



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do potencial mutagênico e recombinogênico do cloridrato de  
bupropiona e do cloridrato de trazodona em células somáticas de  
*Drosophila melanogaster***

**Aluna:** Maria Paula Carvalho Naves

**Orientador:** Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

UBERLÂNDIA – MG  
2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Avaliação do potencial mutagênico e recombinogênico do cloridrato de  
bupropiona e do cloridrato de trazodona em células somáticas de  
*Drosophila melanogaster***

**Aluna:** Maria Paula Carvalho Naves

**Orientador:** Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Uberlândia  
como parte dos requisitos para  
obtenção do Título de Mestre em  
Genética e Bioquímica (Área:  
Genética)**

**UBERLÂNDIA – MG  
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

N323a Naves, Maria Paula Carvalho, 1994  
2017 Avaliação do potencial mutagênico e recombinogênico do cloridrato de bupropiona e do cloridrato de trazodona em células somáticas de *Drosophila melanogaster* / Maria Paula Carvalho Naves. - 2017.  
48 f. : il.

Orientador: Alexandre Azenha Alves de Rezende.  
Coorientador: Mário Antônio Spanó.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.162>  
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Antidepressivos - Teses. 3. Toxicidade - Teses. 4. *Drosophila melanogaster* - Teses. I. Rezende, Alexandre Azenha Alves de. II. Spanó, Mário Antônio. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do potencial mutagênico e recombinogênico do cloridrato de  
bupropiona e do cloridrato de trazodona em células somáticas de  
*Drosophila melanogaster***

**ALUNA: Maria Paula Carvalho Naves**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente: Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende (Orientador)**

**Examinadores: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Dihi – ULBRA**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maíra Pompeu Martins – UFU**

**Data da Defesa: 31/07/2017**

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

---

Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

**“O impossível reside nas mãos inertes  
daqueles que não tentam.”**

**Epicuro de Samos**

## **Agradecimentos**

A Deus, por cuidar de mim, guiar meus passos, me proteger e sempre me fazer mais forte.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende, por todo seu apoio e amizade. Sempre muito sábio e cheio de ensinamentos, me inspiro muito em você, um exemplo a ser seguido. Tenho orgulho em ser sua orientanda!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Mario Antônio Spanó, por me receber em seu laboratório, pelas conversas, ensinamentos e por sua amizade. Te admiro muito, pessoalmente e profissionalmente, você é uma pessoa incrível!

À banca examinadora, por aceitar o convite para fazer parte da avaliação deste trabalho, pelas sugestões e opiniões dadas a essa dissertação.

Ao meu colega de laboratório Cássio Resende pelos ensinamentos e auxílio na realização dos experimentos.

A todos os técnicos e professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, que contribuíram para meu crescimento profissional e para a realização dessa dissertação.

À minha mãe, Shirley Aparecida de Carvalho, por ser minha melhor amiga, por estar sempre ao meu lado, me incentivando, me apoiando, me cobrando e me falando que tudo dará certo. Ao meu pai, Ismael Naves (em memória), por estar sempre olhando por mim e cuidando de mim, saudades!

Aos meus avós, Salomão Carvalho de Melo e Orauci Pereira de Carvalho, pelo amor, carinho, e apoio. Estarei sempre tentando honrar o orgulho que vocês sentem por mim.

À minha Dindinha, Célia Abadia de Carvalho, por me ajudar em tudo, me dar suporte, carinho e amor. Obrigada pelas intermináveis conversas, e por ter o maior coração de todos!

Ao meu namorado, Jean Gouveia Andrade, pelo companheirismo, força e amor, por aguentar meu choro e minhas chatices, por me apoiar e me defender!

À toda minha família e amigos, por me ajudar, me dar apoio e suporte para que meus sonhos pudessem ser realizados e por me mostrar que a família é o bem mais precioso que temos.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de Mestrado.

A todos, o meu muito obrigada!

## **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG), com apoio financeiro das seguintes Agências de Fomento e Instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).



## Lista de Abreviações

<b>ANES</b>	Antidepressivo Noradrenérgico e Específico Serotoninérgico
<b>ATeC</b>	Antidepressivos Tetracíclicos
<b>ATC</b>	Antidepressivos Tricíclicos
<b>BBW</b>	Black Box Warning
<b>BOD</b>	Biologic Oxygen Demand
<b>CB</b>	Cloridrato de Bupropiona
<b>CN</b>	Controle Negativo
<b>CP</b>	Controle Positivo
<b>Cruzamento HB</b>	Cruzamento de Alta Bioativação - High Bioactivation
<b>Cruzamento ST</b>	Cruzamento Padrão - Standart
<b>CT</b>	Cloridrato de Trazodona
<b>Descendentes BH</b>	Descendentes Heterozigotos Balanceados
<b>Descendentes MH</b>	Descendentes Trans-Heterozigotos Marcados
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ERO</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FM</b>	Frequência de Mutação
<b>FR</b>	Frequência de Recombinação
<b>FT</b>	Frequência Total de Manchas
<b>HA</b>	Hipótese Alternativa
<b>HERG</b>	Human Ether-a-go-go-Related Gene
<b>H0</b>	Hipótese Nula
<b>IMAO</b>	Inibidores de Monoaminoxidase
<b>ISRD</b>	Inibidor Seletivo da Recaptação de Dopamina
<b>ISRN</b>	Inibidor Seletivo da Recaptação de Noradrenalina
<b>ISRS</b>	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina
<b>ISRSN</b>	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina
<b><i>m</i>-CPP</b>	1-(3'-chlorofenil)piperazina
<b>SMART</b>	Somatic Mutation and Recombination Test
<b>WHO</b>	World Health Organization

<b>Lista de Figuras</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Fórmula estrutural do (A) Cloridrato de Bupropiona, e (B) Cloridrato de Trazodona.....	<b>02</b>
<b>Figura 2.</b> <i>Drosophila melanogaster</i> macho e fêmea.....	<b>03</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo do ciclo de vida e do dimorfismo sexual de <i>D. melanogaster</i> .....	<b>04</b>
<b>Figura 4.</b> Esquema representando o Cruzamento Padrão (ST) e Cruzamento de Alta Bioativação (HB), e as progênies geradas.....	<b>07</b>
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografias de asas de <i>D. melanogaster</i> obtidas em microscópio óptico de luz. (A) Pêlos normais; (B) Mancha simples pequena, tipo “mwh”; (C) Mancha simples pequena, tipo “flare”; (D) Mancha gêmea, com pêlos “mwh” e “flare”.....	<b>08</b>
<b>Figura 6.</b> Esquema do tratamento de larvas de <i>D. melanogaster</i> .....	<b>11</b>
<b>Figura 7.</b> Frequência de Sobrevivência dos indivíduos dos cruzamentos ST e HB, tratados com diferentes concentrações de (A) Cloridrato de Bupropiona e (B) Cloridrato de Trazodona.....	<b>14</b>
<b>Figura 8.</b> Contribuição de mutação e recombinação (%) para a frequência total de manchas observadas nos indivíduos MH do (A) cruzamento ST e (B) cruzamento HB, tratados com Cloridrato de Bupropiona.....	<b>20</b>
<b>Figura 9.</b> Contribuição de mutação e recombinação (%) para a frequência total de manchas observadas (A) nos indivíduos MH do cruzamento ST e (B) cruzamento HB, tratados com Cloridrato de Trazodona.....	<b>21</b>
<b>Figura 10.</b> Relação entre a Taxa de Sobrevivência, Recombinação e Total de Manchas observado (A) no cruzamento ST e (B) cruzamento HB, tratados com Cloridrato de Bupropiona.....	<b>25</b>
<b>Figura 11.</b> Relação entre a Taxa de Sobrevivência, Recombinação e Total de Manchas observado (A) no cruzamento ST e (B) cruzamento HB, tratados com Cloridrato de Trazodona.....	<b>26</b>

<b>Tabela 1.</b> Resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células da asa de <i>Drosophila melanogaster</i> , com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento padrão (ST), tratados com Água ultra pura e Uretano (controles negativo e positivo, respectivamente) e diferentes concentrações do Cloridrato de Bupropiona.....	<b>15</b>
<b>Tabela 2.</b> Resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células da asa de <i>Drosophila melanogaster</i> , com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com Água ultra pura e Uretano (controles negativo e positivo, respectivamente) e diferentes concentrações do Cloridrato de Bupropion.....	<b>16</b>
<b>Tabela 3.</b> Resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células da asa de <i>Drosophila melanogaster</i> , com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento padrão (ST), tratados com Água ultra pura e Uretano (controles negativo e positivo, respectivamente) e diferentes concentrações do Cloridrato de Trazodona.....	<b>18</b>
<b>Tabela 4.</b> Resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células da asa de <i>Drosophila melanogaster</i> , com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com Água ultra pura e Uretano (controles negativo e positivo, respectivamente) e diferentes concentrações do Cloridrato de Trazodona.....	<b>19</b>

## RESUMO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 7% da população brasileira é afetada por distúrbios psíquicos relacionados à depressão. Estima-se que até 2020, a depressão será a segunda doença mais prevalente no mundo. Diante desse contexto, o uso de antidepressivos tem aumentado exponencialmente. Com o objetivo de avaliar o potencial mutagênico e recombinogênico dos antidepressivos Cloridrato de Bupropiona (CB) e Cloridrato de Trazodona (CT), o Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) em células de asa de *Drosophila melanogaster* foi utilizado. Dois cruzamentos foram realizados: cruzamento padrão (ST) e o cruzamento de alta bioativação (HB). Larvas de terceiro estágio ( $72 \pm 4$ h), obtidas de ambos os cruzamentos, foram tratadas com diferentes concentrações 0,9375; 1,875; 3,75; 7,5 ou 15 mg/mL. Água ultrapura e Uretano (10 mM) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. A maior concentração de CB e CT (15 mg/mL) foi tóxica. A partir da análise dos descendentes trans-heterozigotos (MH), somente a menor concentração (0,9375 mg/mL) do CB, no cruzamento ST, não aumentou significativamente a frequência de manchas mutantes. A análise dos descendentes heterozigotos balanceados (BH) indicou que os eventos genotóxicos induzidos por CB no cruzamento ST são, majoritariamente, de origem recombinogênica. Por outro lado, ao ser metabolizado pelo complexo enzimático CYP450, passam a ser essencialmente mutagênicos. Todas as concentrações avaliadas do CT aumentaram significativamente a frequência de manchas mutantes, independente do cruzamento. Após a análise dos indivíduos BH, as três concentrações iniciais (0,9375; 1,875 e 3,75 mg/mL) foram recombinogênicas, tanto no cruzamento ST como no HB. Já na maior concentração (7,5 mg/mL) os eventos genotóxicos foram essencialmente mutagênicos. Visto a falta de dados na literatura e o aumento da utilização de antidepressivos pela população mundial, são necessários mais estudos para elucidação dos mecanismos de ação relacionados aos danos ao material genético, causados pelo Cloridrato de Bupropiona e pelo Cloridrato de Trazodona.

**Palavras-chave:** Antidepressivos; Toxicidade; SMART; Somatic Mutation and Recombination Test.

## ABSTRACT

According to the World Health Organization, around 7% of the Brazilian population is affected by psychic disorders related to depression. It is estimated that until 2020, depression will be the second most prevalent disease in the world. In light of this context, the use of antidepressants has increased exponentially. In order to evaluate the mutagenic and recombinogenic potential of the antidepressants: Bupropion Hydrochloride (BH) and Trazodone Hydrochloride (TH), the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in wing cells of *Drosophila melanogaster* was used. Two crossings were realized: standard (ST) and high bioactivation (HB) cross. Third instar larvae (72 + 4h), obtained from both crosses, were treated with different concentrations 0.9375; 1.875; 3.75; 7.5 or 15 mg/mL. Ultrapure water and Urethane (10 mM) were used as negative and positive controls respectively. The highest concentration of BH and TH (15 mg/mL) was toxic. From the analysis of the trans-heterozygous descendants (MH), only the lowest concentration (0.9375 mg/mL) of the BH at the ST crossing did not increase the frequency of mutant spots significantly. The analysis of balancer heterozygous (BH) descendants indicated that genotoxic events induced by BH at ST crossing are mostly of recombinogenic origin. On the other hand, when they are metabolized by the enzyme complex of CYP450, they turn to be essentially mutagenic. All concentrations of TH increased the frequency of mutant spots significantly, regardless of crossover. After the analysis of the BH individuals, the three initial concentrations (0.9375, 1.875 and 3.75 mg/mL) were recombinogenic, both at ST and HB crossing. At the highest concentration (7.5 mg/mL) the genotoxic events were essentially mutagenic. Since the lack of data in the literature and the increased use of antidepressants by the world population, it is necessary further studies to elucidate the action mechanisms related to damage to genetic material caused by Bupropion Hydrochloride and Trazodone Hydrochloride.

