

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
AMILTON MARQUES**

**ESTUDO DOS EFEITOS DA IMIPRAMINA SOBRE A
BIOENERGÉTICA E ESTADO OXIDATIVO EM
MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO**

**Mogi das Cruzes, SP
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
AMILTON MARQUES**

**ESTUDO DOS EFEITOS DA IMIPRAMINA SOBRE A
BIOENERGÉTICA E ESTADO OXIDATIVO EM
MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação nível Mestrado em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Rodrigues

**Mogi das Cruzes, SP
2008**

FINANCIAMENTO: FAPESP, FAEP

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Marques, Amilton

Estudo dos efeitos da imipramina sobre a bioenergética e estado oxidativo em mitocôndrias isoladas de fígado de rato / Amilton Marques. – 2009.

69 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -
Universidade de Mogi das Cruzes, 2008

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Tiago Rodrigues

1. Mitocôndria - Imipramina 2. Mitocôndria -
Permeabilidade 3. Estresse oxidativo 4. Mitocôndria -
Transporte de cálcio I. Rodrigues, Tiago

CDD 619.93

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às dez horas do dia dezoito de dezembro de dois mil e oito, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Estudo dos efeitos da imipramina sobre a bioenergética e estado oxidativo mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Amilton Marques**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 50 (cinquenta), a saber: 26 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Tiago Rodrigues e Ivame Luis dos Santos Tersariol da Universidade de Mogi das Cruzes e Afonso Caricati Neto da Universidade Federal de São Paulo, sob a presidência do(a) primeiro(a), como orientador(a) da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADO por UNANIMIDADE
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/majoria)

Mogi das Cruzes, 19 de dezembro de 2008.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Tiago Rodrigues

Prof. Dr. Ivame Luis dos S Tersariol

Prof. Dr. Afonso Caricati Neto

Julgamento

APROVADO
(aprovado(a)/reprovado(a))

Aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))

APROVADO
(aprovado(a)/reprovado(a))

ADENDO

ADENDO À ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às dez horas do dia dezoito de dezembro de dois mil e oito, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Estudo dos efeitos da imipramina sobre a bioenergética e estado oxidativo mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Amilton Marques**.

Em adendo, o título da dissertação, conforme sugestão da banca, foi alterado para "Estudo dos efeitos da imipramina sobre a bioenergética e estado oxidativo em mitocôndrias isoladas de fígado de rato", o que deverá constar nas cópias definitivas da dissertação.

Mogi das Cruzes, 19 de dezembro de 2008


Prof.ª Dr.ª Regina LBC Oliveira
Coordenadora do Programa
Pós-Graduação em Biotecnologia

DEDICATÓRIA

Ao Grande Arquiteto do Universo, porque “ *Faz forte ao cansado e multiplica as forças ao que não tem nenhum vigor*” *Isaías 40:29*

À minha esposa Luciene pelo amor, carinho e cumplicidade sempre presentes. Apesar dos meus vários momentos de ausência.

Aos meus Pais Pedro e Maria pela educação, carinho e incentivo constantes.

....Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que fortaleceu-me os passos e guiou-me nesta difícil caminhada, tornando possível a realização dos meus objetivos;

Ao Prof. Dr. Tiago Rodrigues pela orientação, dedicação e apoio incondicional e ainda, pela amizade sincera e crescimento científico proporcionado.

À Universidade de Mogi das Cruzes pela oportunidade de aprimoramento e pelo apoio.

À FAPESP e FAEP pelo fomento e apoio financeiro que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa.

À Profa. Karla de M. F. Furtado (UNILAVRAS/MG) pela indicação do curso, apresentação do orientador e pela amizade.

À Profa. Dra. Maria Esperança R. Junqueira (UFLA/MG) pelo incentivo à pesquisa e pela amizade.

Aos Professores e funcionários do CIIB/UMC pelo conhecimento e ajuda fundamental na realização deste trabalho.

Aos Profs. Dr. Carlos Curti e Dr. Sérgio A. Uyemura (FCFRP/USP) pelas valiosas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Aos grandes amigos que fiz ao longo desta jornada: Thiago de S. Cruz, Priscila, Débora, Natália, Kátia, Tatiane Prieto, Cíntia, Guilherme, César, Carolina, Zaiane, Vivian, Felipe e Juliana. Agradeço não apenas pela amizade, mas também pelo apoio científico e conhecimento imprescindíveis.

Aos amigos de longa data Aloísio e Maria Lúcia sempre presentes e dispostos a ouvir e apoiar.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

... muito obrigado.

“ A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”

John Ruskin

RESUMO

Atualmente diversos estudos têm demonstrando a participação da mitocôndria em estados patológicos relacionados a distúrbios no metabolismo do ATP, homeostase celular de Ca^{2+} e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, é um consenso atual a participação da mitocôndria na morte celular por apoptose ou necrose. A mitocôndria também está intimamente envolvida em mecanismos de captação/liberação de cálcio (Ca^{2+}), processo este envolvido com a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), devido à abertura de um poro de transição de permeabilidade (PTP). Esta perda de seletividade da membrana mitocondrial parece ser modulada também pelo estado redox dos nucleotídeos de piridina e oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial. Assim, alguns trabalhos têm associado a ação de drogas psicoativas, como antidepressivos tricíclicos, entre eles a imipramina, à neuroproteção contra processos patológicos celulares envolvendo a TPM. Desta forma, neste trabalho foi avaliado o efeito da imipramina sobre parâmetros mitocondriais que envolvem a formação do PTP, tais como: inchamento mitocondrial, captação/liberação de Ca^{2+} , desacoplamento da respiração, potencial de membrana e estado redox. Os resultados demonstraram que a imipramina inibe totalmente a TPM induzida por diversos agentes pró-oxidantes (t-BOOH, Fe^{2+} /citrato e excesso de Ca^{2+}). Este evento parece estar correlacionado com a diminuição da geração mitocondrial de EROs devido a promoção de um leve desacoplamento da fosforilação oxidativa e um discreto efeito *scavenger* de ânions superóxido. A elucidação do mecanismo que envolve a proteção da TPM pela imipramina, bem como a atividade antioxidante demonstrada por esse composto neste trabalho, é de fato relevante para o aspecto farmacológico desta droga, principalmente considerando danos celulares neuronais em situações com envolvimento de disfunção mitocondrial e EROs, como, por exemplo, na isquemia/reperfusão.

Palavras-chaves: Imipramina, mitocôndria, permeabilidade mitocondrial, estresse oxidativo, transporte de cálcio mitocondrial.

ABSTRACT

Several studies have been demonstrating the role of the mitochondria in pathological conditions related to disorders of ATP metabolism, Ca^{2+} homeostasis and generation of reactive oxygen species (ROS). Besides, there is a general consensus on the role of the mitochondria in cell death through apoptosis or necrosis. Also, the mitochondria are closely related to mechanisms of calcium (Ca^{2+}) influx/release. This process is involved in the mitochondrial permeability transition (MPT), due to the opening of a permeability transition pore (PTP). The loss of selectivity of the mitochondrial membrane is apparently regulated by the redox status of pyridine nucleotides and the oxidation of thiol groups of mitochondrial membrane proteins. Therefore, some studies have found that psychoactive drugs, such as tricyclic antidepressants, including imipramine, may provide a neuroprotective effect against MPT-related cell pathological processes. In the present study, the effect of imipramine on the mitochondrial parameters related to PTP opening, such as: mitochondrial swelling, Ca^{2+} influx/release, respiratory uncoupling, membrane potential and redox status. The results showed that imipramine totally inhibits the MPT induced by several pro-oxidant agents (t-BOOH, Fe^{2+} /citrate and excessive Ca^{2+}). This event seems to be correlated to the decrease in the mitochondrial generation of ROS due to a slight uncoupling of oxidative phosphorylation and a mild scavenger effect of superoxide anions. The clarification of the mechanism of protection against mitochondrial permeability transition (MPT) produced by the imipramine, as well as the antioxidant activity showed by this compound in the present study is a main pharmacological aspect of the referred drug, particularly if we consider the neuronal cell damages in cases of mitochondrial dysfunction and ROS, e.g. in ischemia/reperfusion.

Key words: imipramine, mitochondria, mitochondrial permeability, oxidative stress, mitochondrial calcium transport.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
ADT	Antidepressivos tricíclicos
AIF	Fator indutor de apoptose
ANT	Adenina Nucleotídeo Translocase
ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
Da	Dalton
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis-nitrobenzóico
EGTA	Ácido Etileno-Diamino Tetra-acético
EROs	Especies reativas de oxigênio
FCCP	carbonilcianeto-p-trifluormetoxifenilidrazina
FDA	Food and Drug Administration
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IMP	Imipramina
kDa	kilodaltons
MDA	Malondialdeído
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato), forma reduzida
ngAtO	Nanograma átomos de oxigênio
$O_2^- \cdot$	Ânion superóxido
$\cdot OH$	Radical hidroxil
Pi	Fosfato inorgânico
PTPM	Poros de Transição de Permeabilidade Mitocondrial
RCR	Razão de Controle Respiratório
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superoxido dismutase
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
<i>t</i> -BOOH	<i>tert</i> -butil-hidroperóxido
TCA	Ácido Tricloro Acético

TNF	Fator de necrose tumoral
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
VDAC	Canal de Ânions Voltagem Dependente

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estrutura da imipramina.	13
Figura 2 Estrutura da mitocôndria.	17
Figura 3 Transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e representação do modelo quimiosmótico mostrando o gradiente eletroquímico e a síntese do ATP.....	18
Figura 4 Produção e eliminação de radical superóxido durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial.	20
Figura 5 Vias de regulação celular das concentrações citosólicas de cálcio (Ca^{2+}).	23
Figura 6 Estrutura proposta para o PTP.	24
Figura 7 Esquema dos eventos que ocorrem durante as condições de isquemia/reperfusão, induzindo a morte celular.	27
Figura 8 Efeito da imipramina (IMP) sobre o inchamento osmótico mitocondrial.....	38
Figura 9 Efeito da imipramina sobre o inchamento osmótico mitocondrial induzido por <i>t</i> -BOOH/ Ca^{2+}	38
Figura 10 Inibição do inchamento osmótico mitocondrial induzido por Fe^{2+} na presença de imipramina	39
Figura 11 Inibição do inchamento osmótico mitocondrial induzido por Ca^{2+} na presença de imipramina	39
Figura 12 Inibição da lipoperoxidação de membranas mitocondriais pela imipramina (A e B).	41
Figura 13 Efeito da imipramina 100 $\mu\text{mol/L}$ sobre oxidação de grupos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial interna.	42
Figura 14 Efeito da imipramina sobre o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) na ausência ou presença de <i>t</i> -butilhidroperóxido (<i>t</i> -BOOH).	43
Figura 15 Inibição da redução do citocromo <i>c</i> por ânions superóxido pela imipramina.....	44
Figura 16 Efeito da imipramina sobre a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs) (A e B).	45
Figura 17 Efeito da imipramina (100 $\mu\text{mol/L}$) sobre o efluxo de cálcio mitocondrial(A e B).47	
Figura 18 Efeito da imipramina sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) (A e B).....	50
Figura 19 Efeito da imipramina sobre a velocidade de respiração do estado 4.	51
Figura 20 Efeito da imipramina (100 $\mu\text{mol/L}$) sobre o consumo de oxigênio mitocôndria ..	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Imipramina.....	13
1.2 Mitocôndria: Estrutura e Função.....	16
1.3 A geração de radicais livres pela mitocôndria.....	19
1.4 Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM)	21
1.5 Envolvimento da mitocôndria no dano e morte celular	24
1.6. Modulação da TPM como possível alvo farmacológico em situações de estresse oxidativo.....	28
2 OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. MÉTODO	32
3.1 Preparação e isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.....	32
3.2 Dosagem de proteína	32
3.3 Inchamento osmótico mitocondrial (<i>swelling</i>).....	33
3.4 Lipoperoxidação.....	33
3.5 Dosagem de grupos tiólicos reduzidos de proteínas mitocondriais	33
3.6 Dosagem de glutatona reduzida	34
3.7 Determinação da atividade <i>scavenger</i> de ânions superóxido da imipramina	34
3.8 Determinação da geração de EROs pelas mitocôndrias	34
3.9 Efluxo de cálcio mitocondrial.....	35
3.10 Potencial de membrana mitocondrial	35
3.11 Respiração mitocondrial	35
3.12 Análise Estatística	36
4 RESULTADOS	37
4.1 Efeitos da imipramina sobre a transição de permeabilidade mitocondrial.....	37
4.2 Efeito da imipramina sobre a lipoperoxidação de membranas mitocondriais.....	40
4.3 Oxidação de grupos tióis de proteínas da membrana mitocondrial interna	42
4.4 Ação da imipramina sobre os níveis de GSH e atividade <i>scavenger</i> de EROs gerados pela mitocôndria	42

