

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DO ANTIDEPRESSIVO VORTIOXETINA EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS

Gabriela Terue Rizzo Kodama (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Veronica Elisa Pimenta Vicentini (Orientadora), e-mail: vepvicentini@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular.

Biologia Geral, Genética, Mutagênese.

Palavras-chave: Toxicidade, Teste do MTT, Ensaio do Cometa.

Resumo

Atualmente o uso de antidepressivos vem aumentando drasticamente para o tratamento da depressão, sendo a Vortioxetina um dos mais utilizados. Esse fármaco atua sobre várias vias de neurotransmissores tratando a depressão e promovendo melhora de problemas associados a doença, com menos efeitos colaterais. Contudo, o uso de antidepressivos deve ser feito de forma controlada e com acompanhamento médico, pois podem causar efeitos adversos e dependência, sendo importante a constante avaliação *in vitro* e *in vivo* desses medicamentos. Consoante aos dados apresentados, este trabalho buscou avaliar em cultura de linfócitos humanos, o potencial citotóxico e genotóxico da Vortioxetina por meio do Teste do MTT e do Ensaio do Cometa. Os resultados estatísticos demonstraram que as concentrações testadas de Vortioxetina exibiram potencial citotóxico e genotóxico, mostrando a necessidade de mais testes para assegurar a segurança do seu uso.

Introdução

A depressão é uma doença grave e tem grande importância na carga global de doenças. Existem várias formas de tratamentos para a depressão e na maioria das vezes, o tratamento psicológico é realizado concomitante ao uso de fármacos conhecidos como antidepressivos. Esses medicamentos buscam principalmente, regular o nível de serotonina, mas existem alguns que também atuam sobre outros sistemas de neurotransmissão como é o caso da Vortioxetina, um antidepressivo bastante utilizado pela população (INOUE et al., 2020). A dose recomendada de vortioxetina é de 10mg/dia, podendo ser administrada de 5-20mg/dia, com tratamento por pelo menos 6 meses. Porém, há necessidade de acompanhamento médico além da avaliação contínua de antidepressivos que são amplamente utilizados pela população.

O uso de sistemas teste *in vitro*, como a cultura de células humanas, permite a avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de diferentes compostos, e dentre essas, destacam-se os linfócitos, que são células responsáveis pela resposta imune do organismo. Considerando o amplo consumo de antidepressivos pela população,

o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial citotóxico e genotóxico do fármaco vortioxetina em cultura de linfócitos humanos *in vitro*.

Materiais e Métodos

Cultura de linfócitos a partir do sangue total e coleta de sangue

A cultura de linfócitos de sangue periférico humano foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Moorhead et al. (1960), com modificações. Foi coletado 40mL de sangue periférico de 2 doadores, com duas repetições para cada doador. Os linfócitos foram isolados do sangue total com Ficoll Paque Plus®, seguido da contagem das células de cada doador em câmara de Neubauer.

Teste de citotoxicidade - MTT

O ensaio do MTT foi realizado conforme descrito por Mosmann (1983), com modificações. Foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços, onde em cada poço foram semeadas $0,1 \times 10^6$ células. Após estabilização, o meio de cultura foi descartado e adicionado 100µL de meio completo nos grupos controle, sem nada, e tratamentos, sendo adicionado o agente indutor de danos metilmetanossulfonato-MMS [100µM] e a Vortioxetina [0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 1,75; 2; 2,5; 3; 5 e 10 µg/mL]. Após 24, 48 e 72 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por 100µL de meio acrescido de MTT (2mg/mL). Consoante, a placa foi incubada por mais 4 horas antes do descarte do meio contendo MTT, seguido da adição de 100µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazam. Para a realização da leitura, foi utilizado o leitor de microplacas (Labtech) a 550nm e a viabilidade celular foi estimada com base na absorbância do controle ($A_{\text{tratamento}}/A_{\text{controle}} \times 100$).

Ensaio de genotoxicidade

O Ensaio do Cometa foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Tice et al. (2000), com modificações. Para cada doador, foi semeado 1×10^6 células/mL em frascos de vidro contendo 5mL. Após 44h de incubação, foram separados os grupos controle, MMS e adicionados os tratamentos com a Vortioxetina [0,75; 1,5 e 3 µg/mL], por 3h de incubação. Em resumo, após uma série de etapas do procedimento a suspensão foi depositada em lâminas pré-gelatinizadas com agarose normal, e colocadas na cuba de eletroforese. Após as corridas, as lâminas foram neutralizadas, fixadas e mantidas sob refrigeração até o momento da análise. Para a realização da análise, foram contabilizadas 100 células por lâmina, classificando-as quanto aos danos sofridos, de classes 0 a 3. Células apoptóticas não foram contabilizadas.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando a análise de variância (*One way ANOVA*), seguido do Teste de Dunnet ($\alpha=0,05$; $p<0,05$) com auxílio do programa *GrafPad Instat versão 3.02*.