**Keywords:** Antidepressants; Toxicity; SMART; Somatic Mutation and Recombination Test.

## Sumário

	Página
1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	09
3. Material e Métodos.....	10
3.1 Compostos Químicos e Meio de Cultura.....	10
3.2 Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	10
3.2.1 Linhagens de <i>Drosophila</i> .....	10
3.2.2 Cruzamentos e Tratamentos.....	10
3.2.3 Preparação e Análise das Lâminas.....	12
3.2.4 Análise Estatística.....	12
4. Resultados.....	14
5. Discussão.....	22
6. Conclusão.....	28
7. Referências.....	29

## 1. INTRODUÇÃO

A depressão é um transtorno de humor crônico e recorrente, que ocasiona forte impacto na qualidade de vida do paciente e de seus familiares. Considerando o aumento no número de casos e suas consequências sociais, constitui sério problema de saúde pública (Aguiar et al., 2011). Cerca de 4,4 % da população mundial é atualmente acometida por essa doença, sendo a maioria mulheres e idosos (WHO, 2017).

A descoberta de drogas antidepressivas no final da década de 1950, trouxe importantes avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos nos transtornos depressivos, assim como possibilidades de tratamento farmacológico (Moreno et al., 1999; Ribeiro et al., 2014).

De acordo com Then et al. (2017) e Wu et al. (2012), os antidepressivos podem ser classificados como:

1) Antidepressivo tricíclico (ATC), que age à nível pré-sináptico, bloqueando a recaptura de monoaminas (norepinefrina e serotonina);

2) Inibidor de monoamina oxidase (IMAO), atua inibindo a degradação da serotonina, noradrenalina e dopamina pela enzima monoamina oxidase;

3) Inibidor seletivo da recaptção de serotonina (ISRS), causa o aumento da disponibilidade de serotonina;

4) Inibidor seletivo da recaptção de norepinefrina (ISRN), é uma nova classe de antidepressivos, que aumenta a disponibilidade da norepinefrina;

5) Inibidor seletivo da recaptção de dopamina (ISRD), aumenta a disponibilidade de dopamina e noradrenalina no organismo;

6) Inibidor seletivo da recaptção de serotonina e de norepinefrina (ISRSN), similar aos tricíclicos, mas sem os efeitos colaterais anticolinérgicos;

7) Antidepressivo tetracíclico (ATeC), também chamado de antidepressivo noradrenérgico e específico serotoninérgico (ANES), pode atuar em um grande número de receptores, como antagonista ou agonista inverso dos receptores: serotoninérgicos, alfa adrenérgicos, dopaminérgicos, histaminérgicos e muscarínicos.

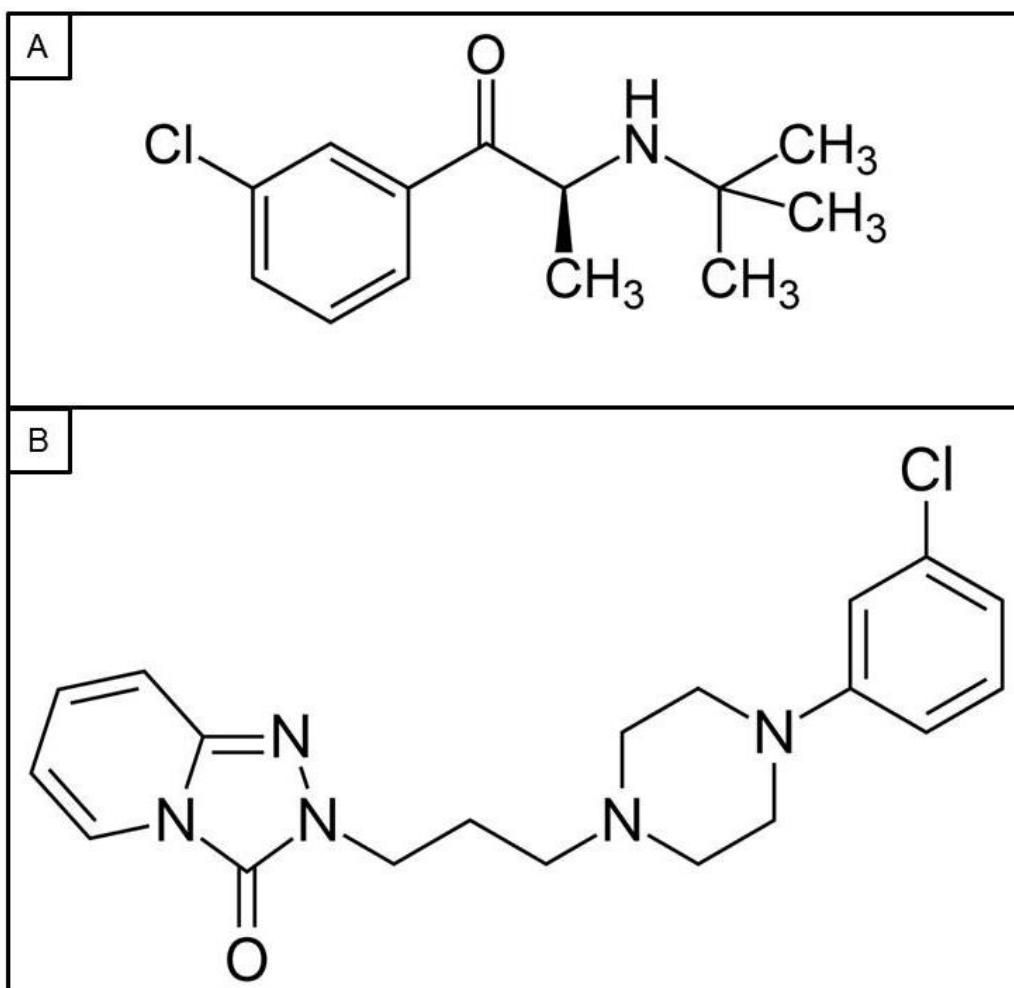
Dentre os antidepressivos da classe dos ISRSN, destaca-se o Cloridrato de Bupropiona (CB) (Fig. 1A), utilizado no tratamento da depressão e no auxílio para

cessação do tabagismo (Bhattacharya et al., 2013). Seu mecanismo de ação ainda não é completamente elucidado, mas sabe-se que ele é um antagonista nicotínico, que causa diminuição dos sintomas de abstinência relacionados à cessação do tabagismo. É metabolizado pelo fígado e devido a sua alta tolerabilidade, por não interagir com receptores histamínicos e colinérgicos, possui efeitos colaterais leves, como insônia, náuseas, vômitos e tonturas (Jefferson et al., 2005).

CB geralmente causa menos efeitos maléficos do que os antidepressivos ISRS, como menor disfunção sexual, devido ao aumento da libido; o tratamento à longo prazo pode gerar diminuição de peso corporal ao invés de ganho de peso, devido à diminuição do apetite e menor desprendimento emocional quando comparado aos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina, visto que esses antidepressivos podem causar desapego, fadiga e até apatia (Demyttenaere e Jaspers, 2008; Vanderkooy et al., 2002).

Além disso, o CB tem mostrado efeitos cardiotoxicos durante o desenvolvimento fetal, por essa razão, seu uso é contraindicado durante a gravidez (Qureshi et al., 2014). Em 2009, a FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos soltou um alerta de perigo (Black Box Warning - BBW) relacionado ao uso do Cloridrato de Bupropiona. Mas um estudo realizado para mensurar o uso desse antidepressivo de 2007 à 2014, mostrou que o seu uso não sofreu declínio, mesmo depois do alerta sobre o risco de sua utilização (Shah et al., 2017).





**Figura 1.** Fórmula estrutural do (A) Cloridrato de Bupropiona, e (B) Cloridrato de Trazodona (Fonte: [www.farmakologiportalen.no](http://www.farmakologiportalen.no); Wen et al., 2008).

Outro antidepressivo muito utilizado é o Cloridrato de Trazodona (CT) (Fig. 1B), pertencente à classe dos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS). Também é metabolizado pelo fígado, e ao longo do tempo ocorre a dessensibilização e diminuição no número de receptores beta-adrenérgicos e 5-HT<sub>2A</sub>. Apresenta atividade antagonista de receptores alfa-1-adrenérgicos e anti-histamínicos, por isso possui baixa frequência de reações adversas no organismo (Karhu et al., 2011).

É eficaz no tratamento contra insônia, e pode também melhorar a apneia do sono (Kaynak et al., 2004; Smales et al., 2015). Seu uso é contraindicado para pessoas com problemas cardíacos, visto que esse antidepressivo leva ao bloqueio

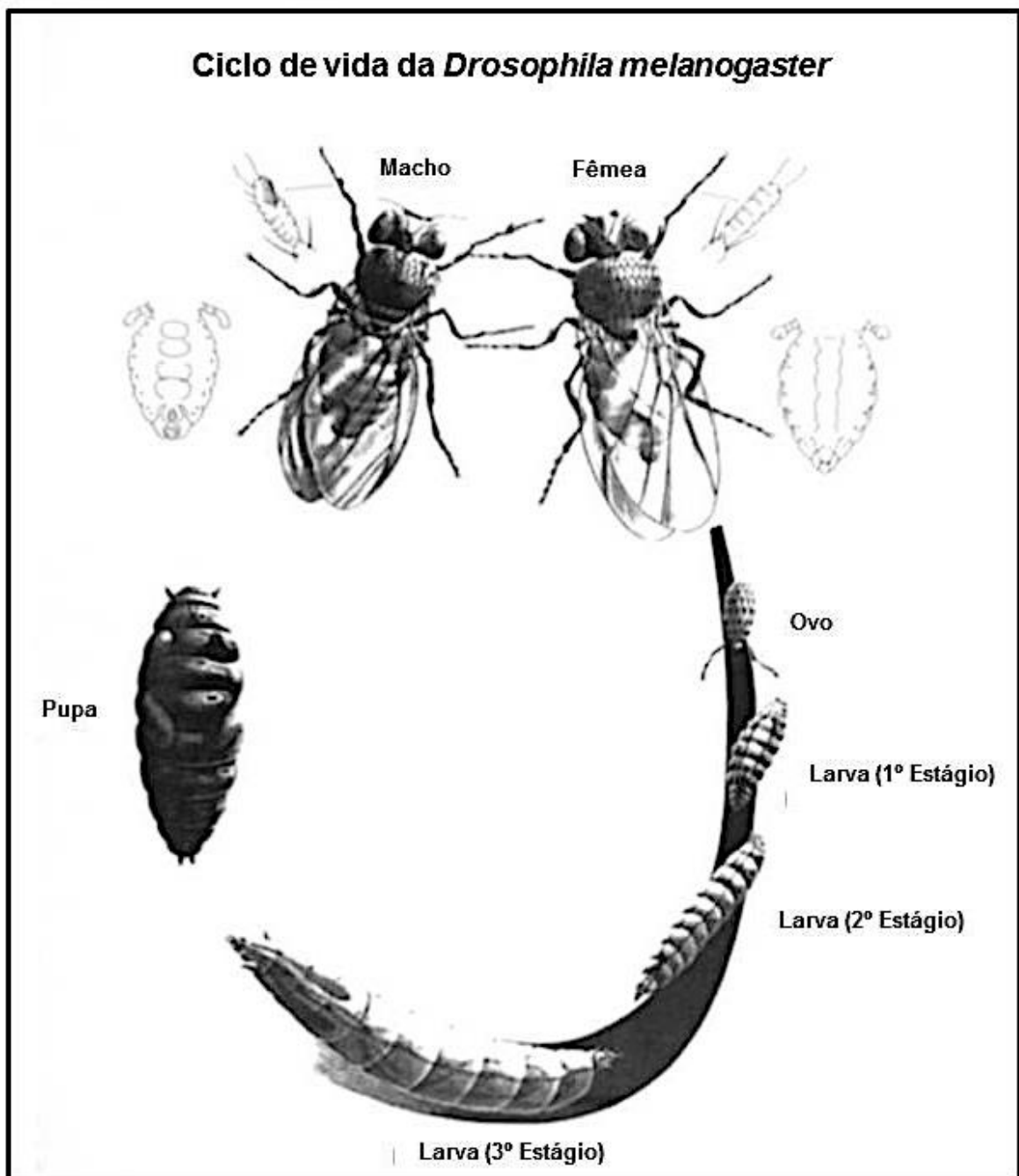
dos canais HERG cardíacos, e em dosagens elevadas pode gerar arritmias cardíacas e taquicardia ventricular (Zitron et al., 2004).

