INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DO ANTIDEPRESSIVO VORTIOXETINA EM CULTURA DE CÉLULAS DE CARCINOMA RENAL HUMANO (786-O)

Gabrielle Aparecida Affonso (PIBIC/FA), Gabriela Terue Rizzo Kodama, Mariane Aparecida Franco de Godoy (Coorientadora), Veronica Elisa Pimenta Vicentini (Orientadora). E-mail: vepvicentini@uem.br

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

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do CNPq/CAPES: Ciências Biológicas / Genética / Mutagênese

Palavras-chave: Brintellix®; Ensaio do MTT; Teste do Cometa.

RESUMO

Os antidepressivos estão entre os medicamentos mais consumidos no país, pois são a base do tratamento para a depressão e o número de pessoas que sofrem com a doença está aumentando a cada ano. Pensando no fato de que os antidepressivos e medicamentos em geral podem ter aplicações distintas e ir além de somente tratar doenças e aliviar sintomas, este trabalho buscou apresentar testes *in vitro*, em cultura de células de carcinoma renal humano (786-O), para avaliar o potencial citotóxico e genotóxico da Vortioxetina por meio do Teste do MTT e do Ensaio do Cometa. Em conclusão, os resultados estatísticos mostraram que a Vortioxetina exibiu citotoxicidade e genotoxicidade em diferentes concentrações na linhagem 786-O, enfatizando a importância de ensaios toxicológicos em fármacos amplamente utilizados.

INTRODUÇÃO

A depressão é um transtorno complexo que afeta a saúde mental e física do indivíduo de forma generalizada e debilitante. Essa doença pode ser tratada de várias maneiras, e muitas vezes combina-se abordagens psicológicas e farmacológicas, com antidepressivos como a Vortioxetina, que atua modulando a neurotransmissão em vários sistemas (Silva *et al.*, 2019).

Estudos *in vitro* permitem a contínua investigação desses fármacos, levantando a necessidade de estudar novas possibilidades terapêuticas. Dentre as linhagens utilizadas em estudos, as células renais tumorais (786-O) tem grande destaque, sendo utilizadas em testes que permitem avaliar o potencial citotóxico de diferentes compostos, como o ensaio do MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2-5-difenil-2H bromotetrazólio. Bem como, em ensaios que possibilitam a identificação do potencial

genotóxico por meio da presença de danos cromatídeos ao material genético, como o Teste do Cometa.

Portanto, como os antidepressivos estão entre os medicamentos mais consumidos no país, é de extrema importância que esses fármacos sejam testados frequentemente. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial citotóxico e genotóxico do antidepressivo Vortioxetina na linhagem de células tumorais renais humanas (786-O), após tratamento *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Solução tratamento e Cultura de células

O fármaco Brintellix® foi adquirido comercialmente e dissolvido no momento do uso em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). A linhagem celular 786-O, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantida no Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental da Universidade Estadual de Maringá, foi cultivada em frascos de cultura de 25cm^2, utilizando o meio DMEM com 10% de SBF. As células foram incubadas a 37ºC, com 5% de CO2, e a contagem celular foi realizada na câmara de Neubauer para a condução dos experimentos.

Teste de citotoxicidade - MTT

O ensaio foi realizado conforme descrito por Mosmann (1983), com modificações. Foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços, onde em cada poço foram semeadas 1x10^4 células 786-O. Após estabilização, o meio de cultura foi descartado e adicionado os grupos: controle, agente indutor de danos Doxorrubicina [18 µM] e a Vortioxetina nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,375; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 1,75; 3; 6; 9; 10; 12; 15; 18 e 21 µg/mL. Após 24, 48 e 72 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de meio acrescido de MTT (98% - Cat. No M6494) [0,167 mg/mL]. A placa foi incubada por mais 4 horas antes do descarte do meio contendo MTT, seguido da adição de 100 µL de dimetilsulfóxido (99,7%) para a solubilização dos cristais de formazam. Para a realização da leitura, foi utilizado o leitor de microplacas (Labtech) a 550 nm.

