



Bolsista PIBITI-Cnpq

Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e do estresse oxidativo e nitrosativo em células de micróglia BV-2 tratadas com diferentes classes de fármacos antidepressivos

Dep-like

Carolina Maccari, Marina Rigotti, Fernando Joel Scariott, Sérgio Echeverrigaray, Mirian Salvador.



INTRODUÇÃO / OBJETIVO

A depressão é uma doença neuropsiquiátrica que afeta cerca de 280 milhões de pessoas em todo mundo. Várias classes de fármacos antidepressivos são utilizadas para o tratamento da depressão e existem evidências da relação entre o uso destes e a geração de estresse oxidativo/nitrosativo. Estes danos estão associados à uma diminuição do metabolismo neuronal, disfunção mitocondrial, diminuição da função cognitiva e morte celular. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi verificar os efeitos dos fármacos antidepressivos Bupropiona, Imipramina, Paroxetina, Trazodona e Venlafaxina, sobre o estresse oxidativo, nitrosativo e produção de espécies reativas de oxigênio em células gliais BV-2.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura de células e tratamentos:



Tratamento com fármacos Bupropiona, Imipramina, Paroxetina, Trazodona e Venlafaxina, durante 1h (50µg/ml e 10 µg/ml).

Preparo das amostras para testes

Células após os tratamentos de 1h com fármacos em garrafão soltas com tripsina.

Sobrenadante descartado pellet suspenso em PBS.

Lisado celular

Utilizado o tampão RIPA na presença de inibidores de protease.

Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

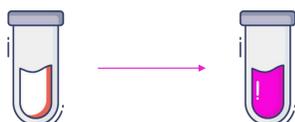
Avaliada por citometria de fluxo, utilizando a sonda 2'7'diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA).



O conteúdo total de proteínas foi determinado usando albumina bovina como padrão.

Peroxidação lipídica

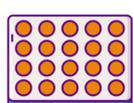
Forma composto colorido após reagir ao ácido tiobarbitúrico.



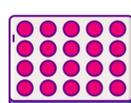
Avaliada através da produção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Produção de Óxido Nítrico

O sobrenadante celular foi adicionado ao reagente de Griess (1:1).



10 minutos incubado



Leitura a 550 nm. Os resultados foram apresentados como porcentagem de controle.

Análise estatística:

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição paramétrica ou não paramétrica dos dados. A significância estatística foi avaliada usando a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste post hoc de Tukey para dados paramétricos e Kruskal-Wallis para dados não paramétricos.

RESULTADOS

O ensaio de viabilidade celular (MTT) foi realizado previamente, a fim de avaliar a possível citotoxicidade dos fármacos. Observou-se que na concentração de 50 µg/ml, os fármacos Imipramina e Paroxetina demonstraram diminuição na viabilidade celular, diferente do encontrado para os demais fármacos. A partir destes dados, foi escolhida a concentração de 10 µg/ml para Imipramina e Paroxetina e de 50 µg/ml para os fármacos Bupropiona, Venlafaxina e Trazodona para a realização dos demais ensaios.

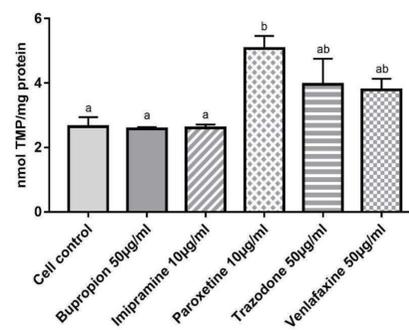


Figura 1. Danos oxidativos aos lipídios detectados pela técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Os resultados da figura 1 mostram os níveis de danos oxidativos aos lipídios, determinados através do ensaio de TBARS. Neste ensaio, os fármacos bupropiona (50 µg/ml) e imipramina (10 µg/ml) não demonstraram alteração em relação ao controle. Ao contrário paroxetina (10 µg/ml), trazodona (50 µg/ml) e venlafaxina (50 µg/ml), induziram danos oxidativos nas células gliais.

Os resultados da figura 2 mostram o estresse nitrosativo, avaliado pela determinação indireta de NO. Observou-se que a paroxetina induziu, um significativo aumento no estresse nitrosativo.

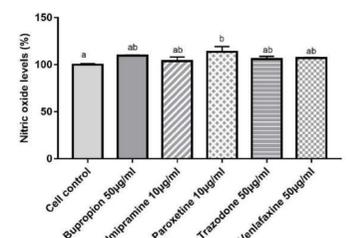


Figura 2. Níveis de óxido nítrico (NO) do sobrenadante celular.

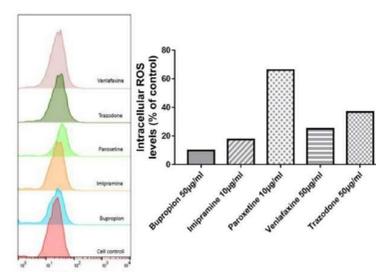


Figura 3. Níveis intracelulares de ROS de detecção por citometria de fluxo usando um ensaio DCFH-DA.

Os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) foram determinados por citometria de fluxo usando o ensaio DCFH-DA. Neste estudo (Figura 3), todos os fármacos foram capazes de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os fármacos paroxetina, trazodona e venlafaxina ocasionaram dano oxidativo nas células gliais, que o fármaco paroxetina ocasionou estresse nitrosativo e que todos os fármacos induziram a um aumento na produção de ROS. Embora mais estudos sejam necessários, estes dados permitem um melhor entendimento dos efeitos biológicos causados por medicamentos antidepressivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cunnane, Stephen; Nugent, Scott; Roy, Maggie; Courchesne-loyer, Alexandre; Croteau, Etienne; Tremblay, Sébastien; Castellano, Alex; Pifferi, Fabien; Bocti, Christian; Paquet, Nancy; Begdouri, Hadi; Bentourkia, M'hamed; Turcotte, Eric; Allard, Michèle; Barberger-gateau, Pascale; Fulop, Tamas; Rapoport, Stanley I; (2011) Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease.
- O H Lowry, N J Rosebrough, A L Farr, R J Randall; (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent.
- Maurya PK, Noto C., Rizzo LB, et al. (2016) O papel do estresse oxidativo e nitrosativo no envelhecimento acelerado e no transtorno depressivo maior. Progresso em Neuropsicofarmacologia e Psiquiatria Biológica.
- Green, L. C; Wagner, D A; Glogowski, J; Skipper, P L; Wishnok, J S; Tannenbaum, S R; (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. Analytical Biochemistry.
- Wills, E. D. (1966) Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. Biochemical Journal.