Nos últimos anos, é possível evidenciar um esforço mundial para reduzir a utilização de mamíferos nas pesquisas toxicológicas e genéticas, principalmente no que se diz respeito ao desenvolvimento de modelos alternativos *in vivo* (Siddique et al., 2005). A *Drosophila melanogaster* é um inseto utilizado como modelo experimental na genética e na biologia do desenvolvimento há cerca de um século (Roberts, 2006). Destaca-se no meio científico para avaliação da toxicidade e mutagenicidade de diferentes xenobióticos (Demir et al., 2011; Demir et al., 2013; Graf et al., 1996; Morais et al., 2016; Oliveira et al., 2017; Parvathi e Rajagopal, 2014; Reis et al., 2015).



**Figura 2.** *Drosophila melanogaster* macho e fêmea (Fonte: [gompel.org/drosophilidae](http://gompel.org/drosophilidae)).

*D. melanogaster* é um inseto da Ordem Diptera, possui aproximadamente 2 mm de comprimento (Fig. 2), holometábolo (Fig. 3) e com ciclo de vida curto, dentre 10 e 12 dias. Durante a fase de pupa, ocorre a metamorfose, onde as células dos discos imaginais vão se proliferar para formar as estruturas do indivíduo adulto. Nos adultos é possível observar o dimorfismo sexual (Fig. 2) (Amoretty et al., 2013; Gomes, 2001).



**Figura 3.** Esquema representativo do ciclo de vida e do dimorfismo sexual de *D. melanogaster* (Fonte: Dr. Ulrich Graf – *Institute of Toxicology* ETH - Zurich – Suíça).

As vantagens inerentes ao trabalho com esse organismo são: tempo de geração curto, fácil manutenção das linhagens, poucas exigências nutricionais, baixo custo, prole numerosa, susceptibilidade para manipulação genética, facilidade de detectar alterações fenotípicas e principalmente, homologia e

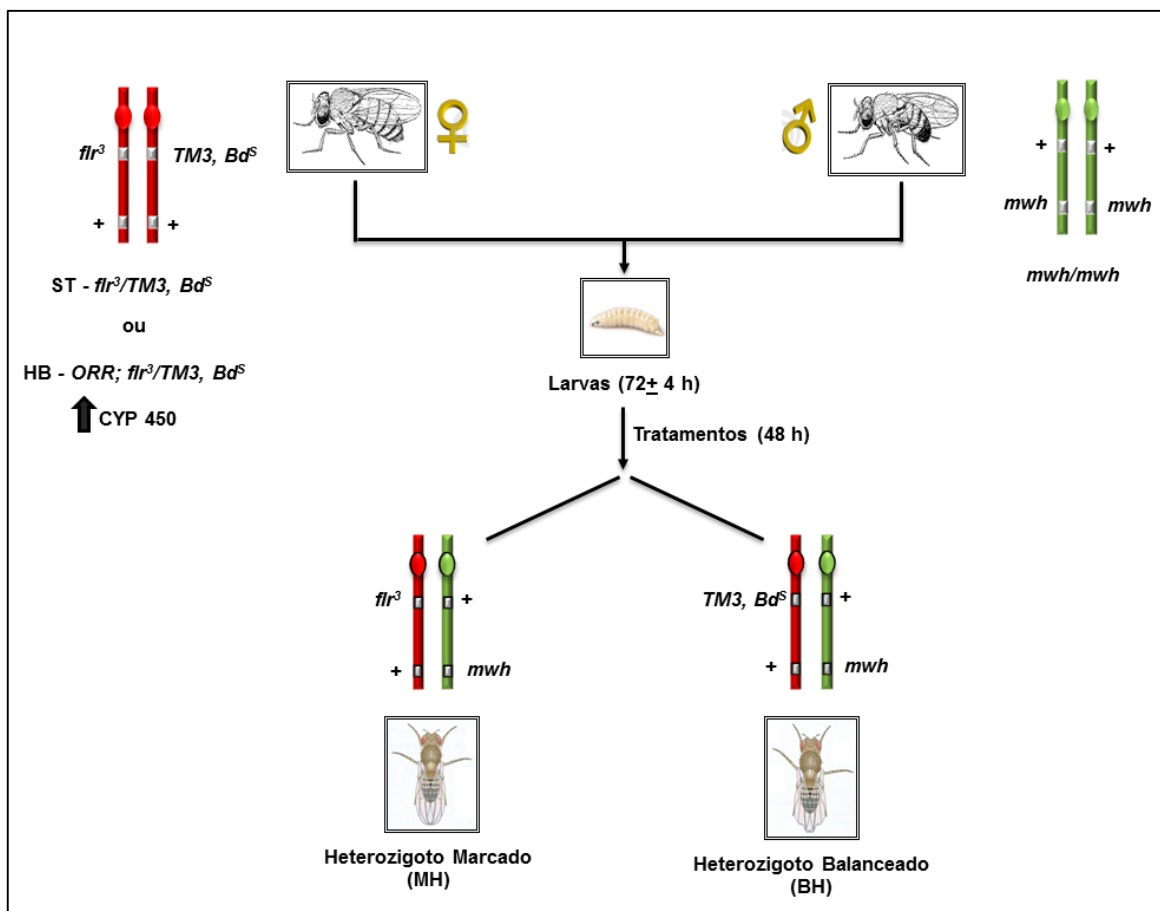
conservação do genoma com organismos superiores (Demir et al., 2011; Demir et al., 2013; Graf et al., 1996; Machado et al., 2016; Parvathi e Rajagopal, 2014; Vasconcelos et al., 2017).

Dentre os testes realizados com *D. melanogaster* como organismo modelo, destaca-se o Teste de Mutação e Recombinação Somática (*Somatic Mutation and Recombination Test* - SMART), considerado um dos testes “padrão ouro” em relação à avaliação de mutagenicidade (Parvathi e Rajagopal, 2014).

Este teste foi desenvolvido por Graf et al. (1984) e aprimorado por Graf e van Schaik (1992). Desde então, tem sido empregado na avaliação mutagênica e recombinogênica de diferentes substâncias químicas e compostos isolados (De Andrade et al., 2014; Morais et al., 2016; Reis et al., 2015; Reis et al., 2016). Fundamenta-se na detecção da perda da heterozigose em genes marcadores, que alteram o fenótipo dos pelos existentes na asa da mosca (Graf et al., 1996).

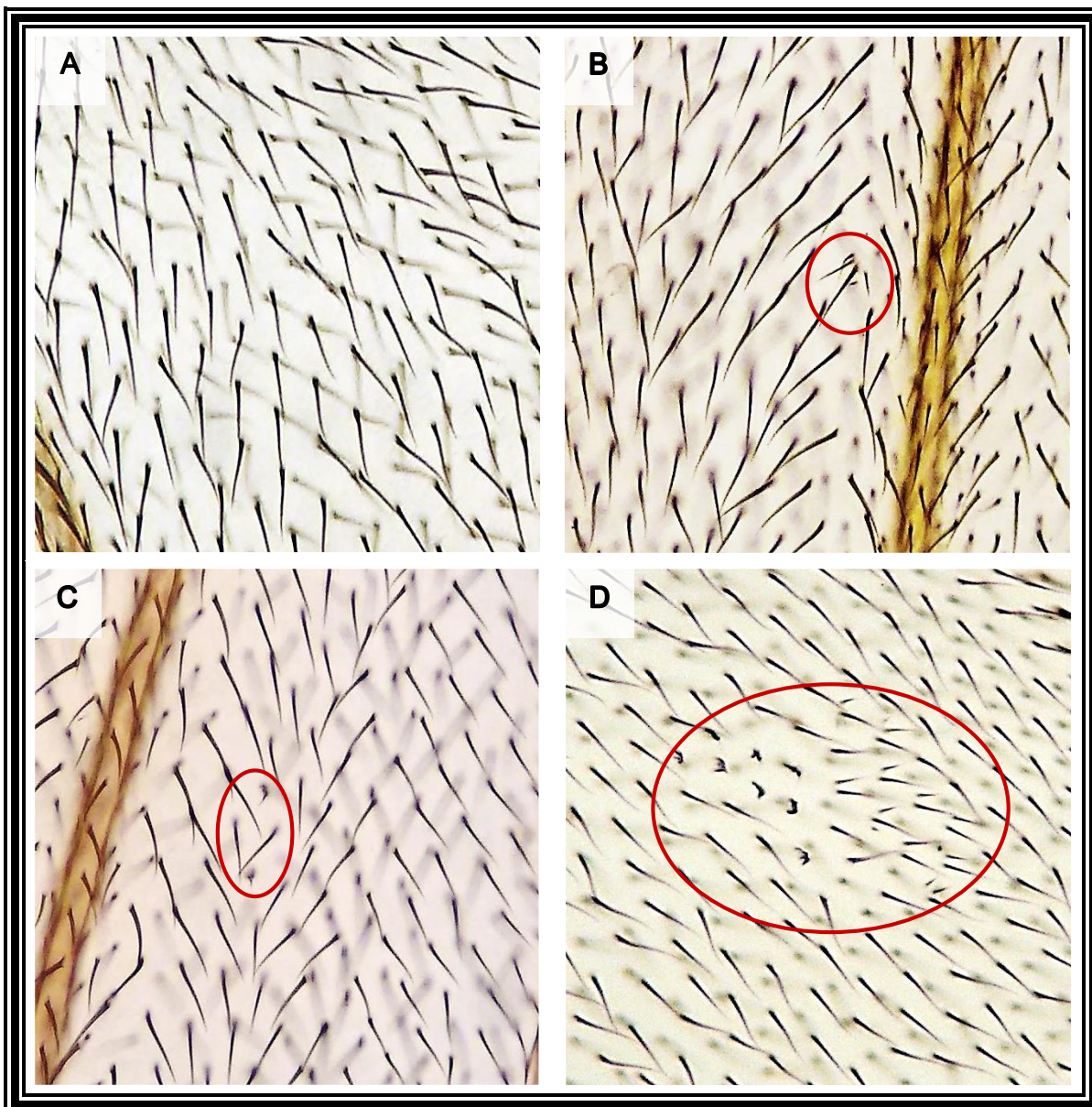
Dois cruzamentos são realizados: Cruzamento padrão (ST – *standard cross*), entre machos “mwh” e fêmeas virgens “flr<sup>3</sup>”, útil na detecção de agentes genotóxicos diretos, e cruzamento de alta bioativação (HB – *high bioactivation cross*) entre machos “mwh” e fêmeas virgens “ORR; flr<sup>3</sup>”, conhecido por sua progênie apresentar elevados níveis de enzimas do complexo citocromo P450 (CYP6A2), útil na detecção de agentes genotóxicos indiretos ou promutágenos, que necessitam de ativação metabólica para induzir efeitos genotóxicos (Graf et al., 1984; Graf e van Shaik, 1992; Spanó e Graf, 1998).

Ambos os cruzamentos produzem dois tipos de progênie: Trans-heterozigotos marcados (*mwh + / + flr<sup>3</sup>*) (MH), que é distinguido pela borda lisa da asa; e Heterozigotos balanceados (*mwh + / TM3, Bd<sup>S</sup>*) (BH), com borda da asa serrilhada (Fig. 4). Através de tratamentos com compostos mutagênicos a perda de heterozigose nos discos imaginiais é induzida, levando à formação de clones de células mutantes, os quais se expressam ao final da diferenciação celular, em uma mancha mutante na asa (Spanó e Graf, 1998).



**Figura 4.** Esquema representando o Cruzamento Padrão (ST) e Cruzamento de Alta Bioativação (HB), e as progênies geradas (Fonte: Imagem cedida pelo Laboratório de Mutagênese, UFU).

Nos indivíduos adultos MH, as manchas mutantes podem aparecer como manchas simples, apresentando o fenótipo “mwh” ou “flare”, ou como manchas gêmeas, mostrando áreas adjacentes “mwh” e “flare”. Manchas simples são consideradas aquelas que expressam apenas um dos genes mutantes, *flr<sup>3</sup>* ou *mwh* e podem ser classificadas como simples pequenas (manchas com uma ou duas células) (Fig. 5B e 5C) ou simples grandes (manchas com mais de duas células). O aparecimento desses pêlos está relacionado à mutação, aberração cromossômica (deleção), não-disjunção mitótica bem como a eventos recombinacionais (o qual apresenta apenas manchas simples do tipo “mwh”). O aparecimento de manchas gêmeas (Fig. 5D) ocorre exclusivamente por recombinação (Graf et al., 1984).



**Figura 5.** Fotomicrografias (aumento de 400X) de asas de *D. melanogaster* obtidas por microscópio óptico de luz. (A) Pêlos normais; (B) Mancha simples pequena, tipo “mwh”; (C) Mancha simples pequena, tipo “flare”; (D) Mancha gêmea, com pêlos “mwh” e “flare” (Fonte: arquivo pessoal).

Embora haja ampla utilização desses medicamentos, não há uma explicação clara sobre seu potencial genotóxico. Estudos anteriores demonstram que os testes de genotoxicidade desses ingredientes ativos são limitados (Yilmaz et al., 2016). Por estas razões, o presente estudo foi realizado para avaliar o potencial genotóxico do cloridrato de trazodona e do cloridrato de bupropiona.

