



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

DANIELLA BASTOS DE ARAÚJO

GENOTOXICIDADE HUMANA E FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS: AVALIAÇÃO DA  
DULOXETINA EM CULTURAS DE LINFÓCITOS

BELÉM  
2014

**DANIELLA BASTOS DE ARAÚJO**

**GENOTOXICIDADE HUMANA E FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS: AVALIAÇÃO DA  
DULOXETINA EM CULTURAS DE LINFÓCITOS**

Defesa de mestrado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Neurociências e Biologia  
Celular, Universidade Federal do Pará – UFPA.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. María Elena Crespo López.

**BELÉM**  
2014

**DANIELLA BASTOS DE ARAÚJO**

**GENOTOXICIDADE HUMANA E FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS: AVALIAÇÃO DA  
DULOXETINA EM CULTURAS DE LINFÓCITOS**

Defesa de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará – UFPA.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. María Elena Crespo López.

Aprovado em        /        /

Banca:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. María Elena Crespo López.

---

Prof. Dr. Rommel Rodríguez Burbano.

---

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira.

## RESUMO

Fármacos antidepressivos são largamente utilizados no tratamento sintomático do transtorno depressivo. Inúmeras pesquisas atuais sobre a depressão vêm contribuindo para o avanço da terapia farmacológica e para o surgimento de novos fármacos antidepressivos. Diretrizes atuais para testes de genotoxicidade de novos medicamentos sugerem a importante utilidade de ensaios que detectem danos ao DNA, ou seja, testes para avaliar a indução de quebras no DNA. Entretanto, o número escasso de dados sobre a genotoxicidade de fármacos faz com que seja reduzido o número de fármacos que realmente podem ser usados em segurança. Portanto, é de extrema importância estudos sobre a avaliação genotoxicológica de fármacos, principalmente, drogas utilizadas por um longo período de tempo como é o caso dos antidepressivos. A duloxetina é um antidepressivo novo, pertencente à classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN), utilizada no tratamento sintomático da depressão. Apesar da existência de trabalhos demonstrando que alguns fármacos antidepressivos são genotóxicos, não existe até hoje nenhum estudo sobre a possível genotoxicidade da duloxetina em células de origem humana. Assim, o presente estudo tem como objetivo explorar o possível potencial genotóxico *in vitro* da duloxetina em culturas primárias de linfócitos humanos através das técnicas de detecção de aberrações cromossômicas e micronúcleos. Culturas primárias de linfócitos sanguíneos de voluntários sadios foram expostas a diferentes concentrações de duloxetina (10-150 ng/ml) e ciclofosfamida (6 µg/ml) como controle positivo. Aberrações cromossômicas estruturais, índice mitótico, índice de divisão nuclear, índice de binucleação, número de células com um, dois, três e quatro micronúcleos e o número de células com pontes nucleoplasmáticas foram avaliadas. Todos os índices das culturas incubadas com duloxetina foram significativamente menores que aqueles dos grupos controles, indicando um certo grau de citotoxicidade da droga. Entretanto, só as concentrações de 100 e 150 ng/ml provocaram o aumento significativo da presença de aberrações cromossômicas e micronúcleos. Considerando que essas concentrações ficam perto do limite superior da faixa terapêutica da droga usada em humanos, nossos resultados alertam já sobre a necessidade de aprofundar no conhecimento da genotoxicidade humana da duloxetina.

**Palavras-chave:** Genotoxicidade, antidepressivos, duloxetina, aberrações cromossômicas, micronúcleos

## ABSTRACT

Antidepressants are widely used for the symptomatic treatment of depressive disorder. Numerous current research on depression has contributed to the advancement of drug therapy and the emergence of new antidepressant drugs. Current guidelines for genotoxicity testing of new drugs suggests the important utility of assays that detect DNA damage, or tests to evaluate the induction of DNA breakage. However, the small number of data on the genotoxicity of drugs causes the number of drugs that can actually be used safely is reduced. Therefore, it is of utmost importance genotoxicology studies on the evaluation of drugs, especially drugs used for a long period of time such as antidepressants. Duloxetine is a new antidepressant belonging to the class of selective serotonin reuptake inhibitors of serotonin and norepinephrine (SNRIs), used in the symptomatic treatment of depression. Despite the existence of studies showing that some antidepressant drugs are genotoxic, there is to date no study on the possible genotoxicity of duloxetine in human cells. Thus, this study aims to explore the possible genotoxic potential of duloxetine in vitro in primary cultures of human lymphocytes through the techniques of detection of chromosomal aberrations and micronuclei. Primary cultures of blood lymphocytes of healthy volunteers were exposed to different concentrations of duloxetine (10-150 ng/ml) and cyclophosphamide (6 µg/ml) as a positive control. Structural chromosomal aberrations, mitotic index, nuclear division index, index binucleation, number of cells with one, two, three and four micronuclei and the number of cells with nucleoplasmatic bridges were evaluated. All cultures incubated with indices of duloxetine were significantly lower than those of the control groups, indicating a degree of cytotoxicity of the drug. However, only concentrations of 100 and 150 ng/ml caused a significant increase in the presence of chromosomal aberrations and micronuclei. Whereas these concentrations are close to the upper limit of the therapeutic range of the drug used in humans, our results call already on the need to deepen their understanding of human genotoxicity of duloxetine.

**Keywords:** Genotoxicity, antidepressants, duloxetine, aberration chromosome, micronucleus.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática dos estágios da carcinogênese. Fonte: INCA, 2002. 12
- Figura 2.** Esquema para a diferenciação de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas nas aberrações estruturais. Em **a** falha cromossômica; **b** quebras cromossômicas; **c** falha cromatídica; **d** quebra cromatídica. 14
- Figura 3.** Ilustração dos possíveis danos genéticos de culturas expostas a um agente genotóxico/citotóxico pelo ensaio do micronúcleo. Utilizando esses biomarcadores, é possível avaliar a frequência de quebras cromossômica (MN), rearranjo cromossômico (Pontes nucleoplasmáticas) e amplificação genética (*bud* nuclear). 15
- Figura 4.** Sinapse adrenérgica/serotoninérgica. Os círculos vermelhos indicam os alvos moleculares dos fármacos antidepressivos. Fonte: Farmacologia Básica e Clínica (Katzung, B. G), 2014. 19
- Figura 5.** Estrutura da Duloxetina. Fonte: Pereira et al., 2009. 20
- Figura 6.** Representação esquemática da técnica de detecção de aberrações cromossômicas. 27
- Figura 7.** Representação esquemática da técnica de detecção de micronúcleo. 28
- Figura 8.** Índices mitóticos de culturas de linfócitos humanos tratadas com diferentes concentrações de duloxetina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=6). \*p<0,01 vs Controle. 31
- Figura 9.** Metáfase obtida após aplicação da técnica de aberrações cromossômicas nas culturas de linfócitos humanos expostos *in vitro* a 100ng/ml de duloxetina. A seta indica uma quebra de cromátide. 32
- Figura 10.** Metáfase obtida após aplicação da técnica de aberrações cromossômicas nas culturas de linfócitos humanos expostos *in vitro* a 100ng/ml de duloxetina. A seta indica uma quebra de cromossomo. 32
- Figura 11.** Metáfase obtida após aplicação da técnica de aberrações cromossômicas nas culturas de linfócitos humanos expostos *in vitro* a 100ng/ml de duloxetina. A seta indica uma quebra de cromátide. 32
- Figura 12.** Metáfase obtida após aplicação da técnica de aberrações cromossômicas nas culturas de linfócitos humanos expostos *in vitro* a 100ng/ml de duloxetina. A seta indica uma quebra de cromátide. 32
- Figura 13.** Média dos Índices Mitóticos ( $\pm$  desvio médio) de culturas de linfócitos tratadas com a concentração de 6 $\mu$ g/ml de ciclofosfamida. 33
- Figura 14.** Metáfase obtida após aplicação da técnica de aberrações cromossômicas nas culturas de linfócitos humanos, pela exposição *in vitro* à ciclofosfamida de 6 $\mu$ g/ml. A seta indica uma quebra de cromátide. 33

- Figura 15.** Média e desvio padrão dos índices mitóticos de culturas de linfócitos humanos tratadas com diferentes concentrações de duloxetina. \* $p < 0,01$  vs Controle. 34
- Figura 16.** Média e desvio padrão dos índices de divisão nuclear de culturas de linfócitos humanos tratadas com diferentes concentrações de duloxetina. \* $p < 0,05$  vs Controle. 35
- Figura 17.** Média e desvio padrão dos índices de binucleação de culturas de linfócitos humanos tratadas com diferentes concentrações de duloxetina. \* $p < 0,05$  vs Controle. 35
- Figura 18.** Micronúcleos encontrados após análise de 1000 células binucleadas nas culturas de linfócitos humanos pela exposição a duloxetina de 100 ng/ml. 36
- Figura 19.** Número de células com MN em 1000 células binucleadas encontrados em culturas de linfócitos humanos tratadas com diferentes concentrações de duloxetina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=6). \* $p < 0,01$  vs Controle. 37

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

DNA      Ácido desoxirribonucleico

CPA      Ciclofosfamida

ACs      Aberrações cromossômicas

MN      Micronúcleo

CtB      Citocalasina – B

OMS      Organização Mundial de Saúde

DSM-IV   Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1. GENOTOXICIDADE HUMANA .....	11
1.1.1. TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS (ACs) .....	13
1.1.2. TESTE DE DETECÇÃO DE MICRONÚCLEOS (MN) .....	14
1.2. GENOTOXICIDADE DE FÁRMACOS .....	16
1.3. FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS: A DULOXETINA .....	17
1.4. ANTIDEPRESSIVOS E GENOTOXICIDADE .....	22
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
2.1. GERAL .....	24
2.2. ESPECÍFICOS .....	24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1. DOADORES VOLUNTÁRIOS DE SANGUE PARA A CULTURA PRIMÁRIA DE LINFÓCITOS HUMANOS .....	25
3.1.1. Critérios de inclusão.....	25
3.1.2. Critérios de exclusão.....	25
3.2. COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE.....	25
3.3. CULTURA PRIMÁRIA DE LINFÓCITOS HUMANOS.....	26
3.4. EXPOSIÇÃO AS DROGAS .....	26
3.5. TÉCNICA DE DETECÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS .....	26
3.6. TÉCNICA DE DETECÇÃO DE MICRONÚCLEO .....	27
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	28
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
4.1. EFEITO GENOTÓXICO DA EXPOSIÇÃO <i>IN VITRO</i> DE LINFÓCITOS HUMANOS A DULOXETINA UTILIZANDO A TÉCNICA DE DETECÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS .....	30
4.1.1. Índice Mitótico detectado nas culturas de linfócitos expostos a duloxetine.....	30

4.1.2. Detecção de Aberrações Cromossômicas nas culturas de linfócitos expostos a duloxetina.....	31
4.1.3. Índice mitótico e aberrações cromossômicas detectadas nas culturas de linfócitos expostas a ciclofosfamida (controle positivo).....	
4.2. EFEITO GENOTÓXICO DA EXPOSIÇÃO <i>IN VITRO</i> DE LINFÓCITOS HUMANOS A DULOXETINA UTILIZANDO O ENSAIO DO MICRONÚCLEO.....	33
4.2.1. Índices detectados nas culturas de linfócitos expostas a duloxetina.....	
4.2.2. Detecção de micronúcleos nas culturas de linfócitos expostas a diferentes concentrações de duloxetina.....	
<b>5.0. DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>6.0. CONCLUSÃO.....</b>	
<b>7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>34</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. GENOTOXICIDADE HUMANA

A genotoxicidade, também denominada de genética toxicológica, tem por objetivo identificar e estudar os efeitos de agentes físicos, químicos ou biológicos capazes de produzirem efeitos deletérios sobre o organismo, com especificidade para os ácidos nucleicos, especialmente o DNA. O termo genotóxico se refere às alterações letais e/ou hereditárias, que são transmitidas tanto pelas células somáticas, como pelas germinativas (SILVA et al., 2003).

Os efeitos genotóxicos causam alterações na estrutura físico-química do DNA (a chamada mutagênese) e alterações no determinismo genético ao nível celular ou orgânico (os chamados processos de carcinogênese e teratogênese, respectivamente). Porém, nem sempre esses dois eventos são consequências de genotoxicidade, podendo ocorrer por outros mecanismos. A intensa pesquisa neste setor da genética se deve a relação deste ramo com malformações, doenças congênitas, genéticas e degenerativas, envelhecimento celular e do corpo, câncer e etc (SILVA et al., 2003).

O nosso DNA é constantemente exposto a uma variedade de substâncias genotóxicas tanto por fontes endógenas, a exemplo de subprodutos metabólicos do organismo, tanto como fontes exógenas, a exemplo da radiação ultravioleta (UV) (ERMOLAEVA & SCHUMACHER, 2014).

O potencial mutagênico desses efeitos genotóxicos depende do alvo celular atingido e alguns destes produtos precisam de metabolização para adquirir a sua capacidade mutagênica. Estes agentes podem induzir danos no DNA de forma direta através da ligação direta com o DNA e/ou de forma indireta através da ligação a proteínas envolvidas em manter a integridade desse genoma, como por exemplo, a radiação ionizante que ataca o DNA sobre as duas formas de danos (direta e indireta). (MATEUCA et al., 2006).

As consequências dos efeitos da interação do mutagênico- célula alvo podem levar o DNA a sofrer vários danos e mutações que vão desde mudanças nos nucleotídeos, alterações cromossômicas tanto numéricas quanto estruturais (MATEUCA et al., 2006). Algumas destas alterações podem afetar o metabolismo celular, desregular o ciclo de divisão celular e até mesmo levar a célula à morte (RODRIGUEZ-ROCHA et al., 2011).

A descoberta do DNA como material genético feito por Avery, McLeod e McCarthy e a descrição de sua estrutura feita por Watson e Crick acabaram por indicar que o DNA era o principal alvo celular dos agentes carcinógenos químicos e que as mutações são

fundamentais para o entendimento acerca dos mecanismos do surgimento do câncer (LOEB & HARRIS, 2008).

Os carcinógenos químicos são capazes de interagir e causar alterações genéticas no DNA de células susceptíveis, o que pode causar um crescimento celular seletivo, consequente expansão clonal tornando-as geneticamente instáveis e, por fim, o surgimento de células neoplásicas (LOEB & HARRIS, 2008).

A primeira fase da carcinogênese (por consequência dos efeitos dos agentes mutagênicos), a iniciação do tumor, inicia-se pela exposição de células normais a agentes cancerígenos químicos ou físicos gerando células que possuem uma resposta alterada ao seu microambiente e uma vantagem proliferativa em relação às células normais. Ao final de vários estágios (representados na Figura 1), obtemos a manifestação do câncer (LOEB & HARRIS, 2008).