4.5 Efeito da imipramina sobre a geração de EROs mitocondrial durante estresse oxidativo	44
4.6. Efeito da imipramina no efluxo de cálcio mitocondrial	46
4.7. Efeito da imipramina sobre o potencial de membrana e respiração mitocondrial.....	48
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	62
7. REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Imipramina

O primeiro grupo de fármacos para o tratamento da depressão surgiu na década de 1960, designado como antidepressivos tricíclicos (ADT), tendo a imipramina e a amitriptilina como os protótipos desta geração (POTTER & HOLLISTER, 2005). Este nome advém da imagem planar da estrutura química básica destes compostos, formada por três anéis, onde dois anéis benzênicos estão unidos por um nitrogênio e um grupo $\text{CH}_2\text{—CH}_2$. A estrutura química da imipramina está representada na figura 1.

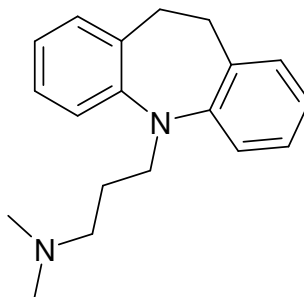


Figura 1: Estrutura química da imipramina.

No final da década de 1940 foram sintetizados mais de 40 compostos para possível emprego como anti-histamínicos, sedativos, analgésicos, e substâncias antiparkinsonianas. Um deles era a imipramina um composto dibenzazepínico, que difere das fenotiazinas apenas pela substituição do enxofre por uma ponte de etileno, de modo a produzir um anel central com sete componentes, análogo aos agentes antipsicóticos benzazepínicos. Após avaliação em cobaias, alguns compostos, inclusive a imipramina, foram selecionados com base nas propriedades sedativas ou hipnóticas para ensaio terapêutico (BALDESSARINI, 1989).

A síntese da imipramina ocorreu aproximadamente na mesma época em que foi demonstrada a eficácia de outra molécula formada por uma estrutura com três anéis, com efeito tranqüilizante na esquizofrenia (a exemplo dos primeiros neurolépticos, como a clorpromazina). Os antidepressivos tricíclicos não mostraram o sucesso esperado quando foram testados como antipsicóticos. Embora possuam estrutura química de três anéis, não se mostraram eficazes no tratamento da esquizofrenia e quase foram descartados. Contudo,

durante os ensaios em pacientes esquizofrênicos, descobriu-se que eram capazes de melhorar os sintomas da depressão. Assim, o efeito antidepressivo dos tricíclicos foi observado ao acaso nas décadas de 1950 e 1960, e, desta forma, esses compostos foram comercializados para o tratamento da depressão (STAHL, 2002).

Os antidepressivos tricíclicos (imipramina, clomipramina, amitriptilina) inibem a recaptação neuronal de serotonina e noradrenalina e em menor grau a recaptação de dopamina (SADOCK, 2002). Acredita-se que esta inibição seja a responsável por seus efeitos terapêuticos. Ainda que, o mecanismo de ação exato dos ADTs não tenha sido completamente elucidado, sabe-se que estes promovem aumento na eficiência da transmissão monoaminérgica, por meio dos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico. E, também, sistemas de segundos mensageiros estão envolvidos neste mecanismo, entre eles AMP cíclico, cálcio, diacilglicerol, fosfolípedes e a fosforilação de quinases proteicas. Hormônios como estradiol e progesterona são substâncias também envolvidas na quantidade de receptores para ADTs e na ação da imipramina sobre o hipotálamo. Estudos recentes sobre vias receptoras pós-sinápticas, mensageiros secundários bem como a expressão genética; podem elucidar melhor a ação dos ADTs (MORENO *et al.*, 1999).

Estes fármacos são largamente empregados no tratamento de todas as formas de depressão, incluindo-se as formas endógenas, as orgânicas e as psicogênicas e a depressão associada com distúrbios de personalidade ou com alcoolismo crônico. São amplamente utilizados na clínica médica, aumentando o tônus psíquico melhorando o humor e, conseqüentemente, melhorando a psicomotricidade de maneira global. Porém vários efeitos colaterais estão associados ao uso destas drogas, tais como, bloqueio de receptor muscarínico do tipo 1 provocando retenção urinária, xerostomia e constipação intestinal; bloqueio de receptor da histamina (H1) promovendo aumento de apetite e conseqüente ganho de peso, sonolência; bloqueio de canais de sódio no cérebro e coração podendo provocar convulsões e arritmias e mesmo parada cardíaca. Estes antidepressivos também são capazes de bloquear os receptores adrenérgicos do tipo alfa 1, causando hipotensão ortostática (STAHL, 2002). Os tricíclicos são cardiotoxicos e devem ser evitados em pacientes com história de cardiopatia. Níveis potencialmente perigosos de depressão cardíaca podem ocorrer particularmente em pacientes em tratamento concomitante com bloqueadores de canais de sódio (GLASSMAN *et al.*, 1993).

Estas substâncias são altamente lipofílicas, sendo metabolizadas principalmente pelos mecanismos oxidativos hepáticos (BALDESSARINI, 1989). Sua metabolização envolve o sistema enzimático do citocromo P₄₅₀ e seu metabólito ativo é a desipramina que possui

menor ação anticolinérgica (SADOCK, 2002). Estas drogas são amplamente distribuídas nos tecidos e suas propriedades farmacocinéticas são semelhantes às das fenotiazinas. Ligam-se fortemente a proteínas plasmáticas e constituintes teciduais, sendo que este fator é determinante para sua ampla distribuição no organismo. A imipramina é prontamente absorvida a partir do trato gastrointestinal, sendo que sua biodisponibilidade é de 94 a 96% (KRISTENSEN, 1983). Este fármaco tem uma meia-vida de eliminação que varia de 6 a 18 horas (BENETELLO *et al.*, 1990). A administração oral de 50mg desta droga a cada oito horas, durante dez dias, proporciona concentrações plasmáticas médias no estado de equilíbrio de imipramina e de desipramina da ordem de 33 a 85 ng/ml e 43 a 109 ng/ml, respectivamente. A concentração terapêutica eficaz é de 100 a 300 ng/ml, sendo que a equivalência de imipramina no fluido cerebrospinal e no plasma são altamente correlacionadas. Os efeitos tóxicos destes compostos podem ocorrer quando concentrações plasmáticas da ordem de 500 ng/ml são superadas, sendo que níveis de 1,0 µg/mL podem ser fatais. Tal fato pode ser atribuído à ampla distribuição tecidual deste composto, ligação a proteínas e lipossolubilidade (BALDESSARINI, 1989).

Além destas propriedades farmacológicas a imipramina possui efeitos adversos, já bem caracterizados, que podem variar em intensidade de um paciente a outro, pois dependem da atividade metabólica individual. Diversos outros efeitos biológicos de compostos tricíclicos, entre eles a imipramina têm sido relatados na literatura, tais como, desacoplamento da fosforilação oxidativa (WEIBACH *et al.*, 1988), alterações das velocidades dos estados respiratórios mitocondriais 3 e 4, bem como da atividade da F₁F₀-ATP sintase (ETO *et al.*, 1985), indução de apoptose em células tumorais, com ativação de caspase-3 (XIA *et al.*, 1999a; LEVKOVITZ *et al.*, 2005), interferência nos mecanismos de transporte iônico na membrana mitocondrial interna, particularmente interferência no sistema uniporter de transporte de cátions (BEAVIS, 1989). Efeitos sobre o movimento de cálcio celular com interferência no metabolismo energético, também tem sido descrito e situado como efeito adverso desta droga (ANTOINE, 2004). Além disso, recentemente algumas publicações têm mostrado o efeito desta classe de compostos sobre o dano celular provocado por espécies reativas de oxigênio (EROs) no processo de isquemia/reperfusão (STAVROVSKAYA *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2008).

1.2 Mitocôndria: Estrutura e Função

A mitocôndria é considerada um dos principais sítios de metabolismo dos eucariotos. Nesta organela estão concentradas enzimas como piruvato desidrogenase, enzimas do ciclo do ácido cítrico, enzimas do metabolismo de ácidos graxos e enzimas e proteínas redox que participam do transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. Morfologicamente, pode variar em tamanho e forma dependendo de sua origem tecidual e condições metabólicas. Em geral possuem o tamanho de 0,5 a 1,5 μm e sua quantidade ocupa em média um quinto do volume celular em uma célula eucariótica (VOET *et al.*, 2002). As mitocôndrias são formadas por duas membranas, uma externa com estrutura não-invaginada e uma interna com extensiva invaginação em forma tubular que delimita uma grande área denominada matriz mitoncondrial. As dobras ou invaginações da membrana interna são chamadas de cristas mitocondriais e o espaço entre as membranas interna e externa é denominado espaço intermembranas. A matriz é composta por uma solução com altas concentrações de enzimas solúveis do metabolismo oxidativo, substratos, nucleotídeos, íons inorgânicos e DNA, RNA e ribossomos envolvidos no mecanismo genético mitocondrial e síntese protéica. Ambas as membranas mitocondriais são ricas em proteínas, porém a membrana mitocondrial externa, a exemplo de outras membranas celulares inclusive as bacterianas, contém proteínas denominadas porinas, que permitem a livre difusão de moléculas de até 10 kDa. Isso torna o espaço intermembranas equivalente ao citosol com relação às concentrações de íons e metabólitos. A membrana interna por sua vez é totalmente impermeável a moléculas de baixo peso molecular com exceção de O_2 , CO_2 e água. Esta membrana é mais rica em proteínas que a membrana externa e possui além das proteínas que compõem os complexos da cadeia respiratória, numerosos transportadores responsáveis pelo transporte de substancias como ATP, ADP, piruvato, Ca^{2+} e fosfato (VOET *et al.*, 2002; KOOLMAN & RÖHM, 2005).

O fato de a membrana mitocondrial interna ser impermeável a prótons e ter uma impermeabilidade controlada a maioria dos íons e metabólitos, permite o estabelecimento de um gradiente de íons, o que resulta nos compartimentos metabólicos citosólico e mitocondrial. Na membrana mitocondrial interna estão localizados os complexos da cadeia respiratória e todos os componentes da fosforilação oxidativa que justamente, ocorre devido ao gradiente de prótons formado através desta membrana. A energia química liberada neste processo é conservada na forma de substratos oxidáveis como NADH e FADH_2 , e utilizada para síntese de ATP.