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar o potencial mutagênico e recombinogênico do Cloridrato de Buprobiona e do Cloridrato de Trazodona em células somáticas de asa de *Drosophila melanogaster*.

### **Objetivos Específicos**

Avaliar a toxicidade do cloridrato de bupropiona e do cloridrato de trazodona, por meio do Teste de Sobrevivência com *Drosophila melanogaster*.

Avaliar e quantificar através do SMART, a indução de mutação e recombinação, utilizando os descendentes trans-heterozigotos marcados e heterozigotos balanceados, provenientes dos cruzamentos padrão e de alta ativação metabólica.

Avaliar a influência do complexo enzimático citocromo P450 (CYP450) na indução de manchas mutantes nos indivíduos tratados com diferentes concentrações dos antidepressivos testados.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Compostos Químicos e Meio de Cultura

Os medicamentos testados foram: Bupium® (Cloridrato de Bupropiona), fabricado pela EMS Sigma Pharma Ltda, Hortolândia/SP (Brasil), Lote: 801094, CAS: 31677-93-7; e Donaren® (Cloridrato de Trazodona), fabricado pela Apsen Farmacêutica, São Paulo/SP (Brasil), Lote: 16090258, CAS: 25332-39-2.

Uretano 10 mM (Etil-carbamato – CAS: 51-79-6, Buchs, Suíça), foi utilizado como controle positivo e água ultra pura (18.2 MΩ), obtida do sistema MilliQ (Millipore, Vimodrone, Milan, Itália) foi usada como controle negativo. O Purê de batata em flocos, utilizado como meio de cultura alternativo, foi obtido da Yoki Alimentos S.A. – São Bernardo do Campo, SP, Brasil. Todas as soluções foram preparadas no momento de uso.

#### 3.2 Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*

##### 3.2.1 Linhagens de *Drosophila*

Três linhagens diferentes foram utilizadas: (i) machos *mwh* (*mwh/mwh*); (ii) fêmeas *flr<sup>3</sup>* (*flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*); e (iii) fêmeas *ORR;flr<sup>3</sup>* (*ORR;flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*). Essas linhagens mutantes foram cedidas pelo Prof. Dr. Ulrich Graf, do Instituto de Toxicologia, ETH, da Universidade de Zürich (Schwerzenbach, Suíça). As linhagens mutantes foram mantidas em estufa B.O.D. (Biologic Oxygen Demand) (Tecnal – Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba, SP), com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e temperatura de 25 ± 1 °C.

##### 3.2.2 Cruzamentos e Tratamentos

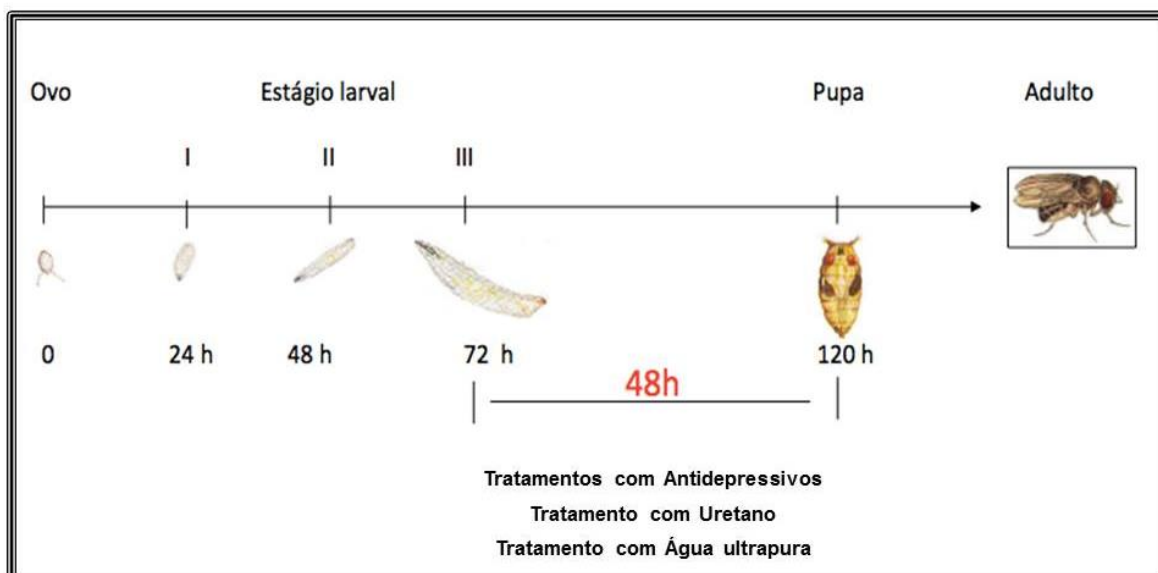
Foram realizados dois cruzamentos: 1] padrão (Standard – ST), que utiliza machos *mwh* e fêmeas *flr<sup>3</sup>* (Graf et al., 1989); e 2] alta bioativação metabólica (High Bioactivation – HB), que utiliza machos *mwh* e fêmeas *ORR; flr<sup>3</sup>* (Graf e van Schaik,



1992), caracterizado por elevados níveis de metabolização por enzimas do citocromo P450. Ambos os cruzamentos (ST e HB) produzem dois tipos de descendentes: moscas trans-heterozigotas marcadas (MH – *mwh+/*flr*<sup>3</sup>*) e moscas heterozigotas balanceadas (BH – *mwh+/*TM3, Bd*<sup>S</sup>*).

Larvas de terceiro estágio (72 ± 4h), provenientes dos dois cruzamentos, foram submetidas a tratamento crônico (aproximadamente 48h) com diferentes concentrações dos antidepressivos, CB e CT: 0,9375; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/mL (Figura 6). As concentrações escolhidas após ensaio de sobrevivência foram aquelas que não alteraram significativamente as taxas de sobrevivência quando comparadas ao controle negativo, para ambos os antidepressivos foram: 0,9375; 1,875; 3,75 e 7,5 mg/mL.

Os tratamentos (sobrevivência e SMART) foram realizados em frascos contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo, Yoki Hikari®), hidratados com 5 mL de cada concentração testada. Água ultra pura foi utilizada como controle negativo e como controle positivo utilizou-se Uretano 10 mM. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata.



**Figura 6.** Esquema do tratamento de larvas de *D. melanogaster* (Fonte: Imagem cedida pelo Laboratório de Mutagênese, UFU).

### 3.2.3 Preparação e Análise das Lâminas

Os adultos emergentes após o tratamento foram coletados e armazenados em frascos contendo etanol 70%. As asas foram retiradas com auxílio de pinças entomológicas e de um estereomicroscópio, e alinhadas sobre uma lâmina de vidro, sendo 5 pares de asas de fêmeas na parte superior e 5 pares de asas de machos na porção inferior. Para adesão da lamínula à lâmina, foram utilizados solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato cloral e 50 mL de água) e pesos de metal. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico de luz com aumento final de 400X.

### 3.2.4 Análise Estatística

Para avaliação do potencial genotóxico, a frequência de manchas por mosca em cada série tratada foi comparada ao controle negativo. Para tanto, foi utilizado o teste binomial condicional de Kastembaum e Bowman (1970), seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würigler (1988) que é aplicado sobre duas hipóteses e permite a obtenção de quatro diagnósticos estatísticos.

Na hipótese nula ( $H_0$ ), é determinado que não há diferença na frequência de manchas induzidas nos dois grupos e na hipótese alternativa ( $H_A$ ) é colocado um fator multiplicador ( $m$ ), em que se afirma que um dos grupos apresenta uma frequência de manchas  $m$  vezes maior ou menor do que o outro. Como as manchas simples pequenas podem apresentar alta frequência espontânea, o valor multiplicador  $m$  é fixado em 2. Para as manchas simples grandes e gêmeas, na qual apresentam uma frequência espontânea baixa, o  $m$  é estabelecido em 5 (Andrade et al., 2004).

Cada hipótese é testada para um nível de significância de 5%, sendo quatro as decisões possíveis:

- inconclusivo (i): são aceitas ambas as hipóteses e como elas não podem ser simultaneamente verdadeiras, nenhuma conclusão pode ser tomada;
- negativo (-): aceita  $H_0$  e rejeita  $H_A$ ;
- positivo (+): rejeita  $H_0$  e aceita  $H_A$ ;

- fraco-positivo (f+): são rejeitadas ambas as hipóteses.

Com o objetivo de confirmar os resultados positivos e excluir os outliers foi efetuado o teste U de Wilcoxon, Mann e Whitney (Frei e Würigler, 1995).

Com base nas frequências de indução de clone por  $10^5$  células, a atividade recombinogênica é calculada como:

$$\text{Frequência de mutação (FM)} = \frac{\text{frequência de clones em moscas BH}}{\text{frequência de clones em moscas MH}}$$

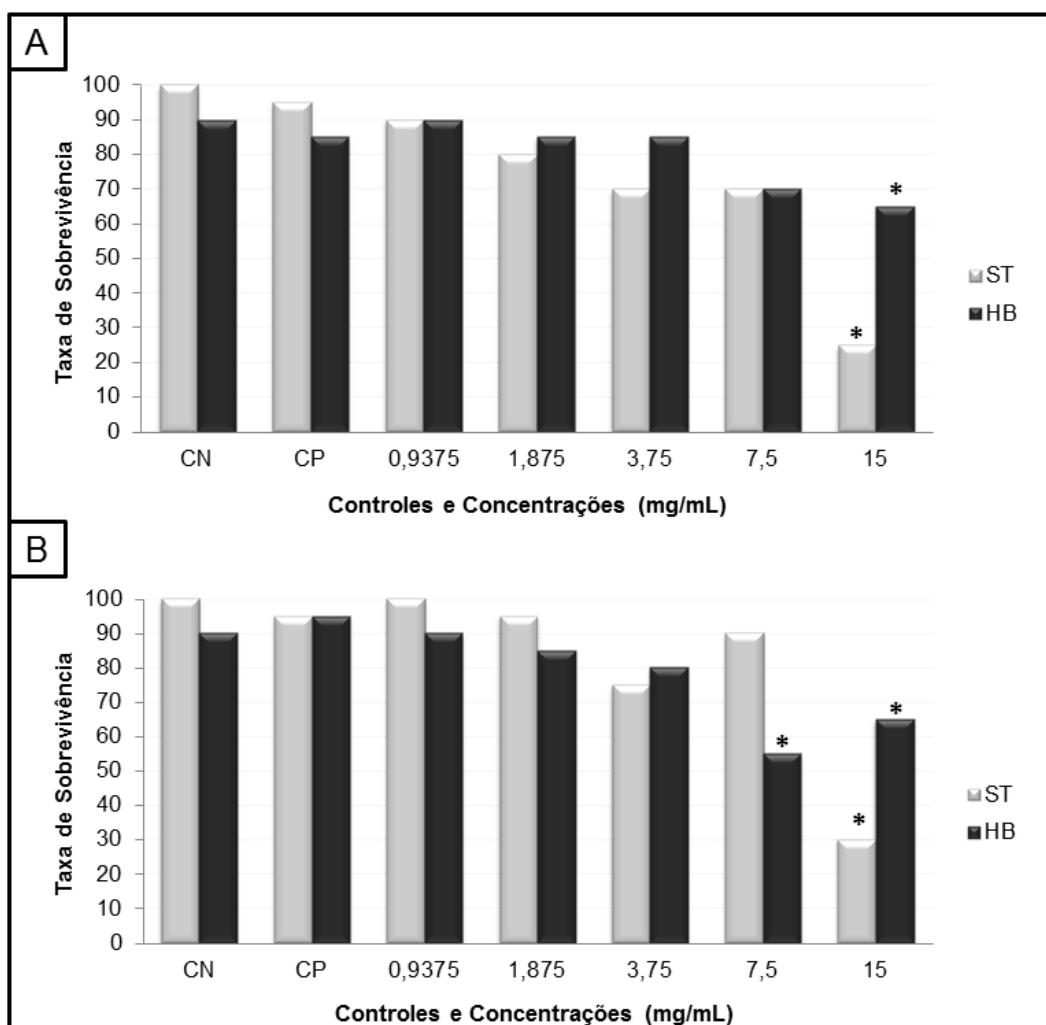
$$\text{Frequência de recombinação (FR)} = 1 - \text{FM}$$

$$\text{Frequências total de manchas (FT)} = \frac{\text{total de manchas em moscas MH}}{\text{número de moscas}}$$

Comparações estatísticas de taxas de sobrevivência foram realizadas por meio do teste do  $X^2$  para proporções, para amostras independentes (Sinigaglia et al., 2006).

