

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO MEDICAMENTO CLORIDRATO DE BUPROPIONA EM TESTES *Allium cepa* E MICRONÚCLEO

Murillo de Sousa Pinto¹
Lorrane Rodrigues da Silva¹
João Antonio Xavier Manso²
Aroldo Vieira de Moraes Filho³

RESUMO: Uma das grandes discussões dos tempos atuais em torno da medicina em países desenvolvidos e em desenvolvimento é o aumento da obesidade na população. Para o tratamento dessa doença, o Cloridrato de Bupropiona é um antidepressivo que não tem seu mecanismo de ação totalmente desvendado, no entanto, acredita-se que interaja com os neurotransmissores noradrenalina e dopamina relacionados à depressão. Diante disto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a atividade mutagênica do medicamento Cloridrato de Bupropiona. Para isso foram realizados os testes *Allium cepa* e micronúcleo. Para o teste *A. cepa* foi realizada a observação das lâminas em microscópio óptico, com objetiva de 100x e, procedeu-se a contagem de 5.000 células. Para o teste de Micronúcleo, a avaliação das anormalidades cromossômicas constituiu na observação de alterações interfásicas e mitóticas observadas em 1.000 células. Os resultados das concentrações teste apresentam aumento gradativo da quantidade de células mutantes. A prescrição desregulada ou desmedida do Cloridrato de Bupropiona pode causar várias alterações fisiológicas, inclusive pode tornar o usuário dependente e gerar grandes danos à saúde.

Palavras-chave: Mutagênese. Antidepressivo. Bupium.

ABSTRACT: *One of the great discussions of the current times around medicine in developed and developing countries is the increase of obesity in the population. For the treatment of this disease, Bupropion Hydrochloride is an antidepressant that does not have its mechanism of action fully unveiled, however, it is believed to interact with the neurotransmitters noradrenaline and dopamine related to depression. In view of this, the aim of this research is to evaluate the mutagenic activity of the drug Bupropion Hydrochloride. Allium cepa and micronucleus tests were performed for this purpose. For the A. cepa test, the observation of the slides was performed under an optical microscope, with an objective of 100x, and the counting of 5,000 cells was performed. For the Micronucleus test, the evaluation of chromosomal abnormalities consisted in the observation of interphase and mitotic alterations observed in 1,000 cells. The results of the test concentrations show a gradual increase in the amount of mutant cells. The unregulated or excessive prescription of Bupropion Hydrochloride can cause several physiological alterations, including making the user dependent and generating great damage to health.*

Key words: Mutagenesis. Antidepressant. Bupium

¹ Acadêmicos do Curso de Biomedicina da Faculdade Alfredo Nasser.

² Doutorando em Biotecnologia e Biodiversidade – UFG.

³ Professor Doutor do Instituto de Ciências da Saúde da Faculdade Alfredo Nasser.

1 INTRODUÇÃO

Uma das grandes discussões dos tempos atuais em torno da medicina em países desenvolvidos e em desenvolvimento é o aumento da obesidade na população. Somente no Brasil, entre o período de 2006 a 2016, a obesidade cresceu mais de 60%, fato que contribuiu para o aumento da hipertensão e diabetes (BRASIL, 2016). Em termos gerais a obesidade é diagnosticada e tratada como distúrbio alimentar associado ao consumo de álcool, drogas e tabaco. Dentre outros fatores em questão a pré-disposição genética está envolvida na variação do metabolismo basal, na regulação do apetite, fatores estes que podem implicar na manutenção do peso corporal (MARQUES-LOPES et al, 2004; DE CASTRO et al.2018).

Na cultura ocidental o uso de medicamentos tornou-se hábito frequente, principalmente os relacionados ao emagrecimento. O uso de substâncias psicoativas ou psicotrópicas torna-se indispensável no tratamento de doenças como epilepsia, alguns transtornos e distúrbios mentais, entre outros. Esta classe de drogas possui, em geral, uma série de efeitos colaterais além de quando usada em excesso e por longos períodos causa ao usuário dependência severa (SOUZA et al., 2018). Para a compreensão dos mecanismos e demandas dos psicotrópicos é necessário aprofundamento nas ações causadas pelos neurotransmissores no Sistema Nervoso Central (SNC), que por sua vez é regulado por essas substâncias (GUYTON et al., 2006).