**Figura 1.** Representação esquemática dos estágios da carcinogênese. Fonte: INCA, 2002.

Os principais biomarcadores de genotoxicidade aos efeitos de agentes cancerígenos e/ou genotóxicos vem sendo aplicados há muitos anos. Dentre estes encontramos o teste de detecção de aberrações cromossômicas (ACs), troca de cromátides de irmãs (TCI) e o ensaio do micronúcleo (MN) que detectam alterações citogenéticas em linfócitos do sangue periférico cultivados *in vitro* (NORPPA, 2004).

Os biomarcadores genotóxicos como os testes de aberrações cromossômicas e micronúcleos são parâmetros de grande validade para a detecção de alterações genéticas devido ao potencial para identificação precoce dos efeitos de agentes genotóxicos, capacidade

de identificar alterações hereditárias e predição para um possível surgimento de câncer (MATEUCA et al., 2006).

### 1.1.1 TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS (ACs)

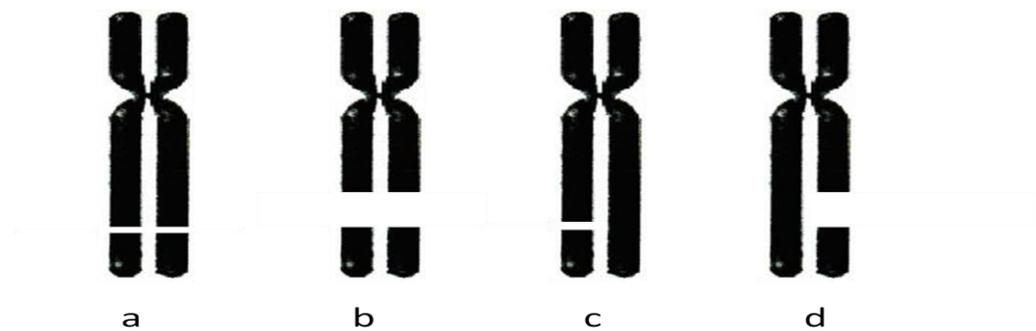
A técnica de detecção de aberrações cromossômicas (ACs) detecta alterações tanto no número de cromossomos (aberrações numéricas) quanto na estrutura (aberrações estruturais). Estas alterações podem ser encontradas em linfócitos do sangue periférico em ambientes ocupacionais e ambientais funcionando como um biomarcador dos efeitos iniciais de agentes carcinogênicos (BONASSI et al., 2004; SUSPIRO & PRISTA, 2011).

Em um estudo realizado por Norppa e colaboradores (2006) foi verificado que um nível elevado de aberrações cromossômicas está associado a um elevado risco de câncer. Estudos indicam que tanto danos cromossômicos quanto cromatídicos preveem um possível câncer em trabalhos realizados pelo Grupo de Estudos Nórdicos e, na Itália com base em dados de mortalidade por câncer (Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage, 1990; HAGMAR et al., 1994; BONASSI et al., 1995).

No ensaio de aberrações cromossômicas, os linfócitos humanos do sangue periférico são cultivados e parados em metáfase e corados pelo Giemsa. Os linfócitos possuem grandes vantagens para sua utilização nos testes de genotoxicidade que são: fácil obtenção da amostra por punção venosa, vida útil longa e circulam por todo o organismo acumulando danos no DNA em suas passagens através dos tecidos-alvos. (SUSPIRO & PRISTA, 2011).

O ensaio de aberrações cromossômicas tem uma posição chave na bateria de testes para detectar compostos genotóxicos e seu protocolo é definido por orientação da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) para análise de substâncias químicas (OECD, 2012).

As vantagens de utilização do ensaio de aberrações cromossômicas estão relacionados com uma identificação mais precisa de todos os diferentes tipos de alterações cromossômicas estruturais (quebras e falhas) e uma possível co-detecção de índices mitóticos (MATEUCA et al., 2006). Os tipos de alterações encontradas neste ensaio estão representados na Figura 2.



**Figura 2.** Esquema para a diferenciação de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas nas aberrações estruturais. Em **a** falha cromossômica; **b** quebras cromossômicas; **c** falha cromatídica; **d** quebra cromatídica.

A sensibilidade da técnica de aberrações cromossômicas é dependente do tipo de substância genotóxica que se vai avaliar. A sua importância reside em sua capacidade para identificar mutágenos capazes de induzir quebras no DNA. (MATEUCA et al., 2006).

Vários trabalhos (BURGAZ et al., 2002; MUSAK et al., 2006; TOMPA et al., 2006; TESTA et al., 2007; KOPJAR et al., 2009; MCDIARMID et al., 2010) relevantes utilizando o ensaio de aberrações cromossômicas em trabalhadores da saúde expostos a agentes cancerígenos demonstraram aumento das frequências de aberrações cromossômicas apoiando a excelente sensibilidade que esta técnica possui como um biomarcador para a detecção de baixos níveis de danos ao DNA, tais como aqueles que provavelmente ocorram no ambiente de trabalho (SUSPIRO & PRISTA, 2011).

### 1.1.2 ENSAIO DE DETECÇÃO DE MICRONÚCLEOS (MNs)

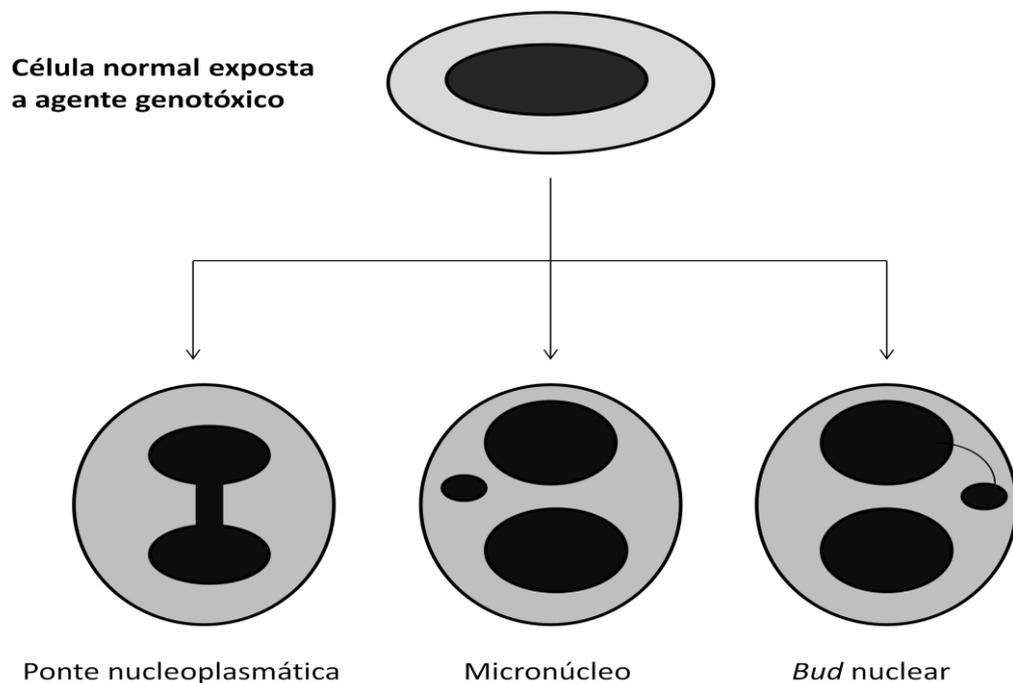
A avaliação da frequência de micronúcleos (MNs) foi primeiramente proposta de forma independente por Schmid (1975) e Heddle (1973) como uma abordagem alternativa mais simples para avaliação genotóxica de substâncias. Esta técnica avalia os danos cromossômicos medindo os micronúcleos, também conhecidos como corpos de Howell-Jolly em medula óssea de camundongo e em linfócito de sangue periférico. É uma técnica extensivamente utilizada na epidemiologia e no campo da toxicologia genética determinando a presença e a extensão de dano cromossômico em populações humanas expostas a agentes genotóxicos (FENECH, 2000; FENECH et al., 2003).

O significado da presença de MN só foi descoberto no século XX pelo trabalho de Dawson & Bury (1961) quando eles verificaram sua presença em células vermelhas da medula óssea durante diferentes estados patológicos. Não muitos anos depois os micronúcleos

foram descritos em outro tipo celular, principalmente nos linfócitos. Foi demonstrada a presença de micronúcleos em linfócitos expostos a irradiação, comprovando a relação entre dose de irradiação e a indução de micronúcleos (LUZHNA et al., 2013).

O micronúcleo é um pequeno núcleo adicional composto por material cromossômico perdido pelo núcleo principal como consequência de um dano genético (Figura 3). Encontrados em grande quantidade em pacientes cancerígenos não tratados e em várias condições pré-neoplásicas, este ensaio pode ser utilizado como um biomarcador para identificar precocemente condições pré-neoplásicas muito antes das manifestações clínicas características do câncer (SWAPAN & PRANAB, 2010).

As pontes nucleoplasmáticas ocorrem quando os centrômeros de cromossomos, cromátides ou anéis dicêntricos são tracionados para o pólo oposto da célula durante a anáfase e já, os *buds* nucleares são morfologicamente iguais aos micronúcleos, com a exceção da conexão nucleoplasmática que os liga ao núcleo (MALUF & RIEGEL et al., 2011).



**Figura 3.** Ilustração dos possíveis danos genéticos de culturas expostas a um agente genotóxico/citotóxico pelo ensaio do micronúcleo. Utilizando esses biomarcadores, é possível avaliar a frequência de quebras cromossômica (MN), rearranjo cromossômico (Pontes nucleoplasmáticas) e amplificação genética (*bud* nuclear).

A técnica de micronúcleos por bloqueio da citocinese tem por objetivo a parada da célula em divisão na fase binucleada (citocinese), tornando possível a visualização e

reconhecimento das perdas cromossômicas e também das pontes nucleoplasmáticas, que desapareceriam caso as células entrassem em divisão (LUZHNA et al., 2013).

A formação dos micronúcleos é considerada como a manifestação de danos genéticos ou quebras cromossômicas proveniente de várias condições como a radiação, medicamentos, poluentes e etc. Muitos pesquisadores já tem denominado o MN como um marcador de tumorigênese, pois o seu papel no rastreamento do câncer é bem estabelecido. Em qualquer malignidade, a presença de MN é sempre aumentada em relação à lesão benigna ou em relação a pessoas saudáveis (SWAPAN & PRANAB, 2010).

Dessa forma, a técnica de detecção de micronúcleos vem sendo aplicada no estudo de diversos agentes genotóxicos, assim como para o estudo da segurança no uso de fármacos em diversos trabalhos (BRAMBILLA et al., 2009; BRAMBILLA et al., 2010; BRAMBILLA et al., 2011; BRAMBILLA et al., 2012; BRAMBILLA et al., 2013).

## 1.2 GENOTOXICIDADE DE FÁRMACOS

A avaliação genotoxicológica é de extrema importância para produtos medicinais para a qualificação e melhora de impurezas químicas. Agências reguladoras já recomendam testes de genotoxicidade para aprovação de comercialização dos medicamentos antes de sua aplicação. A avaliação do potencial genotóxico é especialmente importante para produtos farmacêuticos onde o uso clínico seja por um longo período de tempo (LIU et al., 2012).

Diretrizes atuais para os testes de genotoxicidade de medicamentos sugerem a importante utilidade de ensaios que detectem a possível ocorrência de danos no DNA, ou seja, testes para avaliar a indução de quebras no DNA. Portanto, é válido analisar em que medida os resultados obtidos por ensaios de danos ao DNA estão correlacionados positivamente com os resultados de carcinogenicidade em longo prazo (BRAMBILLA et al., 2010).

Segundo o departamento de saúde e serviços humanos de alimentação e administração de drogas dos Estados Unidos (FDA), produtos farmacêuticos cuja expectativa de uso clínico seja contínua por pelo menos seis meses, devem ser submetidos obrigatoriamente a testes de genotoxicidade, bem como para os produtos farmacêuticos utilizados frequentemente de forma intermitente no tratamento para condições crônicas (BRAMBILLA et al., 2013).

As orientações e recomendações atuais para testes de genotoxicidade de produtos farmacêuticos têm sido muito díspares, tanto em termo dos testes mais adequados como quanto protocolos a serem seguidos. Porém em um estudo realizado por Purves e

colaboradores (1995) verificou-se que 37 das 47 (78%) das empresas farmacêuticas participantes incluem o ensaio *in vitro* para detectar mutação de genes em células de mamíferos como parte de seus testes de rotina.

Na Conferência Internacional de Harmonização de Orientação sobre Teste de Genotoxicidade e Interpretação de Dados para Medicamentos destinados para o uso humano, realizado em 2012, foram fornecidas orientações para os fabricantes de drogas sobre quais testes devem ser realizados para avaliar o potencial genotóxico dos medicamentos e também proporcionou orientação sobre condições de teste, interpretação de dados e estratégias de subsequentes se uma resposta positiva é observada em ensaios *in vitro* (ICH, 2012).

Esta orientação tem como objetivo fornecer aos patrocinadores de fármacos recomendações para garantir que os medicamentos sejam adequadamente testados para o potencial de causar danos genéticos e de assegurar o desenvolvimento eficiente de novos medicamentos.

Do ponto de vista do desenvolvimento de medicamentos, é muito importante que se tenha um conhecimento profundo sobre o mecanismo de quaisquer resultados toxicológicos genéticos positivos para que as informações inerentes com relação ao risco sejam corretamente informadas. Portanto, os testes de genotoxicidade de fármacos antes de sua comercialização são exigidos por agências reguladoras em todo o mundo (SNYDER & GREEN, 2001). No Brasil essa regulação é feita pela ANVISA, porém, não é seguida pela maioria das indústrias farmacêuticas.

Estudos genotoxicológicos em vários tipos de medicamentos são escassos. A classe dos antidepressivos, principalmente os inibidores seletivos da recaptação de serotonina que são largamente utilizados em sua grande maioria em longo prazo, contra diversas formas de distúrbios psiquiátricos possuem poucas informações sobre sua genotoxicidade (BOZKURT et al., 2004). Os antidepressivos que agem em mais de um neurotransmissor, a exemplo dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina, como a duloxetina, também são fármacos extremamente eficazes e de pouco conhecimento sobre seus efeitos genotóxicos.

### 1.3 FARMACOS ANTIDEPRESSIVOS: A DULOXETINA

O transtorno depressivo é uma desordem afetiva considerada grave caracterizada pelos seguintes sintomas mais comuns: decréscimo de humor, redução de energia, sentimentos de culpa, insônia ou hipersônia, dificuldade de concentração, diminuição do

apetite, perda de peso, acentuada redução da auto-estima, tendências suicidas dentre outros sintomas (ANDRIOPOULOS et al., 2013; HUNZIKER et al., 2005).