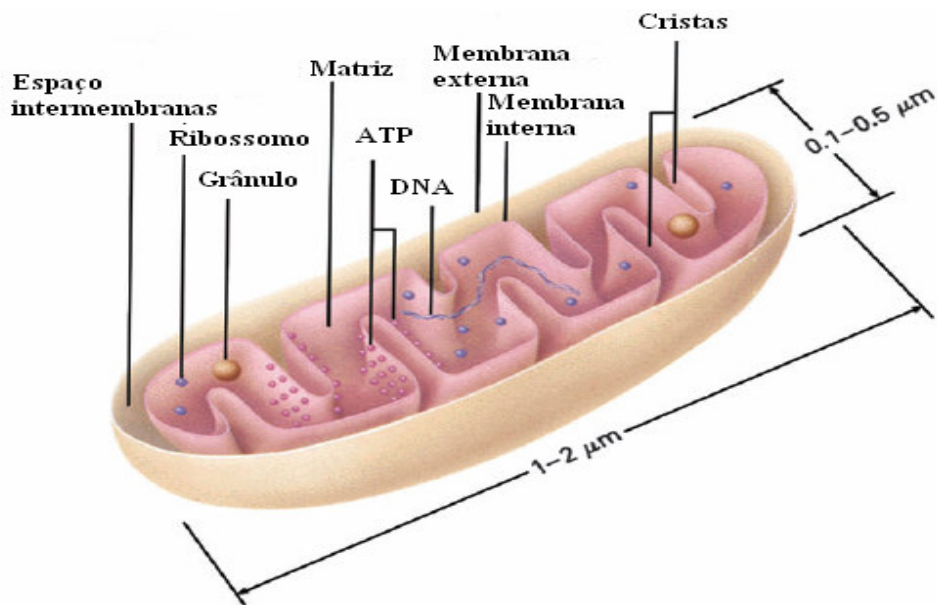


Figura 2: Estrutura da mitocôndria (LOGAN, 2006).

A mitocôndria é a organela responsável pela síntese de aproximadamente 95% do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular, processo que se dá através da fosforilação oxidativa (HATEFI, 1985). Além dessa função central, a mitocôndria está envolvida em outros processos alternativos, tais como captação/liberação de cálcio, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), os quais evidenciam a participação da organela em diversas situações fisiológicas ou patológicas da célula (KOWALTOWSKI, 2000).

Na fosforilação oxidativa, substratos oxidáveis, como NADH e FADH₂, doam seus elétrons para a cadeia respiratória, sendo transportados do complexo I e do complexo II para o complexo III pela coenzima Q (ou ubiquinona) e do complexo III para o complexo IV pelo citocromo *c* e do complexo IV são transferidos ao oxigênio molecular o qual é reduzido à água.

O transporte de elétrons doados por coenzimas reduzidas e a síntese de ATP são processos firmemente acoplados devido à impermeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons permitindo o estabelecimento do gradiente eletroquímico. Diversas substâncias são capazes de interferir com a fosforilação oxidativa, e são divididos em desacopladores e inibidores. Os desacopladores estimulam as respirações basais, por desfazerem o gradiente eletroquímico sem que ocorra a fosforilação do ADP. O 2,4-dinitrofenol (DNP), valinomicina e a carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenilidrazina (FCCP)

são exemplos clássicos desses compostos. Os inibidores interferem na respiração acoplada à síntese de ATP atuando nos complexos da cadeia respiratória ou na F_1F_0 -ATP sintase. A rotenona inibe o transporte de elétrons da ubiquinona para o citocromo c e o cianeto bloqueia a redução do oxigênio pelo citocromo aa_3 . Substâncias como, por exemplo, o fluoracetato, que inibem o ciclo do ácido cítrico com conseqüente diminuição da geração de coenzimas reduzidas, também inibe a fosforilação oxidativa, assim como o atractilósídeo, um glicosídeo tóxico de origem vegetal, que impede a troca ADP/ATP devido à inibição da adenina nucleotídeo translocase (ANT). Finalmente, os inibidores da F_1F_0 -ATP sintase, como por exemplo, a oligomicina que se associa à porção F_0 da enzima numa ligação dependente de interação com a membrana mitocondrial, também são inibidores importantes da fosforilação oxidativa (KOWALTOWSKI *et al*, 1999; MITCHELL, 1961).

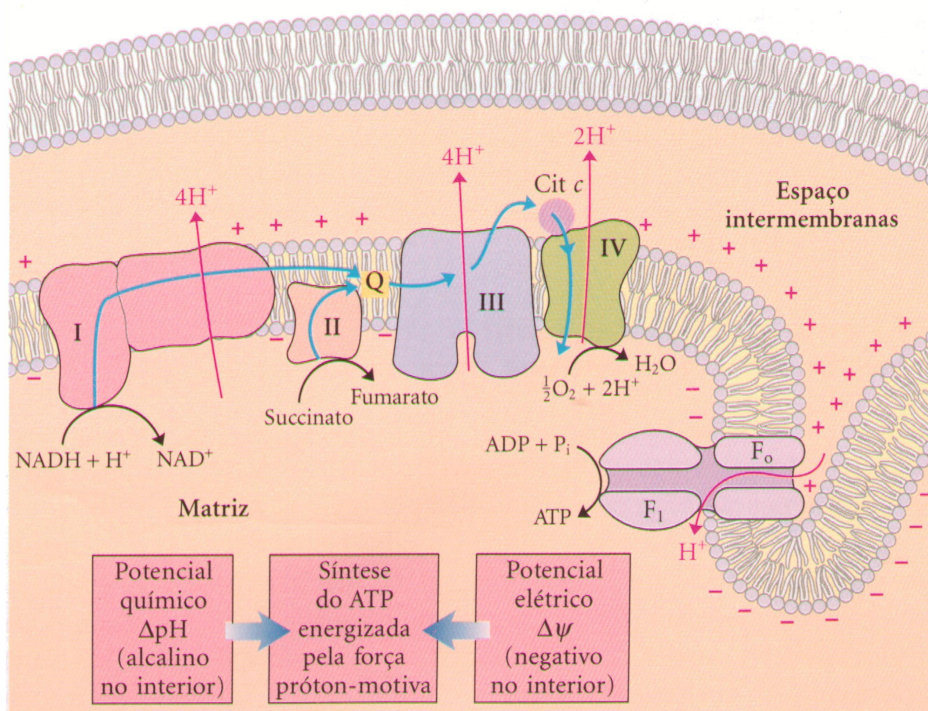


Figura 3: Transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e representação do modelo quimiosmótico mostrando o gradiente eletroquímico e a síntese do ATP (NELSON & COX, 2000).

1.3 A geração de radicais livres pela mitocôndria

O metabolismo aeróbico dos eucariotos proporcionou um ganho energético incomparavelmente maior que o anaeróbico, o que permitiu a aquisição de sistemas biológicos cada vez mais complexos e, em consequência, a evolução destas espécies. No processo conhecido como respiração celular, o oxigênio é o aceptor final dos elétrons e a elevada produção de energia na forma de ATP deve-se ao elevado potencial eletroquímico deste sistema. Entretanto, há sempre o paradoxo da utilização do oxigênio para obtenção de energia: a formação endógena de EROs é uma consequência indiscutível do metabolismo aeróbico (MICHIELS *et al.*, 1994).

Fisiologicamente, o oxigênio (O_2) consumido pelas mitocôndrias no processo de respiração é reduzido com grande eficiência e rapidez pelo complexo citocromo *c* oxidase. Entretanto, algumas vezes esta redução pode ocorrer de modo parcial ou incompleto gerando ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), principalmente nas etapas envolvendo a NADH desidrogenase ou o ciclo da coenzima Q (KOWALTOWSKI *et al.*, 1999). Conforme descrito anteriormente, na cadeia respiratória os elétrons oriundos dos complexos I e II são transferidos para coenzima Q (ubiquinona) que é um transportador móvel de elétrons e prótons de fase lipídica. A redução completa da coenzima Q requer dois elétrons e dois prótons e ocorre em duas etapas através de um intermediário radicalar, a semiquinona (QH^{\cdot}); esta, por sua vez, pode ser oxidada pelo oxigênio molecular dando origem ao radical $O_2^{\cdot-}$ (CARRERAS *et al.*, 2004). Desta forma, é descrito que a maior parte das EROs seja gerada devido ao escape de elétrons ao nível da coenzima Q entre os complexos respiratórios I e III (TURRENS, 2003; RIBEIRO, 2005). Estes radicais livres, particularmente as espécies reativas de oxigênio (EROs), formadas na cadeia respiratória mitocondrial são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL *et al.*, 1989). Estes, constantemente estão presentes em células eucarióticas e, se não forem adequadamente eliminados podem provocar inúmeros efeitos deletérios ao reagir com componentes celulares.

Quanto à reatividade das EROs no meio biológico, o radical hidroxil ($\cdot OH$) é o mais potente com meia vida de 1×10^{-9} segundos e em teoria pode oxidar qualquer molécula biológica. Assim, é provável que este reaja nas proximidades dos sítios onde foi gerado (HALLIWELL, 1990). O radical $O_2^{\cdot-}$ também possui meia vida muito curta (1×10^{-6} s) sendo precursor de outras espécies reativas (EROs), dentre eles, o radical $\cdot OH$. Desta forma, eles

facilmente reagem captando elétrons de outras moléculas e convertendo-as em radicais livres, iniciando assim, uma reação em cadeia (HALLIWELL & CROSS, 1994).

Em condições normais, o ânion superóxido é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), que em mitocôndrias e bactérias são dependentes de manganês (MnSOD) e no citosol, dependentes de cobre e zinco (CuZnSOD); o H_2O_2 é então reduzido à H_2O por ação da catalase ou da glutathiona peroxidase às custas de glutathiona reduzida (GSH), a qual é mantida no estado reduzido por NAD(P)H, via glutathiona redutase. Este sistema é considerado a principal linha de defesa antioxidante da mitocôndria frente à produção de EROs é capaz de eliminar esses radicais, evitando a oxidação de macromoléculas causando danos e morte celular (HALLIWELL *et al.*, 1989; BROOKES *et al.*, 2004).

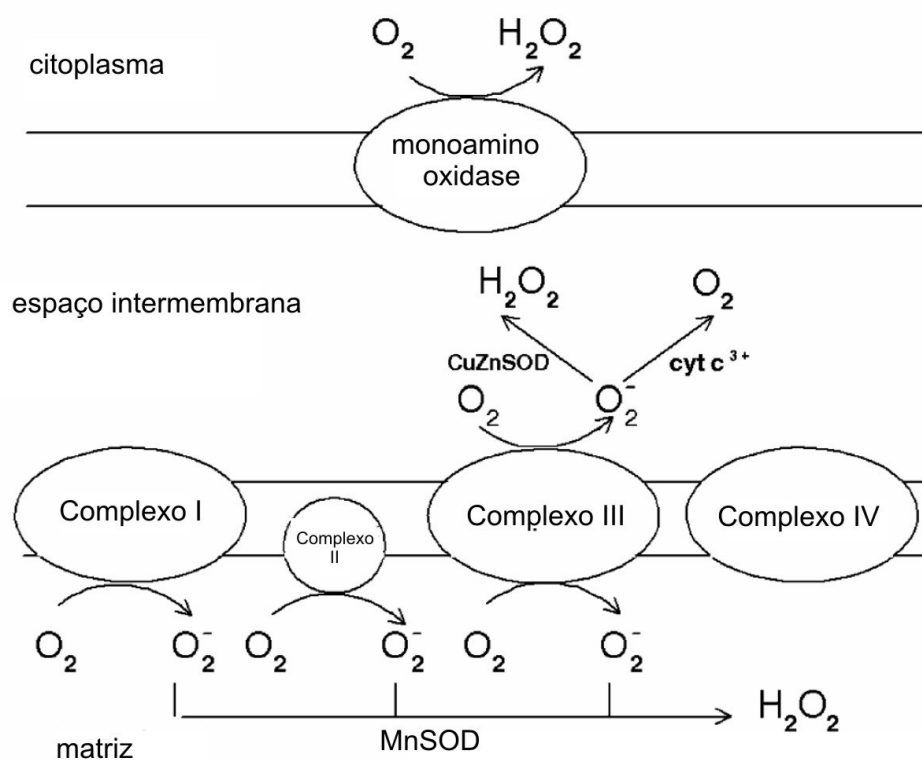


Figura 4: Produção e eliminação de radical superóxido durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Adaptado de Turrens (2003).

