Desafios da Prevenção, Diagnóstico, Tratamento e Cuidado na Sociedade Moderna

SAÚDE MENTAL

Edição XXIV

Capítulo 5

SAÚDE MENTAL NO ENVELHECIMENTO: IMPACTO DO ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E USO DE BENZODIAZEPÍNICOS

GRAZIELA MORO MEIRA[1]
NATHÁLIA CARDOSO DE AFONSO BONOTTO[2]
LARA CELESTINA SANTOS[1]
HENRIQUE DUMKE DENARDIM[1]
ÉRICA DOS SANTOS DA SILVA[1]
CAROLINE PRADRO REHBEIN[3]
CINDY SUELY DA SILVA MEDEIROS[4]
ELIZE APARECIDA SANTOS MUSACHIO[5]
IVANA BEATRICE MÂNICA DA CRUZ[6]
FERNANDA BARBISAN[7]

1. Discente - Farmácia na Universidade Federal de Santa Maria.
2. Discente – Doutoranda em Farmacologia na Universidade Federal de Santa Maria.
3. Discente – Medicina na Universidade Federal de Santa Maria.
4. Discente – Mestranda de Gerontologia na Universidade Federal de Santa Maria.
5. Docente – Doutorado em Bioquímica na Universidade Federal do Pampa.
6. Docente – Pós – Doutorado em Genética e Biologia Molecular University of Califórnia, Davis-USA
7. Docente – Pós- Doutorado em Gerontologia e Farmacologia pela Universidade Federal de Santa Maria.

Palavras-Chave: *Envelhecimento; Estresse; Oxidação.*

DOI 10.59290/978-65-6029-247-5.5

EDITORA PASTEUR

INTRODUÇÃO

A expectativa média de vida vem crescendo. O número de pessoas idosas (consideradas aquelas com mais de sessenta anos de idade em países subdesenvolvidos e com mais de 65 anos em países desenvolvidos) está aumentando mais rapidamente do que os grupos etários mais jovens em todo o mundo. Espera-se que o grupo de pessoas idosas no planeta cresça de 761 milhões em 2021 para 1,6 milhões em 2050, de acordo com estimativas das Nações Unidas. Essa mudança na pirâmide etária vem ocorrendo, principalmente, por conta do avanço da ciência que proporcionou melhores cuidados médicos, saneamento básico, alimentos, higiene, habitação e estilo de vida. Além disso, à medida que as cidades se urbanizam, é observada uma diminuição da taxa de fecundidade, conforme apontado pelo censo demográfico brasileiro de 2018, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018; OLIVEIRA, 2018; NU DESA, 2023).

No Brasil, segundo dados do IBGE (2022), a população idosa, de 60 anos ou mais de idade, que era de 2,95 milhões de pessoas em 1970, passou para 22,2 milhões de pessoas em 2022, o que representa um salto de 7,5 vezes em 52 anos. Também puderam observar que os idosos de idade mais avançada, aqueles de 80 anos ou mais, eram 451 mil indivíduos e passaram para 4,6 milhões de indivíduos, crescendo entre 1970 e 2022 (IBGE, 2018)

O envelhecimento é caracterizado como um processo natural, dinâmico e irreversível, caracterizado por alterações fisiológicas, como a mudança na composição corporal e o acúmulo de danos moleculares no DNA. Esses danos contribuem para mutações, morte celular, senescência e inflamação, favorecendo o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), incluindo transtornos neurodegenerativos e psiquiátricos, como a ansiedade (BRASIL, 2023; BAANDRUP *et al*., 2018). A ansiedade está associada ao estresse oxidativo e pode resultar de fatores genéticos, neurobiológicos e ambientais, sendo frequente em idosos, o que impacta sua qualidade de vida e aumenta o risco de isolamento social (NASCIMENTO *et al*., 2022).

O tratamento com benzodiazepínicos (BDZs), amplamente utilizado na população idosa, é alvo de preocupações devido ao uso prolongado, que pode levar a comprometimento motor e cognitivo, aumentando o risco de quedas e déficits de memória (FROTA *et al*., 2023). Entidades de saúde recomendam a restrição do uso desses fármacos, enfatizando a necessidade de alternativas terapêuticas (MAUSTET *et al*., 2022; SANABRIA *et al*., 2021). Estudos *in vitro* permitem avaliar a toxicidade dessas substâncias em células neuronais, sendo a rotenona um agente amplamente utilizado para induzir o envelhecimento celular por meio da disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (MASTELLA *et al*., 2022; BONOTTO, 2022).