Segundo o Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV), estamos diante de um episódio de transtorno depressivo maior quando o indivíduo apresentar todos os sinais ou sintomas (ou pelo menos três) citados acima há mais de duas semanas. Estes conjuntos de sintomas precisam estar presentes quase todos os dias e também precisam causar mal-estar ou incapacidade funcional significativo ao paciente, tendo-se também que excluir como etiologias um fármaco ou uma doença.

Atualmente, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a depressão é a quarta principal causa de deficiência no mundo ocidental e está prevista para ocupar o segundo lugar em 2020, indicando que será uma das doenças que mais crescerão. Um estudo feito nos Estados Unidos da América entre os anos de 1990 e 2000 mostrou que o custo de tratamento para depressão aumentou em 31,2% (subiu de \$19,8 para \$26,08 milhões de dólares) (GREENBERG et al., 2003).

O tratamento da depressão apresenta uma gama de opções que permite ao médico especialista, uma flexibilidade no sentido de adequar os melhores métodos terapêuticos respeitando a individualidade de cada paciente. Informações sobre a doença, bem como as opções de tratamento e os possíveis efeitos colaterais e transitórios são disponibilizados aos pacientes, que pode ajuda-los a cumprir todo o tratamento e a evitar o seu abandono (RUIZ & RODRÍGUEZ, 2005).

A maioria dos tratamentos em casos de pacientes com transtorno depressivo envolve o uso de fármacos, a chamada terapia farmacológica com o uso de antidepressivos (STAHL, 1998).

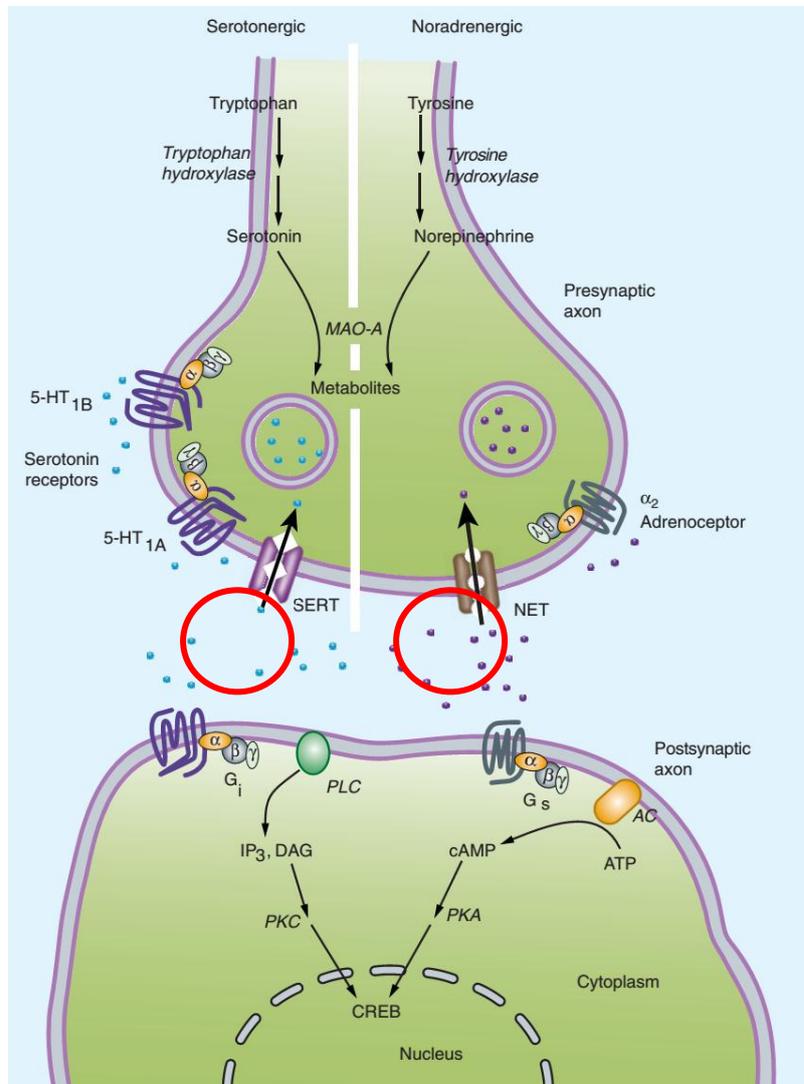
Estes fármacos produzem, em média, uma melhora dos sintomas de 60% a 70%, no prazo de um mês e esta taxa de melhora dificilmente é encontrada em outros tipos de tratamento, exceto à terapia eletroconvulsiva (TEC) que ainda continua sendo mais rápido e eficaz e em alguns casos possibilita salvar pacientes com comportamento suicida agudo (SOUZA 1999; RUDORFER, 1997).

A grande maioria dos antidepressivos possuem importantes ações no metabolismo dos neurotransmissores e seus respectivos receptores, a exemplo da noradrenalina e serotonina (BUCKLEY & WADDINGTON, 2000; OWENS et al., 1997).

Em 1950 com o início do uso da reserpina (alcalóide utilizado para o tratamento da hipertensão e o primeiro a atuar no sistema nervoso central) e a sua capacidade de induzir a depressão, trabalhos foram feitos sobre a sua capacidade de inibir o armazenamento de

neurotransmissores (EARL, 1954; DUSTAN et al., 1954; WINSOR, et al., 1954; DENNISON et al., 1955) fornecendo a base para a Hipótese das Aminas na depressão, elucidando que fármacos capazes de produzir um aumento da função dos neurotransmissores, dentre as principais a serotonina e noradrenalina, na fenda sináptica causariam uma melhora no quadro depressivo. Esta hipótese foi de extrema importância para o avanço em pesquisas e a descoberta de novos antidepressivos (POTTER & HOLLISTER, 2007).

Nas sinapses serotoninérgicas e adrenérgicas, os fármacos antidepressivos atuam de forma indireta favorecendo a presença das catecolaminas e/ou serotonina endógenas na fenda sináptica. Para isso, os locais de ação possíveis são: as bombas de recaptação com inibição da recaptação de serotonina e/ou noradrenalina e a inibição da enzima monoamina oxidase (MAO), que degrada os neurotransmissores, representados na Figura 4.



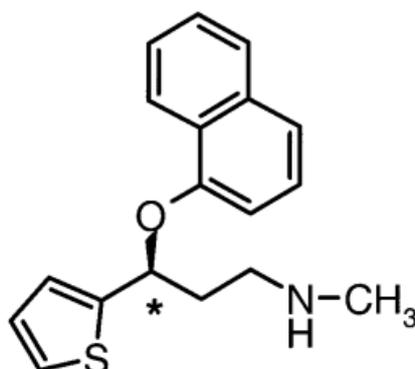
**Figura 4.** Sinapse adrenérgica/serotoninérgica. Os círculos vermelhos indicam os alvos moleculares dos fármacos antidepressivos. Fonte: Farmacologia Básica e Clínica (Katzung, B. G), 2014.

Assim, existem três classes de grupos de fármacos usados no tratamento da depressão que são: inibidores dos transportadores das monoaminas (antidepressivos tricíclicos), inibidores seletivos da recaptação de serotonina e/ou noradrenalina e os inibidores da enzima monoamina oxidase MAO.

Os antidepressivos tricíclicos, assim chamados por possuírem um núcleo característico com três anéis, são inibidores do transporte de monoaminas e, portanto maximizam a duração da ação destes neurotransmissores nos neurônios pós-sinápticos. Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e/ou noradrenalina inibem a recaptação pré-sináptica destes neurotransmissores aumentando a sua disponibilidade na fenda sináptica, e consequentemente o tempo de duração de seus efeitos. Os inibidores seletivos da MAO inibem a enzima monoaminoxidase, responsável pelo metabolismo da noradrenalina, serotonina e tiramina (POTTER & HOLLISTER, 2007).

A duloxetina [(+)-(S)-N-metil-1-(1-naftaleniloxi)-2-tiofenopropanamina], que tem por nome comercial Cymbalta, é um antidepressivo relativamente novo (Figura 5) aprovado pelo US Food and Drug Administration (FDA) (agência regulatória de administração de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos) e também aprovada e registrada no Brasil em 2009 de acordo com as normas da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2009) para o tratamento do transtorno depressivo maior.

É um potente inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina com fracos efeitos sobre a recaptação de dopamina tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro* (TRAN et al., 2003; LANTZ et al., 2003, ANVISA, 2009 PATEL et al., 2011).



**Figura 5.** Estrutura da Duloxetina. Fonte: Pereira et al., 2009.

Este fármaco é um derivado tiofenopropilamina com um grupo amino secundário a que a naftalina é ligada através de uma ligação éter. Seu peso molecular é de 297,4 com

fórmula empírica  $C_{18}H_{19}NOS$  e é vendido na forma de sal cloridrato (BAUER et al., 2006; KARPA et al., 2002).

A duloxetina é administrada oralmente com doses efetivas para a terapia do transtorno depressivo maior variando entre 20 a 120 mg/dia, sendo a sua dose de manutenção de 60 mg/dia (HUNZIKER et al., 2005).

É bem absorvida após administração oral alcançando sua concentração plasmática máxima ( $C_{máx}$ ) 6 horas após a administração. A biodisponibilidade oral absoluta da duloxetina varia entre 32 % e 80 % (média de 50 %). Os alimentos podem aumentar de 6 para 10 horas o tempo médio necessário para atingir a concentração máxima o que faz diminuir, levemente, a sua absorção (em aproximadamente 11 %) (PATEL et al., 2011).

A duloxetina liga-se a aproximadamente 90% das proteínas plasmáticas humanas sendo as principais proteínas de ligação a albumina e a glicoproteína  $\alpha$ -1 ácida, não sendo esta ligação afetada pela função renal ou hepática (PATEL et al., 2011).

Em um estudo realizado por Lantz et al. (2003), onde avaliou-se a farmacocinética após a administração oral de 20,2 mg de duloxetina em pacientes depressivos, foram achados os seguintes dados farmacocinéticos que estão demonstrados na tabela 1.

**Tabela 1.** Parâmetros farmacocinéticos da duloxetina em indivíduos que receberam uma dose oral de 20.2 mg de Duloxetina.

<b>Parâmetros farmacocinéticos</b>	<b>Valores</b>
<b><math>T_{máx}</math> (hr)</b>	6
<b><math>C_{máx}</math> (ng/ml)</b>	23.5
<b><math>AUC_{0-\infty}</math> (ng . h/ml)</b>	257
<b><math>T^{1/2}</math> (hr)</b>	10.3
<b>CL/F (L/h)</b>	119
<b><math>V_d/F</math> (L)</b>	1787

$T_{max}$  = tempo máximo transcorrido após administração oral até alcançar a  $C_{max}$ ;  $C_{max}$  = concentração plasmática máxima;  $AUC_{0-\infty}$  = área sob a curva das concentrações plasmáticas do tempo zero até o infinito;  $T^{1/2}$  = meia-vida (tempo requerido para que a concentração do agente diminua pela metade); CL/F = depuração sistêmica oral;  $V_d/F$  = volume de distribuição oral.

A citocromo P450 (CYP) isoenzimas CYP1A2 e CYP2D6 é a responsável pelo metabolismo da duloxetina. O principal metabólito da duloxetina no plasma é o conjugado

glicuronídeo de 4-hidroxi-duloxetina e o segundo mais abundante encontrado no plasma é o conjugado 5-hidroxi-6-metoxiduloxetina, que são farmacologicamente inativos (LANTZ et al., 2003; BYMASTER et al., 2005; HUNZIKER et al., 2005; PATEL et al., 2011).

As principais vias de excreção da duloxetina são a urina (cerca de 72%) e as fezes (cerca de 20%) (LANTZ et al., 2003; BYMASTER et al., 2005).

Quanto ao uso clínico, a duloxetina demonstra-se segura e tolerada para o tratamento do transtorno depressivo maior e incontinência urinária (LANTZ et al., 2003).

#### 1.4 ANTIDEPRESSIVOS E GENOTOXICIDADE

Como revisado acima, os antidepressivos são drogas de uso em longo prazo utilizadas em pacientes que apresentam distúrbios depressivos sintomáticos. Na avaliação da relação risco/benefício, deve ser considerado que dentre as várias reações adversas dos antidepressivos, a ocorrência de efeitos genotóxicos e carcinogênicos pode ser bastante provável considerando que a maioria dos tratamentos são de exposição longa e excessiva. Portanto, é considerada de essencial importância a avaliação do potencial genotóxico destas drogas (BRAMBILLA et al., 2009).

A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer, nos 91 volumes das monografias relativas à avaliação dos riscos de câncer em seres humanos publicados entre os anos de 1927-2007, examinou 203 medicamentos incluindo duas famílias consideradas de antidepressivos, e, apenas o antidepressivo fenelzina foi considerado não carcinogênico em seres humanos (BRAMBILLA et al., 2009).

Antidepressivos da classe dos tricíclicos foram estudados em asas de *Drosophila melanogaster* utilizando o teste de mutação e recombinação somáticas (SMART) para análise genotóxica. Alguns fármacos (clomipramina, ionfepramina e mianserina) desta classe demonstraram ser claramente mutagênicos em diferentes concentrações (10mM e 100mM). (SCHAIK & GRAF, 1993).

Em um estudo realizado por Brambilla e colaboradores (2009) no qual a genotoxicidade e carcinogenicidade de antidepressivos e antipsicóticos foram estudadas, 33 antidepressivos foram avaliados e dentre estes a duloxetina (com doses para camundongos: 100mg/kg/dia e 140mg/kg/dia e ratos: 27-36 mg/kg/dia), mirtazapina (com doses para camundongos: 200mg/kg/dia e ratos: 20-60mg/kg/dia) e paroxetina (com doses para camundongos: 25mg/kg/dia e ratos: 20mg/kg/dia) obtiveram resultados positivos em testes de

carcinogenicidade a longo prazo com surgimento de tumores em camundongos e ratos tratados.

Porém em testes de genotoxicidade, os resultados para estes antidepressivos foram negativos. Para o antidepressivo duloxetina, não foi realizado nenhum teste em células humanas. Os testes utilizados para a duloxetina foram: mutação reversa de *Salmonella typhimurium*, ensaio UDS em hepatócitos de rato, mutação genética em células de linfomas de ratos L5178 Y lócus TK, troca de cromátides irmãs em células da medula óssea de hamsters chinês *in vivo* e aberrações cromossômicas em células de medula óssea de ratos *in vivo*.

Em um dos escassos estudos sobre a duloxetina, avaliou-se o efeito da droga em memória de curto e longo prazo e a genotoxicidade por ensaio do cometa em camundongos tratados, com dose máxima de 20mg/kg de duloxetina por injeção intraperitoneal. Os resultados não mostraram perda de memória avaliada por parâmetros neurocomportamentais e nem efeitos genotóxicos analisados em tecido cerebral (PEREIRA et al., 2009).