O Cloridrato de Bupropiona é um antidepressivo que, como a maioria dos antidepressivos não tem seu mecanismo de ação totalmente desvendado, no caso da Bupropiona acredita-se que interaja com os neurotransmissores noradrenalina e dopamina relacionados à depressão. Esta droga contém vários mecanismos de ação referentes a manipulação, ligação e inibição de neurotransmissores e neuroreceptores o que reduz, por exemplo, a excitabilidade das células nervosas que quando super ativadas causam a epilepsia ou ainda podem inibir a recaptação de noradrenalina, o que causa sensação de saciedade (BULA CLORIDRATO DE BOPRUPIONA -ANVISA, 2016).

No entanto, esse medicamento tem sido associado a vários efeitos colaterais como tontura, nervosismo, ataxia, fadiga, tremores, arrepios, ansiedade, assim com efeitos

indesejados como dor, vômito, enjoo (FIGUEIREDO et al., 2018). Porém, está sendo amplamente usado como recurso para a perda de peso.

Por apresentar vários efeitos colaterais, torna-se importante estudar os demais efeitos secundários, como citotoxicidade e genotoxicidade, desse medicamento. Para isso, segundo Bagatini et al. (2007) os testes *A. cepa* e Micronúcleo são bastante eficazes na identificação e determinação desses efeitos. Adicionalmente, a literatura descreve a respeito do êxito e aceitação desses testes que são capazes de identificar mutações cromossômicas que persistem ou são adquiridas no momento da execução dos mecanismos de reparo (RIBEIRO et al., 2003,).

Este trabalho teve por preceito avaliar a atividade mutagênica do medicamento Cloridrato de Bupropiona em testes *Allium cepa* e Micronúcleo, bem como, quantificar as mutações e qualificar o potencial citotóxico e genotóxico causadas pelos medicamentos em células da raiz de cebola.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

A Bupropiona utilizada foi comercialmente adquirida, na composição comercial de cloridrato de Bupropiona preparada em água destilada, conforme a necessidade de concentração das amostras testadas.

Para o controle positivo do teste foi utilizado o Paracetamol.

2.2 Teste *Allium cepa*

Bulbos de cebola orgânica foram adquiridos no comércio local com fonte confiável. As escamas externas secas foram retiradas sem prejudicar a área radicular e o parênquima central da coroa de brotamento também foi retirado, por incisão circular, para aumentar a absorção e a uniformidade do brotamento e crescimento das raízes. Estes bulbos foram lavados em água corrente por cerca de 30 minutos. Cuidadosamente, as raízes dos bulbos foram colocadas em exposição com as amostras, em béqueres de vidro cobertos, para evitar a entrada de luz, de forma que apenas o parênquima central da coroa de brotamento ficasse em contato com as amostras. Para cada amostra analisada, foram usados cinco

bulbos de cebolas que foram colocados em contato com as concentrações testadas por 24 horas. O controle negativo foi realizado da mesma maneira, utilizando água destilada (RANK et al., 1993; KRUGER et al., 2009; CUCHIARA et al., 2012).

As concentrações testes foram padronizadas com base nas doses consideradas subdose 10 mg/L, dose terapêutica 50 mg/L e 150 mg/L e superdose 1000 mg/L do medicamento Cloridrato de Bupropiona.

O controle positivo foi Paracetamol® na concentração 800 mg/L. Após o crescimento, as raízes imersas nas amostras foram medidas e em seguida fixadas em solução de Carnoy (ácido acético e álcool etílico, na concentração de 3:1) por 12 horas. Após fixação, as raízes foram lavadas em água destilada por cinco minutos e realizada a coloração em lâminas. Para tanto, as raízes foram coradas em corante orceína acética, na diluição de orceína 2% em ácido acético a 45%. As pontas das raízes foram cortadas e aquecidas por um minuto, em contato com o corante. Em seguida, as raízes foram colocadas em lâminas, cobertas por lamínulas e uma gota do corante orceína acética foi adicionada entre lâmina e lamínula. Posteriormente, a raiz foi esmagada por pressão suave. A observação das lâminas foi realizada em microscópio óptico, com objetiva de 100x, procedendo a contagem de 5.000 células, observando os índices mitóticos e as alterações cromossômicas e mitóticas (RANK et al., 1993; RIBEIRO et al., 2012; DIAS et al., 2014; YUSUPOV et al., 2019).