A partir desse reconhecimento o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do Clonazepam em marcadores cito-genotóxicos de células neuronais humanas (SH-SY5Y) expostas à rotenona um pesticida natural de amplo espectro.

MÉTODO

Trata-se de um estudo experimental *in vitro* conduzido nas dependências do Laboratório de Biogenômica, do centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

1. DESENHO EXPERIMENTAL

Inicialmente, foi realizada uma curva farmacológica para a escolha da concentração do fármaco Clonazepam a ser utilizada na fase

seguinte deste experimento. Para tanto, a linhagem celular SH-SY5Y (células neuronais) foi exposta à diferentes concentrações do fármaco Clonazepam (0,1; 0,5; 2,5; 5; 10 e 20 µg/L) e, após 24 e 72 horas, foi realizado o ensaio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) para avaliação da citotoxicidade e da proliferação celular, respectivamente.

A escolha das concentrações de Clonazepam a serem testadas baseou-se no estudo de Kruizinga *et al*. (2021) que investigou a farmacocinética do Clonazepam na saliva e plasma de 20 indivíduos adultos saudáveis com idade entre 18 e 30 anos. Os pesquisadores administraram uma única dose de 0,5 mg ou 1,0 mg de solução de Clonazepam dissolvida em limonada. Após 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 e 48 horas, amostras de plasma e saliva foram coletadas e os níveis de Clonazepam quantificados. O estudo permitiu conhecer os níveis plasmáticos deste psicofármaco. Como o meio de cultivo *in vitro* mimetiza condições plasmáticas e teciduais, as concentrações do Clonazepam descritas no estudo (µg/L) apresentaram uma variação entre 2,3 µg/L a 13,7 µg/L. Com base neste estudo, considerando que idosos podem apresentar menor taxa de depuração do Clonazepam, o que aumenta os níveis plasmáticos deste fármaco, neste estudo testamos as seguintes concentrações já citadas: 0,1; 0,5; 2,5; 5; 10 e 20 µg/L.

Considerando que células não têm capacidade de metabolizar o Clonazepam e que este fármaco permaneceu com níveis plasmáticos relativamente estáveis em 24h nos voluntários testados no estudo de referência, foram conduzidos protocolos em culturas de 24h e 72h conforme o tipo de análise a ser feita. A concentração escolhida foi aquela que não resultou em morte celular significativa em relação ao grupo controle (não-tratado) e/ou induziu o aumento da proliferação celular após 72h.

Após a escolha da concentração do Clonazepam, será iniciada a segunda etapa deste experimento, em que as células neuronais foram expostas à um modelo de senescência *in vitro*, utilizando o pesticida rotenona 30 nM (MACHADO *et al*., 2016). De forma concomitante, foram tratadas com o fármaco Clonazepam na concentração de 5 µg/L, dando origem aos seguintes grupos de tratamento:

- Controle (células tratadas apenas com meio);
- Rotenona 30 nM;
- Clonazepam 5 µg/L;
- Rotenona 30 nM + Clonazepam 5 µg/L.

Após o tratamento, as células foram incubadas por 24 e 72 horas, a fim de avaliar o efeito agudo e crônico de exposição ao fármaco em células envelhecidas e, após esse período foram realizadas análises de viabilidade celular via teste MTT e alterações cromossômicas pelo teste 4',6'- diamino-2-fenil-indol (DAPI).

1.1 Cultivo Celular

A linhagem comercial de células SH-SY5Y foi obtida comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivada em meio DMEM/ F-12, suplementado com 15% de soro bovino fetal, 1% de antibióticos (penicilina/ estreptomicina) e 1% de antifúngico (anfotericina B). As células permaneceram em cultivo celular em condições estéreis em incubadora apropriada a 37°C com saturação de 5% de CO_2. O cultivo foi feito em frascos apropriados e as células foram sub cultivadas cada vez que atingiam a confluência máxima de 80%, para a realização dos testes.

1.2 Preparo dos tratamentos

O fármaco Clonazepam, produzido pelo Laboratório Teuto, foi adquirido comercialmente na concentração de 2,5 mg/L sob a forma de solução oral em gotas. A diluição do fármaco foi feita em meio DMEM/ F-12 até que se atingissem as concentrações testadas neste estudo. A rotenona (P.M. 394,4 g/mol), adquirida da empresa Sigma-Aldrich, devido à sua caracte-

rística hidrofóbica, foi diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%, visto que, na maioria das culturas celulares, as concentrações de DMSO entre 0,1% e 10% não interferem no metabolismo das células.