Entretanto, não existe até hoje nenhum estudo sobre a possível genotoxicidade da duloxetina em humanos e, com o crescente aumento de pessoas afetadas pela depressão, o consequente aumento do uso de antidepressivos e os recentes trabalhos demonstrando que vários antidepressivos possuem efeitos genotóxicos, faz-se necessário um estudo com ensaios que possam avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e/ou carcinogênicos da duloxetina.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. GERAL**

O objetivo deste trabalho é analisar o possível efeito mutagênico da duloxetina em modelo de cultura primária de linfócitos humanos.

### **2.2. ESPECÍFICOS**

2.2.1. Analisar os efeitos genotóxicos da exposição de culturas primárias de linfócitos humanos a diferentes concentrações de Duloxetina (0-150 ng/ml).

2.2.2. Analisar os efeitos citotóxicos da exposição de culturas primárias de linfócitos humanos a diferentes concentrações de Duloxetina (0-150 ng/ml).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. DOADORES VOLUNTÁRIOS DE SANGUE PARA A CULTURA PRIMÁRIA DE LINFÓCITOS HUMANOS

Para os estudos *in vitro* foram usados linfócitos de seis doadores voluntários Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará (UFPA). Todos os doadores obtiveram informações sobre o projeto de pesquisa e foi solicitado seu consentimento por escrito. Todos os doadores passaram por avaliações através dos critérios descritos nos tópicos 3.2 e 3.3.

##### 3.1.1. Critérios de Inclusão

Adultos com idades entre 18 e 40 anos de ambos os sexos.

##### 3.1.2. Critérios de Exclusão

Indivíduos fumantes de mais de quatro cigarros ao dia, portadores de doenças agudas e crônicas graves, que receberam tratamento à base de medicamentos nos últimos dois meses, no uso de fármacos-dependentes, que bebiam quantidades significativas de álcool (mais de 200 ml) ao dia e/ou com exposição ocupacional ou outras atividades que causassem genotoxicidade.

#### 3.2. COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE

A coleta de sangue foi realizada com material estéril e descartável, sendo os mesmos abertos diante do voluntário. As amostras de sangue dos voluntários foram armazenadas em tubos vacutainer heparinizados e utilizadas para a realização da cultura em no máximo duas horas do início da coleta, evitando assim, qualquer tipo de interferência aos experimentos.

### 3.3. CULTURA PRIMÁRIA DE LINFÓCITOS HUMANOS

Para a realização da cultura, foram adicionados 500µl de sangue total heparinizado em meio RPMI 1640, suplementado com 20% de soro bovino fetal, 10 ml de antibiótico/antimicótico e glutamina. Os linfócitos foram estimulados com 1,5% (200µl) de fitohemaglutinina e incubados a 37 °C por 72 horas em estufa de CO<sub>2</sub> (MALUF et al., 2011; MOORHEAD et al., 1960).

### 3.4. EXPOSIÇÃO ÀS DROGAS

A duloxetine foi dissolvida em solução de NaCl a 0,9% para a obtenção das concentrações finais utilizadas no estudo (10, 25, 50, 100 e 150 ng/ml), baseadas na concentração plasmática máxima (C<sub>máx</sub>) de 23,5 ng/ml encontrada quando se administra 20,2 mg de duloxetine por via oral (LANTZ et al., 2003).

As culturas de linfócitos humanos, tanto para o teste de detecção de aberrações cromossômica quanto para detecção de micronúcleos foram expostas a estas concentrações de duloxetine por 5 horas antes do término das 72 horas de incubação da cultura.

A exposição das culturas de linfócitos humanos à ciclofosfamida foi realizada como controle positivo, uma vez que esta droga é reconhecidamente mutagênica (ANDERSON et al., 1995). Para isso, os linfócitos foram expostos à ciclofosfamida na concentração de 6 µg/ml por 4 horas antes do término das 72 horas de incubação a 37 °C (MOREIRA et al., 2004).

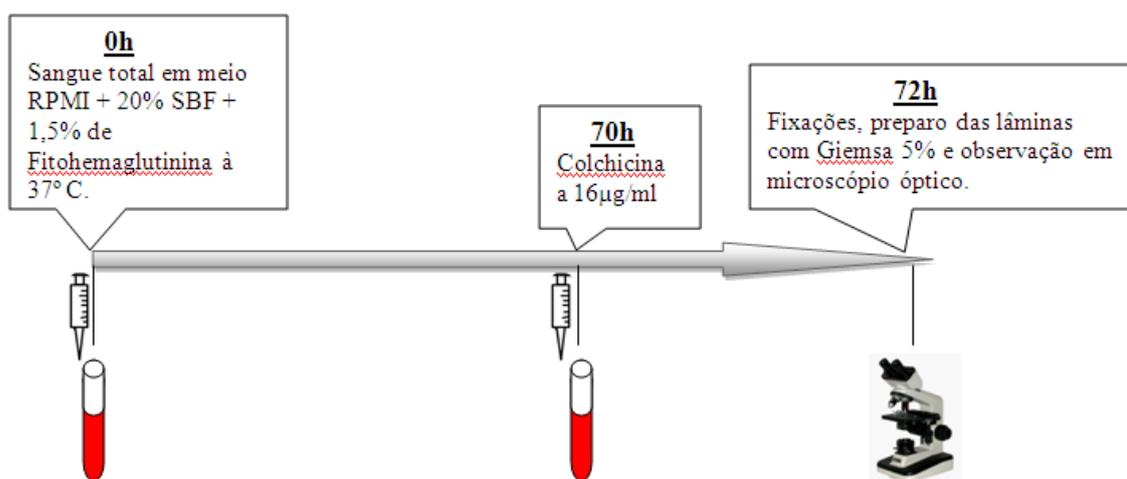
### 3.5. TÉCNICA DE DETECÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Para o preparo das amostras nas quais foram determinadas as aberrações cromossômicas, durante as duas últimas horas de incubação, as células foram tratadas com 75 µl de colchicina a uma concentração final de 16 µg/ml (Figura 6).

Ao completar 72 horas de incubação, as células do cultivo foram centrifugadas a 1000 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos à temperatura ambiente, descartando-se então 4 ml do sobrenadante. O restante foi ressuspensionado e tratado com a solução hipotônica de KCl 0,075M (temperatura de 37 °C) durante 28 minutos na mesma temperatura. Após uma nova centrifugação por 5 minutos a 1000 rpm, a temperatura ambiente, foram descartados 4 ml do sobrenadante e o restante foi novamente ressuspensionado. Com essa suspensão, foram então

realizadas três fixações consecutivas que consistiram na adição de 5 ml dos fixadores metanol e ácido acético (3:1), posterior centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente e ressuspensão do sedimento após descarte de 4 ml do sobrenadante (LEE et al., 1999).

Finalmente, as células fixadas foram gotejadas sobre lâminas limpas, secas ao ar e coradas com Giemsa 5% durante 5 minutos. As lâminas foram observadas em microscópio óptico. Para determinação das aberrações cromossômicas (AC), foram analisadas 1000 metáfases por lâmina e quantificado o Índice Mitótico (nº de células em metáfase em 1000 células viáveis, IM).



**Figura 6.** Representação esquemática da técnica de detecção de aberrações cromossômicas.

### 3.6. TÉCNICA DE DETECÇÃO DE MICRONÚCLEOS

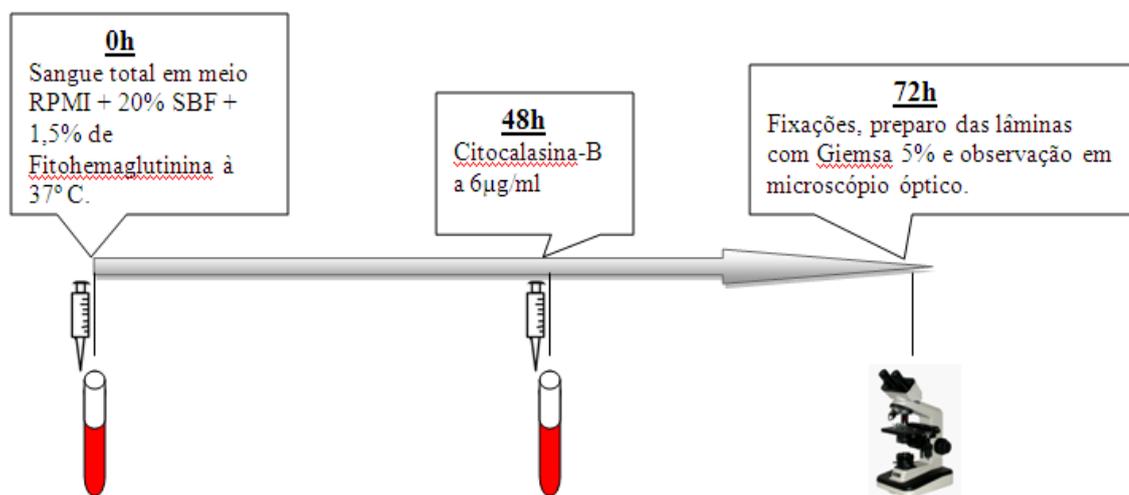
Os linfócitos foram incubados com citocalasina-B (CtB) a uma concentração final de 6 µg/ml (20 µg/ml) nas últimas 24 horas da cultura, isto é, a partir de 48 horas após o início da cultura (LEE et al., 1999; FENECH et al., 2000) (Figura 7).

Completadas às 72 horas de incubação, as células foram centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado deixando-se apenas 1 ml. Em seguida, adicionou-se solução hipotônica gelada de KCl (0,075 M), ressuspendida e centrifugada a 800 rpm por 5 minutos. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado deixando-se 1 ml. A seguir foram adicionados 5 ml do fixador 5:1 (5 partes de metanol : 1 parte de ácido acético) recém preparado e três gotas de formaldeído e as células foram ressuspendidas e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos (MALUF & RIEGEL et al., 2011; BURGAZ et al., 1998; LEE et al., 1999).

Após a etapa acima foram adicionados 5 ml de fixador 3:1 recém preparado (metanol:ácido acético). O conteúdo foi novamente ressuspensionado e centrifugado a 800 rpm por 5 minutos. O procedimento acima foi repetido e por fim o sobrenadante foi descartado deixando-se 0,5 ml de suspensão para preparação das lâminas.

As células fixadas foram gotejadas sobre lâminas limpas, secas ao ar e coradas com Giemsa 5% por 7 minutos (MALUF et al., 2011). Todas as lâminas foram observadas em microscópio óptico.

Para determinação da frequência de micronúcleos, foram analisadas 1000 células (com a membrana intacta) por lâmina e quantificado o índice de divisão nuclear (IDN), o número de células binucleadas, o número de células com um, dois, três e quatro micronúcleos, o número de células em metáfase (índice mitótico) e o número de células com pontes nucleoplasmáticas. O IDN foi calculado por  $IDN = [M1 + 2 (M2) + 3 (M3) + 4 (M4)] / N$ , em que M1 a M4 = número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente, e N = número total de células viáveis (FENECH, 2000; FENECH et al., 2003; CRESPO-LÓPEZ et al., 2007).



**Figura 7.** Representação esquemática da técnica de detecção de micronúcleo.

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi testada pelo método de Kolmogorov-Smirnov assumindo um nível de significância  $P < 0,05$ . Após confirmada a distribuição gaussiana dos dados, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) para evidenciar a diferença entre os grupos. Quando o valor de F foi significativo ( $p < 0,05$ ), aplicou-se o *post hoc* de Tukey para realização de comparação múltipla. Todas estas análises foram realizadas com o programa estatístico BIOESTAT 5.0 (AYRES et al., 2007).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EFEITO GENOTÓXICO DA EXPOSIÇÃO *IN VITRO* DE LINFÓCITOS HUMANOS A DULOXETINA UTILIZANDO A TÉCNICA DE DETECÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Uma das técnicas tradicionais em detecção de genotoxicidade, a técnica de detecção de aberrações cromossômicas identifica alterações cromossômicas e estruturais (quebras e falhas). Assim, esta técnica foi utilizada neste estudo em experimentos *in vitro* para verificar a um possível efeito genotóxico de diferentes concentrações de duloxetine.

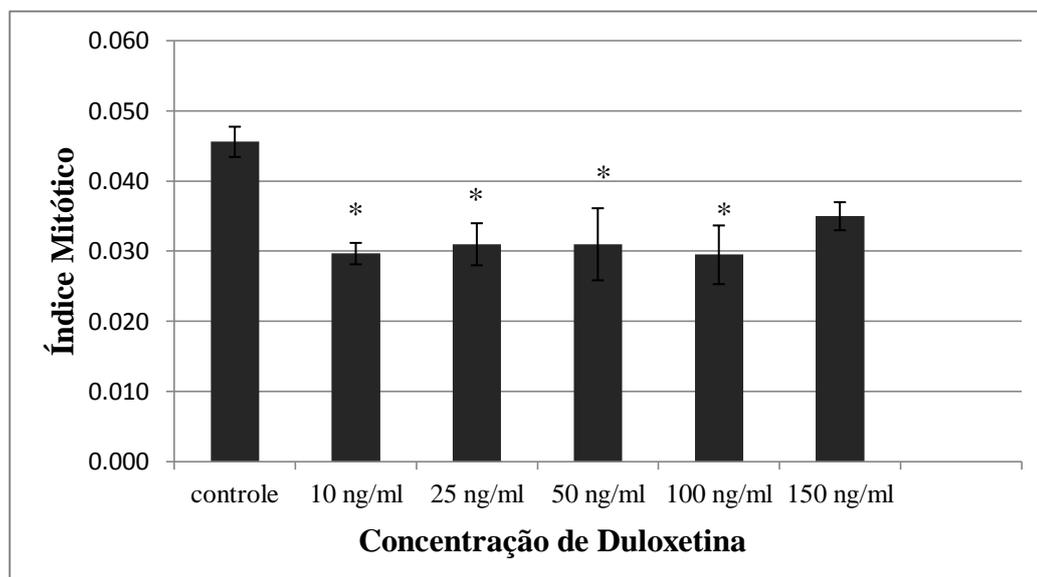
#### 4.1.1. Índice Mitótico detectado nas culturas de linfócitos expostos a duloxetine

Na tabela 2, são mostrados os resultados de Índice Mitótico (IM) das culturas de linfócitos expostas a concentrações crescentes de duloxetine.

**Tabela 2.** Índices mitóticos de culturas de linfócitos humanos expostas a concentrações crescentes de duloxetine. Os dados são apresentados como média e desvio padrão (n=6).

<u>Concentrações de Duloxetine a que foram expostas as culturas</u>	<u>Média dos Índices Mitóticos</u>	<u>Desvio Padrão dos Índices Mitóticos</u>
Controle	0,046	0,002
10 ng/ml	0,030	0,002
25 ng/ml	0,031	0,003
50 ng/ml	0,031	0,005
100 ng/ml	0,028	0,004
150 ng/ml	0,035	0,002

Quando o índice mitótico dos grupos tratados com duloxetine foi comparado ao índice mitótico do grupo controle, observou-se uma redução estatisticamente significativa destes índices ( $p < 0,01$ ) (Figura 8).