Ensaio de genotoxicidade

O teste foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Tice *et al.* (2000), com modificações. Nesse ensaio, o Metilmetanosulfonato [75 µM] foi utilizado como indutor de danos ao DNA. Foram semeadas 1x10^6 de células/poço em placas de 6 poços, e após 24 horas de estabilização foi realizado o tratamento com a Vortioxetina (0,75; 1,5 e 3 µg/mL) durante 3 horas. Após a colheita das células, a suspensão foi depositada em lâminas pré-gelatinizadas com agarose normal, cobertas por lamínulas e levadas para a geladeira por 20 minutos. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas na solução de

lise celular por 1h30, posteriormente, foram submetidas a eletroforese. Após a corrida, 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro ensaio de citotoxicidade MTT, foi utilizado as seguintes concentrações de Vortioxetina: 0,375; 0,75; 1,5; 3; 6; 9; 12; 15; 18 e 21 µg/mL, e os resultados indicaram que, no tempo de 24 horas, apenas a concentração de 1,5 µg/mL não foi estatisticamente significativa em relação ao controle. No tempo de 48 horas, apenas a concentração 0,375 µg/mL não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. Já, no tempo de 72 horas, as concentrações de 0,375 e 0,75 µg/mL também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle. Para as demais concentrações avaliadas (3; 6; 9; 12; 15; 18 e 21 µg/mL), nos três tempos amostrais (24, 48 e 72 horas), os resultados foram estatisticamente significativos em relação ao controle, assim como o agente indutor de danos DOX.

Em outro experimento, outras concentrações mais baixas de Vortioxetina (0,01; 0,05; 0,1; 0,375; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 1,75; 3 e 6 µg/mL) também foram testadas no Ensaio do MTT, evidenciando que no tempo de 24 horas, a concentração 0,75 µg/mL exibiu diferença estatística. No tempo de 72 horas, as concentrações de 1,5 µg/mL e 1,75 µg/mL; e as concentrações de 3 e 6 µg/mL, nos três tempos amostrais, apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle, assim como o agente indutor de danos DOX. Para as demais concentrações avaliadas (0,01; 0,05; 0,1; 0,375; 0,5 e 1 µg/mL), nos três tempos amostrais (24, 48 e 72 horas), os resultados não foram estatisticamente significativos.

Esse resultado indica que a Vortioxetina é citotóxica para células tumorais renais (786-O), em concordância com Li *et al.* (2023), que também demonstrou a inibição da proliferação de células de câncer gástrico (HGC27 e AGS) com diferentes concentrações de Vortioxetina (0, 0,5, 1, 2 e 4 µM). Além disso, o fármaco mostrou potencial para induzir apoptose em células de câncer gástrico (AGS), indicando seu efeito na viabilidade celular de diferentes tipos de células tumorais.

No Ensaio do Cometa, todas as concentrações de Vortioxetina causaram um aumento estatisticamente significativo no índice de danos em células 786-O e um aumento estatisticamente significativo no número de células danificadas dos tipos 1, 2 e 3 em comparação com o controle, indicando sua genotoxicidade. Esses resultados se alinham com um estudo anterior de Slamon *et al.* (2001), que usou o Ensaio do Cometa para avaliar o dano ao DNA em células de glioma de rato C6 após exposição a diversos medicamentos antidepressivos, como Amitriptilina, Imipramina, Fluoxetina e Tranilcipromina. Esse estudo mostrou um aumento proporcional no dano ao DNA com o aumento das concentrações dos antidepressivos, destacando o potencial genotóxico dessas substâncias nas linhagens celulares testadas.

CONCLUSÕES

Considerando a importância da Vortioxetina e dos antidepressivos para o tratamento da depressão, este estudo teve como objetivo investigar a ação do fármaco na linhagem celular de carcinoma renal humano (786-O). Os resultados mostraram que este antidepressivo foi capaz de induzir citotoxicidade e genotoxicidade nas células testadas nas concentrações avaliadas. Este fato sugere que a Vortioxetina pode ter outros usos farmacológicos além do tratamento da depressão, demonstrando assim, a importância de tais estudos para a pesquisa farmacológica e oncológica.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação Araucária pelo financiamento deste projeto, à Universidade Estadual de Maringá e a Capes responsáveis por outras pesquisas; ao DBC, à minha Orientadora e aos colegas do Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental.

REFERÊNCIAS

LI, M.; DUAN, L.; WU, W.; LI, W.; ZHAO, L.; LI, A.; LU, X.; HE, X.; DONG, Z.; LIU, K.; JIANG, Y. Vortioxetine hydrobromide inhibits the growth of gastric cancer cells in vivo and *in vitro* by targeting JAK2 and SRC. **Oncogenesis**, v. 12, n. 24, 2023. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10163056/. Acesso em: 25 ago. 2023.

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. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6606682/. Acesso em: 25 ago. 2023.

SILVA, M.L.; PELIZZARI, J.V.; LINARTEVICHI, V.F. Folato e seu papel na depressão. **Fag Journal of Health**, 2019. Disponível em: https://fjh.fag.edu.br/index.php/fjh/article/view/104. Acesso em: 26 ago. 2023.

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. **Archives of Toxicology**, v. 75, p. 243-250, 2001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11482523/. Acesso em: 25 ago. 2023.

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. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10737956/. Acesso em: 25 ago. 2023.