1.3 Tratamento das células

As células neuronais foram plaqueadas em placas para cultivo de células em uma concentração de $1x10^4$células/mL. Após 24 horas do plaqueamento (tempo necessário para a aderência e ambientação das células), foi realizado o tratamento seguindo o planejamento experimental supra-citado. O tratamento das células com as soluções de clonazepam 5 µg/L e rotenona 30 nM foi feito de forma concomitante. Foi realizado um grupo controle positivo apenas com DMSO 0,5% para os testes em que a rotenona foi utilizada. Passadas 24h de tratamento foi realizado o ensaio MTT para análise da viabilidade celular, e após 72h de exposição das células aos tratamentos foi realizada a análise da proliferação celular via MTT e das alterações nucleares via teste micronúcleo utilizando o corante DAPI.

1.4 Análises experimentais

1.4.1 Ensaio de Viabilidade e Proliferação Celular

O ensaio MTT consiste em uma análise espectrofotométrica amplamente utilizada para determinar a viabilidade e a proliferação celular em culturas de 24 e 72h, respectivamente. A viabilidade das células é testada por este ensaio devido à capacidade que células metabolicamente ativas possuem de reduzir o MTT (um sal de coloração amarela) em formazan, este que possui coloração arroxeada e é insolúvel em água. Resumidamente, o reagente MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvido em 5 mg/mL de PBS 1x. Para este ensaio, as células expostas aos tratamentos foram incubadas por 1h com o reagente MTT. Depois disso, o sal de formazan foi dissolvido com DMSO e a absorbância foi medida a 570 nm (BARBISAN *et al*., 2017).

1. 4. 2 Ensaio de Genotoxicidade:

Este método, descrito por Filippi-Chiela *et al*. (2012), visa avaliar a frequência de alterações nucleares, como a presença de micronúcleos (MN), os quais se formam durante a interfase celular, sendo de mesma coloração e de tamanho não superior a um terço do núcleo principal, bem como a ocorrência de núcleos dismórficos (com formato alterado), não disjunção nuclear e de células esféricas. A medição do tamanho e forma dos núcleos celulares, permite inferir mecanismos de senescência, apoptose e irregularidades nucleares. Para tanto, as células tratadas foram coradas com o corante DAPI, um corante fluorescente que se liga ao DNA celular, e, após, foram obtidas imagens em microscópio de fluorescência (filtro azul), com aumento de 100X. Após a obtenção das imagens, a proporção de alterações nucleares foi determinada em cada tratamento, utilizando o software Image J. As alterações foram pontuadas a partir da contagem de 100 células por 2 pesquisadores que observaram as lâminas de forma independente e, ao final, foi feita a comparação estatística entre os grupos tratados e controle.

2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações estatísticas foram realizadas utilizando dados previamente normalizados por porcentagem em relação ao grupo controle, método utilizado para análises in vitro, permitindo a comparação de dados obtidos, conforme preconizado no Documento de Orientação da OCDE sobre Boas Práticas do Método In vitro (2018). As comparações estatísticas foram feitas usando o software GraphPad Prism (versão 9.0), através da análise de variância unidirecional ou bidirecional (ANOVA) segui-

da pelo teste post hoc de Tukey ou Dunnet. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$, evidenciando média e ± desvio padrão (DP).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos do Clonazepam sobre a viabilidade e proliferação de células neuronais SH-SY5Y foram avaliados por meio do ensaio MTT. Inicialmente, a escolha da concentração do fármaco foi baseada naquelas que não comprometeram a viabilidade celular e que aumentaram a proliferação neuronal. Como demonstrado na **Figura 5.1**, a concentração de 5 µg/L não apresentou diferença significativa em relação ao controle. Para a proliferação celular, as concentrações de 0,5, 2,5, 5 e 20 µg/L induziram um aumento, sendo a de 5 µg/L escolhida por atender ambos os critérios (**Figura 5.2**).

Figura 5.1 Ensaio MTT – Viabilidade Celular

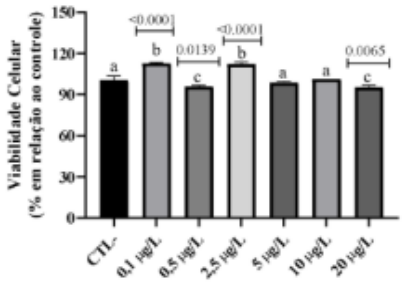
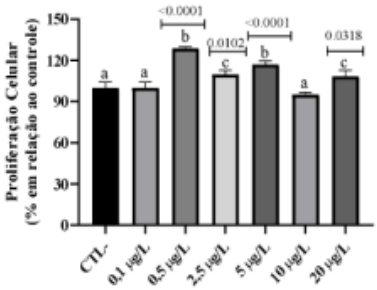


