

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DA NICOTINA E SEU PRINCIPAL METABÓLITO COTININA UTILIZANDO A LINHAGEM CELULAR SH-SY5Y**

Nicolau CC<sup>1</sup>, Dalberto D<sup>1</sup>, Garcia A L<sup>1</sup>, Grivicich I<sup>1</sup>, Da Silva J<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Luterana do Brasil - Laboratório de Genética Toxicológica. Av. Farroupilha, 8001 Bairro São José CEP: 92425-900 Canoas/RS, Brasil.

**INTRODUÇÃO**

A nicotina é o principal alcaloide vegetal encontrado na composição da planta do tabaco. Esse alcaloide pode causar toxicidade aguda e apresentar riscos à saúde, principalmente em longo prazo, como danos cromossômicos e instabilidade genética. O principal metabólito da nicotina é a cotinina, que é metabolizada principalmente no fígado. A cotinina é caracterizada pela sua estabilidade e detecção no plasma e no cérebro por longos períodos, o que facilita sua mensuração. A acumulação de elevadas concentrações de cotinina no cérebro, juntamente com seu potencial farmacológico, sugere que a cotinina deve ser examinada por seu possível envolvimento na dependência da nicotina.

**OBJETIVOS**

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos, de diferentes doses da nicotina e da cotinina, utilizando a linhagem celular de neuroblastoma humano (SHSY-5Y).

**METODOLOGIA**

As células SH-SY5Y foram mantidas em meio DMEM/F12, suplementadas com soro fetal bovino (10%), 1 % antibiótico 100X e mantidas a 37°C em atmosfera umidificada e com CO<sub>2</sub> a 5%. Para o Ensaio de MTT as células foram expostas a concentrações de nicotina (2.0 µg/mL, 1.0 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.125 µg/mL) e cotina (2.0 mg/mL, 1.0 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL), e após foram incubadas com 150 µL/poço de solução de MTT (0,1 g de MTT diluído em 5mL de PBS). A leitura da absorbância dos cristais de formazan, que é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis, é realizada utilizando um leitor de ELISA. Para o Ensaio Cometa Alcalino (pH>13) as células foram expostas por 3 horas as mesmas doses utilizadas no ensaio de MTT e após preparação das lâminas foram expostas a uma solução de lise, passaram por corrente elétrica e foram coradas com nitrato de prata. A análise foi realizada em microscópio óptico, avaliando dano ao DNA de 0 a 4.

**RESULTADOS**

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 de neuroblastoma tratadas, conforme figura 1. O ensaio cometa apresentou resultados significativos no índice e na frequência de danos para ambos os compostos, nicotina e cotina, demonstrando assim a indução de genotoxicidade (P<0,05; ANOVA, Dunnet) (Figura 2).

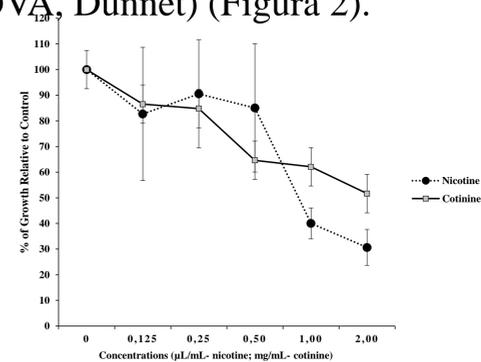
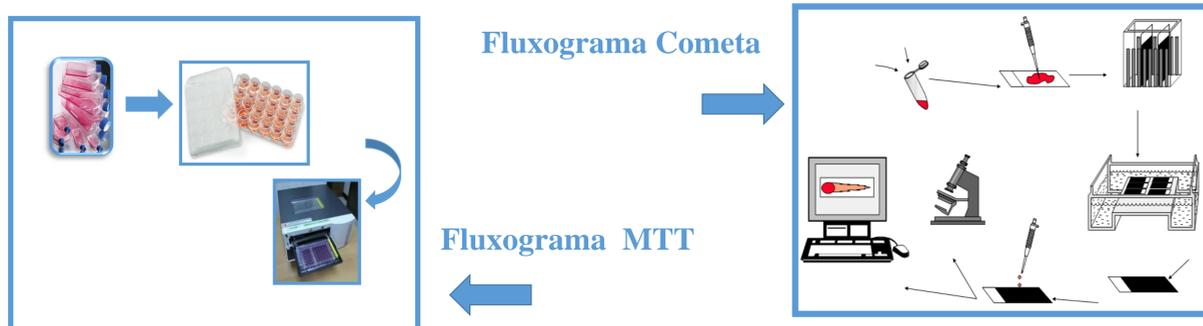


Figura 1: Ensaio de MTT com Nicotina e Cotinina.