#### 4. RESULTADOS

De acordo com os procedimentos experimentais utilizados, os testes de sobrevivência demonstraram que, em altas concentrações, os dois antidepressivos testados foram tóxicos. O Cloridrato de Bupropiona na concentração de 15 mg/mL, em ambos os cruzamentos, diminuiu significativamente ( $p > 0,05$ ) a taxa de sobrevivência quando comparados aos respectivos controles negativos (Fig. 7A). De forma análoga, o Cloridrato de trazodona, na concentração de 15 mg/mL foi tóxico para os dois cruzamentos. Por outro lado, a concentração de 7,5 mg/mL foi tóxica somente para indivíduos do cruzamento HB (Fig. 7B).



**Figura 7.** Taxa de Sobrevivência dos indivíduos dos cruzamentos ST e HB, tratados com diferentes concentrações de (A) Cloridrato de Bupropiona e (B) Cloridrato de Trazodona.

**Tabela 1.** Resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células da asa de *Drosophila melanogaster*, com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento padrão (ST), tratados com Água ultra pura e Uretano (controles negativo e positivo, respectivamente) e diferentes concentrações do Cloridrato de Bupropiona.

Genótipos e Tratamento (mg/ml)	Nº de moscas	Manchas por mosca (número de manchas), diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				Manchas com clones <i>mwh</i> <sup>c</sup>	Frequência de formação de clones/10 <sup>5</sup> células <sup>d</sup>		Recombinação (%)
		Manchas simples pequenas (1-2 cells) <sup>b</sup>	Manchas simples grandes (>2 cells) <sup>b</sup>	Manchas gêmeas	Total de manchas		Observado	Controle Corrigido	
<b><i>mwh/flr<sup>3</sup></i></b>									
Controle Negativo	40	0.45 (18)	0.05 (02)	0.00 (00)	0.50 (20)	18	0.92		
Controle Positivo	40	2.13 (85) +	0.23 (09) +	0.10 (04) i	2.45 (98) +	92	4.71	3.79	9.77
<b>Bupium</b>									
0,937	40	0.58 (23) i	0.10 (04) i	0.03 (01) i	0.70 (28) i	25	1.28	0.36	
1,875	40	0.70 (28) i	0.10 (04) i	0.15 (06) +	0.95 (38) +	38	1.95	1.03	60.51
3,75	40	0.80 (32) +	0.08 (03) i	0.05 (02) i	0.90 (36) +	33	1.69	0.77	57.40
7,5	40	0.83 (33) +	0.05 (02) i	0.10 (04) i	0.98 (39) +	36	1.84	0.92	66.85
<b><i>mwh/TM3</i></b>									
Controle Negativo	40	0.30 (12)	0.05 (02)		0.35 (14)	14	0.72		
Controle Positivo	40	2.03 (81) +	0.05 (02) i		2.08 (83) +	83	4.25	3.53	
<b>Bupium</b>									
1,875	40	0.38 (15) i	0.00 (00) i		0.38 (15) i	15	0.77	0.05	
3,75	40	0.35 (14) i	0.00 (00) i		0.35 (14) i	14	0.72	0.00	
7,5	40	0.30 (12) i	0.00 (00) i		0.30 (12) -	12	0.61	-0.11	

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram avaliadas.

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988; 1995), para comparação com o respectivo controle: -, negativo; i, inconclusivo; +, positivo (P<0.05).

<sup>b</sup> Incluindo raras manchas simples *flr<sup>3</sup>*.

<sup>c</sup> Considerando clones *mwh* de manchas simples *mwh* e gêmeas.

<sup>d</sup> Frequência de formação de clones: clones/moscas/48.800 células (sem correção de tamanho).

**Tabela 2.** Resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células da asa de *Drosophila melanogaster*, com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com Água ultra pura e Uretano (controles negativo e positivo, respectivamente) e diferentes concentrações do Cloridrato de Bupropiona.

Genótipos e Tratamento (mg/ml)	Nº de moscas	Manchas por mosca (número de manchas), diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				Manchas com clones <i>mwh</i> <sup>c</sup>	Frequência de formação de clones/10 <sup>5</sup> células <sup>d</sup>		Recombinação (%)
		Manchas simples pequenas (1-2 cells) <sup>b</sup>	Manchas simples grandes (>2 cells) <sup>b</sup>	Manchas gêmeas	Total de manchas		Observado	Controle Corrigido	
<b><i>mwh/flr<sup>3</sup></i></b>									
Controle Negativo	40	0.58 (23)	0.03 (01)	0.03 (01)	0.63 (25)	24	1.23		
Controle Positivo	40	9.33 (373) +	0.75 (30) +	1.20 (48) +	11.28 (451) +	437	22.39	21.16	12.15
<b>Bupium</b>									
0,937	40	0.80 (32) i	0.20 (08) +	0.08 (03) i	1.08 (43) +	42	2.15	0.92	16.77
1,875	40	0.85 (34) i	0.08 (03) i	0.10 (04) i	1.03 (41) +	41	2.10	0.87	34.28
3,75	40	0.93 (37) +	0.08 (03) i	0.00 (00) i	1.00 (40) +	39	2.00	0.77	20.50
7,5	40	0.78 (31) i	0.25 (10) +	0.00 (00) i	1.03 (41) +	41	2.10	0.87	17.14
<b><i>mwh/TM3</i></b>									
Controle Negativo	40	0.75 (30)	0.00 (00)		0.75 (30)	30	1.54		
Controle Positivo	40	9.43 (377) +	0.18 (07) +		9.60 (384) +	384	19.67	18.13	
<b>Bupium</b>									
0,937	40	0.85 (34) -	0.03 (01) i		0.88 (35) -	35	1.79	0.25	
1,875	40	0.65 (26) -	0.03 (01) i		0.68 (27) -	27	1.38	-0.16	
3,75	40	0.75 (30) -	0.03 (01) i		0.78 (31) -	31	1.59	0.05	
7,5	40	0.80 (32) -	0.05 (02) i		0.85 (34) -	34	1.74	0.20	

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram avaliadas.

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988; 1995), para comparação com o respectivo controle: -, negativo; i, inconclusivo; +, positivo (P<0.05).

<sup>b</sup> Incluindo raras manchas simples *flr<sup>3</sup>*.

<sup>c</sup> Considerando clones *mwh* de manchas simples *mwh* e gêmeas.

<sup>d</sup> Frequência de formação de clones: clones/moscas/48.800 células (sem correção de tamanho).

Diante dos resultados de sobrevivência obtidos, as concentrações escolhidas foram: 0,9375; 1,875; 3,75 e 7,5 mg/mL. Os resultados referentes à exposição crônica das larvas trans-heterozigotas marcadas e heterozigotas balanceadas estão representados nas Tabelas 1, 2, 3, e 4.

As frequências de mutações observadas no controle negativo (água ultrapura) e no controle positivo (Uretano 10 mM), para ambos os cruzamentos, estão de acordo com aquelas obtidas em experimentos prévios com o teste SMART de asa em *D. melanogaster* (Machado et al., 2016; Morais et al., 2016; Reis et al., 2016).

A partir da análise dos indivíduos MH tratados com o CB, oriundos do cruzamento ST (Tabela 1), apenas a concentração de 0,9375 mg/mL, não aumentou significativamente o número de manchas mutantes. Por outro lado, no cruzamento HB, todas as concentrações avaliadas alteraram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) a frequência de manchas mutantes quando comparadas ao controle negativo (Tabela 2).

O CT foi mutagênico ( $p < 0,05$ ), em ambos os cruzamentos, e em todas as concentrações avaliadas (Tabela 3 e 4). A análise dos descendentes heterozigotos balanceados (BH) indicou que, no cruzamento padrão, CB é preferencialmente recombinogênico (Fig. 8A) e, quando metabolizado pelas enzimas do complexo CYP450, passa a ser essencialmente mutagênico (Fig. 8B).

Os descendentes BH analisados, que foram tratados com CT, indicaram que no cruzamento ST, nas três menores concentrações (0,9375; 1,875 e 3,75 mg/mL), o cloridrato de tradozona foi recombinogênico, e na maior concentração (7,5 mg/mL) mostrou-se mutagênico (Fig. 9A). O mesmo pode ser observado no cruzamento HB, porém a contribuição de recombinação foi menor quando comparado ao cruzamento ST (Fig. 9B).

**Tabela 3.** Resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células da asa de *Drosophila melanogaster*, com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento padrão (ST), tratados com Água ultra pura e Uretano (controles negativo e positivo, respectivamente) e diferentes concentrações do Cloridrato de Trazodona.

Genótipos e Tratamento (mg/ml)	Nº de moscas	Manchas por mosca (número de manchas), diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				Manchas com clones <i>mwh</i> <sup>c</sup>	Frequência de formação de clones/10 <sup>5</sup> células <sup>d</sup>		Recombinação (%)
		Manchas simples pequenas (1-2 cells) <sup>b</sup>	Manchas simples grandes (>2 cells) <sup>b</sup>	Manchas gêmeas	Total de manchas		Observado	Controle Corrigido	
<b><i>mwh/flr<sup>3</sup></i></b>									
Controle Negativo	40	0.43 (17)	0.03 (01)	0.00 (00)	0.45 (18)	17	0.87		
Controle Positivo	40	2.58 (103) +	0.35 (14) +	0.25 (10) +	3.18 (127) +	125	6.35	5.48	43.46
<b>Donaren</b>									
0,937	40	0.73 (29) i	0.33 (13) +	0.10 (04) i	1.15 (46) +	46	2.36	1.49	74.15
1,875	40	0.65 (26) i	0.28 (11) +	0.10 (04) i	1.03 (41) +	40	2.05	1.18	60.00
3,75	40	0.90 (36) +	0.30 (12) +	0.08 (03) i	1.28 (51) +	51	2.61	1.74	70.50
7,5	40	0.53 (21) i	0.35 (14) +	0.03 (01) i	0.90 (36) +	36	1.84	0.97	41.85
<b><i>mwh/TM3</i></b>									
Controle Negativo	40	0.35 (14)	0.03 (01)		0.38 (15)	15	0.77		
Controle Positivo	40	1.63 (65) +	0.13 (05) i		1.75 (70) +	70	3.59	2.82	
<b>Donaren</b>									
0,937	40	0.23 (09) -	0.08 (03) i		0.30 (12) -	12	0.61	-0.16	
1,875	40	0.33 (13) -	0.08 (03) i		0.40 (16) i	16	0.82	0,05	
3,75	40	0.33 (13) -	0.05 (02) i		0.38 (15) -	15	0.77	0,00	
7,5	40	0.50 (20) i	0.03 (01) i		0.53 (21) i	21	1.07	0,30	

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram avaliadas.

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988; 1995), para comparação com o respectivo controle: -, negativo; i, inconclusivo; +, positivo (P<0.05).

<sup>b</sup> Incluindo raras manchas simples *flr<sup>3</sup>*.

<sup>c</sup> Considerando clones *mwh* de manchas simples *mwh* e gêmeas.

<sup>d</sup> Frequência de formação de clones: clones/moscas/48.800 células (sem correção de tamanho).



**Tabela 4.** Resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células da asa de *Drosophila melanogaster*, com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com Água ultra pura e Uretano (controles negativo e positivo, respectivamente) e diferentes concentrações do Cloridrato de Trazodona.