O adequado funcionamento celular exige um equilíbrio entre as condições pró-oxidantes e antioxidantes. O rompimento deste equilíbrio em favor da condição de oxidação promove dano celular. Em diversas situações a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode estar aumentada o suficiente para superar a capacidade do sistema de defesa

antioxidante, ou a defesa pode estar diminuída levando a uma situação conhecida como estresse oxidativo, onde o H_2O_2 que seria normalmente eliminado acumula-se e, na presença de Fe^{2+} , pode ser convertido no radical hidroxil ($\bullet OH$) pela reação de Fenton-Haber-Weiss (REED, 1990) capaz causar diversos tipos de danos oxidativos a lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (SIES, 2007). O estresse oxidativo é considerado um evento celular importante em muitos processos patológicos, sendo a hipótese oxidativa uma das mais atraentes na área médica para explicar mecanismos moleculares que envolvem a patogenia de algumas doenças (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Diversos estudos mostram o envolvimento da mitocôndria em vários estados patológicos como neoplasias, infarto, diabetes, obesidade, acidente vascular cerebral (AVC), doenças neurodegenerativas e envelhecimento; devido a distúrbios no metabolismo do ATP, do cálcio e de EROs (BROOKES *et al.*, 2004; MURPHY & STEENBERGEN, 2008). As doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer, estão cada vez mais associadas às disfunções mitocondriais e lesões oxidativas. Este fato é devido à observação que reações com radicais livres aumentam durante o curso do metabolismo oxidativo normal e são parcialmente responsáveis pelo processo de envelhecimento (HALLIWELL & CROSS, 1994). Além disso, é um consenso atual a participação da mitocôndria na morte celular tanto por necrose quanto por apoptose (MARTINOU & GREEN, 2001; KARMAKAR *et al.*, 2001; SKULACHEV, 2006). Quando proteínas da membrana mitocondrial interna, tais como AIF (fator indutor de apoptose) e citocromo *c*, foram relacionados a eventos apoptóticos, a correlação entre mecanismos mitocondriais e morte celular programada ganhou uma atenção especial (SKULACHEV, 2006).

1.4 Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM)

A manutenção das condições metabólicas mitocondriais está diretamente ligada permeabilidade seletiva da membrana externa e a impermeabilidade da membrana interna. Estes fatores permitem a manutenção de um gradiente eletroquímico e um perfeito acoplamento entre o fluxo de elétrons nos complexos respiratórios mitocondriais e a síntese de ATP. As alterações no metabolismo mitocondrial estão, em grande parte, associadas à abertura de um complexo poro protéico na membrana mitocondrial interna (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999). O cálcio, em altas concentrações ou em presença de

fosfato inorgânico (Pi) ou pró-oxidantes, pode induzir uma rápida transição da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, associada à despolarização, desacoplamento da fosforilação oxidativa, perda de intermediários metabólicos e liberação de íons intramitocondriais. Essa perda de seletividade da membrana permite a entrada e a saída de íons e solutos com peso molecular até 1500 Da, proporcionando um inchamento osmótico mitocondrial de larga amplitude, fenômeno conhecido como transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) (ZORATTI; SZABÒ, 1995).

A TPM é um dos maiores enigmas que envolvem a bioenergética mitocondrial (GUNTER, 2004). Contudo, é um dos fenômenos mais amplamente estudados e atualmente parece ser um fato já bem descrito que este poro não é específico, permite a passagem de moléculas de baixo peso molecular (inferior a 1500Da), opera em condições com excesso de Ca^{2+} . Sua abertura parece ser reforçada pela depleção de NAD(P)H, elevação de fosfato inorgânico e estresse oxidativo (LEUNG; HALLESTRAP, 2008; CROMPTON, 1999).

Tem sido proposto que o estado redox dos NAD(P)H mitocondriais module o efluxo mitocondrial de Ca^{2+} e também a TPM. Assim, condições ou substâncias químicas que aumentam a geração de EROs, podem conduzir ao acúmulo de H_2O_2 , e, conseqüentemente, causar uma diminuição dos níveis de NADPH e levar a TPM e/ou o efluxo de Ca^{2+} (VALLE *et al.*, 1993). A captação mitocondrial de Ca^{2+} é controlada por um ciclo de transporte dirigido pela bomba de prótons da cadeia respiratória, entretanto o controle da homeostase celular do Ca^{2+} tem sido revisto nos últimos anos (GUNTER *et al.*, 2004; CROMPTON, 1999). A mitocôndria pode seqüestrar cálcio pela via conhecida como uniporter, sendo esta mediada pela concentração de Ca^{2+} citosólico. A liberação do Ca^{2+} mitocondrial (efluxo) pode ocorrer através de um mecanismo de troca com íons Na^+ e, a concentração deste íon nos compartimentos citosólico e mitocondrial é regulada pela troca com prótons (antiporter). Em circunstâncias especiais o Ca^{2+} pode deixar a mitocôndria via PTPM (GUNTER *et al.*, 2004). Assim, há um sensível mecanismo de regulação das concentrações do Ca^{2+} , que no meio mitocondrial pode sofrer variações dentro dos limites de 0,2 a 10 μM , variações que controlam a atividade de enzimas sensíveis a Ca^{2+} presentes neste compartimento (McCORMACK; DELTON, 1990).

Quando ocorre aumento do Ca^{2+} citoplasmático, a mitocôndria capta cálcio, principalmente pela via de captação rápida (uniporter). O sequestro de Ca^{2+} pela mitocôndria com conseqüente acúmulo intramitocondrial deste íon, tende a promover alteração no gradiente de prótons estabelecido e conseqüentemente alteração no pH do meio mitocondrial, devido aos mecanismos homeostáticos já citados, o que leva a formação do PTPM. Os

mecanismos de regulação das concentrações de Ca^{2+} que não são mediados por troca citosólica necessitam consumo de energia na forma de ATP. Assim, a homeostasia do Ca^{2+} está diretamente ligada ao mecanismo de síntese de ATP. Em condições patológicas onde ocorre um aumento do Ca^{2+} citosólico, há depleção de ATP, que associada ao estresse oxidativo proporciona a abertura do PTPM (CROMPTON, 1999; GUNTER, 2004).

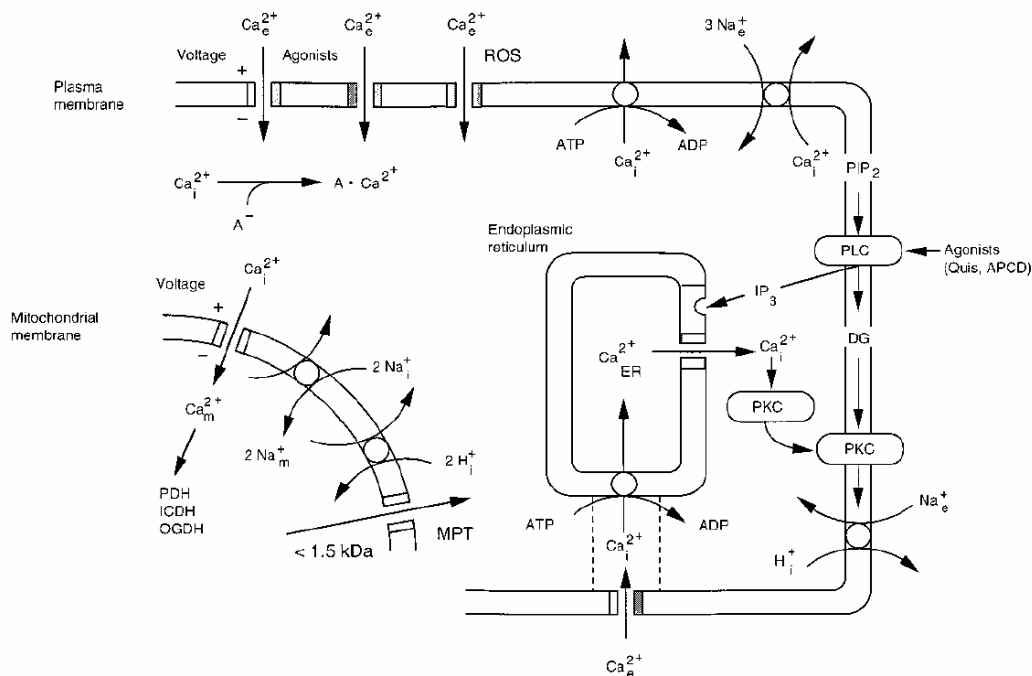


Figura 5: Vias de regulação celular das concentrações citosólicas de cálcio (Ca^{2+}) (KRISTIÁN & SIESJÖ, 1998).

A estrutura que compõe o PTPM atualmente ainda é foco de discussão, porém já se sabe que este possui estruturas protéicas e não protéicas que estabelecem contato entre as membranas interna e externa mitocondrial (FAUSTIN *et al.*, 2004; ZORATTI & SZABÒ, 1995; BRENNER & GRIMM, 2006). O modelo atual sugere que PTPM tem como estrutura molecular de contato entre membranas um canal de ânions voltagem-dependente (VDAC), na membrana interna em associação com o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT), ligado a matrix a ciclofilina D e outras proteínas associadas (LEMASTERS, 2004, LEUNG, 2008). O ANT é responsável pelo transporte antiporter ADP/ATP, importa ADP e exporta ATP para o citoplasma, reação esta mediada pelo Ca^{2+} . A participação do ANT na estabilidade do PTPM é descrita como responsável pelo fechamento e abertura do canal. Isto se deve em parte a sua mudança conformacional quando ligado ao ADP ou ATP e também a

sua ativação por Ca^{2+} (LE QUOC & LE QUOC, 1988). A ciclofilina D também tem participação na estrutura do PTPM, o qual pode ser inibido por ciclosporina A, que se liga a ciclofilina D impedindo assim, a abertura e manutenção do PTPM (PTPM sensível a ciclosporina) (HALESTRAP, 2002). Em recente estudo ficou claro seu envolvimento na estrutura do poro, ratos com deleção do gene para ciclofilina D não exibem PTPM sensível a ciclosporina. Este mesmo estudo mostra ainda um papel, apenas de regulador para ANT na formação do PTPM (LEUNG, 2008).

A formação do PTP também pode ser regulada por Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica da família Bcl2, e essa abertura parece promover a liberação do citocromo *c*, disparando a apoptose. Recentemente, foi demonstrado que durante a TPM pode ocorrer uma liberação de citocromo *c*, evento associado ao processo de apoptose (MARTINO, 1999). As proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 regulam a integridade da membrana mitocondrial externa (ARMSTRONG, 2006) e bloqueiam a liberação de citocromo *c* (YANG *et al.*, 1997). Existem ainda outras proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, que parecem formar um canal na membrana mitocondrial externa liberando o citocromo *c* para o citoplasma disparando a apoptose (MARTINO; GREEN, 2001). Estes eventos demonstram a participação do PTPM no processo de apoptose.

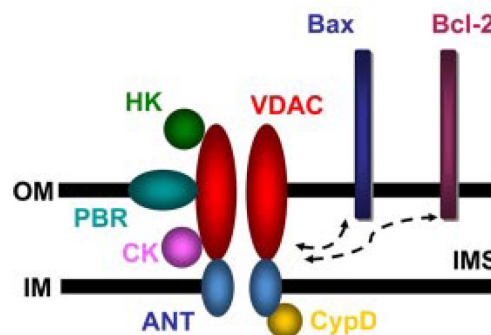


Figura 6: Estrutura proposta para o PTP. A estrutura demonstra o envolvimento do VDAC, ANT, Ciclofilina D (CypD), as proteínas Hexoquinase (HK) e Creatinaquinase (CK), Receptor benzodiazepínico (PBR) e as proteínas envolvidas com apoptose (Bax e Bcl-2) (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007).

