

ESTUDO DOS EFEITOS DA IMIPRAMINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR PERÓXIDOS EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA (NEURO-2A)

Gemima Samara Bezerra Vanderley¹; Tiago Rodrigues²

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: gemimasamara@terra.com.br¹

Professor da Universidade Federal do ABC; e-mail: tiago.rodrigues@ufabc.edu.br²

Área do Conhecimento: Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chave: Imipramina, estresse oxidativo, mitocôndria, morte celular, Neuro-2A.

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é uma condição importante em muitos processos celulares, participando como causa ou conseqüência de diversos processos patológicos, tais como neoplasias, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas. Sabe-se que a mitocôndria gera radicais livres durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória. O aumento da produção dessas espécies está associado a danos oxidativos em proteínas, lipídeos e DNA, e conseqüentemente, distúrbios no metabolismo energético, perda da homeostase de cálcio e exacerbação da geração de espécies reativas. Entretanto, tem se discutido a participação de espécies reativas geradas em pequenas quantidades na célula como reguladores de processos celulares. Segundo a literatura, as fenotiazinas e os antidepressivos tricíclicos são capazes de modular diversos processos mitocondriais.

A imipramina, um antidepressivo tricíclico, faz parte de uma lista de 1040 compostos com ação sobre a transição de permeabilidade mitocondrial em mitocôndrias isoladas, podendo inibir este processo. Estudos demonstram que a imipramina é capaz de promover desacoplamento da fosforilação oxidativa, proteger a mitocôndria contra o inchamento osmótico induzido por cálcio ou condições de estresse oxidativo ou nitrosativo por meio da inibição da NO sintase e aumento da atividade de enzimas antioxidantes como catalase e superóxido dismutase. Foi mostrado ainda um aumento na proliferação e reparação de neurônios após isquemia cerebral transiente pela imipramina. Com base nos vários efeitos desse fármaco sobre o funcionamento mitocondrial e conseqüentemente celular, torna-se importante estudar os efeitos da imipramina em um modelo de células neuronais em condições normais e condições de estresse oxidativo, investigando a participação da mitocôndria no efeito observado.

OBJETIVOS

Considerando que são relatados vários efeitos da imipramina sobre o funcionamento mitocondrial e conseqüentemente celular, o objetivo deste projeto foi estudar os efeitos da imipramina sobre a viabilidade de células de neuroblastoma de rato (Neuro-2A), em condições normais e condições de estresse oxidativo promovido por peróxidos (*t*-butilhidroperóxido ou peróxido de hidrogênio), investigando a participação da mitocôndria no efeito observado.

METODOLOGIA

A imipramina foi adquirida comercialmente de Sigma Chem Co. (St. Louis, MO, USA) e a partir deste foram preparadas diluições aquosas desta substância. As células Neuro-2A foram cultivadas em meio DMEM *high glucose* (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA), suplementado com soro bovino fetal 10% (v/v) (Gibco), glutamina 2 mmol/L,

penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 µg/ml, pH 7,2, em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. A viabilidade celular foi determinada através da redução do teste de redução do 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan (MTT), no qual as células viáveis são capazes de reduzir o corante originando cristais de formazan, com absorvância em 570 nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle sem adição de imipramina ou peróxidos, considerada como 100 %. O conteúdo de glutatona reduzida (GSH) foi estimado espectrofluorimetricamente (Hitachi F2500, Tóquio, Japão) nos comprimentos de onda 350/420 nm (excitação/emissão) utilizando *o*-ftaldialdeído (OPT) como indicador. O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) das células (1×10^6) permeabilizadas com digitonina 0,004 %, foi avaliado espectrofluorimetricamente utilizando rodamina 123 nos comprimentos de onda de 505 e 535nm, excitação e emissão respectivamente (IMBERTI *et al.*, 1993).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incubação das células Neuro-2A com imipramina em diferentes tempos de exposição mostrou que este fármaco possui baixa citotoxicidade, sendo que na maioria das concentrações testadas a viabilidade se manteve maior que 90%, e apenas nas concentrações superiores a 100 µmol/L em maiores tempos de incubação a viabilidade foi menor que 90%.