O cálculo do índice mitótico (IM) e do índice de aberrações cromossômicas e mitóticas (IACM) ocorreu de acordo com as equações abaixo:

$$IM = n^{\circ} \text{ de células em mitose} \times 100 \div n^{\circ} \text{ total de células observadas}$$

$$IACM = n^{\circ} \text{ de células alteradas} \times 100 \div n^{\circ} \text{ total de células observadas}$$

2.3 Teste de Micronúcleo

As mesmas raízes foram coletadas para análise após 24h em contato com as concentrações testes. Elas foram lavadas com água destilada, hidrolisadas com HCl a 1 mol/L por 10 min em banho-maria a 60° C e após, os frascos resfriados em água corrente. Após a lavagem dos meristemas foram feitos esfregaços em duas lâminas que ficaram 30

min em temperatura ambiente para secagem. Logo após, as lâminas foram coradas com o Kit Panótico Rápido. As lâminas foram mergulhadas 10 vezes nos dois primeiros compostos do kit, e 3 vezes no último composto do kit, com submersão de 1s de duração. Por fim, as lâminas foram lavadas em água deionizada e secas à temperatura ambiente. A avaliação das anormalidades cromossômicas constituiu na observação de alterações interfásicas e mitóticas observadas em 1.000 células por tratamento. A contagem foi feita em microscopia óptica, com objetiva de 40x e ocular de 10x (MENEGUETTI et al., 2011; POLETO et al., 2011).

Para análise estatística, os dados foram calculados no Bioestat 5.0 e na plataforma online medcalc.net calculando Odds: Odds Ratio ou Risco de Chance, IC: Intervalo de Confiança, RR: Risco Relativo, ARR: Aumento do Risco Relativo, AARR: Aumento Absoluto do Risco Relativo, IM: Índice Mitótico e IACM: Índice de Anormalidades Cromossômica e Mitóticas para os testes Micronúcleo e *A. cepa*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de *A. cepa* foram observadas algumas alterações consistentes nas raízes das cebolas expostas aos tratamentos, principalmente nas duas maiores concentrações testadas (150 mg/L e 1000 mg/mL) do fármaco (Tabela 1).

Tabela1: Índice do Risco Relativo Mutagênico do Cloridrato de Bupropiona pelo Teste *A. cepa*

	Mutações	n°	RR	IC (±)		p	ARR (%)
B 10mg/L	198	5000	1,4	1,1	1,7	<0,01	36
Paracetamol	146	5000					
B 50mg/L	491	5000	3,4	2,8	4,0	<0,01	236
Paracetamol	146	5000					
B 150mg/L	785	5000	5,4	4,5	6,4	<0,01	438
Paracetamol	146	5000					
B 1000mg/L	1951	5000	13,4	11,4	15,7	<0,01	1236
Paracetamol	146	5000					

FONTE: próprio autor

Tabela1: Quantitativo mutagênico do Cloridrato de Bupropiona nos tratamentos e controle positivo Paracetamol. Mutações: quantidade de células mutagênicas encontrada em cada

tratamento. N^o: número de células contadas por tratamento. RR: risco relativo. IC: intervalo de confiança. ARR: Aumento do Risco Relativo.

Os resultados do teste *A. cepa* apresentam alteração significativa quando comparam-se os tratamentos com o controle negativo. Os resultados das concentrações teste expressos na Tabela 1 apresentam aumento gradativo da quantidade de células mutantes, portanto demonstraram dose-dependência.

