskan, UNISCIENCE), em densidade óptica de 540 nm (ISO 10993-5; 2009). O perfil de dose-resposta foi plotado, e deste, foi obtido a viabilidade celular. Para avaliação da migração celular *in vitro*, foi utilizado o ensaio *Scratch wound* (Walter et al., 2010; Vockel et al., 2011). As células foram semeadas em uma densidade de  $3 \times 10^5$  por poço em uma placa de 24 poços e incubadas por 24 h para permitir a adesão e formação de uma monocamada confluenta. As monocamadas foram marcadas com uma ponta de ponteira 200 $\mu\text{L}$  estéril, formando uma lesão de comprimento próximo ao diâmetro do poço. Após, as células foram lavadas com solução salina HBSS para completa remoção dos *debris* celulares resultantes da criação do risco. As células foram tratadas com doses de 2, 6 e 10  $\mu\text{mol/L}$  de minoxidil. A migração celular foi analisada por fotografia após 0 h e 24 h, subsequentes à criação da lesão. As imagens foram obtidas com câmera digital (AxioCamMRC, Carl Zeiss) em lente objetiva de 5 X, acoplada ao microscópio óptico invertido com contraste de fase (Axiovert 25, Carl Zeiss, Alemanha), utilizando o programa MRGrab 1.0.0.4 (Carl Zeiss). As imagens foram analisadas com utilização de software ImageJ (versão 1.50i) e o resultado da migração foi expresso em porcentagens. Considerando-se o tempo 0 h como sendo equivalente a 100% da medida da largura do risco.

## Referências

- Ellis JA, Sinclair R, Harrap SB. Androgenetic alopecia: pathogenesis and potencial for therapy. *Expert in Molecular Medico*, 2002; 1462-3994.
- Nantes MC et al. Ação do Minoxidil e da Finasterida através da intradermoterapia no tratamento da alopecia androgenética. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, 2018. V.24,n.2,pp.166-175.
- Olsen EA, Whiting D, Bergfeld W, Miller J, Hordinsky M, Wanser R, Zhang P, Kohut B. A multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of a novel formulation of 5% minoxidil topical foam versus placebo in the treatment of androgenetic alopecia in men. *J Am Acad Dermatol*. 2007; 57(5):767-774.
- Rossi A, Cantisani C, Melis L, Iorio A, Scali E, Calvieri S. Minoxidil use in dermatology, side effects and recent patents. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2012; 6(2):130-136.
- Santos LDN, Shapiro J. "Update on male pattern hair loss", *Journal of Drugs in Dermatology*, 2014:1308-1310.
- Walter MNM, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WEB. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res*, 2010;316(7):1271-81.
- Vockel M, Pollok S, Breitenbach U, Ridderbusch I, Kreienkamp H-J, Brandner JM. Somatostatin inhibits cell migration and reduces cell counts of human keratinocytes and delays epidermal wound healing in an ex vivo wound model. *PLoS One*, 2011;6(5):e19740.

## Resultados

O minoxidil não demonstrou efeito citotóxico, mantendo uma viabilidade celular na linhagem L929, quando comparada com o controle negativo.

Tabela 1: Efeito citotóxico do minoxidil na linhagem celular L929.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Viabilidade celular (% em relação ao controle negativo)
	Minoxidil
0	100 $\pm$ 0
2	89,2 $\pm$ 3,7
4	84,3 $\pm$ 5,8
6	76,8 $\pm$ 6,0
8	71,5 $\pm$ 3,0
10	63,4 $\pm$ 5,0*
DMSO (controle positivo)	49,9 $\pm$ 4,9*

\*De acordo com a ISO 10993-5 (2009), que normatiza testes de citotoxicidade *in vitro* para avaliação de compostos para uso na saúde, um composto é considerado com potencial citotóxico quando causar redução de 70% ou mais na viabilidade celular, ou seja, quando apresentar 30% ou mais citotoxicidade.

Aparentemente, o minoxidil demonstrou redução da superfície do ferimento em um percentual semelhante ao controle negativo.

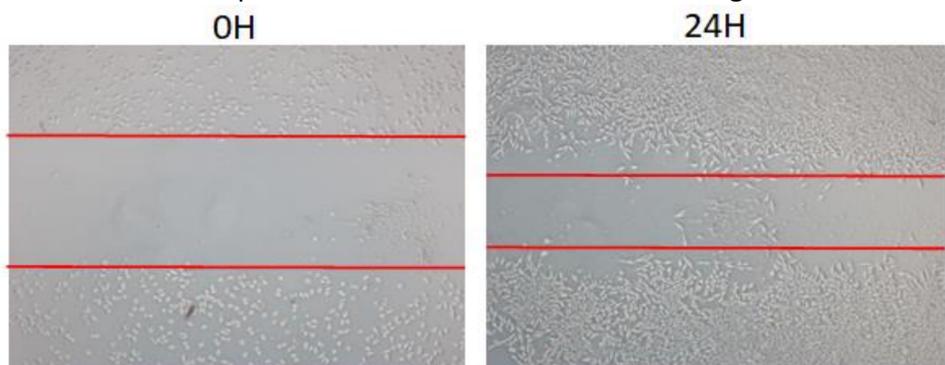


Figura 1: Representação do ensaio de migração celular *in vitro* com a linhagem celular L929 tratadas com Minoxidil em 0 e 24h.

## Conclusão

Os resultados parciais deste trabalho, sugerem que o minoxidil não possui um efeito citotóxico.

APOIO:



✉ carolinaluzardo97@gmail.com