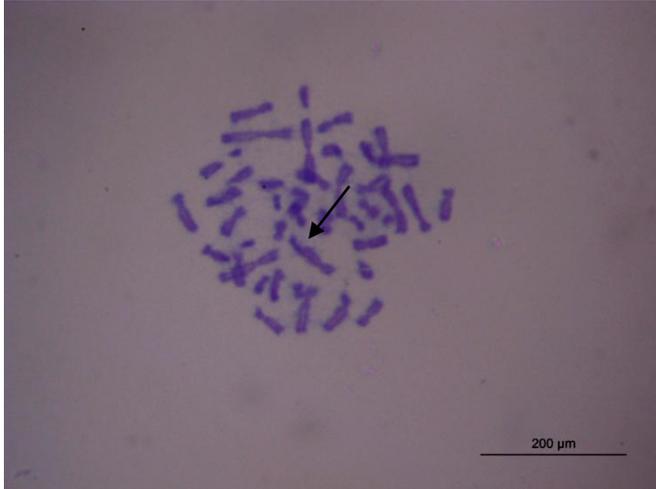
**Figura 8.** Índices mitóticos de culturas de linfócitos humanos tratadas com diferentes concentrações de duloxetina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=6). \*p<0,01 vs Controle.

#### 4.1.2. Detecção de Aberrações Cromossômicas nas culturas de linfócitos expostos a duloxetina

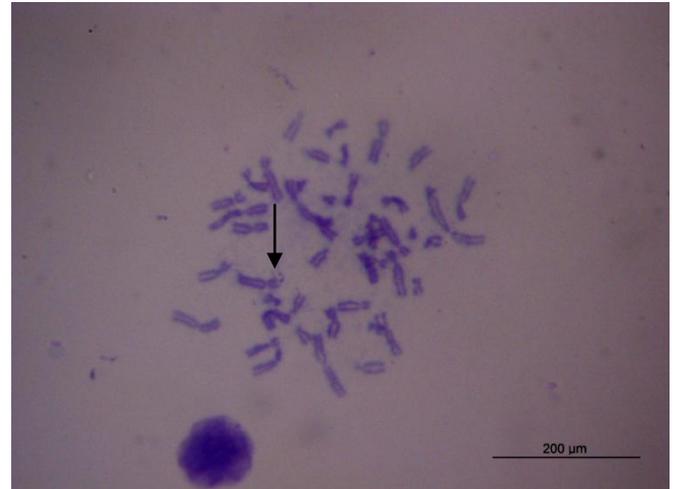
Não foram observados danos cromossômicos quando as células foram expostas a 10, 25 e 50 ng/ml de duloxetina (Tabela 3). Porém, nas culturas expostas às concentrações mais elevadas de 100 e 150 ng/ml, foram encontrados todos os tipos de aberrações cromossômicas (Tabela 3 e Figuras 9, 10, 11 e 12).

**Tabela 3.** Quantidade de aberrações cromossômicas encontradas em 1000 células nas culturas de linfócitos humanos (n=6) expostas à duloxetina nas concentrações de 0, 10, 25, 50, 100 e 150 ng/ml.

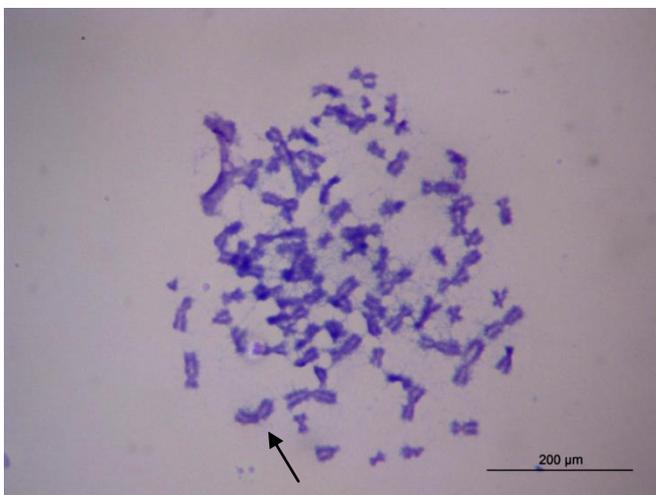
	Salina	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	100ng/ml	150ng/ml
Falha cromossômica	0	0	0	0	23	3
Quebra de cromossomo	0	0	0	0	20	5
Falha de cromátide	0	0	0	0	10	1
Quebra de cromátide	0	0	0	0	20	2
Cromossomo triradial	0	0	0	0	10	0
Cromossomo dicêntrico	0	0	0	0	7	0



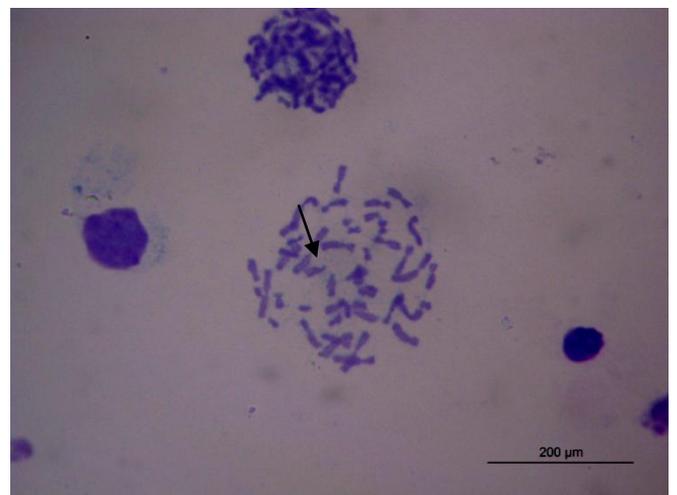
**Figura 9.** Metáfase obtida após aplicação da técnica de aberrações cromossômicas nas culturas de linfócitos humanos expostos *in vitro* a 100ng/ml de duloxetina. A seta indica uma quebra de cromátide.



**Figura 10.** Metáfase obtida após aplicação da técnica de aberrações cromossômicas nas culturas de linfócitos humanos expostos *in vitro* a 100 ng/ml de duloxetina. A seta indica uma quebra de cromossomo.



**Figura 11.** Metáfase obtida após aplicação da técnica de aberrações cromossômicas nas culturas de linfócitos humanos expostos *in vitro* a 100 ng/ml de duloxetina. A seta indica uma quebra de cromátide.

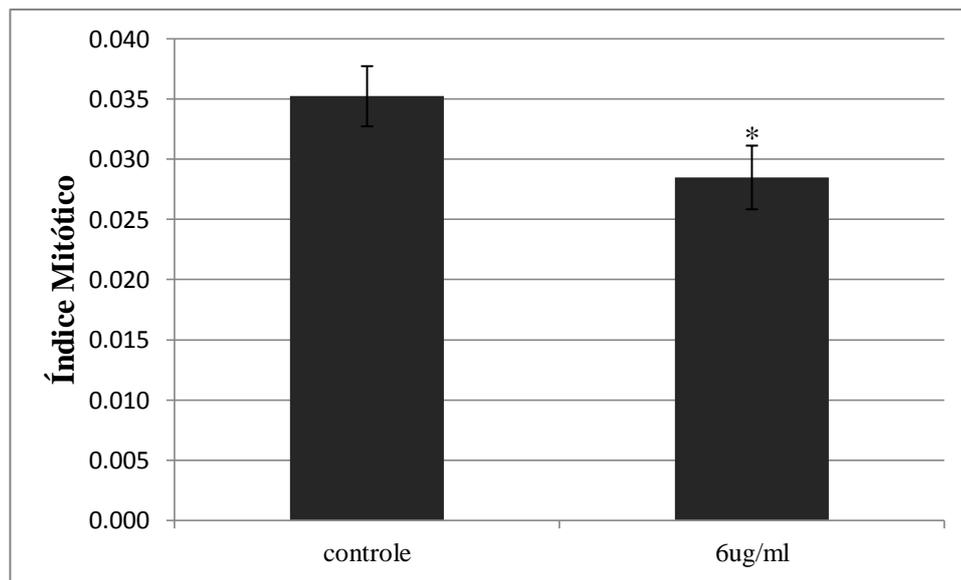


**Figura 12.** Metáfase obtida após aplicação da técnica de aberrações cromossômicas nas culturas de linfócitos humanos expostos *in vitro* a 100 ng/ml de duloxetina. A seta indica uma quebra de cromátide.

#### 4.1.3. Índice mitótico e aberrações cromossômicas detectadas nas culturas de linfócitos expostas a ciclofosfamida (controle positivo)

Com o objetivo de comparar os resultados obtidos com os de uma droga reconhecidamente genotóxica, foram realizados controles positivos em culturas de linfócitos humanos expostos a ciclofosfamida na concentração de 6  $\mu\text{g/ml}$ .

Quando o índice mitótico foi analisado, obteve-se uma diminuição estatisticamente significativa do grupo tratado com 6  $\mu\text{g/ml}$  de ciclofosfamida em relação ao grupo controle (Figura 13).



**Figura 13.** Média dos Índices Mitóticos ( $\pm$  desvio médio) de culturas de linfócitos tratadas com a concentração de 6  $\mu\text{g/ml}$  de ciclofosfamida. \* $p < 0,01$  vs Controle.

Foram encontradas 32 falhas cromossômicas, 28 quebras de cromossomo, 35 falhas de cromátide, 30 quebras de cromátide, 20 cromossomos triradiais e 10 cromossomos dicêntricos em 1000 células ( $n=6$ ) expostas à ciclofosfamida na concentração de 6  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 14).



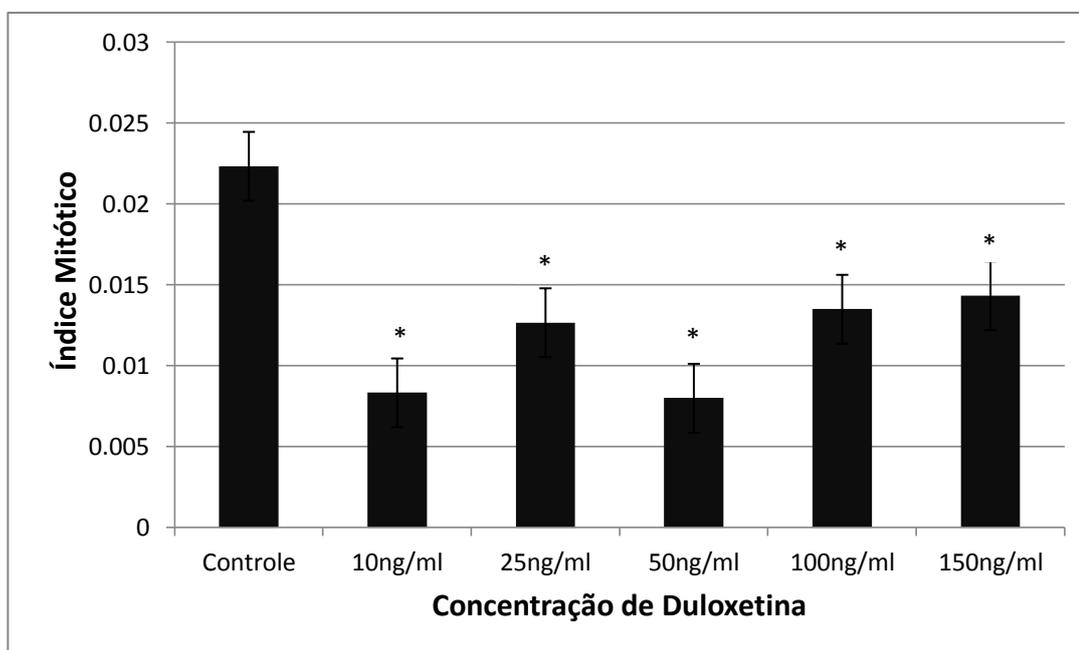
**Figura 14.** Metáfase obtida após aplicação da técnica de aberrações cromossômicas nas culturas de linfócitos humanos, pela exposição *in vitro* à ciclofosfamida de 6  $\mu\text{g/ml}$ . A seta indica uma quebra de cromátide.

## 4.2. EFEITO GENOTÓXICO DA EXPOSIÇÃO *IN VITRO* DE LINFÓCITOS HUMANOS A DULOXETINA UTILIZANDO O ENSAIO DE MICRONÚCLEOS (MN)

A técnica do ensaio do micronúcleo identifica agentes genotóxicos clastogênicos (que induzem quebras no DNA) e os que interferem na formação do fuso mitótico. Assim, esta técnica foi utilizada em seis experimentos *in vitro* para verificar a concentração de duloxetine que possa apresentar um possível efeito genotóxico em células de linfócitos humanos.

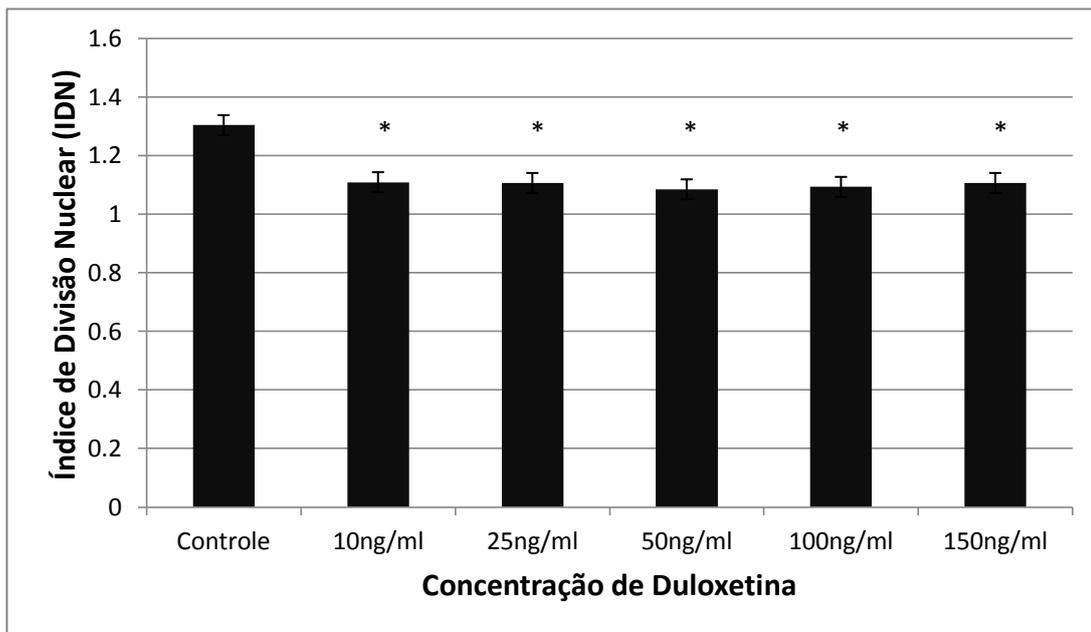
### 4.2.1. Índices detectados nas culturas de linfócitos expostas a duloxetine

Todos os grupos tratados com duloxetine apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) do índice mitótico em relação ao grupo controle (Figura 15). Os índices mitóticos das culturas de linfócitos expostas a duloxetine não apresentaram diferenças significativas entre elas.