Aos resultados do quantitativo de divisões celulares observa-se linearidade em todos os tratamentos, inclusive no controle negativo (Tabela 2). A não variação deste parâmetro mostra confiabilidade nos resultados das mutações, uma vez que, as possíveis mutações ocorridas podem ter início no fuso mitótico e na ação do aparato de regulação da divisão celular além do sistema proteico enzimático como exemplo a p53 (SOUZA et al., 2006; VOGELSTEIN et al., 2010).

O índice mitótico (IM) foi calculado para cada grupo, foi inferido através do teste de comparação de proporções e, verificou-se tendência significativa ($p < 0.05$) na redução do IM nas concentrações de 150 mg/L e 1000 mg/L como mostra a Tabela 2. O teste de comparação de proporções também foi utilizado na comparação do índice de anormalidades cromossômicas e mitóticas entre os tratamentos, obtendo-se diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as proporções avaliadas, indicando que o bupropinona tem maior tendência de induzir mutações, em relação ao Paracetamol (controle positivo), e que a mesma (tendência) aumenta na medida que se concentra o medicamento (Tabela 2). A análise do risco de chance (*Odds ratio*) também foi utilizada e revelou aumento considerável da chance de risco de mutações em relação ao controle positivo. O Risco Relativo também foi calculado, obtiveram-se diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos com aumento absoluto do risco (AAR) de mutações de até 36%. Os dados indicam o Bupropinona como agente mutagênico de potencial elevado.

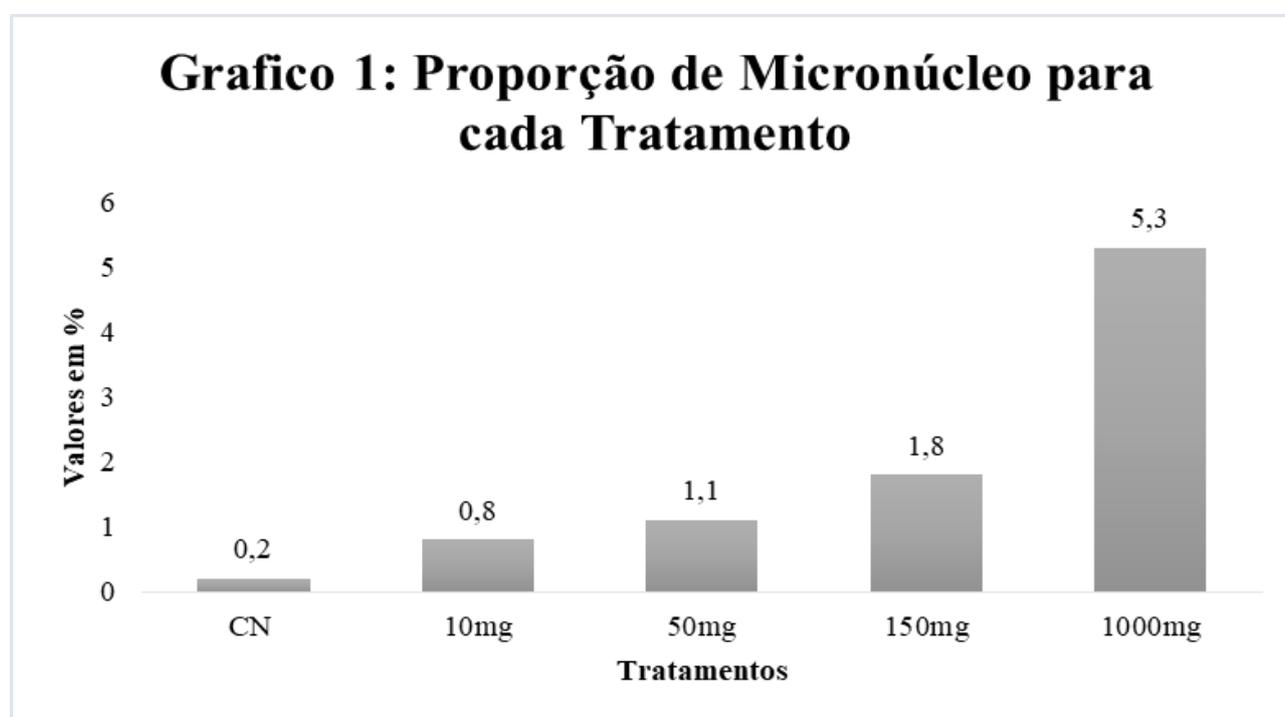
Tabela 2: Teste de proporções do IACM e IM para *A. cepa*