1.5 Envolvimento da mitocôndria no dano e morte celular

O reconhecimento da ocorrência de liberação de proteínas apoptogênicas de origem mitocondrial como citocromo *c*, fator indutor de apoptose e outras proteínas pró-caspases; no espaço intermembranas na mitocôndria, foi o primeiro encontro verdadeiramente evidente do

envolvimento da mitocôndria no mecanismo de apoptose (CROMPTON, 1999). Recentes estudos revelam que independentemente das características morfológicas da fase final da morte celular, seja ela por apoptose, necrose ou autofagia, ocorre a permeabilidade da membrana mitocondrial, evento que parece delinear a sobrevivência da célula (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). Um dos fatores que parece desencadear eventos que levam a morte celular é a substancial depleção de ATP na célula (SKULACHEV, 2006). De fato, tecidos geralmente propensos à privação de oxigênio, como o músculo cardíaco ou nervoso, tecidos de respiração rápida; acabam por depletar rapidamente suas reservas energéticas utilizando vias alternativas de obtenção de energia, na ausência de oxigênio (VOET, 2002). Substanciais evidências apontam que estas condições podem estar presentes em estados de isquemia/reperfusão onde importantes fatores envolvidos na patogênese da morte celular por necrose e apoptose são produzidos (CROMPTON, 1999; STROKE, 1998).

A apoptose é um tipo de morte celular que pode ser disparada por duas vias: a extrínseca e a intrínseca (ou mitocondrial). Na via extrínseca a apoptose é induzida pela ativação de receptores da superfície celular relacionados à morte programada, entre eles receptores para fator de necrose tumoral (TNF). Pela via mitocondrial, a apoptose é iniciada pela liberação de proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo *c*, que induz a formação de um complexo chamado apoptossomo, resultado na ativação de caspases efetoras da morte celular. Diversos trabalhos têm demonstrado que a liberação de citocromo *c* para o citosol pode ocorrer mediante a formação do PTPM (KROEMER *et al.*, 2007).

Assim, os eventos iniciados com a abertura do PTPM e o seu papel na morte celular por apoptose e necrose são facilmente explicados. A abertura do PTPM permite o livre trânsito de prótons que cruza a membrana interna da mitocôndria, dissipando o potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e o gradiente de prótons (pH). Estes eventos impedem a geração de ATP pela fosforilação oxidativa, revertendo a ação da ATP sintase. Isto promove também uma desaceleração na geração do ATP pela glicólise. Esta condição culmina com a diminuição dos níveis de ATP tecidual comprometendo a viabilidade da célula e a homeostase metabólica; fenômenos que podem promover a necrose celular (LEUNG & HALESTRAP, 2008). A literatura descreve ainda que, a morte celular por necrose é atribuída à ativação de fosfolipases, nucleases e proteases, que são ativadas em situações onde há diminuição do pH citosólico (dissipação do gradiente de prótons) (BERNARDI *et al.*, 2006).

Há uma evidente participação do Ca^{2+} em conexão com o estresse oxidativo na patogênese celular nos casos de isquemia seguida de reperfusão. Durante o estado de privação de oxigênio ocorre um aumento intracelular de Ca^{2+} . Devido principalmente a saída de H^+ da

célula pelo mecanismo de troca com Na^+ , pois durante o período de isquemia ocorre aumento de H^+ intracelular o qual tende a deixar a célula o que ocorre via troca citosólica Na^+/H^+ . O Ca^+ entra na célula pela troca citosólica com Na^+ , considerando que nesta fase os mecanismos de efluxo de Ca^{2+} via consumo de ATP estão depletados, desta forma a mitocôndria capta Ca^{2+} como recurso homeostático (MURPHY & STEENBERGEN, 2008). O aumento de Ca^{2+} intramitocôndria induz a formação do PTPM. Alguns estudos têm sugerido um papel crucial da mitocôndria na regulação das concentrações de cálcio na célula, sendo que parece haver um sincronismo muito bem determinado entre a captação de Ca^{2+} pela mitocôndria e o efluxo mitocondrial deste íon. Desta forma o principal mecanismo de efluxo rápido de Ca^{2+} intramitocôndria ocorreria via PTP (SMALI & RUSSELL, 1999). A captação de Ca^{2+} pela mitocôndria conduz a eventos como dissipação do potencial de membrana e conseqüente depleção de ATP propiciando o dano celular. Assim, o PTP nesta situação onde ocorre uma ruptura na homeostase de cálcio, atuaria como um poro transitório e funcional, proporcionando através do efluxo de Ca^{2+} , via PTP, a regulação do $\Delta\Psi$ e das concentrações citoplasmática deste íon de modo correlacionado (ZHU *et al.*, 2000).

Como relatado, a isquemia está associada à disfunção do metabolismo energético, o que pode levar a morte celular por eventos já conhecidos. Contudo, períodos curtos de isquemia podem deprimir momentaneamente o estado energético celular, o qual é completamente restabelecido, quando seguido de imediata reperfusão (CROMPTON, 1999; LEUNG & HALESTRAP, 2008). Entretanto, dados clínicos mostram que períodos mais prolongados de isquemia levam a um fenômeno conhecido como injúria da reperfusão, onde os tecidos se tornam mais sensíveis a reoxigenação sanguínea. Isto é classicamente observado em condições de transplante de órgãos, estados trombóticos, cirurgias cardíacas e casos de acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico. Em nível molecular o dano celular é evidenciado pela diminuição ao nível crítico de ATP e NAD(P)H e aumento intracelular de Ca^{2+} e Pi (ZHAO *et al.*, 2004). Estas condições definem perfeitamente o estado de estresse oxidativo celular onde ocorre a formação de EROs e conseqüentemente a abertura do PTPM.

Com base nestas observações, tem sido proposto que após um transitório período de isquemia/reperfusão, a célula pode ou não entrar em processo de necrose, e este ponto de retorno, ou seja, o momento crítico que define o dano irreversível é marcado pela abertura do PTPM (CROMPTON, 1999; MURPHY & STEENBERGEN, 2008). A importância atribuída à TPM neste evento é corroborada ainda pelo fato que, durante a condição de isquemia, a energia necessária à célula é obtida pela via glicolítica anaeróbica com conseqüente produção de ácido láctico, o que diminui o pH intracelular (pH menor que 7,0) (HALESTRAP, 1991). É

conhecido que *in vitro* mitocôndrias isoladas apresentam inibição do PTPM em pH 7,0-6,5 (AL NASSER & CROMPTON, 1986). Desta forma, isto permite a proteção da TPM durante o estado de isquemia. Porém, após a reperfusão em que ocorre retorno as condições normais de pH e com a excessiva geração de EROs ocorre abertura do PTPM o que induz a morte celular por necrose (HALESTRAP *et al.*, 1998, KROEMER, 2007).

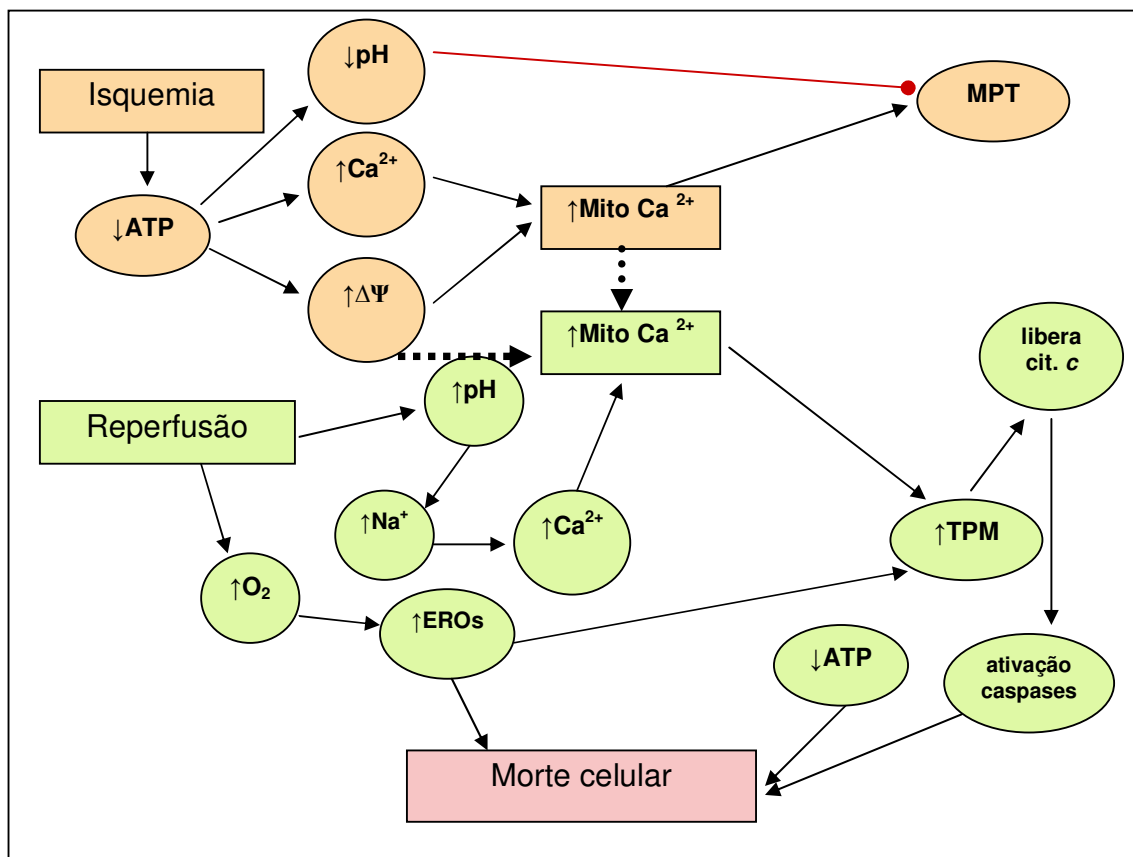


Figura 7: Eventos moleculares durante a isquemia e reperfusão relacionados à TPM e morte celular. Adaptado de Murphy & Steenbergen (2008).

Além da evidente participação na necrose celular, o PTPM tem papel crucial na morte celular por apoptose (MARTINO, 2001). Como consequência da formação do PTPM ocorre inchamento mitocondrial de larga amplitude devido à passagem de solutos promovido pela permeabilidade da membrana mitocondrial. Esta condição pode levar ao rompimento da membrana interna permitindo o extravasamento do conteúdo mitocondrial. Entre as substâncias que cruzam a membrana mitocondrial nestas condições, estão proteínas pró-apoptóticas; como citocromo *c*, Smac/Diablo e fator indutor de apoptose (ZAMZAMI;

KROEMER, 2003). Entretanto, mesmo com a formação do PTPM não há depleção de ATP suficiente para promover necrose celular, como ocorre durante a isquemia/reperfusão. Desta forma, apenas o mecanismo apoptótico prevalece. Como a apoptose é também um evento fisiológico, tal fato, permite atribuir a participação da mitocôndria neste processo, como componente do mecanismo apoptótico e não como incidente ou patológico, através da geração de EROs, por exemplo. Um segundo grupo de proteínas com envolvimento na estabilidade do PTPM, também fazem parte do processo de morte celular programada, as proteínas da família Bcl-2 e Bax (LEUNG & HALESTRAP, 2008). Ainda que, os mecanismos que regulam o evento apoptótico não sejam bem conhecidos; sabe-se que as proteínas do grupo Bcl-2 têm características anti-apoptóticas. Assim, é possível que a abertura do VDAC seja regulada por esta proteína mediando a liberação de citocromo *c* (MARTINOU *et al.*, 1999). As proteínas da família Bax têm características pró-apoptóticas e parecem formar um canal na membrana mitocondrial externa pelo qual o citocromo *c* passa para o citoplasma disparando a apoptose (KORSMEYER *et al.*, 2000).