Figura 5.2 Ensaio MTT – Proliferação Celular



Ao avaliar a viabilidade das células tratadas com Clonazepam e rotenona (ROT), observou se que a ROT induziu uma queda significativa, conforme esperado (**Figura 5.3**). O Clonazepam isolado também reduziu a viabilidade, embora de forma mais branda. Quando administrados concomitantemente (ROT + CLO), a redução da viabilidade celular foi ainda mais acentuada, sugerindo um efeito sinérgico entre os com-postos. A análise de proliferação celular após 72h mostrou que, isoladamente, nem a ROT nem o CLO afetaram significativamente esse marcador em relação ao controle (**Figura 5.4**). No entanto, o tratamento combinado resultou em uma queda expressiva na proliferação, sugerindo que a interação dessas substâncias pode comprometer a capacidade proliferativa neuronal, reforçando a hipótese de prejuízos acentuados em neurônios envelhecidos.

Figura 5.3 Resultado do teste MTT em 24 horas

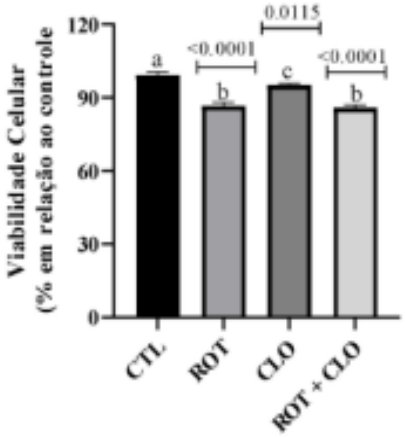
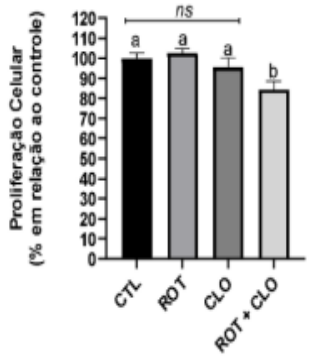
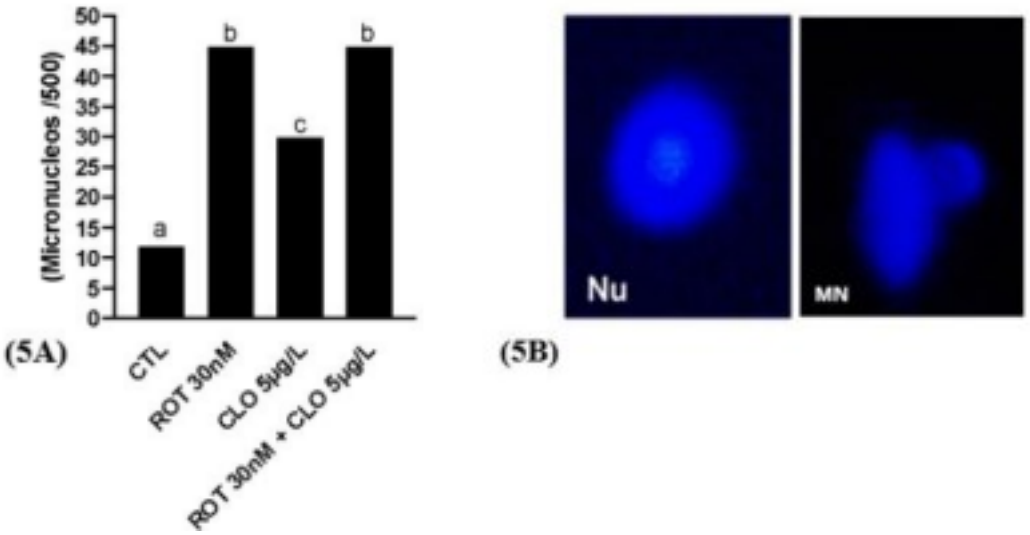


Figura 5.4 Resultado do teste MTT em 72 horas



O ensaio DAPI evidenciou que o tratamento com Clonazepam isolado aumentou alterações nucleares, sendo o efeito intensificado no grupo ROT (**Figura 5.5A**). A formação de micronúcleos foi ainda maior no grupo ROT + CLO, indicando danos mais severos ao DNA. As imagens microscópicas (**Figura 5.5B**) corroboram esses achados, mostrando diferenças morfológicas entre células intactas e aquelas com micronúcleos.