Tratamento	(IACM) Proporção	Tamanho da amostra em célula	(IM) Proporção %
Paracetamol (1)	146 (2,92%)	5000	19,96
B 10mg (2)	198 (3.96%)	5000	20,26
B 50mg (3)	491 (9.82%)	5000	19,68
B 150mg (4)	785 (15.7%)	5000	17,86
B 1000mg (5)	1951 (39.02%)	5000	15,84

Tabela2: Proporções do Índice Mitótico (IM) e o Índice de Anormalidades Cromossômica e Mitóticas (**IACM**), por concentração e quantidade.

A quantidade de Micronúcleos presentes nas lâminas corrobora com a hipótese de possível atividade mutagênica da Bupropiona, o percentual de células mutadas ultrapassa o limiar estipulado na contagem dos micronúcleos do controle negativo (Gráfico 1). A atividade mutagênica que gera o micronúcleo relaciona o comportamento da divisão celular bem como o fuso mitótico (STOPPER; MÜLLER, 1997; FERNANDES,2005).

Gráfico 1: Percentual de Micronúcleo ocasionados pela Bupropiona em modelo teste *Allium* cepa



Fonte: próprio autor

O Gráfico 1 demonstra os resultados da contagem de micronúcleo expressas em porcentagem. A quantificação dos micronúcleos na concentração de 1000 mg/L foi de 5,3%, portanto infere-se que o medicamento tem ação mutagênica aparente.

Para análise dos dados, assumiu-se intervalo de confiança de 95%, sendo o nível de significância $p \leq 0,05$. O teste de comparação de proporções, o *Odds Ratio* (risco de chance) e o Risco Relativo foram empregados durante a análise. Os resultados do teste de comparação de proporções indicam tendência significativa ($<0,05$) do aumento da frequência de micronúcleos, conforme o aumento das concentrações do medicamento

testado. O teste *Odds Ratio* revelou aumento significativo na chance de risco para micronúcleo nas três maiores concentrações testadas (50 mg/L, 150 mg/L e 1000 mg/L).

O fármaco Cloridrato de Bupropiona foi formulado e predestinado para o tratamento de distúrbios neurológicos como epilepsia e depressão e hoje é prescrito pela classe médica para diversos fins como, por exemplo, para o emagrecimento que é o efeito colateral dos medicamentos (BULA CLORIDRATO DE BOPRUPIONA-ANVISA, 2016).

A atividade mutagênica do Cloridrato de Bupropiona foi estudada por NAVES (2017) que demonstra por meio do Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) que mesmo em concentrações baixas o fármaco é capaz de provocar mutações nas células e que apenas em doses inferiores a 0,93 mg/mL esta capacidade não é significativa; o estudo ainda afirma que o Cloridrato de Bupropiona tem propriedades tóxicas em grandes concentrações.

Quando comparados os testes de genotoxicidade entre medicamentos de mesma classe observa-se linearidade na incidência de mutação. Um estudo feito com o fármaco Diazepam apresenta em seus resultados quantidade de micronúcleo aumentada (DE JESUS et al., 2019).

Alguns efeitos adversos da Bupropiona estão ligados a ação do medicamento no SNC como, por exemplo: efeitos neurológicos, disfunções sexuais, efeitos adversos dermatológicos, entre outros (FIGUEIREDO et al., 2018).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos mutagênicos do Cloridrato de Bupropiona nas células foram evidenciados nos testes *A. cepa* e micronúcleo, por isso, devem ser avaliados o risco/benefício na administração do Cloridrato de Bupropiona, além de tornarem-se necessárias mais análises relacionadas aos efeitos adversos do medicamento.