Como esperado, a exposição aos agentes oxidantes H₂O₂ ou a *t*-BOOH resultou em diminuição da viabilidade das células Neuro-2A de forma concentração dependente, sendo este efeito maior quando expostas a H₂O₂. Porém, a análise dos resultados obtidos nos diferentes tempos de incubação utilizados mostrou que essas células são afetadas de forma aguda, ou seja, o efeito do peróxido sobre a viabilidade celular é maior em tempos de incubação menores (2 horas) do que quando as células são incubadas por tempos maiores (24 ou 48 horas) com o agente agressor, este parece ser eliminado e as células que permaneceram viáveis se multiplicaram novamente. Estes resultados sugerem que as células são capazes de sobreviver à exposição tóxica ao peróxido de hidrogênio ou metabolizá-lo em produtos menos tóxicos, voltando a se multiplicar após 24 e 48 horas. Foi observado também aumento na quantidade de GSH nas células Neuro-2A em tempos prolongados de exposição aos agentes oxidantes de 6h para 24h (**Figura 2**). Tal aumento não foi observado durante a incubação com a imipramina. Esta possível indução da síntese de glutatona por agentes oxidantes já descrita na literatura em outros modelos celulares (RAHMAN, *et al.*, 1996), provavelmente tenha contribuído para a menor citotoxicidade dos peróxidos em tempos prolongados de exposição.

Foi avaliado também o efeito da imipramina e dos peróxidos sobre o potencial de membrana mitocondrial nas células Neuro-2A, monitorando-se as alterações de fluorescência da rodamina 123 em células permeabilizadas com digitonina. Utilizou-se o desacoplador CCCP 2 mmol/L para a dissipação total do potencial de membrana mitocondrial. Os resultados obtidos mostraram que os peróxidos não possuem efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial destas células, porém, a imipramina possui a capacidade de dissipar parcialmente o potencial de membrana mitocondrial de forma concentração-dependente.