**CONCLUSÕES**

Estes dados demonstram que a nicotina e o seu principal metabólito a cotinina são capazes de induzir danos genotóxicos em células SHSY-5Y, conforme foi observado no ensaio cometa. Até o momento se tinha registro sobre o efeito danoso ao DNA da nicotina, sem conhecimento deste efeito para o seu metabólito

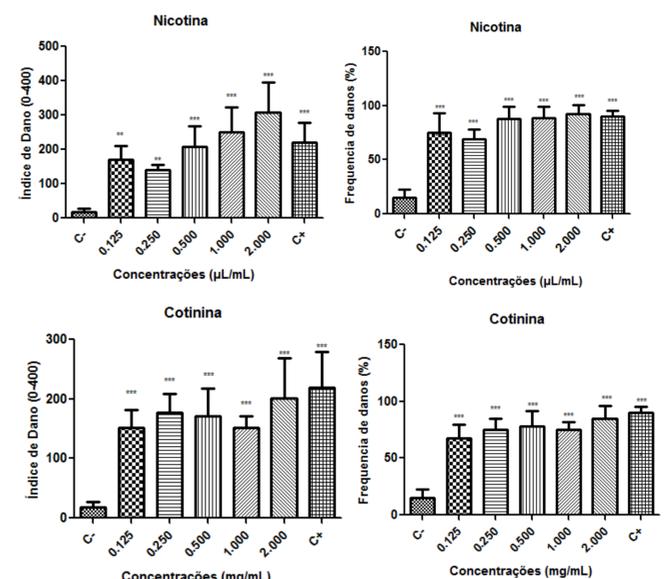


Figura 2: Resultados do ensaio cometa para os índices de danos e frequências de danos para as diferentes concentrações de nicotina e cotinina.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Bersch R B, Périco E e Pozzobon A. Verificação de dano no DNA de células sanguíneas em adultos jovens consumidores de tabaco. Caderno Pedagógico. Lajeado. 2014; 11: 8 - 19.  
 Cunha H G, Jorge C R A, Fonteles F M M, Souza F C F, Vianas B S G e Vanconcelos M M S. Nicotina e tabagismo. Revista Eletrônica Pesquisa Médica. 2007; 1.  
 Da Silva N G, De Camargo A E, Salvadori M F D e Ribeiro A D. Genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to antimicrobial endodontic agents. ResearchGate. 2007; 104: 58 - 61.  
 Da Silva J, Fonseca M B. Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana. In: silva J, Erdtmann B, Henriques J A P. (org.). Genética Toxicológica. Porto Alegre. 2003: 70 - 84.  
 Da Silva R F, Erdtmann B, Dalpiaz T, Nunes E, Da Rosa P D, Porawski M, Bona S, Simon F C, Allgayer Da C M e Da Silva J. Effects of dermal exposure to *Nicotiana tabacum* (Jean Nicot,1560) leaves in mouse evaluated by multiple methods and tissues. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010; 58: 9868 - 9874.  
 Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendlerschwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V and Tice R R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. Mutagenesis. 2003; 18: 45 - 51.  
 Kahl S F V, Reyes M J, Sarmento S M e Da Silva J. Mitigation by vitamin C of the genotoxic effects of nicotine in mice, assessed by the comet assay and micronucleus induction. Mutation Research. 2012; 744: 140 - 144.  
 Singh N P, McCoy M T, Tice R R e Schneider E L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research. 1988; 175: 184 - 191.

caroline\_nicolau@hotmail.com

Apoio: CNPq, FAPERGS, ULBRA