Ainda a autofagia parece ser um fenômeno que mantém uma estreita relação com a apoptose e conseqüentemente com eventos relacionados à mitocôndria. Enquanto a apoptose é um fenômeno extenso que compromete quase a totalidade citoplasmática celular, ocorrendo de forma expansiva, a autofagia é um evento circunscrito onde partes citoplasmáticas são seqüestradas por vacúolos em dupla membrana sofrendo ação de hidrolases lisossomais (KROEMER, 2007). Este fenômeno pode estar ainda correlacionado à privação de ATP em algumas células, seja devido à restrição exógena (nutricional) ou situações metabólicas que prejudiquem a síntese de ATP. Desta forma, a obtenção de energia por outras vias metabólicas, bem como a privação energética pode levar à mudança conformacional de proteínas e acúmulos de corpos de inclusão citoplasmáticos, que tendem a promover danos celulares. Estas estruturas são particularmente eliminadas por autofagia. Neste caso, tal fenômeno parece exercer neuroproteção em tecido nervoso realmente propenso a tal situação (KROEMER, 2007; ZHAO *et al.*, 2004).

1.6. Modulação da TPM como possível alvo farmacológico em situações de estresse oxidativo

Considerando as maiores causas de morte em seres humanos, o infarto agudo do miocárdio (IAM) e o acidente vascular cerebral (AVC), que podem ocorrer devido à privação de oxigênio nestes tecidos e a evidente conexão com a função mitocondrial, isto justifica a

investigação de possíveis fármacos que possam interferir neste mecanismo. É conhecido que diversas substâncias químicas são capazes de afetar as funções mitocondriais, seja por dissipação do potencial de membrana, acúmulo de EROs, indução da TPM e liberação de proteínas anti ou pró-apoptóticas para o citoplasma da célula; disparando a apoptose inclusive em células tumorais (HIGUCHI, 2004; ASAKURA & OHKAWA, 2004). Particularmente, psicofármacos como fenotiazínicos são capazes de interagir com membranas biológicas e inibir danos mitocondriais promovidos por Fe^{2+} ou *t*-BOOH (RODRIGUES *et al.*, 2002). Com relação a esta propriedade, as drogas psicoativas do grupo dos tricíclicos, parecem exercer efeitos sobre as funções mitocondriais relacionadas ao estado oxidativo e interferência na apoptose (STAVROSVSKAYA, 2004; XIA *et al.*, 1997; XIA, *et al.*, 1999b).

Como o há envolvimento da TPM na patogênese da morte celular por apoptose, danos neurológicos oriundos de isquemia/hipóxia, doenças neurodegenerativas e injúrias relacionadas ao sistema nervoso central, particularmente as relacionadas à isquemia/reperfusão, a mitocôndria é vista como um provável alvo terapêutico para lesão neurológica aguda. Com base nisto um estudo recente selecionou um elenco de 1040 drogas aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) com potencial atividade para inibir TPM em mitocôndrias isoladas (STAVROSVSKAYA, 2004). Dentre estas drogas foram identificados 28 compostos com estrutura química que inclui fármacos tricíclicos, antidepressivos e antipsicóticos. Entre os mais efetivos, notadamente incluem a nortriptilina, prometazina e fármacos da classe dos tricíclicos, herocíclicos e fenotiazínicos (ZHANG *et al.*, 2008).

A análise retrospectiva da literatura mostra que varias drogas pertencentes à classe dos heterocíclicos, tricíclicos, fenotiazínicos e estruturas relacionadas exercem algum efeito sobre a isquemia, TPM ou fenômeno relacionado à TPM (ETO *et al.*, 1985; WEINBACH *et al.*, 1986; MELZACKA *et al.*, 1995). Um relevante aspecto na compreensão dos eventos ocorridos na isquemia/hipóxia e aqueles correlacionados a reperfusão, bem como a interferência de drogas neuroativas nestes eventos é o desenho de novos compostos com atividade protetora nas patologias relacionadas ao dano celular provocado pela TPM.

Considerando os antidepressivos da família dos tricíclicos, a imipramina apresenta além, do efeito farmacológico esperado, uma toxicidade celular relativamente elevada, fato que contribui para os efeitos colaterais da droga (SAUTER, 1989). E como esta droga está incluída no grupo de fármacos com potencial efeito mitocondrial, um estudo dos efeitos da imipramina sobre a bioenergética e estado oxidativo de mitocôndrias isoladas é de grande importância para o aspecto farmacológico desta droga, principalmente considerando sua ação

como psicofármaco. Além disso, como a mitocôndria é uma organela envolvida no disparo e/ou regulação da apoptose, no dano celular com envolvimento de EROs e a imipramina tem se mostrado capaz de induzir apoptose em células tumorais (XIA, *et al.*, 1997) e fármacos com estrutura análoga a imipramina tem sido relacionados a efeitos antioxidantes (ZHANG *et al.*, 2008; WEINBACH *et al.*, 1986), o estudo dos efeitos deste composto sobre a geração de EROs e sua correlação com TPM é de fato relevante.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Uma vez que estudos anteriores demonstraram que fármacos que atuam no sistema nervoso central com estrutura tricíclica apresentam efeitos variados sobre a bioenergética mitocondrial e tais efeitos podem estar associados à toxicidade e aos efeitos colaterais exibidos por estes compostos (RODRIGUES *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2008), este estudo apresenta como objetivo geral avaliar o efeito do antidepressivo tricíclico imipramina sobre a bioenergética e o estado oxidativo mitocondrial com ênfase aos efeitos sobre a transição de permeabilidade mitocondrial, utilizando como modelo mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

2.2. Objetivos específicos

Durante os estudos preliminares, diversas concentrações de imipramina foram utilizadas a fim de se estabelecer a faixa de concentração molecular que interfere com a função mitocondrial. Assim, para atingirmos o objetivo acima avaliamos os efeitos da imipramina sobre os seguintes parâmetros mitocondriais:

- inchamento osmótico mitocondrial;
- lipoperoxidação da membrana mitocondrial;
- oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas;
- conteúdo de glutathione reduzida;
- geração mitocondrial de EROs;
- efluxo de cálcio mitocondrial;
- potencial de membrana mitocondrial;
- respiração mitocondrial
- atividade *scavenger* de ânions superóxido;

A transição de permeabilidade mitocondrial foi induzida por diversos pró-oxidantes, tais como *t*-BOOH, Fe²⁺/citrate e altas concentrações de Ca²⁺.

3. MÉTODO

A imipramina foi obtida de Sigma Chem. Co. (St Louis, MO, USA) e todos os demais reagentes utilizados no preparo das soluções têm o mais elevado grau de pureza disponível comercialmente. A água utilizada para o preparo das soluções foi bidestilada e purificada pelo sistema Milli-Q (água tipo 1).

3.1 Preparação e isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

Ratos Wistar machos de aproximadamente 180 g foram sacrificados por deslocamento cervical e o fígado foi alcançado por incisão bilateral na cavidade abdominal. Após sua remoção, o órgão foi cortado em pequenos fragmentos em meio de homogeneização contendo sacarose 250 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4 a 4°C, lavados no mesmo meio e homogeneizado em Potter-Elvehjen (1 ciclo com 2 passagens do pistilo). A suspensão foi centrifugada a 580g por 5 minutos e o sobrenadante, centrifugado a 10.300g por 10 minutos. O sedimento resultante foi re-suspendido com 10 mL de um meio contendo sacarose 250 mmol/L, EGTA 0,3 mmol/L, e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, e centrifugado a 3400g por 15 minutos. O sedimento final, contendo as mitocôndrias isoladas, foi re-suspendido com 1,0 mL de meio contendo sacarose 250 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4. Todos os ensaios com mitocôndrias energizadas foram realizados em um período máximo de 3 horas após o isolamento.

3.2 Dosagem de proteína

Uma alíquota (10 µL) da suspensão mitocondrial a ser determinada foi misturada a 100 µL de uma solução de ácido deoxicólico 5% (m/v) e água q.s.p. 1,5 mL. A essa mistura foi adicionado 1,5 mL do reativo de Biureto, composto por sulfato cúprico 0,15 % (m/v), tartarato de sódio e potássio 0,6 % (m/v) e NaOH 0,75 mol/L. Após 10 minutos, a absorbância foi determinada em 540 nm contra um branco de reagentes e a concentração foi determinada a partir de uma curva de calibração obtida nas mesmas condições da amostra, utilizando BSA como padrão (CAIN & SKILLETER, 1987).

3.3 Inchamento osmótico mitocondrial (*swelling*)

Em 1,5 mL do meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, a 30°C, adicionado de succinato de potássio 5 mmol/L, rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$ e CaCl_2 10 $\mu\text{mol/L}$, foi adicionado 0,4 mg de proteína mitocondrial e o inchamento osmótico mitocondrial foi avaliado pela diminuição da absorvância em 540 nm em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 (Tóquio, Japão).

3.4 Lipoperoxidação

A lipoperoxidação da membrana mitocondrial foi avaliada através da formação de malondialdeído (MDA) (BUEGE; AUST, 1978). A suspensão mitocondrial (1,0 mg de proteína) foi incubada no meio contendo KCl 130 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, adicionado de succinato de potássio 5 mmol/L, rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 50 $\mu\text{mol/L}$ e citrato de sódio 2,0 mmol/L por 30 minutos a 37°C (volume final de 1,0 mL). Para determinação do MDA, foi adicionado 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1,0 % (m/v) (preparado em NaOH 50 mmol/L), 0,1 mL de NaOH 10 mol/L e 0,5 mL de ácido fosfórico 20 % (v/v), seguido por incubação durante 20 minutos a 85°C. O complexo MDA-TBA foi extraído com 2,0 mL de *n*-butanol e a absorvância determinada em 535 nm. A concentração de MDA foi calculada a partir de um $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ (mol/L)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5 Dosagem de grupos tiólicos reduzidos de proteínas mitocondriais

As mitocôndrias (0,4 mg de proteína) foram incubadas nas condições do experimento de inchamento osmótico mitocondrial por 15 minutos a 30°C. Após precipitação com ácido tricloroacético (TCA) 5 % (v/v) e centrifugação a 3.400g por 5 minutos, o precipitado foi re-suspendido em 1,0 mL de tampão fosfato 0,5 mol/L, pH 7,6, e, após adição de ácido 5,5-ditiobis-nitrobenzóico (DTNB) 0,2 mmol/L, a absorvância foi determinada em 412 nm, sendo que a concentração de grupamentos tiólicos reduzidos foi calculada utilizando $\epsilon=13.600 \text{ (mol/L)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (JOCELYN, 1987). Para a dosagem somente de grupos tiólicos reduzidos da membrana mitocondrial interna foi utilizada a técnica de ciclos de congelamento/descongelamento (*freeze-thawing*) (BLONDE; KRESACK; KOSICKI, 1967).

3.6 Dosagem de glutathiona reduzida

Em 1,0 mL do meio padrão contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, acrescentou-se succinato de potássio 5 mmol/L, rotenona 2,5 μ mol/L e citrato 0,2 mol/L, após a adição de 0,4 mg de proteína mitocondrial e das respectivas concentrações de imipramina a mistura foi incubada a 30°C por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 500 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 13 %, seguido de centrifugação a 3.400 g por 5 minutos. Uma alíquota de 100 μ L do sobrenadante foi adicionada a 1,8 mL de um tampão fosfato de sódio 0,5 mol/L, pH 8,0 e, após a adição de *o*-ftalaldeído 0,1 mg/mL, a mistura foi incubada a 30°C por 15 minutos. A quantidade de glutathiona foi determinada espectrofluorimetricamente em 350 e 420 nm, excitação e emissão, respectivamente, em um espectrofluorímetro Hitachi F-2500 (Tóquio, Japão).