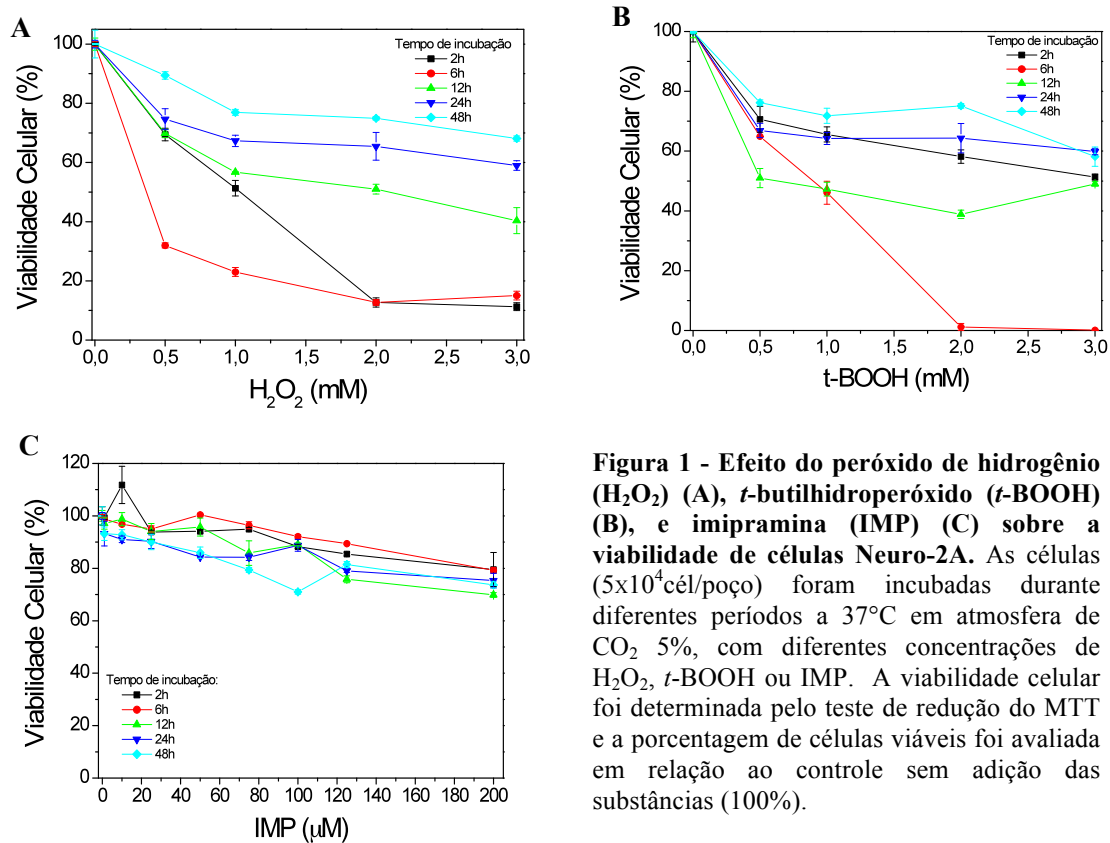


Figura 1 - Efeito do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (A), *t*-butilhidroperóxido (*t*-BOOH) (B), e imipramina (IMP) (C) sobre a viabilidade de células Neuro-2A. As células (5x10⁴ cél/poço) foram incubadas durante diferentes períodos a 37°C em atmosfera de CO₂ 5%, com diferentes concentrações de H₂O₂, *t*-BOOH ou IMP. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de redução do MTT e a porcentagem de células viáveis foi avaliada em relação ao controle sem adição das substâncias (100%).

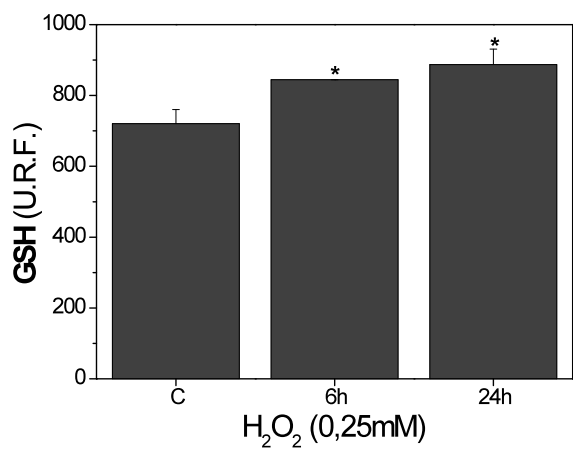


Figura 2 - Efeito da imipramina e peróxidos sobre aos níveis de GSH de células Neuro-2A. As células (5x10⁵/poço) foram incubadas por 6 h e 24h com 0,25mM de H₂O₂. Os níveis de GSH foram estimados fluorimetricamente utilizando OPT como indicador. * Significativamente diferente do controle p<0,05.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até o presente permitiram caracterizar os efeitos isolados de cada substância utilizada sobre a viabilidade das células Neuro-2A, mostrando que a imipramina possui baixa citotoxicidade para essa linhagem e que há uma diferença de susceptibilidade em condições de estresse oxidativo induzido tanto por H₂O₂ quanto por *t*-BOOH, sendo que H₂O₂ foi mais citotóxico. Os resultados sugerem possível indução da síntese de glutatona induzida pelo estresse oxidativo capaz de proteger as células em

tempos prolongados de exposição. Além disso, a imipramina, mas não os peróxidos, dissipou o potencial de membrana mitocondrial de forma concentração-dependente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, J.K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nature Medicine**, v. 10, n. 7, suplemento, p. 518-525, jul. 2004.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, jan. 2002.

IMBERTI, R.; NIEMINEN, A-L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J.J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 265, p. 392-400, 1993.

KOWALTOWSKI, A.J.; SOUZA-PINTO, N.C.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 333-343, ago. 2009.

KUMAR, A. Nitric oxide mechanism in protective effect of imipramine and venlafaxine against acute immobilization stress-induced behavioral and biochemical alteration in mice. **Neuroscience Letters**, v. 467, n. 2, p. 72-75, dez. 2009.

RAHMAN, I., BEL, A., MULIER, B., LAWSON, M.F., HARRISON, D.J., MACNEE, W., SMITH, C.A.D. Transcriptional Regulation of g-Glutamylcysteine Synthetase-Heavy Subunit by Oxidants in Human Alveolar Epithelial Cells. **Biochemical and Biophysical Research**. v. 229. p. 832-837, nov. 1996.

SCHIAVON, A.P.; MILANI, H.; ROMANINI, C.V.; FORESTI, M.L.; CASTRO, O.W.; CAIRASCO, N.G.; OLIVEIRA, R.M.W. Imipramine enhances cell proliferation and decreases neurodegeneration in the hippocampus after transient global cerebral ischemia in rats. **Neuroscience Letters**, v. 470, n.1, p. 43-48, fev. 2010.

ZHANG, W.H.; WANG, H.; WANG, X.; NARAYANAN, M.V.; STAVROVSKAYA, I.G.; KRISTAL, B.S.; FRIEDLANDER, R.M. Nortriptyline Protects Mitochondria and Reduces Cerebral Ischemia/Hypoxia Injury. **Stroke**, v.39, n.2, p.455-462, fev. 2008.