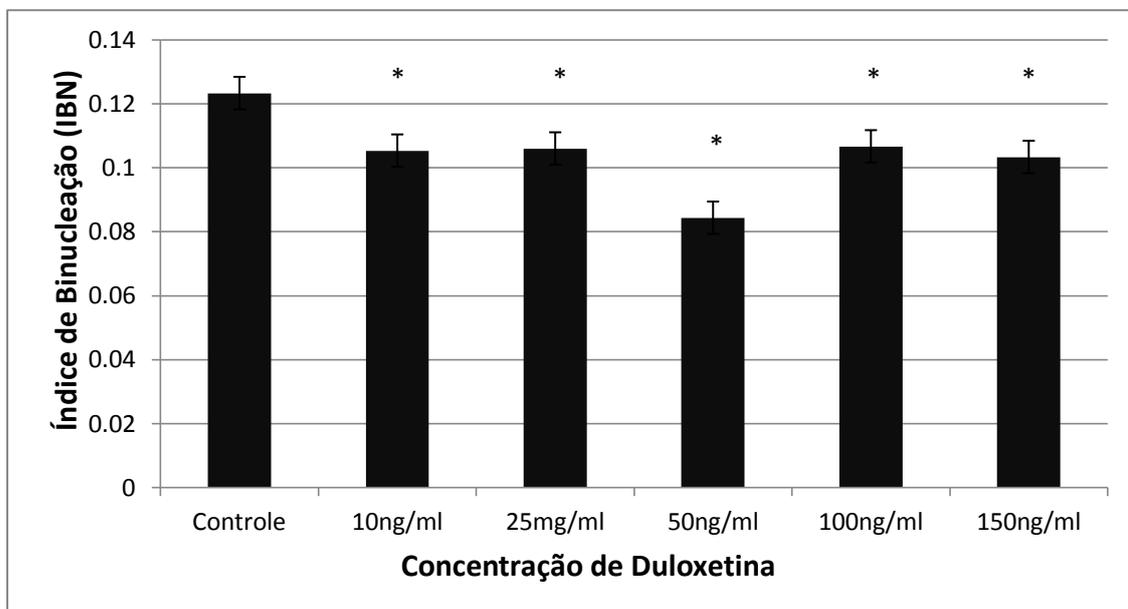
**Figura 15.** Índices mitóticos de culturas de linfócitos humanos tratadas com diferentes concentrações de duloxetine. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=6$ ). \* $p < 0,01$  vs Controle.

Quando o parâmetro avaliado foi o índice de divisão nuclear (IDN), também observou-se uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) de todos os grupos tratados em relação ao grupo controle e nenhuma diferença entre os grupos tratados (Figura 16).



**Figura 16.** Índice de divisão nuclear de culturas de linfócitos humanos tratadas com diferentes concentrações de duloxetina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=6). \*p<0,01 vs Controle.

A análise do índice de binucleação (IBN) confirmou a diminuição na proliferação celular detectada com os índices anteriores, já que os grupos tratados não apresentaram diferenças entre si, mas todos eles mostraram IBNs significativamente menores que o do grupo controle (Figura 17).



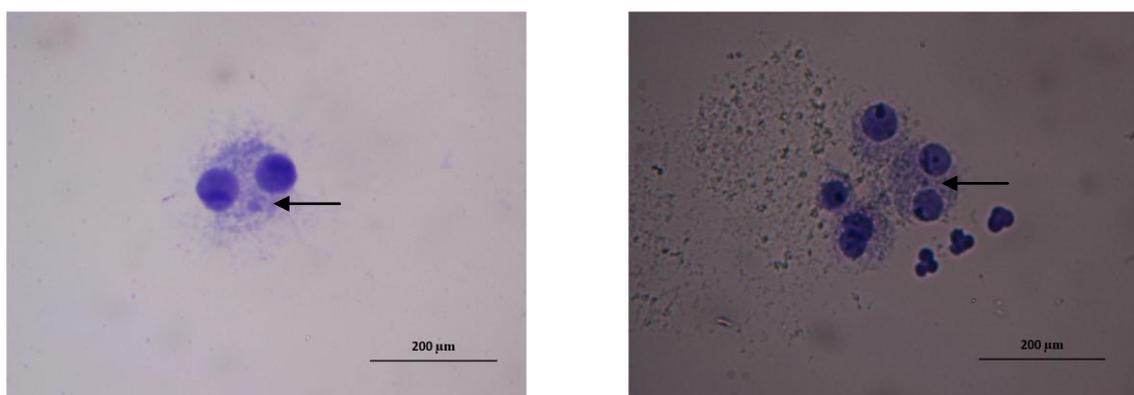
**Figura 17.** Índice de binucleação de culturas de linfócitos humanos tratadas com diferentes concentrações de duloxetina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=6). \*p<0,05 vs Controle.

#### 4.2.2. Detecção de micronúcleos nas culturas de linfócitos expostas a diferentes concentrações de duloxetina

Nas culturas expostas às concentrações de 100 ng/ml e 150 ng/ml foram encontradas bastantes células que apresentavam micronúcleos (Tabela 4 e Figura 18), mas nas culturas expostas a 10, 25 e 50 ng/ml de duloxetina as células com micronúcleos foram relativamente escassas, havendo muitas culturas onde não foi encontrada nenhuma células com micronúcleos (Tabela 4).

**Tabela 4.** Quantidade de células com micronúcleos encontradas nas culturas de linfócitos humanos expostas à duloxetina por 1000 células binucleadas (n=6).

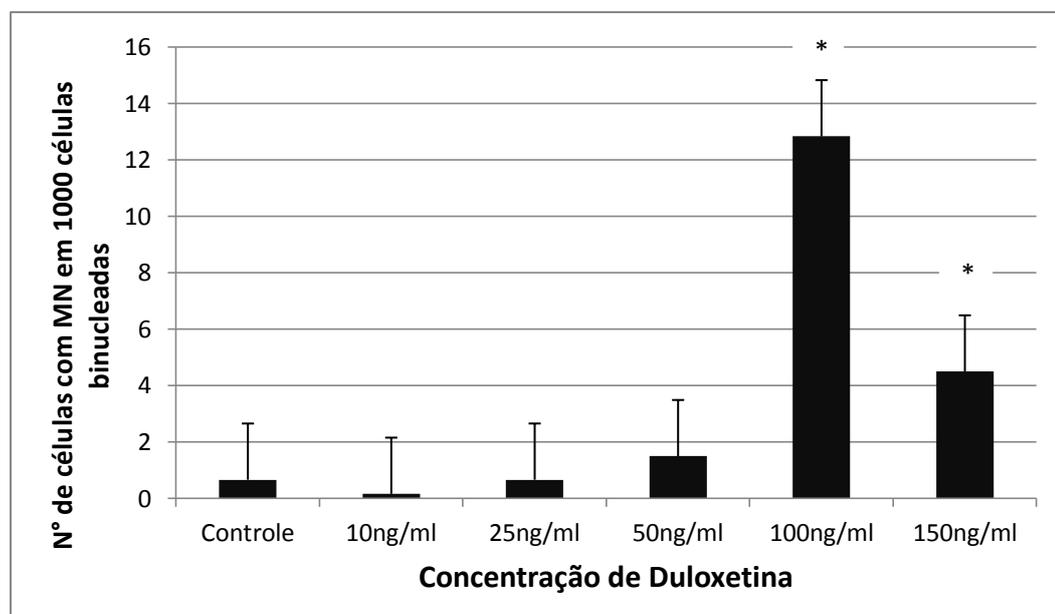
Controle	10 ng/ml	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	150 ng/ml
0	0	0	4	18	4
2	0	0	0	10	5
2	1	0	0	12	6
0	0	3	4	9	5
0	0	0	1	15	4
0	0	1	0	13	3



**Figura 18.** Células binucleadas encontradas nas culturas de linfócitos humanos expostas a 100 ng/ml de duloxetina. As setas indicam a presença de micronúcleos.

A análise estatística da quantidade de células micronucleadas indicou que 100 e 150 ng/ml de duloxetina provocaram um aumento significativo de células micronucleadas em relação ao grupo controle (Figura 19), sendo que o incremento mais expressivo foi encontrado com a concentração de 100 ng/ml. Cabe ressaltar que, apesar destes aumentos, não foram

encontradas células com mais de um micronúcleo, o que seria indicativo de um dano mais intenso capaz de provocar uma maior fragmentação dos núcleos.



**Figura 19.** Número de células com MN em 1000 células binucleadas encontrados em culturas de linfócitos humanos tratadas com diferentes concentrações de duloxetina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=6). \*p<0,01 vs Controle.

## 5. DISCUSSÃO

Os linfócitos são células responsáveis pela extraordinária especificidade das respostas imunes adaptativas do organismo. Eles são produzidos na medula óssea e estão presentes em grande quantidade na corrente sanguínea, na linfa e nos órgãos linfóides (ALBERT et al., 2010).

O modelo de cultura primária de linfócitos humanos é amplamente utilizado para diversos estudos *in vitro*, a exemplo dos de genotoxicidade e citotoxicidade, devido a que os linfócitos são de fácil obtenção (por punção venosa), possuem uma vida útil longa e circulam por todo o organismo, possivelmente acumulando danos genéticos à medida que passam através dos tecidos-alvos específicos (SUSPIRO & PRISTA, 2011).

As vantagens acima justificam a ampla utilização deste modelo em estudos de genotoxicidade, tanto com os testes clássicos (como o ensaio de micronúcleos e a avaliação da presença de aberrações cromossômicas, usados no presente trabalho), quanto os moleculares (como o ensaio de FISH).

Danos genéticos em culturas de linfócitos do sangue periférico cultivados *in vitro* observados com testes como o de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, ensaio de micronúcleos e ensaio do cometa já tem sido usados por muitos anos como biomarcadores de exposição genotóxica, especialmente para a detecção dos efeitos iniciais de agentes carcinogênicos (ALBERTINI et al., 2000; NORPPA, 2004 e 2006; SUSPIRO & PRISTA, 2011).

O teste de aberrações cromossômicas é atualmente o biomarcador de exposição genotóxica mais validado e deve ser considerado como padrão-ouro em comparação com os testes mais recentes (SUSPIRO & PRISTA, 2011). Também, o ensaio de micronúcleos é um teste que está se tornando bastante promissor, apropriado para biomonitoramento genotóxico em larga escala, proporcionando estudos prospectivos confirmando sua associação com o risco de câncer (SUSPIRO & PRISTA, 2011). Portanto, um expressivo aumento da presença de células micronucleadas é sugestivo de um dano genético que no rastreamento do câncer é bem estabelecido, pois a frequência de células micronucleadas no câncer maligno é sempre significativamente muito maior do que em lesões benignas ou em pessoas saudáveis (SWAPAN & PRANAB, 2010).

Assim, os testes de aberrações cromossômicas e micronúcleos estão se convertendo nos parâmetros de maior validade para se detectar alterações genéticas devido ao alto potencial para detecção precoce dos efeitos de agentes mutagênicos e carcinogênicos,

capacidade de identificar alterações hereditárias e predição para um possível câncer (MATEUCA et al., 2006).

Esses testes são especialmente indicados para o estudo da genotoxicidade provocada por fármacos e são recomendados pelos órgãos reguladores da Europa, USA e Japão para o desenvolvimento racional de novos fármacos antes de sua comercialização. Orientações atuais para testes de genotoxicidade de produtos farmacêuticos indicam a necessidade da aplicação de três testes-padrão: 1) um teste de mutação genética em bactérias, 2) um teste *in vitro* para avaliação citogenética de danos cromossômicos ou um ensaio de mutação genética em células de mamíferos e 3) um ensaio *in vivo* de lesões cromossômicas realizados em células hematopoiéticas de roedores (BRAMBILLA et al., 2009; BRAMBILLA et al., 2010; BRAMBILLA et al., 2011; BRAMBILLA et al., 2012; BRAMBILLA et al., 2013).

Entretanto, a grande maioria dos fármacos desenvolvidos e que começaram a ser comercializados antes das atuais regulamentações, não possuem estudos suficientes para cumprir essas orientações. Assim, recentes revisões da literatura existente sobre genotoxicidade de fármacos demonstraram que de 70 drogas anti-histamínicas, 71 drogas gastrintestinais e 120 drogas anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas estudadas, somente 17-18% apresentavam todos os dados sobre genotoxicidade e carcinogenicidade necessários para cumprir com as regulamentações atualmente em vigor (BRAMBILLA et al., 2009b; 2010; 2011). Embora essa percentagem de fármacos que cumprem a legislação aumenta ao analisar 46 fármacos para o asma e 48 drogas antibacterianas, antifúngicas, antimaláricas e antivirais (BRAMBILLA et al., 2012; 2013), ainda é muito maior a quantidade de fármacos sem estudos suficientes em relação aqueles com dados necessários para usar eles com segurança. Um fato mais alarmante ainda é que para muitos desses grupos de drogas (que na atualidade estão no mercado e são prescritos regularmente), a proporção de fármacos sem nenhum dado sobre genotoxicidade chega a ser mais de 50% do total de fármacos analisados (BRAMBILLA et al., 2009b; 2010; 2013).

No grupo de drogas antipsicóticas e antidepressivas, 47 de 104 fármacos analisados (45,2%) não possuíam nenhum dado sobre genotoxicidade e unicamente 16 (15,4%) (entre os quais não estava a duloxetine) tinham sido estudados de forma adequada para cumprir com as regulamentações (BRAMBILLA et al., 2009). Ainda, apenas três antidepressivos (sertralina, paroxetina e citalopram) utilizaram como modelo de estudo os linfócitos humanos *in vitro* e somente foi utilizada a técnica de aberrações cromossômicas, reforçando a falta de estudos em modelos com células humanas.

Nesse estudo, os dados sobre a possível genotoxicidade da duloxetina também foram analisados demonstrando positividade para testes de carcinogenicidade a longo prazo em camundongos fêmeas tratadas, e negatividade para outros testes (mutação reversa de *Salmonella typhimurium*, síntese de DNA não programada em hepatócitos primários de ratos, mutação gênica em linfoma de rato, troca de cromátides irmãs *in vivo* em células de medula óssea de hamster chinês e teste de carcinogênese a longo prazo em camundongos machos e ratos) (BRAMBILLA et al., 2009).