Genótipos e Tratamento (mg/ml)	Nº de moscas	Manchas por mosca (número de manchas), diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				Manchas com clones <i>mwh</i> <sup>c</sup>	Frequência de formação de clones/10 <sup>5</sup> células <sup>d</sup>		Recombinação (%)
		Manchas simples pequenas (1-2 cells) <sup>b</sup>	Manchas simples grandes (>2 cells) <sup>b</sup>	Manchas gêmeas	Total de manchas		Observado	Controle Corrigido	
<b><i>mwh/flr<sup>3</sup></i></b>									
Controle Negativo	40	0.43 (17)	0.05 (02)	0.03 (01)	0.50 (20)	20	1.02		
Controle Positivo	40	13.93 (557) +	1.98 (79) +	1.08 (43) +	16.98 (679) +	656	34.8	33.78	34.65
<b>Bupium</b>									
0,937	40	1.20 (48) +	0.23 (09) +	0.33 (13) +	1.75 (70) +	68	3.48	2.46	51.44
1,875	40	1.88 (75) +	0.25 (10) +	0.18 (07) +	2.30 (92) +	85	4.35	3.33	52.87
3,75	40	1.35 (54) +	0.30 (12) +	0.28 (11) +	1.93 (77) +	76	3.89	2.87	59.13
7,5	40	0.75 (30) +	0.28 (11) +	0.08 (03) i	1.10 (44) +	42	2.15	1.13	26.05
<b><i>mwh/TM3</i></b>									
Controle Negativo	40	0.40 (16)	0.03 (01)		0.43 (17)	17	0.87		
Controle Positivo	40	10.63 (425) +	0.48 (19) +		11.10 (444) +	444	22.74	21.74	
<b>Bupium</b>									
0,937	40	0.80 (32) +	0.03 (01) i		0.83 (33) +	33	1.69	0.82	
1,875	40	0.98 (39) +	0.03 (01) i		1.00 (40) +	40	2.05	1.18	
3,75	40	0.75 (30) +	0.03 (01) i		0.78 (31) +	31	1.59	0.72	
7,5	40	0.65 (26) i	0.13 (05) i		0.78 (31) +	31	1.59	0.72	

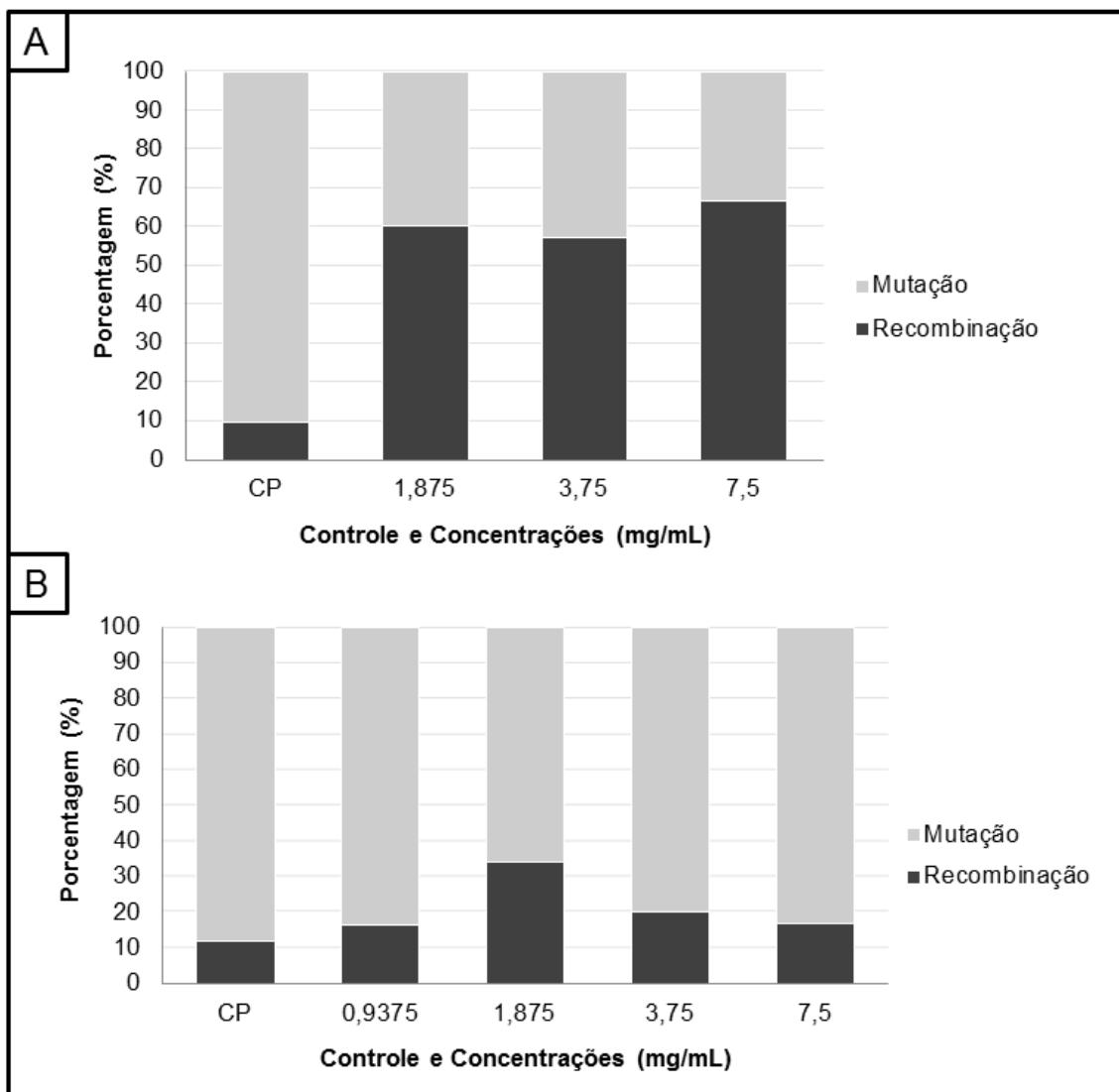
Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram avaliadas.

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988; 1995), para comparação com o respectivo controle: -, negativo; i, inconclusivo; +, positivo (P<0.05).

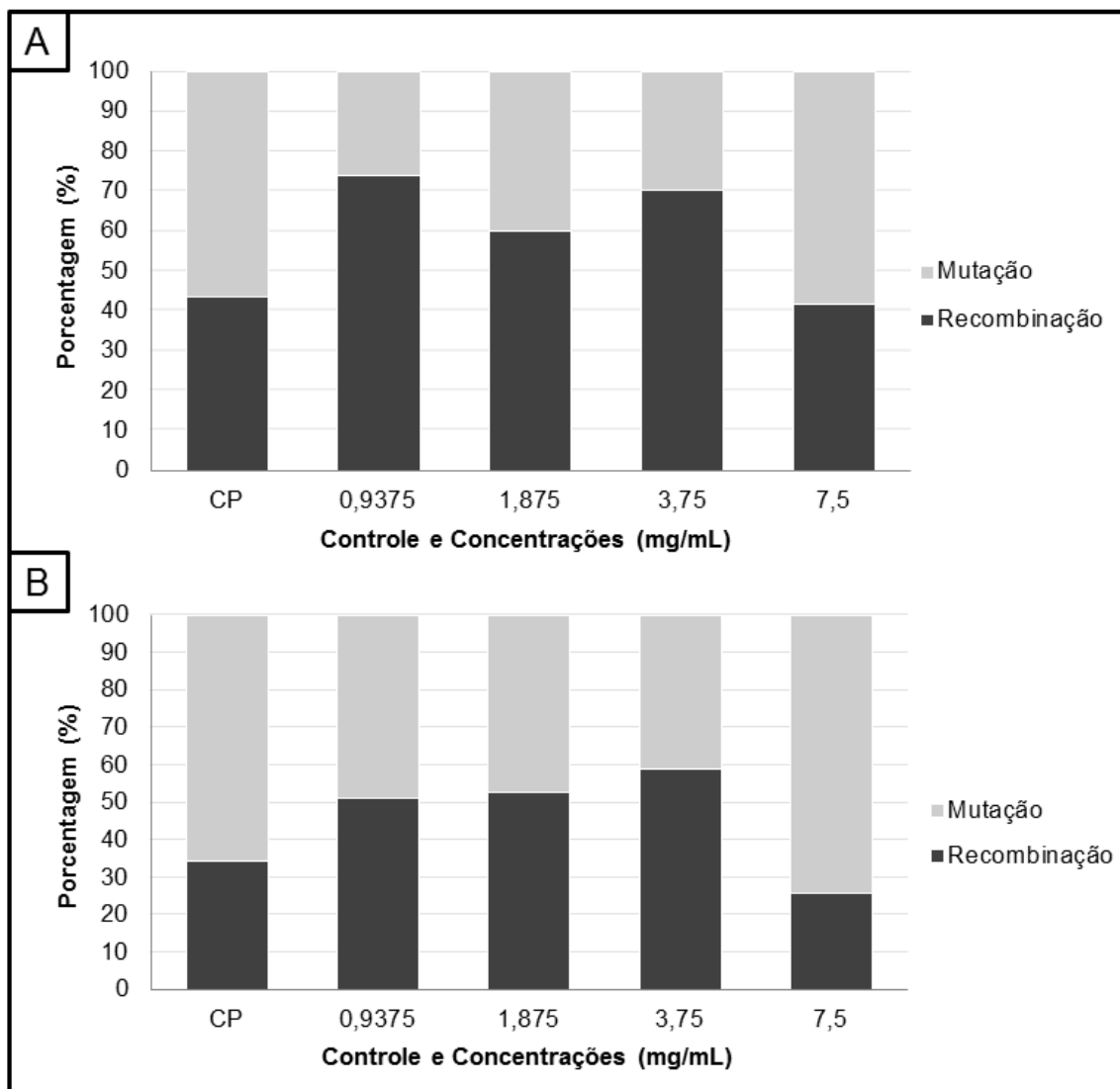
<sup>b</sup> Incluindo raras manchas simples *flr<sup>3</sup>*.

<sup>c</sup> Considerando clones *mwh* de manchas simples *mwh* e gêmeas.

<sup>d</sup> Frequência de formação de clones: clones/moscas/48.800 células (sem correção de tamanho).



**Figura 8.** Contribuição de mutação e recombinação (%) para a frequência total de manchas observadas nos indivíduos MH do (A) cruzamento ST e (B) cruzamento HB, tratados com Cloridrato de Bupropiona.



**Figura 9.** Contribuição de mutação e recombinação (%) para a frequência total de manchas observadas (A) nos indivíduos MH do cruzamento ST e (B) cruzamento HB, tratados com Cloridrato de Trazodona.

## 5. DISCUSSÃO

A depressão é uma doença que tem crescido de maneira exponencial, e é uma grande preocupação e desafio para a saúde pública (WHO,2017). Os antidepressivos são medicamentos de uso prolongado amplamente prescritos, porém encontra-se na literatura poucos estudos sobre os efeitos genotóxicos e carcinogênicos desses medicamentos (Yilmaz et al., 2016).

Este é o primeiro trabalho que aplica o SMART de asa na avaliação da genotoxicidade do Cloridrato de Bupropiona e do Cloridrato de Trazodona.

De acordo com os dados obtidos nos testes de sobrevivência, o CB, nas maiores concentrações testadas foi tóxico para *D. melanogaster* (Fig. 7A). De maneira similar, estudos *in vitro* mostram que este antidepressivo é citotóxico em elevadas concentrações para hepatócitos. Os efeitos deletérios estão relacionados a alterações no citoesqueleto e na membrana celular, aumento do estresse oxidativo, peroxidação lipídica, depleção da glutathiona, além de causar lesões na membrana mitocondrial (Ahmadian et al., 2017).

O CT também foi tóxico nas maiores concentrações avaliadas no presente trabalho (Fig. 7B), corroborando com os dados *in vitro* existentes na literatura, em que são evidenciados efeitos citotóxicos, mutagênicos e clastogênicos, de forma dose dependente (Yilmaz et al., 2016). Analogamente, foi observado, em células hepáticas, toxicidade e distúrbios mitocondriais causados pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio - ERO (Dykens et al., 2008).

Os resultados obtidos nos tratamentos com uretano (10 mM), tanto nos descendentes dos cruzamentos ST (Tabela 1 e 3) e HB (Tabela 2 e 4), validam os resultados negativos obtidos nos tratamentos com água ultrapura, demonstrando a eficácia das linhagens mutantes utilizadas, uma vez que todos os experimentos foram realizados concomitantemente. Além disso, os dados do controle positivo dos cruzamentos HB (Tabela 2 e 4) estão de acordo com dados preliminares (Frölich e Würigler, 1990), que mostram que o uretano possui um evidente potencial mutagênico em *D. melanogaster*, com forte dependência de ativação metabólica via citocromo P450 (Machado et al., 2016; Morais et al., 2016; Reis et al., 2016).

Não foi evidenciada nenhuma relação dose-dependência na indução de manchas mutantes, para os antidepressivos analisados, independente do

cruzamento. A maioria das mutações foram classificadas como manchas simples pequenas, sendo resultantes de mutações pontuais, eventos aneugênicos ou clastogênicos que ocorreram em uma ou duas células e, o seu aparecimento, pode ser resultado do mecanismo de ação tardio (Graf et al., 1984) das substâncias analisadas.

Após a análise da progênie MH, observou-se resultado positivo quanto à mutagenicidade para os dois antidepressivos, tanto no cruzamento ST quanto no HB. Somente a menor concentração do CB no cruzamento padrão não mostrou-se mutagênica (Tabela 1), o resultado obtido nessa concentração (0,9375 mg/mL) foi inconclusivo, mas a partir dessa concentração, todos os demais resultados foram positivos.

Nos indivíduos MH, manchas mutantes (*mwh* ou *flr*) podem ser produzidas por mutação, aberração cromossômica (deleção), recombinação e não disjunção. A presença de manchas gêmeas demonstra a ocorrência de recombinação mitótica entre o centrômero e o locus “flare”. No entanto, apenas por este parâmetro, não é possível quantificar a contribuição de cada um desses mecanismos no total de manchas mutantes. Para tanto, faz-se necessário a análise dos descendentes BH, nos quais as manchas mutantes são devidas apenas à mutação, aberração cromossômica (deleção) e não disjunção. Devido à inversão presente no cromossomo balanceador TM3, todos os eventos recombinacionais são eliminados. Assim sendo, a frequência de manchas mutantes observada na análise dos descendentes BH, comparada com a frequência de manchas mutantes observada na análise dos descendentes MH permite quantificar a contribuição de eventos recombinacionais no total de manchas observadas (Graf et al., 1984).