Resultados e Discussão

Os resultados do ensaio de citotoxicidade MTT, mostraram que em 24 horas as maiores concentrações (2-10 µg/mL) foram estatisticamente significativas em relação ao controle. No tempo de 48 horas, somente as concentrações 1 e 1,5 µg/mL não exibiram diferença estatisticamente significativa. Já no tempo de 72

horas, as concentrações a partir de 1µg/mL tiveram diferença significativa do controle. O tratamento com o MMS diferiu estatisticamente do controle em todos os tempos amostrais, apresentando uma diminuição na absorbância média.

Em relação à viabilidade celular, no tempo de 24 horas as concentrações a partir de 2µg/mL tiveram a viabilidade celular abaixo de 80%. No tempo de 48 horas, as concentrações 0,1; 0,5; 2; 2,5; 3; 5 e 10 µg/mL causaram viabilidade celular abaixo de 80%. Já no período de 72 horas, todas as concentrações a partir de 1,5µg/mL tiveram a viabilidade celular abaixo de 80%, reforçando o efeito citotóxico do composto nestas concentrações e tempos avaliados. O MMS diminuiu significativamente a viabilidade celular.

Apesar da Vortioxetina ser um importante e eficaz fármaco no tratamento da depressão, esse medicamento afeta células do sangue, os linfócitos. Esse fato vai ao encontro do que foi apresentado no trabalho de Song et al. (2021), no qual cita que alguns antidepressivos provocam certa citotoxicidade em diferentes linhagens celulares, como as células cancerígenas: AML (leucemia mieloide aguda), CRC (câncer colorretal), HCC (carcinoma hepatocelular), câncer gástrico, câncer de ovário, câncer de colo do útero, entre outras. Para mais, nos ensaios feitos por Lv et al. (2020), a Vortioxetina inibiu a progressão tumoral do câncer gástrico (GC), inibindo assim a proliferação celular, invasão e migração, além da confirmação de que esse fármaco possui potencial para induzir apoptose de linhagens de células de câncer gástrico (AGS). Dessa forma, conclui-se que a Vortioxetina interfere na viabilidade celular de diferentes tipos celulares.

Em relação ao ensaio do cometa, os resultados indicaram que a Vortioxetina induz significativamente quebra no DNA em todas as concentrações testadas. Além disso, também observa-se que o fármaco possui uma ação dose dependente, onde o aumento do escore de dano é proporcional ao aumento das concentrações de Vortioxetina.

Ademais, todos os tratamentos provocaram aumento estatisticamente significativo no número total de células com danos quando comparados ao controle, mostrando novamente a ação dose dependente do antidepressivo. Em relação as classes de danos, constata-se que todas as concentrações aumentaram significativamente o número de células com dano de classe 1. Já nos danos 2 e 3, apenas as duas maiores concentrações induziram aumento estatisticamente significativo.

No trabalho de Slamon et al. (2001), foi utilizado o Ensaio do Cometa para a avaliação de dano ao DNA em células de glioma de rato C6, utilizando como tratamento alguns antidepressivos, sendo eles amitriptilina, imipramina, fluoxetina e tranilcipromina. Esse trabalho teve como resultado o aumento nos danos no DNA proporcional ao aumento das concentrações dos antidepressivos, mostrando o potencial genotóxico desses fármacos na linhagem testada, assim como a Vortioxetina em cultura de linfócitos neste estudo.

Conclusões

Levando em consideração a importância da Vortioxetina e de antidepressivos em geral para o tratamento da depressão, o presente estudo buscou verificar a segurança genotóxica desse fármaco para uso. As concentrações de Vortioxetina avaliadas e nestes tempos de tratamento foram capazes de induzir citotoxicidade e genotoxicidade em cultura de linfócitos humanos. Tais resultados destacam a

importância de testes de toxicidade *in vitro* e mostram que estudos de toxicidade para esse fármaco e outros pertencentes a classe de antidepressivos, são essenciais.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária pelo financiamento desse projeto, à Universidade Estadual de Maringá, ao DBC, à minha Orientadora e aos colegas de laboratório.

Referências

INOUE, T.; SASAI, K.; KITAGAWA, T.; NISHIMURA, A.; INADA, I. Randomized, double-blind, placebo-controlled study to assess the efficacy and safety of vortioxetine in Japanese patients with major depressive disorder. **Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 74, p. 140-148, 2020.

LV, G. B.; WANG, T. T.; ZHU, H. L.; WANG, H. K.; SUN, W.; ZHAO, L. F. Vortioxetine induces apoptosis and autophagy of gastric cancer AGS cells via the PI3K/AKT pathway. **FEBS Open Bio**, v. 10, p. 2157-2165, 2020.

MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome Preparations of Leucocytes Cultured from Human Peripheral Blood. **Experimental Cell Research**, v.33, n.3, p. 613-616, 1960.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

SLAMOM, N.D.; WARD, T.H.; BUTLER, J.; PENTREATH, V. W. Assessment of DNA damage in C6 glioma cells after antidepressant treatment using an alkaline comet assay. **Arch Toxicol**, v. 75, p. 243-250, 2001.

SONG, I.; YANG, X.; YU, B. Repurposing antidepressants for anticancer drug Discovery. **Drug Discovery Today**. v. 27, p. 1924-1935. 2022.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.