Nosso estudo revelou que as concentrações relativamente baixas de duloxetina não apresentaram uma genotoxicidade muito pronunciada para as culturas de células humanas (danos cromossômicos e micronúcleos não foram detectados nas células expostas a concentrações de 10, 25 e 50 ng/ml, Tabelas 3 e 4), confirmando os escassos dados descritos anteriormente para essa droga a partir de estudos realizados em células de origem animal (ratos, camundongos e hámster) (BRAMBILLA et al., 2009). Entretanto, quando os linfócitos foram incubados com 100 e 150 ng/ml de duloxetina, lesões cromossômicas (como o surgimento de micronúcleos), falhas e quebras cromossômicas e cromatídicas foram encontradas com o uso dos dois testes (Figuras 9, 10, 11, 12 e 18). Curiosamente, a exposição a 100 ng/ml de duloxetina fez que os linfócitos apresentassem um número significativamente maior de alterações (micronúcleos e aberrações cromossômicas) que quando eles foram expostos a 150 ng/ml. Assim, mais estudos serão necessários para explicar este fenômeno.

Embora a presença de células com micronúcleos foi evidente especialmente com a concentração de 100 ng/ml de duloxetina, vale ressaltar que mesmo para essa concentração não foram encontrados *buds* nucleares (DNA amplificado), pontes nucleoplasmáticas (indicativo de má reparação no DNA, rearranjos cromossômicos, fusão de telômeros e/ou ausência de reparação do dano no genoma resultante de quebras nas cadeias de DNA) ou mais de um micronúcleo por célula binucleada. A presença dessas alterações seria a consequência de um dano muito mais intenso (como já foi demonstrado para outros agentes genotóxicos como, por exemplo, o metilmercúrio) (CRESPO-LÓPEZ et al., 2007), o que não aconteceu com a duloxetina.

De posse destes resultados, a duloxetina pode ser considerada uma droga mais clastogênica que aneugênica, pois tende a induzir quebras no DNA como verificamos com ambas as técnicas usadas no presente trabalho.

Ainda, o ensaio de micronúcleos nos permitiu avaliar outros parâmetros como o índice mitótico (número de metáfases em 1000 células), o índice de divisão nuclear (IDN) (número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos em 500 células) e o índice de binucleação (IBN)

(número de células binucleadas em 500 células). Esses índices são diretamente influenciados pelo estado de proliferação celular da cultura e representam assim, marcadores específicos para avaliar o nível de citotoxicidade do agente testado.

O índice de divisão nuclear é um marcador muito útil para comparar as respostas mitogênicas dos linfócitos e dos efeitos citostáticos dos agentes que serão examinados após exposição em células de linfócitos (FENECH, 2000). Também, a detecção de alterações no índice de binucleação, em culturas com bloqueio da citocinese, é uma indicação de ocorrência ou não da atividade mitótica, portanto, culturas de linfócitos com um baixo índice de binucleação possuem um baixo índice de proliferação (AKUDUGU et al., 2001).

O índice mitótico foi um parâmetro analisado tanto no ensaio de micronúcleos como no teste de detecção de aberrações cromossômicas, pois as duas técnicas permitem a visualização de metáfases. Atualmente, o índice mitótico representa um dos parâmetros mais usados para a identificação do efeito de agentes genotóxicos e por ser bastante sensível e de fácil execução ele já foi utilizado em vários trabalhos (CRESPO-LÓPEZ et al., 2007; KONTAS & SEKEROGLU, 2014).

Na análise das culturas de linfócitos incubados com concentrações crescentes de duloxetina, observou-se uma redução estatisticamente significativa de todos esses índices nos grupos tratados com duloxetina em relação ao grupo controle (Figuras 8, 15, 16 e 17). Essa pronunciada redução dos índices representa uma diminuição na proliferação celular, indicativo da relativa citotoxicidade da droga.

Vale ressaltar que o índice mitótico medido em ambos os testes do presente trabalho apresentou diferenças significativas até com a concentração mais baixa de duloxetina, onde nenhuma alteração como aberrações cromossômicas e/ou micronúcleos foi detectada (Figuras 8 e 15). Essa sensibilidade torna esse parâmetro extremamente útil para a detecção precoce de qualquer dano citotóxico provocado por fármacos ou outros agentes genotóxicos. Resultados obtidos em um estudo no nosso laboratório incluindo pessoas de comunidades expostas ao metilmercúrio confirmam que o índice mitótico é um dos parâmetros mais sensíveis para detecção de citotoxicidade em humanos (CRESPO-LÓPEZ et al., 2011).

Assim, baseando-nos nos dados do presente trabalho, a duloxetina eliciaria inicialmente um processo de citotoxicidade que chega a provocar genotoxicidade com doses mais elevadas. Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para confirmar essa hipótese.

Outro fato importante é que as concentrações utilizadas em nosso estudo estão dentro da faixa de dose terapêutica em humanos, que varia de 20 mg (23,5 ng/ml no plasma após 6 horas de administração por via oral) a 120 mg (141 ng/ml no plasma após 6 horas de administração por via oral), exceto a concentração de 150 ng/ml que extrapola esta faixa (KNADLER, et al., 2011). Cabe lembrar que a concentração de 100 ng/ml de duloxetine (concentração com a que foi detectado o maior número de alterações genotóxicas) equivale aproximadamente à concentração plasmática alcançada no humano após ingerir uma dose de 80 mg do fármaco (KNADLER, et al., 2011). Assim, esta concentração estaria perto do limite superior da faixa terapêutica usada (máxima dose de 120 mg/dia), alertando para a necessidade de realizar mais estudos sobre a genotoxicidade do fármaco.

Essa última conclusão parece contradizer os escassos estudos anteriores realizados com esse antidepressivo, que defendem a ausência de efeitos genotóxicos da duloxetine (BRAMBILLA et al., 2009; PEREIRA ET AL., 2009).

Os dados revisados por Brambilla et al. (2009) sobre testes realizados com duloxetine (mutagênicos e carcinogênicos) indicaram que a duloxetine unicamente apresentava carcinogenicidade em testes realizados em longo prazo com camundongos fêmeas. Entretanto, todos esses dados levantados não foram publicados em revistas científicas com revisão *ad hoc* e sim em manuais de laboratório e páginas de internet. Os próprios autores (Brambilla e colaboradores) reconhecem que as informações levantadas são incompletas, especialmente aquelas que se referem aos ensaios de genotoxicidade onde os resultados foram apresentados sem nenhuma indicação das doses de duloxetine usadas.

Em um dos poucos estudos publicados sobre a genotoxicidade da duloxetine, Pereira et al. (2009) usaram esse fármaco para verificar seu possível efeito genotóxico em camundongos tratados subagudamente durante 5 dias com 10 e 20 mg/Kg via intraperitoneal. O ensaio do cometa, aplicado em amostras de sangue e tecido cerebral desses animais, não mostrou alterações na fragmentação do DNA com o tratamento, mas sim revelou uma maior suscetibilidade das células pertencentes aos animais tratados, quando essas células foram desafiadas *ex vivo* com peróxido de hidrogênio.

O fato de usar um modelo animal, que por vezes pode ser mais resistente que as células de origem humana devido a processos farmacocinéticos diferenciados, pode ter influenciado definitivamente para que não fossem detectadas alterações tão claras como as que detectamos no nosso trabalho.

Como já revisado acima, o modelo de culturas de linfócitos do sangue periférico humano seria mais indicado para avaliar alterações genotóxicas e da proliferação celular, uma

vez que células do tecido cerebral não sofrem constantes divisões o que diminui a confiança quanto à certeza de um possível efeito genotóxico da duloxetina.

Ainda, é preciso que o fármaco provoque um evento genotóxico muito mais agressivo para gerar uma significativa fragmentação do DNA (como quantificada no ensaio do cometa) que aquele necessário para produzir micronúcleos, por exemplo.

Outro ponto que pode explicar a diferença de resultados quanto a genotoxicidade da duloxetina é que a duloxetina em humanos é administrada por via oral mas a via escolhida pelo trabalho de Pereira et al. (2009) foi a intraperitoneal. Por esta via, a absorção do fármaco ocorre de forma rápida sem passar primeiro pelo fígado (como acontece na administração oral) e produzindo um pico de concentração plasmática que favorece a eliminação mais rápida que quando a mesma dose é administrada pela via oral (GOODMAN & GILMAN, 2013). Assim, as concentrações plasmáticas alcançadas e mantidas no tempo são bem diferentes por ambas as vias. Isso não acontece no modelo *in vitro*, onde as concentrações do fármaco a que são expostas os linfócitos refletem exatamente aquelas concentrações plasmáticas alcançadas no humano.

O possível mecanismo molecular de genotoxicidade de antidepressivos, como os da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), ainda não é totalmente conhecido (GURBUZEL et al., 2012).

O tratamento com antidepressivos pode causar genotoxicidade-induzida e adaptação fisiológica em função do neurotransmissor e esta adaptação pode resultar em tolerância ou resistência. Pelo menos alguns dos efeitos mencionados acima podem resultar de efeitos mutagênicos e recombinogênicos que envolvem variações bioquímicas por medicação (GURBUZEL et al., 2012).

Embora tenha sido demonstrada a ocorrência de efeitos teratogênicos significativos causados por alguns antidepressivos tanto em modelos *in vivo* quanto *in vitro*, ainda é incerto se estas malformações e efeitos adversos perinatais são exatamente atribuíveis à droga (CHAMBERS et al., 1996; KUSAKAWA et al., 2008; SLOOT & BOWDEN, 2009; ELLFOLK & MALM, 2010).

Finalmente, os resultados do presente estudo demonstram pela primeira vez os efeitos genotóxicos da duloxetina nos testes de detecção de aberrações cromossômicas e micronúcleos com o modelo de estudo de culturas primárias de linfócitos humanos. Baseando-nos nestes resultados, podemos concluir que a duloxetina pode ser usada em segurança sempre que sejam completados os estudos sobre genotoxicidade necessários para cumprir as regulamentações atuais para as indústrias farmacêuticas e que delimitem

exatamente as doses que não provocam genotoxicidade no humano De posse dos resultados, destacamos a extrema importância da realização de testes genotóxicos para drogas de uso em longo prazo, principalmente a classe dos antidepressivos onde os estudos ainda são muito escassos.

## 6. CONCLUSÕES

- A duloxetina demonstrou ser genotóxica para os linfócitos humanos unicamente nas concentrações de 100 e 150 ng/ml através do uso das técnicas de detecção de aberrações cromossômicas e micronúcleos.
- Todas as concentrações de duloxetina usadas no presente trabalho diminuíram significativamente a proliferação celular (avaliada pelos índices mitótico, de divisão celular e de binucleação) dos linfócitos humanos tratados..

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTINI, R. J; ANDERSON, D; DOUGLAS, G. R; HAGMAR, L; HEMMINK, K; MERLO F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, v. 463, n. 2, p. 111-172, 2000.

ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.

AKUDUGU, J.; GADE, G.; BOHM, L. Cytotoxicity of azadirachtin A in human glioblastoma cell lines. **Life Science**, v. 68, p.1153–60, 2001.

ANDERSON, D; BISHOP, J. B; GARNER, R. C; OSTROSKY-WEGMAN, P; SELBY, P. B. Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 330, n. 1-2, p. 115-181, 1995.

ANDRIOPOULOS, P; LOTTI-LYKOUSA, M; PEPPA, E; PAPADOPOULOS, A. A; NIAKAS, D. Depression, quality of life and primary care: A cross-sectional study. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 3, n. 4, p. 245-252, 2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 40, de 15 de julho de 2009 - Dispõe sobre a atualização do Anexo I, Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS nº. 344, de 12 de maio de 1998. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/controlados/rdc40\\_atualizacao30.pdf?id=34859](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/controlados/rdc40_atualizacao30.pdf?id=34859) &word Acesso em 19/03/2014.

ARENAS, M. C; VINADER, C. C, MONLEÓN S; MARTOS, A. J; EVERSS, E; FERRER, A. A, et al. Are the effects of the antidepressants amitriptyline, maprotiline, and fluoxetine on inhibitory avoidance state-dependent? **Behavioral Brain Research**, v. 166, p. 150–8, 2006.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S dos. **BioEstat 5.0**. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 2007.

BAUER, M; HANS, J. M; SCHNEIDER, E. Duloxetine: a new selective and dual acting antidepressant. **Expert Opin. Pharmacother**, v. 7, n. 4, p. 421-427, 2006.

BONASSI, S; ABBONDANDOLO, A; CAMURRI, L; DAL PRÁ, A; DE FERRARI, M; DEGRASSI, F; FORNI, A; LAMBERTI, L; LANDO, C; PADOVANI, P; SBRANA, I; VECCHIO, D; PUNTONI, R. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of a future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 79, p. 133–135, 1995.

BONASSI, S; ZNAOR, A; NORPPA, H; HAGMAR, L. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 104, n. 1-4, p. 276-382, 2004.

BOZKURT, G; ABAY, E; ATEŞ, I; KARABOGAZ, G; TURE, M; SAVRAN, F. O; PALANDUZ, S; TEMOCIN, K; ALGUNES, C. Clastogenicity of selective serotonin-reuptake inhibitors. **Mutation Research**, v. 558, p. 1137-144, 2004.

BRAMBILLA, G; MATTIOLI, F; MARTELLI, A. Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants. **Toxicology**, v. 261, n. 3, p. 77-88, 2009.

BRAMBILLA, G; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research**, v. 60, n. 1, p. 1-17, 2009b.

BRAMBILLA, G; MATTIOLI, F; ROBBIANO, L; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity testing of pharmaceuticals: Correlations between induction of DNA lesions and carcinogenic activity. **Mutation Research**, v. 705, p. 20-39, 2010.

BRAMBILLA, G; MATTIOLI, F; MARTELLI, A. Genotoxic and carcinogenic effects of gastrointestinal drugs. **Mutagenesis**, v. 25, n. 4, p. 315-326, 2010.

BRAMBILLA, G; MATTIOLI, F; ROBBIANO, L; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihistamines. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 10, p. 1173-1187, 2011.

BRAMBILLA, G; MATTIOLI, F; ROBBIANO, L; MARTELLI, A. Studies on genotoxicity and carcinogenicity of antibacterial, antiviral, antimalarial and antifungal drugs. *Mutagenesis*, v. 27, n. 4, p. 387-413, 2012.

BRAMBILLA, G; MATTIOLI, F; ROBBIANO, L; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of bronchodilators and antiasthma drugs. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 112, p. 302-313, 2013.

BUCKLEY, P. F & WADDINGTON, J. L. Schizophrenia and Mood Disorders: The New Drug Therapies in Clinical Practice. **Butterworth-Heinemann**, Boston, 2000.

BURGAZ, S; KARAHALIL, B; BAYRAK, P; TASKIN, L; YAVUZASLAN, F; BOKESYOY, I; ANZION, R. B; BOS, R. P; PLATIN, N. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics. **Mutation Research**, v. 439, n. 1, p. 97-104, 1998.

BURGAZ, S; KARAHALIL, B; CANLI, Z. Assessment of genotoxic damage in nurses occupationally exposed to antineoplastics by the analysis of chromosomal aberrations. **Human & Experimental Toxicology**, v. 21, p. 129–135, 2002.