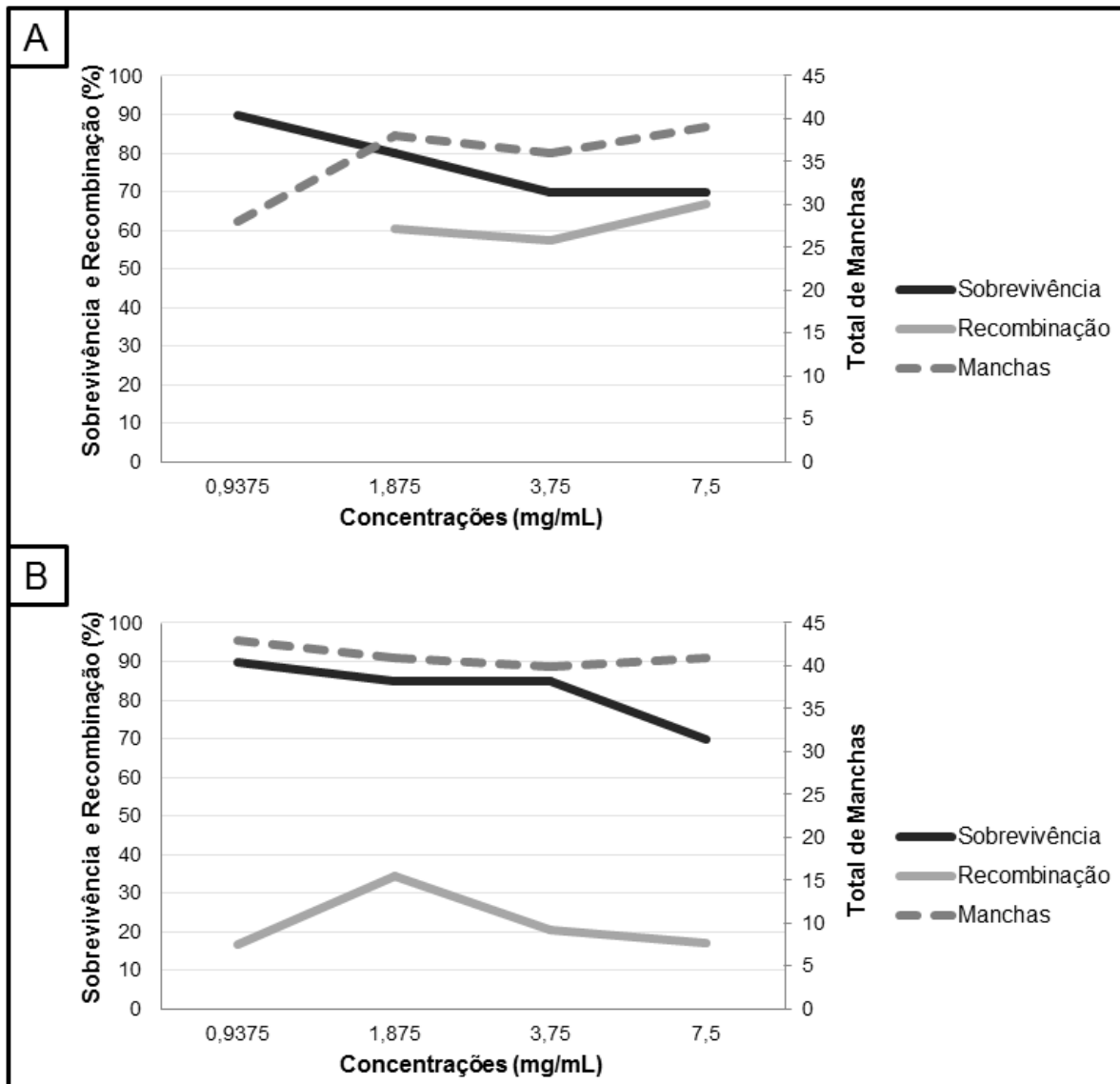
Devido aos resultados positivos observados dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, do CB e do CT, a progênie BH (*mwh/TM3*, *bd<sup>s</sup>*) foi também avaliada para permitir a quantificação da contribuição dos eventos recombinogênicos na frequência total de mutações encontradas. A frequência dos eventos que resultaram em manchas simples e gêmeas foram quantificados em porcentagem de mutação e recombinação em cada grupo tratado, incluindo o controle positivo.

Quando se relaciona a taxa de sobrevivência, porcentagem de recombinação e o total de manchas observado (Fig. 10 e 11) é possível verificar

que para o tratamento realizado com o Cloridrato de Bupropiona, no cruzamento ST, a diminuição da porcentagem de sobrevivência está relacionada ao aumento da frequência de manchas e a contribuição da recombinação na totalidade dos eventos mutagênicos observados (Fig. 10A), indicando que diminuição da sobrevivência pode estar vinculada aos eventos genotóxicos induzidos pelo medicamento. Bhattacharya et al., (2013) demonstraram o potencial genotóxico em cultura de linfócitos.

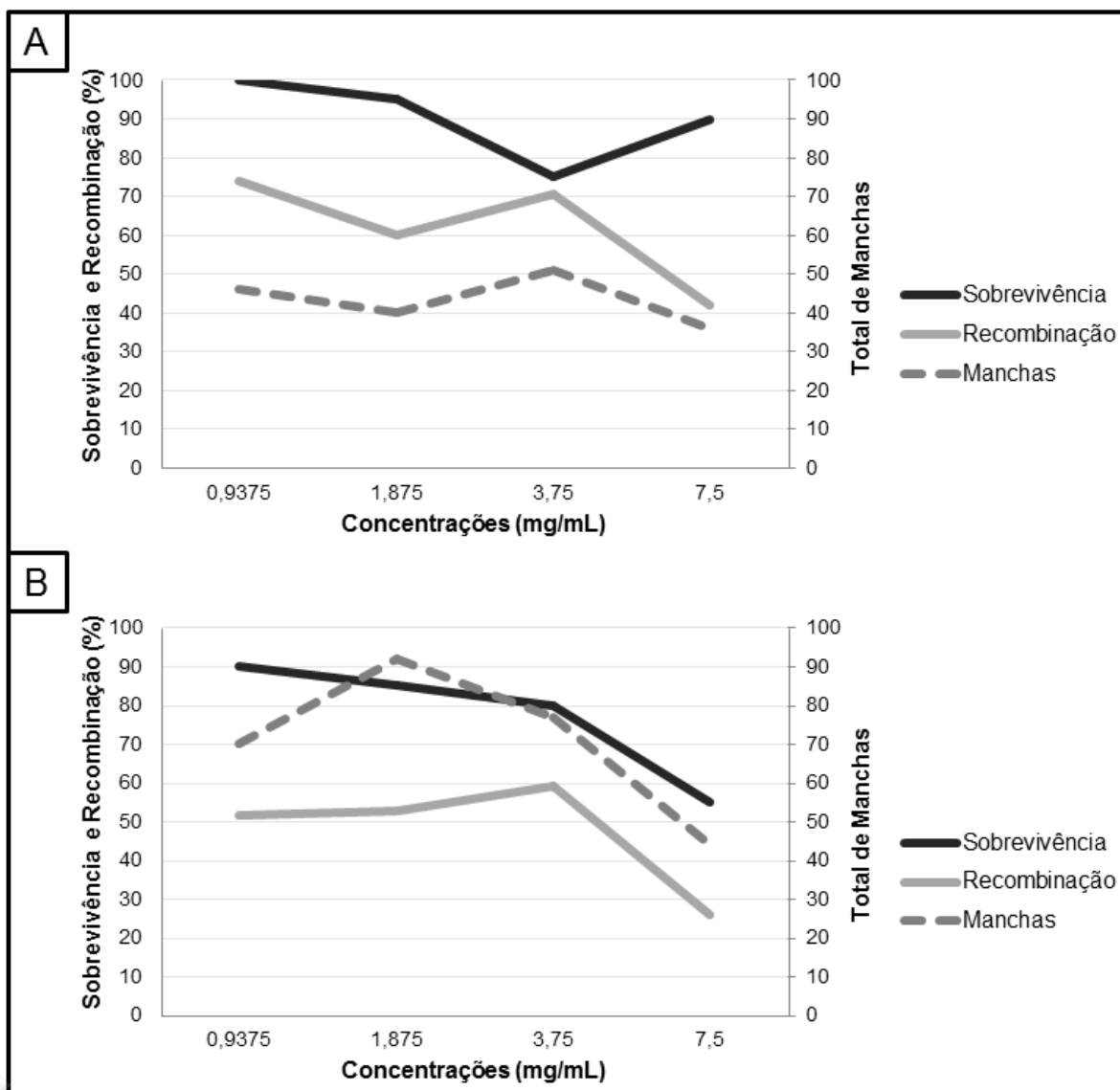
Já no cruzamento HB (Fig. 10B), a frequência de mutação se mantém constante em todas as concentrações, inclusive na de 7,5 mg/mL a qual apresenta maior índice de mortalidade. A taxa de recombinação decai a partir da concentração de 1,875 mg/mL. Aparentemente não há relação entre a taxa de sobrevivência, recombinogenicidade e total de eventos genotóxicos. Ahmadian et al., (2017) evidenciaram o aumento na produção de ERO em hepatócitos, o que poderia explicar o potencial genotóxico do mesmo.

O CB para o cruzamento padrão mostrou-se essencialmente recombinogênico e, quando metabolizado, passa a ser mutagênico (Fig. 8). Os metabólitos gerados pela metabolização do Cloridrato de Bupropiona são: hidroxibupropiona (OHBUP), treohidrobupropiona e eritrohidrobupropiona (Fokina et al., 2016; Sager et al., 2016).



**Figura 10.** Relação entre a Taxa de Sobrevivência, Recombinação e Total de Manchas observado (A) no cruzamento ST e (B) cruzamento HB, tratados com Cloridrato de Bupropiona.

Para o CT, no cruzamento padrão, não há uma correlação dose dependente para os parâmetros: sobrevivência, recombinogenicidade e total de eventos mutagênicos (Fig. 11A).



**Figura 11.** Relação entre a Taxa de Sobrevivência, Recombinação e Total de Manchas observado (A) no cruzamento ST e (B) cruzamento HB, tratados com Cloridrato de Trazodona.

Por outro lado, ao analisar a influência das enzimas CYP450 nos indivíduos tratados (cruzamento HB), fica evidenciada a toxicidade relacionada aos possíveis subprodutos oriundos da metabolização. A taxa de sobrevivência, a porcentagem de recombinação e o total de manchas, diminuem com o aumento da concentração, mostrando que o complexo enzimático citocromo P450, influencia diretamente no modo de ação.



Taziki et al., (2013) concluíram que o cloridrato de trazodona é mais tóxico quando metabolizado em células hepáticas. A produção de ERO e a peroxidação lipídica são significativamente aumentadas, e o potencial de membrana mitocondrial decai drasticamente. 1-(3'-clorofenil)piperazina (*m*-CPP) é o metabólito ativo circulante mais abundante no corpo, proveniente da metabolização do CT pelo fígado (Wen et al., 2008).

Em ambos os cruzamentos o CT mostrou-se essencialmente recombinogênico nas menores concentrações (Fig. 9). Por outro lado, foi majoritariamente mutagênico. Os dados obtidos no presente trabalho confirmam o potencial genotóxico (clastogênico e mutagênico) evidenciado em ensaios *in vitro* (Yilmaz et al., 2016)

## 6. CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais utilizadas, pôde-se concluir que, os antidepressivos Cloridrato de Bupropiona e Cloridrato de Trazodona, nas maiores concentrações, foram tóxicos.

O efeito mutagênico não está relacionado com a concentração administrada. Para o CB, não observou-se interferência do citocromo P450 na indução de manchas mutantes. Já o CT demonstrou um aumento significativo de manchas mutantes quando metabolizado, provavelmente relacionado à produção de *m*-CPP.

Com a análise dos descendentes heterozigotos balanceados (BH), concluiu-se que para o cruzamento padrão (ST) o CB foi essencialmente recombinogênico, e que quando metabolizado, passa a ser mutagênico. Já o CT mostrou-se recombinogênico em ambos os cruzamentos nas menores concentrações analisadas.

Visto a falta de dados na literatura e o aumento da utilização de antidepressivos pela população mundial, são necessários mais estudos para elucidação dos mecanismos de ação relacionados aos danos ao material genético, causados pelo Cloridrato de Bupropiona e pelo Cloridrato de Trazodona.