REFERÊNCIAS

BAGATINI, Margarete Dulce; SILVA, Antonio Carlos Ferreira da; TEDESCO, Solange Bosio. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 444-7, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Disponível em:

<http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2017/04/obesidade-cresce-60-em-dez-anos-no-brasil> acesso em:25/03/2019.

BULA CLORIDRATO DE BOPRUPIONA –ANVISA. Laboratório Eurofarma S.A.®, Cloridrato de Bupropiona. São Paulo. Bula de Remédio, disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=23840382016&pIdAnexo=3950402>, acesso em: 19/03/2019.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. S.; BOBROWSKI, V.L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnologia Ciência Agropecuária**, v. 6, n. 1, p. 33-38 (2012).

DE CASTRO, Jessica Marliere et al. Prevalence of overweight and obesity and the risk factors associated in adolescents/PREVALENCIA DE SOBREPESO E OBESIDADE E OS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS EM ADOLESCENTES. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 12, n. 69, p. 84-94, 2018.

DE JESUS, Amanda Moreira; ZAMBERLAM, Cláudia Raquel. GENOTOXICIDADE DO DIAZEPAM E POTENCIAL DE REVERSÃO DO Ginkgo biloba PELO MÉTODO *Allium cepa*. **Revista Saúde-UNG-Ser**, v. 12, n. 1 (ESP), p. 10, 2019.

DIAS, M. G. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L) Willd.(*Asteraceae*) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **L. Revista brasileira plantas medicinais**, v. 16, n. 2, p. 202-208 (2014).Ed., (2006).

FERNANDES, Thaís Cristina Casimiro. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes**. 2005.

FIGUEIREDO, Izabela Rodrigues et al. Farmacodermia induzida por Bupropiona em paciente com transtorno depressivo maior. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 6, n. 3, 2018.

Guyton, A.C.; Hall, J.E. Tratado de fisiologia médica. 11ª Ed. Rio De Janeiro, Elsevier

KRUGER, R. A. Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa*. **Novo Hamburgo [Dissertação de Mestrado em Qualidade Ambiental – Feevale]**, 2009.

MARQUES-LOPES, Iva et al. Aspectos genéticos da obesidade Genetics of obesity. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 327-338, 2004.

MENEGUETTI D. U, de O. Adaptação da técnica de Micronúcleo em *Allium cepa*, para futuras análises de mutagenicidade dos rios da região do Vale do Jamari, Rondônia, Amazônia Ocidental. **Revista Pesquisa & Criação**. v. 10, n 2, 2011: 181-187

NAVES, Maria Paula Carvalho et al. **Avaliação do potencial mutagênico e recombinogênico do cloridrato de bupropiona e do cloridrato de trazodona em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2017.

POLETO, P.O. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (Mart. Ex Benth. J. F. Macbr: Fabaceae), Timbó Amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. **Revista Pesquisa & Criação**, v. 10, n. 1, 163-175. 2011.

RANK, J e NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, p. 49-53 (1993).

RIBEIRO, C. A. O.; REIS FILHO, H. S.; GROTZNER, S. R. Técnicas e Métodos para Utilização Prática de Microscopia. **São Paulo: GEN - Grupo Editorial Nacional, Editora Santos** 1: 440, 2012.

RIBEIRO, Lucia Regina; SALVADORI, Daisy Maria Fávero; MARQUES, Edmundo Kanan. Mutagênese ambiental. **Canoas: ULBRA**, 2003.

SOUZA, Marina Farias. USO DE PSICOTRÓPICOS NO BRASIL: UMA REVISÃO DA LITERATURA. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 12, n. 4, 2018.

STOPPER H.; MÜLLER S. O. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. *Toxicology in vitro*, Oxford, v. 11, p. 661-667. 1997

YUSUPOV, Ziyoviddin et al. The complete chloroplast genome of *Allium fistulosum*. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 1, p. 489-490, 2019.

VOGELSTEIN, B.; SUR, S.; PRIVES, C. p53: the most frequently altered gene in human cancers. **Nature Education**, v. 3, n. 9, p. 6, 2010.

SOUZA, D. M. B. Caracterização patológica e gênica (genep53) dos tumores mamários em cadelas. **Recife**: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006.