Figura 5.5A / Figura 5.5B Identificação de alterações nucleares através do teste DAPI



A redução da viabilidade celular observada nos grupos expostos à rotenona está associada à disfunção mitocondrial e ao aumento do estresse oxidativo, conforme relatado por Tanaka *et al*. (2022). Esse estresse pode gerar ânions superóxidos que danificam o DNA, desencadeando apoptose (DA CRUZ *et al*., 2023). O aumento da formação de micronúcleos pelo Clonazepam sugere potencial genotóxico, corroborando achados de Jesus e Zamberlam (2018) para outros benzodiazepínicos. Esse efeito pode ser mais acentuado em células envelhecidas, que apresentam maior acúmulo de danos e menor capacidade de reparo.

No que diz respeito à proliferação celular, o aumento observado com a rotenona pode estar relacionado à ativação de vias inflamatórias e resposta de reparo (ROBBINS, 2023). No entanto, o Clonazepam reduziu essa proliferação, possivelmente devido ao seu efeito inibitório sobre a atividade neuronal, como sugerido por Olney *et al*. (2002). Esse efeito foi ainda mais pronunciado quando administrado com rotenona, sugerindo que neurônios comprometidos pelo envelhecimento podem ser particularmente vulneráveis ao Clonazepam.

Os achados destacam a importância de considerar os impactos celulares do Clonazepam em neurônios comprometidos pelo envelhecimento, levantando questões sobre seu uso prolongado em populações idosas. Estudos adicionais são necessários para compreender melhor os mecanismos envolvidos e suas implicações clínicas.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que, tanto o tratamento de forma concomitante, quanto de forma isolada com rotenona e Clonazepam resultou na intensificação da dimi-

nuição da viabilidade celular em células da linhagem SH-SY5Y em relação àquelas não tratadas. Já em relação a proliferação celular, somente células tratadas concomitantemente com Clonazepam e rotenona tiveram queda significativa neste marcador.

Por fim, os resultados do ensaio micronúcleo (dano no DNA) mostraram que, em células envelhecidas, o fármaco Clonazepam é responsável por acentuar a formação de micronúcleos, exacerbando os danos nesse grupo celular. Portanto, apesar de serem necessários mais estudos, tendo em vista as limitações das pesquisas *in vitro*, esta pesquisa corrobora evidências anteriores apontando para a necessária cautela no uso contínuo de BDZs, especialmente em populações idosas. Mais estudos precisam ser realizados *in vitro* e *in vivo* para que seja elucidado o mecanismo relacionado aos danos ao DNA induzidos pelo Clonazepam em neurônios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAANDRUP L *et al*. Pharmacological interventions for benzodiazepine discontinuation in chronic benzodiazepine users. Cochrane Database Systematic Reviews. v. 3, n.3 p. 1. 2018. Doi: 10.1002/14651858.CD011481.pub2

BONOTTO, N.C.A. *et al* Efeito do ânion superóxido em marcadores de senescência proliferativa e funcional de fibroblastos dérmicos humanos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, 2022.

FROTA IJ *et al*. Transtornos de ansiedade: histórico, aspectos clínicos e classificações atuais. Journal of Health and Biological Sciences. v. 10, n. 1, p. 1, 2022.

IBGE- Organização Pan-Americana da Saúde. Depressão. Disponível em: IBGE divulga as Estimativas de População dos municípios para 2018. Agência de Notícias.

MACHADO, A. K. *et al*. Neuroprotective Effects of Açaí (Euterpe oleracea Mart.) against Rotenone In Vitro Exposure. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2016, p. 8940850, 2016. Doi: 10.1155/2016/8940850.

MASTELLA *et al*. Papel evolutivo da disfunção mitocondrial farmacologicamente induzida pela rotenona em alterações oxiinflamatórias e comportamentais de Eisenia fetida. Programa de Pós Graduação - UFSM. p. 17. 2022.

NU DESA. Department of Economic and Social Affairs. Disponível em: UN DESA Annual Highlights Report 2023-2024. DESA Publications.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Relatório mundial de envelhecimento e saúde. Genebra: OMS, 2020. Disponível em: OMS divulga relatório sobre envelhecimento e saúde - SBGG

VICENTI DE OLIVEIRA D. *et al* OS FATORES SOCIODEMOGRÁFICOS E DE SAÚDE SÃO INTERVENIENTES NO NÍVEL DE ANSIEDADE DE IDOSOS DA ATENÇÃO BÁSICA À SAÚDE?. Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde (2018). v. 7, n. 2, p. 181, 2018. Doi:10.33362/ries.v7i2.1444