## 7. REFERÊNCIAS

- Aguiar, C.C., Castro, T.R., Carvalho, A.F., Vale, O.C., Sousa, F.C., Vasconcelos, S.M., 2011. Drogas Antidepressivas. *Acta Med Port.* 24, 91-98.
- Ahmadian, E., Babaei, H., Nayebi, A.M., Eftekhari, A., Eghbal, M.A., 2017. Mechanistic Approach for Toxic Effects of Bupropion in Primary Rat Hepatocytes. *Drug Res.* 67, 217-222. <https://doi.org/10.1055/s-0042-123034>
- Amoretty, P.R., Padilha, K.P., De Freitas, R.T., Bruno, R.V., 2013. Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo para o estudo do relógio circadiano em insetos vetores. *AS&T - Acta Scientiae & Technicae.* 1, 12.
- Andrade, R., Reguly, L., Lehmann, M., 2004. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: Henderson, DS (Ed.), *Drosophila Cytogenetics Protocols*, Human Press Inc.;389-412.
- Bhattacharya, S. K., Nathawat, L. S., Damani, P., Choksi, A. K., Banik, A., Sinha, K., Bhattacharya, A. S., 2013. Assessment of Potential In vitro Genotoxic and Cytotoxic Effects of Bupropion Hydrochloride (Wellbutrin) in Human Peripheral Lymphocytes and Human Cortical Neuron. *Toxicol Int.* 20(1), 11–18. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.111535>
- De Andrade, L.R., Brito, A.S., Melero, A.M., Zanin, H., Ceragioli, H.J., Baranauskas, V., Cunha, K.S., Irazusta, S.P., 2014. Absence of mutagenic and recombinagenic activity of multi-walled carbon nanotubes in the *Drosophila* wing-spot test and *Allium cepa* test. *Ecotoxicol Environ Saf.* 99, 92-97. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.013>
- Demir, E., Vales, G., Kaya, B., Creus, A., Marcos, R., 2011. Genotoxic analysis of silver nanoparticles in *Drosophila*. *Nanotoxicol.* 5, 417-424. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.529176>
- Demir, E., Turna, F., Vales, G., Kaya, B., Creus, A., Marcos, R., 2013. In vivo genotoxicity assessment of titanium, zirconium and aluminium

nanoparticles, and their microparticulated forms, in *Drosophila*.  
*Chemosphere*. 93, 2304-2310.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.022>

Demyttenaere, K., Jaspers, L., 2008. Review: Bupropion and SSRI-induced side effects. *J Psychopharmacol*. 22, 792-804.

<https://doi.org/10.1177/0269881107083798>

Dykens, J.A., Jamieson, J.D., Marroquin, L.D., Nadanaciva, S., Xu, J.J., Dunn, M.C., Smith, A.R., Will, Y., 2008. In Vitro Assessment of Mitochondrial Dysfunction and Cytotoxicity of Nefazodone, Trazodone, and Buspirone. *Toxicol Sci*. 103, 335-345. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn056>

Fokina, V.M., Xu, M., Rytting, E., Abdel-Rahman, S.Z., West, H., Oncken, C., Clark, S.M., Ahmed, M.S., Hankins, G.D., Nanovskaya, T.N., 2016. Pharmacokinetics of Bupropion and Its Pharmacologically Active Metabolites in Pregnancy. *Drug Metab Dispos*. 44, 1832-1838.

<https://doi.org/10.1124/dmd.116.071530>

Frei, H., Würigler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat Res*. 203, 297–308.

[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(88\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0165-1161(88)90019-2)

Frei, H.; Würigler, F.E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res*. 334, 247–258.

[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)90018-7](https://doi.org/10.1016/0165-1161(95)90018-7)

Frölich, A., Würigler, F.E., 1990. *Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res*. 234, 71-80.

[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(90\)90033-K](https://doi.org/10.1016/0165-1161(90)90033-K)

- Gomes, R.A.P.L., 2001. PROTOCOLO - Utilização de *Drosophila* em Genética: 1ª Parte. Departamento de Biologia Vegetal. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Graf, U., Frei, H., Kagi, A., Katz, A.J., Wurgler, F.E., 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 222, 359-373.  
[https://doi.org/10.1016/0165-1218\(89\)90112-2](https://doi.org/10.1016/0165-1218(89)90112-2)
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen.* 6, 153-188.  
<https://doi.org/10.1002/em.2860060206>
- Graf, U., Spanó, M.A., Rincón, J.G., Abraham, S.K., Andrade, H.H., 1996. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies of antigenotoxicity. *Afr Newslett Occup Health Safety.* 6, 9-13.
- Graf, U., van Schaik, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* v, 59-67. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(92\)90032-H](https://doi.org/10.1016/0165-1161(92)90032-H)
- Jefferson, J.W., Pradko, J.F., Muir, K.T., 2005. Bupropion for major depressive disorder: Pharmacokinetic and formulation considerations. *Clin Ther.* 27, 1685-95. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.11.011>
- Karhu, D., Gossen, E.R., Mostert, A., Cronjé, T., Fradette, C., 2011. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of once-daily trazodone extended-release caplets in healthy subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 49, 730-43.  
<https://doi.org/10.5414/CP201546>
- Kastenbaum, M. A. Bowman, K. O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res.* 9, 527–549.  
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(70\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(70)90038-2)

Kaynak, H., Kaynak, D., Gözükirmizi, E., Guillemineault, C., 2004. The effects of trazodone on sleep in patients treated with stimulant antidepressants. *Sleep Med.* 5, 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2003.06.006>

Machado, N.M., de Rezende, A.A., Nepomuceno, J.C., Tavares, D.C., Cunha, W.R., Spanó, M.A., 2016. Evaluation of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of (+)-usnic acid in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol.* 96, 226-33. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.005>

Morais, C.R., Bonetti, A.N., Carvalho, S.M., Rezende, A.A.A., Araujo, G.R., Spanó, M.A., 2016. Assessment of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of Fipronil insecticide in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere.* 165, 342-351. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.023>

Moreno, R.A., Moreno, D.H., Soares, M.B.M., 1999. Psicofarmacologia de antidepressivos. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 21, 24-40. <https://doi.org/10.1590/S1516-44461999000500006>

Oliveira, V.C., Constante, S.A.R., Orsolin, P.C., Nepomuceno, J.C., de Rezende, A.A.A., Spanó, M.A., 2017. Modulatory effects of metformin on mutagenicity and epithelial tumor incidence in doxorubicin-treated *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol.* 106, 283-291. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.052>

- Parvathi, V.D., Rajagopal, K., 2014. Nanotoxicology testing: Potential of *Drosophila* in toxicity assessment of nanomaterials. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 5, 25-35.
- Qureshi, W.M.S., Latif, M.L., Parker, T.L., Pratten, M.K., 2014. Evaluation of Bupropion Hydrochloride Developmental Cardiotoxic Effects in Chick Cardiomyocyte Micromass Culture and stem cell derived Cardiomyocyte Systems. *Birth Defects Res B.* 101, 371–378.  
<https://doi.org/10.1002/bdrb.21121>
- Reis, E.M., Rezende, A.A.A., Santos, D.V., Oliveria, P.F., Nicolella, H.D., Tavares, D.C., Silva, A.C.A., Dantas, N.O., Spanó, M.A., 2015. Assessment of the genotoxic potential of two zinc oxide sources (amorphous and nanoparticles) using the in vitro micronucleus test and the in vivo wing somatic test. *Food Chem. Toxicol.* 84, 55-56.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.07.008>
- Reis, E.M., Rezende, A.A.A., Oliveira, P.F., Nicolella, H.D., Tavares, D.C., Silva, A.C.A., Dantas, N.O., Spanó, M.A., 2016. Evaluation of titanium dioxide nanocrystal-induced genotoxicity by the cytokinesis-block micronucleus assay and the *Drosophila* wing spot test. *Food Chem. Toxicol.* 96, 309-319. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.023>
- Ribeiro, A.G., Cruz, L.P., Marchi, K.C., Tirapeli, C.R., Miasso, A.I. 2014. Antidepressants: use, adherence and awareness among medical students. *Cien. & Sau. Colet.*, 19, 1825-1833. <https://doi.org/10.1590/1413-81232014196.06332013>
- Roberts, D.B., 2006. *Drosophila melanogaster*: the model organism. *Entomol. Exp. Appl.* 121, 93–103. <https://doi.org/10.1111/j.1570-8703.2006.00474.x>
- Sager, J.E., Price, L.S., Isoherranen, N., 2016. Stereoselective Metabolism of Bupropion to OH-bupropion, Threohydrobupropion, Erythrohydrobupropion, and 4'-OH-bupropion in vitro. *Drug Metab Dispos.* 44, 1709-1719. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.072363>

- Shah, D., Shah, A., Tan, X., Sambamoorthi, U., 2017. Trends in utilization of smoking cessation agents before and after the passage of FDA boxed warning in the United States. *Drug Alcohol Depend.* 177, 187–193.  
<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.03.021>
- Siddique, H.R., Chowdhuri, D.K., Saxena, D.K., Dhawan, A., 2005. Validation of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. *Mutagenesis.* 20, 285-290.  
<https://doi.org/10.1093/mutage/gei032>
- Sinigaglia M., Lehmann, M., Baumgardt, P., Amaral, V.S., Dihl, R.R., Reguly, M.L., De Andrade, H.H. 2006. Vanillin as a modulator agent in SMART test: inhibition in the steps that precede N-methyl-N-nitrosourea-, N-ethyl-N-nitrosourea-, ethylmethanesulphonate- and bleomycin-genotoxicity. *Mutat Res.* 607, 225-230. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.04.012>
- Smales, E.T., Edwards, B.A., Deyoung, P.N., McSharry, D.G., Wellman, A., Velasquez, A., Owens, R., Orr, J.E., Malhotra, A., 2015. Trazodone Effects on Obstructive Sleep Apnea and Non-REM Arousal Threshold. *Ann Am Thorac Soc.* 12, 758-64. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201408-399OC>
- Spanó, M.A., Graf, U., 1998. Segundo taller sobre Smart: un método para detectar las actividades mutagénica y recombinogénica en células somáticas de *Drosophila*, en la Universidad Federal de Uberlandia (MG) Brasil. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 14, 111-114.
- Taziki, S., Sattari, M.R., Eghbal, M.A., 2013. Mechanisms of trazodone-induced cytotoxicity and the protective effects of melatonin and/or taurine toward freshly isolated rat hepatocytes. *J Biochem Mol Toxicol.* 27, 457-62.  
<https://doi.org/10.1002/jbt.21509>
- Then, C.K., Chi, N.F., Chung, K.H., Kuo, L., Liu, K.H., Hu, C.J., Shen, S.C., Lin, Y.K., 2017. Risk analysis of use of different classes of antidepressants on



subsequent dementia: A nationwide cohort study in Taiwan. PLoS ONE. 12, 4: e0175187.

Vanderkooy, J.D., Kennedy, S.H., Bagby, R.M., 2002. Antidepressant side effects in depression patients treated in a naturalistic setting: a study of bupropion, moclobemide, paroxetine, sertraline, and venlafaxine. Can J Psychiatry. 47, 174-80. <https://doi.org/10.1177/070674370204700208>

Vasconcelos, M.A., Orsolin, P.C., Silva-Oliveira, R.G., Nepomuceno, J.C., Spanó, M.A., 2017. Assessment of the carcinogenic potential of high intense-sweeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. Food Chem Toxicol. 101, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.028>

Wen, B., Ma, L., Rodrigues, A.D., Zhu, M., 2008. Detection of Novel Reactive Metabolites of Trazodone: Evidence for CYP2D6-Mediated Bioactivation of m-Chlorophenylpiperazine. Drug Metab Dispos. 36, 841-850. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.019471>

WHO, 2017. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva, Switzerland. World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Wu, C.S., Shau, W.Y., Chan, H.Y., Lee, Y.C., Lai, Y.J., Lai, M.S., 2012. Utilization of antidepressants in Taiwan: a nationwide population-based survey from 2000 to 2009. Pharmacoepidemiol Drug Saf, DOI: 10.1002/pds.

Yilmaz, E.A., Unal, F., Yuzbasioglu, D., 2016. Evaluation of cytogenetic and DNA damage induced by the antidepressant drug-active ingredients, trazodone and milnacipran, in vitro. Drug and Chemical Toxicology. 40, 57-66. <https://doi.org/10.1080/01480545.2016.1174870>

Zitron, E., Kiesecker, C., Scholz, E., Luck, S., Bloehs, R., Kathofer, S., Thomas, D., Kiehn, J., Kreye, V.A.W., Katus, H.A., Schoels, W., Karle, C.A., 2004.

Inhibition of cardiac HERG potassium channels by the atypical antidepressant trazodone. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 370, 146-156. <https://doi.org/10.1007/s00210-004-0952-3>