3.7 Determinação da atividade *scavenger* de ânions superóxido da imipramina

O método utilizado é baseado na inibição da redução do ferricitocromo *c* por ânions superóxido em presença da imipramina (MCCORD & FRIDOVICH, 1970) Para o ensaio, uma alíquota (suficiente para reduzir o ferricitocromo *c* em uma razão de 0,025 Ab/min em 550nm) da solução de xantina oxidase foi adicionada em 1,0 mL do meio de reação composto por ferricitocromo *c* 20 μ mol/L, xantina 50 μ mol/L, EDTA 0,1 mmol/L e fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 7,8 e a absorbância foi monitorada em 550 nm a 25°C por 2 minutos. A atividade *scavenger* da imipramina foi determinada por meio da inibição da redução do citocromo *c* em comparação ao ensaio controle, na ausência da droga.

3.8 Determinação da geração de EROs pelas mitocôndrias

A produção de espécies reativas de oxigênio pelas mitocôndrias foi monitorada espectrofluorimetricamente utilizando o fluoróforo 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) 2 μ mol/L. Este, em presença de EROs, é oxidado gerando o composto fluorescente DCF, detectado usando os comprimentos de onda de excitação de 503 nm (fenda 5,0 nm) e emissão de 529 nm (fenda 5,0 nm) (CATHCART; SCHWIERS; AMES, 1983). As mitocôndrias (1,0 mg/mL) foram incubadas em meio padrão (volume final de 2,0 mL) composto de sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, acrescido de rotenona 2,5 μ mol/L, succinato 5,0 mmol/L, CaCl₂ 10 μ mol/L e imipramina nas

concentrações selecionadas para o estudo. Para avaliação da produção de EROs nas condições de respiração mitocondrial foi utilizado meio composto de sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, EGTA 0,5 mmol/L e K_2HPO_4 10 mmol/L, adicionado de succinato de potássio 5,0 mmol/L e rotenona 2,5 μ mol/L.

3.9 Efluxo de cálcio mitocondrial

A captação e o efluxo de cálcio foram avaliados usando o indicador metalocrômico arsenazo III 50 μ M, em um espectrofotômetro Shimadzu multi-espectro 1501 (Tóquio, Japão), utilizando a diferença entre os comprimentos de onda de 675-685 nm. As mitocôndrias (1 mg/mL) foram incubadas em um meio composto de sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, acrescido de rotenona 2,5 μ mol/L e $CaCl_2$ 10 μ mol/L, a 30°C (volume final 2,0 mL). A captação de cálcio foi iniciada pela adição de succinato 5,0 mmol/L (AL-Nasser & CROMPTON, 1986).

3.10 Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado em um espectrofluorímetro Hitachi F-2500 (Tóquio, Japão), monitorando-se as alterações na fluorescência da rodamina 123, usando-se como comprimento de onda de excitação e emissão 505 e 525 nm, respectivamente. As mitocôndrias (0,4 mg de proteína) foram incubadas em 2,0 mL do meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4 a 30 °C, adicionado de rotenona 2,5 μ mol/L, rodamina 123 0,4 μ mol/L e $CaCl_2$ 10 μ mol/L para um volume final de 2,0 mL, sendo, as mitocôndrias energizadas pela adição de succinato de potássio 5,0 mmol/L. A diminuição do potencial de membrana observada foi determinada pelo aumento da intensidade da fluorescência do fluorocromo a medida que ele é liberado das mitocôndrias.

3.11 Respiração mitocondrial

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas foi analisado polarograficamente a 30°C em um oxígrafo equipado com um eletrodo tipo Clark (Gilson Medical Electronics, USA), e os parâmetros respiratórios foram determinados de acordo com Chance & Willians (1956). As mitocôndrias (1,0 mg/mL) foram adicionadas em 1,5 mL de

um meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7.4, EGTA 0,5 mmol/L e K_2HPO_4 10 mmol/L e como substrato respiratório foi utilizado succinato de potássio 5,0 mmol/L + rotenona 2,5 μ mol/L. A respiração do estado 3 foi iniciada pela adição de 400 nmoles de ADP. Diferentes concentrações de imipramina foram adicionadas no estado 4 para verificar um possível efeito desacoplador da fosforilação oxidativa.

3.12 Análise Estatística

As análises matemática, estatística e gráfica foram realizadas utilizando o programa Microcal Origin 6.0 (Microcal™ Software, Inc.). A significância estatística dos dados experimentais foi avaliada por meio de teste *t*-student para comparação das médias.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da imipramina sobre a transição de permeabilidade mitocondrial

A determinação do inchamento osmótico mitocondrial é usada para avaliação do processo de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) e pode ser medido experimentalmente por meio da diminuição da absorbância relativa de uma suspensão mitocondrial em 540 nm. Isto é possível, pois a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP) e o inchamento mitocondrial fazem com que a organela fique relativamente mais “translúcida”, resultando em diminuição da turbidez do meio, aqui tratada como absorbância relativa.

Nas concentrações testadas (10, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$), a imipramina não foi capaz de induzir significativo inchamento osmótico mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato (+ rotenona) na presença de Ca^{2+} 10 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 8). Uma vez que a imipramina não apresentou efeito indutor da TPM, mesmo em concentrações elevadas (100 $\mu\text{mol/L}$), e dados da literatura demonstraram que um análogo estrutural da imipramina, a nortriptilina, protegeu a mitocôndria no dano causado por isquemia/hipóxia (ZHANG *et al.*, 2008). Investigamos a capacidade de inibição da TPM pela imipramina, como pode ser observado na Figura 9, nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$, a imipramina foi capaz de inibir significativamente o inchamento osmótico mitocondrial induzido pelo pró-oxidante *t*-BOOH em presença de Ca^{2+} , o que foi verificado pela não diminuição da absorbância relativa em comparação com o ensaio efetuado apenas com o indutor *t*-BOOH/ Ca^{2+} (Figura 9).

Verificamos a capacidade de inibição do inchamento osmótico mitocondrial pela imipramina, induzido por outros agentes como Fe^{2+} , um catalisador da reação de Fenton, e altas concentrações de Ca^{2+} na ausência de pró-oxidante. Da mesma forma como observado anteriormente, a imipramina 100 $\mu\text{mol/L}$ inibiu significativamente a TPM induzida por Fe^{2+} 50 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 10, linha c) ou Ca^{2+} 50 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 11, linha c), se comparado com os respectivos controles na presença dos indutores e ausência de imipramina (linhas b).

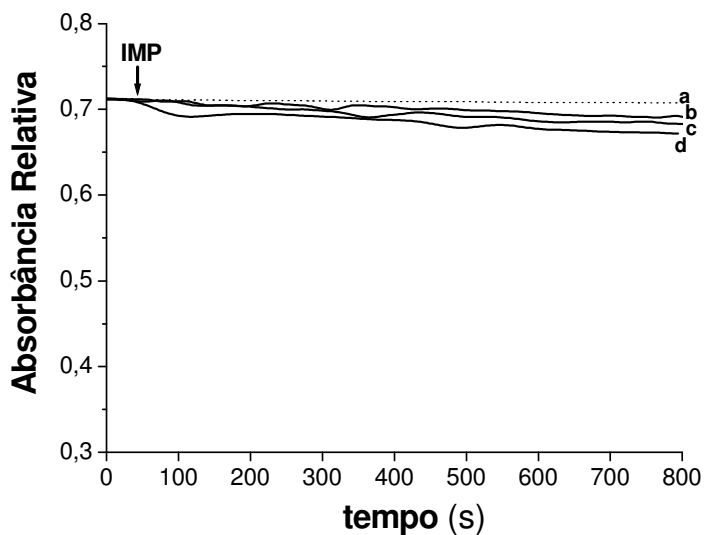


Figura 8 Efeito da imipramina (IMP) sobre o inchamento osmótico mitocondrial. As mitocôndrias (0,4 mg de proteína/mL) foram incubadas em 1,5 mL de um meio composto por sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4 a 30°C, adicionado de succinato de potássio (5 mmol/L), rotenona (2,5 μmol/L) e CaCl₂ (10 μmol/L) e a absorbância relativa foi determinada em 540 nm. Linha a: controle, na ausência de imipramina; b: imipramina 10 μmol/L; c: imipramina 50 μmol/L; d: imipramina 100 μmol/L. Os traçados são representativos de, no mínimo, três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

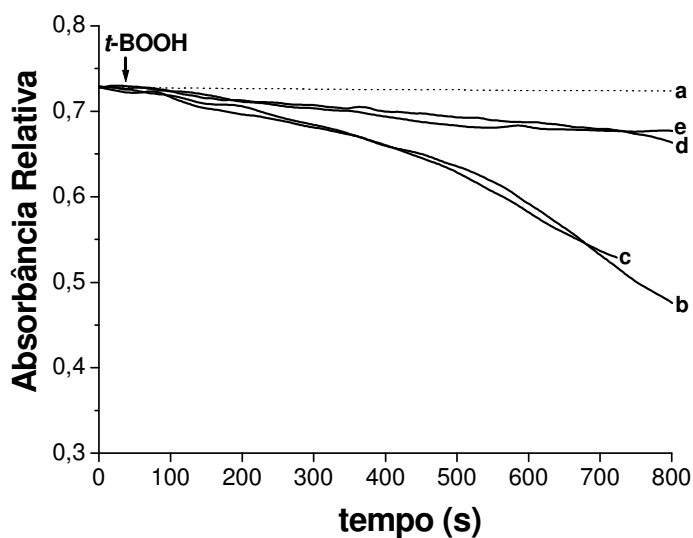


Figura 9: Efeito da imipramina sobre o inchamento osmótico mitocondrial induzido por *t*-BOOH/Ca²⁺. As mitocôndrias (0,4 mg de proteína/mL) foram incubadas em 1,5 mL de um meio composto por sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4 a 30°C, adicionado de succinato de potássio (5 mmol/L), rotenona (2,5 μmol/L) e CaCl₂ (10 μmol/L) e a absorbância relativa foi determinada em 540 nm. Linha a: controle, na ausência de imipramina e de *t*-BOOH; b: *t*-BOOH 0,6 mmol/L; c: imipramina 10 μmol/L + *t*-BOOH 0,6 mmol/L; d: imipramina 50 μmol/L + *t*-BOOH 0,6 mmol/L; e: imipramina 100 μmol/L + *t*-BOOH 0,6 mmol/L. Os traçados são representativos de, no mínimo, três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

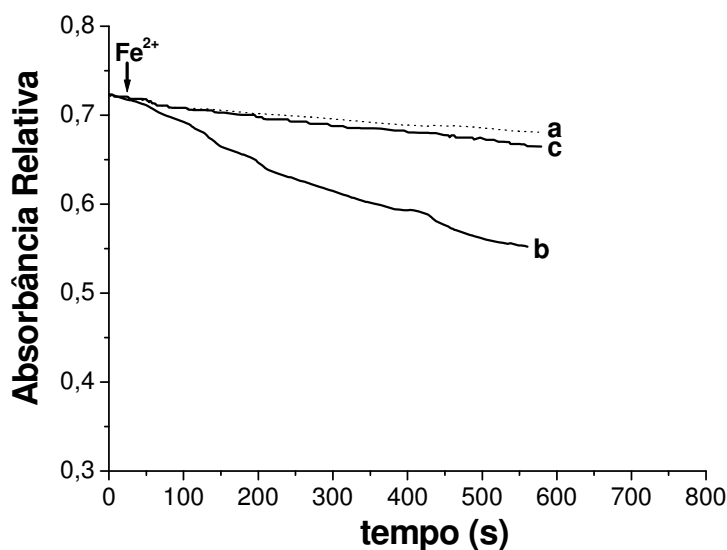


Figura 10: Inibição do inchaço osmótico mitocondrial induzido por Fe^{2+} na presença de imipramina. As mitocôndrias (0,4 mg/mL) foram incubadas em meio padrão composto por sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4 a 30°C, adicionado de succinato de potássio (5 mmol/L), rotenona (2,5 $\mu\text{mol/L}$) e CaCl_2 (10 $\mu\text{mol/L}$). A seta indica a adição do agente indutor $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 50 $\mu\text{mol/L}$ + Citrato de sódio 2,0 mmol/L. Linha a: controle, ausente de droga e indutor, b: $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 50 $\mu\text{mol/L}$ + Citrato de sódio 2,0 mmol/L, c: imipramina 100 $\mu\text{mol/L}$ + agente indutor. Os traçados são representativos de, no mínimo, três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