BYMASTER, F. P; LEE, T. C; Knadler, M. P; DETKE, M. J; IYENGAR, S. The dual transporter inhibitor duloxetine: a review of its preclinical pharmacology, pharmacokinetic profile, and clinical results in depression. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 1475-1493, 2005.

CHAMBERS, C. D; JOHNSON, K. A; DICK, L. M; FELIX, R. J; JONES, K. L. Birth outcomes in pregnant women taking fluoxetine. **N. Engl. J. Med.**, v. 335 p. 1010–1015, 1996.

CRESPO-LÓPEZ, M. E; SÁ, A. L; HERCULANO, A. M; BURBANO, R. R; MARTINS-NASCIMENTO, J. L. Methylmercury genotoxicity: A novel effect in human cell lines of the central nervous system. **Environment International**, v. 33, p. 141-146, 2007.

DAWSON, D; BURY, H. P. The significance of Howell–Jolly bodies and giant metamyelocytes in marrow smears. **Journal of Clinical Pathology**, v. 14, p. 374-380, 1961.

DSM-IV: diagnostic and statistical manual of mental disorders/American Psychiatric Association. 4.<sup>a</sup> ed. Washington: **American Psychiatric Association**, 1995.

DENNISON, A. D; WHITE, P. T; MOORE, R .B; PIERCE, W. J. Effect of reserpine upon the human electroencephalogram. **Neurology**, v. 5, n. 1, p. 56-58, 1955.

DUSTAN, H. P; TAYLOR, R. D; CORCORAN, A. C; PAGE, I. H. Clinical experience with reserpine (serpasil): a controlled study. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 59, n. 1, p. 136-140, 1954.

EARL, A. A report on the tranquilizing effect of reserpine (serpasil). **International Journal of Anesthesiology**, v. 1, n. 4, p. 214-219, 1954.

EKE, D; CELIK, A. Genotoxicity of thimerosal in cultured human lymphocytes with and without metabolic activation sister chromatid exchange analysis proliferation index and mitotic index. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 4, p. 927-934, 2008.

ELLFOLK, M; MALM, H. Risks associated with in utero and lactation exposure to selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). **Reprod. Toxicol.**, v. 30, p. 249–260, 2010.

ERMOLAEVA, MA; SCHUMACHER, B. Systemic DNA damage responses: organismal adaptations to genome instability. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 3, p. 95-102, 2014.

ESTEVEES, F. C; GALVAN, A. L. Depressão numa contextualização contemporânea. **Aletheia: revista do curso de psicologia**, n. 24, p.127-135, 2006.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81–95, 2000.

FENECH, M; CHANG, W. P; KIRSCH-VOLDERS, M; HOLLAND, N; BONASSI, S; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, n. 1-2, p. 65-75, 2003.

GONÇALES, C. A. V; MACHADO, A. L. Depressão, o mal do século: de que século? **Revista Enfermagem da UERJ**, v. 15, n. 2, p. 298-304, 2007.

GOODMAN & GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. McGrall Hill, 12ª ed. 2013.

GOTLIB, I. H; JOORMANN, J. Cognition and depression: current status and future directions. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 27, p. 285–312, 2010.

GREENBERG, P; KESSLER, R. C; BIRNBAUM, H. G; LEONG, S. A; LOWE, S. W; BERGLUND, P. A. The economic burden of depression in the United States: how did it change between 1990 and 2000? **Journal Clinical Psychiatry**, v. 64, n. 12, p. 1465-1475, 2003.

GUPTA, S.; NIHALANI, N.; MASAND, P. Duloxetine: review of its pharmacology, and therapeutic use in depression and other psychiatric disorders. **Ann. Clin. Psychiatry**, 19: 125–32, 2007.

GURBUZEL, M; ORAL, E; KIZILET, H; HALICI, Z; GULEC, M. Genotoxic evaluation of selective serotonin-reuptake inhibitors by use of the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v, 748, p. 17-20, 2012.

HAGMAR, L; BROGGER, A; HANSTEEN, I. L; HEIM, S; HOGSTEDT, B; KNUDSEN, L; LAMBERT, B; LINNAINMAA, K; MITELMAN, F; NORDENSON, I; REUTERWALL, C; SALOMAA, S; SKERFVING, S; SORSA, M. Cancer risk in humans predicted by increased

levels of chromosome aberrations in lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Research*, v. 54, p. 2919–2922, 1994.

HUNZIKER, M. E; SUEHS, B. T; BETTINGER, T. L, CRISMON, M. L. Duloxetine hydrochloride: a new dual-acting medication for the treatment of major depressive disorder. *Clinical Therapeutics*, v. 27, n. 8, p. 1126–1143, 2005.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. Guidance on Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. Geneva: 2012. Disponível em: <  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Safety/S2\\_R1/Step4/S2R1\\_Step4.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf) >. Acesso em: 28 abril 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Fisiopatologia do câncer. In: **Ações de enfermagem no controle do câncer**. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, p. 58, 2002.

KARPA, K. D; CAVANAUGH, J. E; LAKOSKI, J. M. Duloxetine Pharmacology: profile of a dual monoamine modulator. *CNS Drug Reviews*, v. 8, n. 4, p. 361–376, 2002.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 10 ed., São Paulo: Lange, 2007.

KNADLER, M. P; LOBO, E; CHAPPELL, D; BERGSTROM, R. Duloxetine: Clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 50, n. 5, p. 281-294, 2011.

KONTAS, S.; SEKEROGLU, Z. A, Investigation of cytotoxic and genotoxic effects of the antihistaminic drug, loratadine, on human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, v.18, 2014.

KOPJAR, N; KASUBA, V; ROZGAJ, R. The genotoxic risk inhealthcareworkers occupationally exposed to cytotoxic drugs – a comprehensive evaluation by the SCE assay. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 44, p. 462–479, 2009.

KUSAKAWA, S; YAMAUCHI, J; MIYAMOTO, Y; SANBE, A; TANOUE, A. Estimation of embryotoxic effect of fluoxetine using embryonic stem cell differentiation system. **Life Science**, v. 83, p. 871–877, 2008.

LANTZ, R. J; GILLESPIE, T. A; RASH, T. J; KUO, F; SKINNER, M; KUAN, H-I; KNADLER, M. P. Metabolism, Excretion, And Pharmacokinetics of duloxetine in healthy human subjects. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 9, p. 1142-1150, 2003.

LEE, T. K; O'BRIEN, K; EAVES, G. S; CHRISTIE, K. I; VARGA, L. Effect of blood storage on radiation-induced micronuclei in human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 444, n. 1, p. 201-216, 1999.

LIU, X; LEE, J; JI, K; TAKEDA, S; CHOI, K. Potentials and mechanisms of genotoxicity of six pharmaceuticals frequently detected in freshwater environment. **Toxicology Letters**, v. 211, p. 70-76, 2012.

LOEB, L. A; HARRIS, C. C. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. **American Association for Cancer Research**, v. 68, p. 6863-6872, 2008.

LUZHNA, L; KATHIRIA, P; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers in Genetic**, v. 34, n. 131, p. 1-17, 2013.

MALUF, S. W; RIEGEL, M. **Citogenética humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515-1531, 2006.

MCDIARMID, M; OLIVER, M. S; ROTH, T. S. Chromosome 5 and 7 abnormalities in oncology personnel handling anticancer drugs. **JOEM**, v. 52, p. 1028–1034, 2010.

MOORHEAD, P. S; NOWELL, P. C; MELLMAN, W. J; BATTIPS, D. M; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, v. 20, p. 613-616, 1960.

MOREIRA, L. M . A; ARAÚJO, L. M. P; CORDEIRO, A. P. B; GUSMÃO, F. A. F. Teste de linfócitos humanos no reconhecimento do efeito clastogênico e citotóxico da 5-fluorouracil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 3, n. 1, p. 5-12, 2004.

MULLER, L; KIKUSHI, Y; PROBST, G; SCHECHTMAN, L; SHIMADA, H; SOFUNI, T; TWEATS, D. ICH-harmonized guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals; evolution, reasoning and impact. **Mutation Research**, v. 436, p. 195-225, 1999.

MUSAK, L; VODICKA, P; KLIMENTOVÁ, G. Chromosomal damage and polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 in workers exposed to cytostatics. **Neuroendocrinology Letter**, v. 27 (Suppl. 2), p. 57–60, 2006.

NESTLER, E. J; BARROT, M; DILEONE, R. J; EISCH, A. J; GOLD, S. J; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NORDIC STUDY GROUP ON THE HEALTH RISK OF CHROMOSOME DAMAGE, A Nordic data base on somatic chromosome damage in humans. **Mutation Research**, v. 241, p. 325–337, 1990.

NORDIC STUDY GROUP ON THE HEALTH RISK OF CHROMOSOME DAMAGE, A Nordic prospective study on the relationship between peripheral lymphocyte chromosome damage and cancer morbidity in occupational groups, in: MENDELSON, M.L., ALBERTINI, R.J.(Eds.), *Mutation and the Environment. Part C: Somatic and Heritable Mutation, Adduction, and Epidemiology*, Wiley–Liss, New York. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 340C, p. 357–366, 1990.

NORDIC STUDY GROUP ON THE HEALTH RISK OF CHROMOSOME DAMAGE, An inter-Nordic prospective study on cytogenetic endpoints and cancer risk, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, v. 45, p. 85–92, 1990.

NORPPA, H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. **Toxicology Letters**, v. 149, p. 309-334, 2004.

NORPPA, H; BONASSI, S; HANSTEEN, I. L; HAGMAR, L; STROMBERG, U; ROSSNER, P; BOFFETTA, P; LINDHOLM, C; GUNDY, S; LAZUTKA, J; CEBULSKA-WASILEWSKA, A; FABIÁNOVÁ, E; SRÁM, R. J; KNUDSEN, L. E; BARALE, R; FUCIC, A. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. **Mutation Research**, v. 600, n. 1-2, p. 37-45, 2006.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. PROPOSAL FOR UPDATING TEST GUIDELINE 473 (*In Vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test). 29 October, 2012.

OWENS, M. J; MORGAN, W. N; PLOTT, S. J; NEMEROFF, C. B. Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 283, p. 1305-1322, 1997.

PATEL, D. S; DESHPANDE, S. S; PATEL, C. G; SINGH, S. Duloxetine: A dual action antidepressant. **Indo-Global Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 63-76, 2011.

PEREIRA, P.; GIANESINI, J.; BARBOSA, C. S.; CASSOL, G. F.; BOROWSKI, R. G. V.; KAHL, V. F. S.; CAPPELARI, S. E.; PICADA, J. N. Neurobehavioral and genotoxic parameters of duloxetine in mice using the inhibitory avoidance task and comet assay as experimental models. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 57-61, 2009.

PURVES, D; HARVEY, C; TWEATS, D; LUMLEY, CE. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesis**, v. 10, n. 4, p. 297 – 312, 1995.

RODRIGUEZ-ROCHA, H; GARCIA-GARCIA, A; PANAYIOTIDIS, M. I; FRANCO, R. DNA damage and autophagy. **Mutation Research**, v. 711, p. 158-166, 2011.

RUDORFER, M. V; HENRY, M. E; SACKEIN, H. A. Eletroconvulsive therapy. **In, Psychiatry**, v. 1. (TASMAN, A., KAY, J., LIEBERMAN, J. A) Saunders, Philadelphia, p. 1535-1551, 1997.

RUIZ, S. J; RODRÍGUEZ, J. M. M. Tratamiento farmacológico de la depresión. **Rev. Clin. Esp.**, v. 205, n. 5, p. 233-240, 2005.

SCHAIK, N. V.; GRAF, U. Structure-activity relationships of tricyclic antidepressants and related compounds in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 286, p.155-163, 1993.

SILVA, J; ERDTMANN, B; PÊGAS-HENRIQUES, J. A. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SLOOT, W. N; BOWDEN, H. C; YIH, T. D. In vitro and in vivo reproduction toxicology of 12 monoaminergic reuptake inhibitors: possible mechanisms of infrequent cardiovascular anomalies, *Reprod. Toxicol.*, v. 28, p. 270–282, 2009.

SNYDER, R. D; EWING, D; HENDRY, L. B. DNA intercalative potential of marketed drugs testing positive in vitro cytogenetics assays. **Mutation Research**, v. 609, p. 47–59, 2006.

SNYDER, R. D; GREEN, J. W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 488, p. 151-169, 2001.

SOUZA, F. G. M. Tratamento da depressão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 2, p. 18-23, 1999.

STAHL, S. M. Psicofarmacologia: Bases neurocientíficas e aplicações clínicas. Rio de Janeiro (RJ): Medsi; 1998.

STAHL, S. M; GRADY, M. M; MORET, C; BRILEY, M. SNRIs: their pharmacology, clinical efficacy, and tolerability in comparison with other classes of antidepressants. **CNS Spectrums** , v. 10, n. 9, p. 732-747, 2005.

STOIBER, T.; BONACKER, D.; BOHM, K. J.; BOLT, H. M.; THEIR, R.; DEGEN, G.; UNGER, E. Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury(II). **Mutation Research**, v. 563, n. 2, p. 97-106, 2004.

SUSPIRO, A; PRISTA, J. Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: a minireview. **Toxicology Letters**, v. 207, p. 42-52, 2011.

SWAPAN, S; PRANAB, D. Micronucleus and Its applications. **Diagnostic Cytopathology**, v. 40, n. 1, p. 84-90, 2010.

TESTA, A; GIACHELIA, M; PALMA, S. Occupational exposure to antineoplastic agents induces a high level of chromosome damage. Lack of effect of GST polymorphisms. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 223, p. 46–55, 2007.

THOMAS, P; UMEGAKI, K; FENECH, M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 2, p. 187-194.

TOMPA, A; JAKAB, M; BIRÓ, A. Chemical safety and health conditions among Hungarian hospital nurses. *Ann. N.Y. Academy of Science*, v. 1076, p. 635–648, 2006.

TRAN, P. V, BYMASTER, F. P; MCNAMARA, R. K; POTTER, W. Z. Dual monoamine modulation for improved treatment of major depressive disorder. **J. Clin. Psychopharmacology**, v. 23, p. 78-86, 2003.

U.S. Department of Health and Human Services, 1987. **Registry of Toxic Effects of Chemical Substances**, 1985–1986 ed., U.S. Government Printing Office, Washington.

WINSOR, T. Human pharmacology of reserpine. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 59, n. 1, p. 61-81, 1954.

WNUK, M; LEWINSKA, A; OKLEJEWICZ, B; BUGNO, M; SLOTA, E; BARTOSZ, G. Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariense*) in human lymphocytes in vitro. **Mutation Research**, v. 679, p. 18-23, 2009.

XIA, Z; LUNDGREN, B; BERGSTRAND, A; DePIERRE, J. W; NASSBERGER, L. Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-XL, **Biochem. Pharmacol.**, v. 57, p. 1199–1208, 1999.