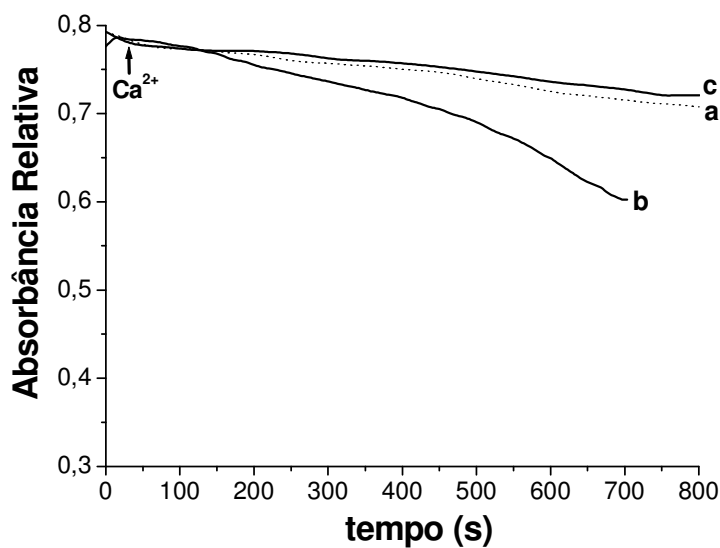


Figura 11: Inibição do inchaço osmótico mitocondrial induzido por Ca^{2+} na presença de imipramina. As mitocôndrias (0,4 mg/mL) foram incubadas em meio padrão composto por sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4 a 30°C, adicionado de succinato de potássio (5 mmol/L), rotenona (2,5 $\mu\text{mol/L}$). O inchaço osmótico mitocondrial foi induzido pela adição de CaCl_2 (50 $\mu\text{mol/L}$), indicado pela seta. Linha a: controle realizado com CaCl_2 (10 $\mu\text{mol/L}$) na ausência de imipramina, b: CaCl_2 (50 $\mu\text{mol/L}$), c: CaCl_2 (50 $\mu\text{mol/L}$) + imipramina 100 $\mu\text{mol/L}$. Os traçados são representativos de, no mínimo, três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

4.2 Efeito da imipramina sobre a lipoperoxidação de membranas mitocondriais

Para elucidar se a inibição da TPM é decorrente de propriedades antioxidantes da imipramina seus efeitos sobre a oxidação de lipídeos das membranas mitocondriais induzida por indutores clássicos de lipoperoxidação (Fe^{2+} e *t*-BOOH) foram investigados nas mesmas concentrações dos ensaios de inchamento osmótico mitocondrial. Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, a lipoperoxidação foi avaliada por meio da formação de malondialdeído (MDA), um dos principais aldeídos formados neste processo, que reage com ácido tiobarbitúrico (TBARS) formando um cromóforo que pode ser determinado espectrofotometricamente (BUEGE & AUST, 1978). Como pode ser visto na figura 12B, a imipramina nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ inibiu completamente a lipoperoxidação induzida por *t*-BOOH. Da mesma forma, quando a lipoperoxidação foi induzida por Fe^{2+} a imipramina 10, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ também protegeu as membranas mitocondriais, sendo maior efeito verificado nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ (figura 12A). A imipramina, por si, não foi capaz de induzir a lipoperoxidação de membranas mitocondriais em nenhuma das concentrações utilizadas (figura 12A).

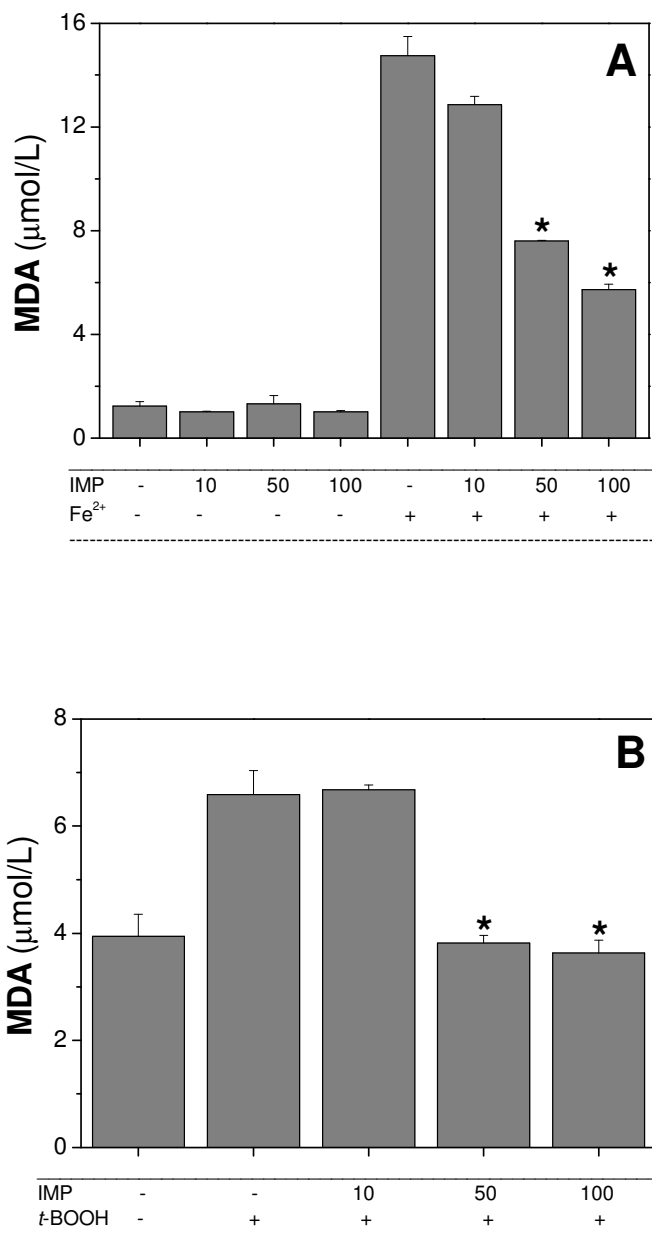


Figura 12: Inibição da lipoperoxidação de membranas mitocondriais pela imipramina. As mitocôndrias (1 mg/ml) foram incubadas em um meio composto por KCl 130 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, adicionado de succinato de potássio 5mmol/L e rotenona 2,5 µmol/L a 37°C por 30 minutos (volume final 1,0 mL). A lipoperoxidação foi avaliada pela formação de MDA. Em (A) foi avaliada a lipoperoxidação somente na presença de imipramina nas concentrações de 10, 50 e 100µM e com a droga nestas concentrações mais o indutor $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 50 µmol/L + citrato de sódio 2mmol/L. Em (B): efeito protetor da lipoperoxidação pela imipramina nas mesmas concentrações de (A), induzida por *t*-BOOH (0,6mmol/L). As figuras são representativas de no mínimo três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *Significativamente diferente do controle *t*-BOOH ou Fe²⁺ (P<0,05).

4.3 Oxidação de grupos tióis de proteínas da membrana mitocondrial interna

A oxidação de grupos tiólicos de proteínas de membrana é um evento que pode acontecer quando há formação de EROs na célula, ocorrendo uma situação de estresse oxidativo. Assim, a determinação de grupos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial é importante na avaliação de propriedades oxidantes ou antioxidantes de compostos. A figura 13 mostra a dosagem de grupos tiólicos reduzidos da membrana mitocondrial interna na presença de imipramina, nas condições em que esta inibiu a TPM, determinado espectrofotometricamente com DTNB. Os resultados mostram que a imipramina na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ impediu a oxidação de grupos SH de proteínas mitocondriais na presença do oxidante *t*-BOOH.

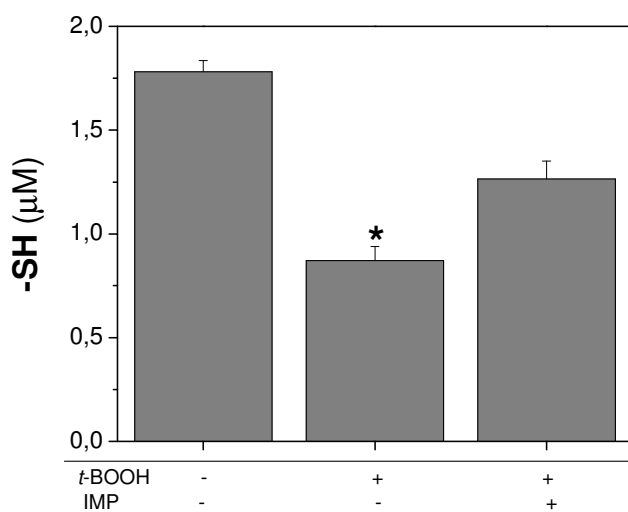


Figura 13: Efeito da imipramina 100 $\mu\text{mol/L}$ sobre oxidação de grupos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial interna. (0,4 mg/ml) de mitocôndrias foram incubadas em meio padrão composto por sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4 a 30°C, adicionado de succinato de potássio (5 mmol/L), rotenona (2,5 $\mu\text{mol/L}$). A dosagem de grupos tiólicos reduzidos foi determinada espectrofotometricamente a 412nm, após ciclos de congelamento/descongelamento (*freeze-thawing*) e posterior reação com DTNB (0,2 mmol/L). Foi utilizado como agente indutor oxidante de grupos SH *t*-BOOH (0,6 mmol/L). Os ensaios são representativos de pelo menos três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *Significativamente diferente do controle negativo (ausência de *t*-BOOH e droga) ($p < 0,05$).

4.4 Ação da imipramina sobre os níveis de GSH e atividade *scavenger* de ânions superóxido gerados pela mitocôndria

Um dos eficientes mecanismos de defesa antioxidante mitocondrial é a atividade da glutatona reduzida (GSH). Quando ocorre produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) há diminuição dos níveis de GSH devido ao seu consumo em reações redox que tem por

finalidade eliminar hidroperóxidos formados. A imipramina nas concentrações em estudo (10, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$) não interferiu nos níveis de GSH e quando incubada juntamente com o pró-oxidante (*t*-BOOH) não impediu a diminuição do conteúdo de GSH (figura 14). Desta forma, a imipramina parece não interferir neste sistema redox.

Outro mecanismo enzimático antioxidante de importância é atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) à peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 . Biologicamente, o ânion radical superóxido tem a capacidade de reduzir o citocromo *c*, sendo que essa propriedade foi utilizada em ensaios *in vitro* para a determinação de efeito *scavenger* da imipramina por meio da inibição da redução do ferricitocromo *c* pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$ gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase. O ensaio foi determinado espectrofotometricamente em 550 nm e a atividade *scavenger* da imipramina foi avaliada pela inibição do ferricitocromo *c*, visto neste ensaio como diminuição da absorbância, em comparação com o ensaio controle, realizado na ausência de droga. Como pode ser observado na figura 15, houve uma discreta diminuição da velocidade de redução do citocromo *c* em relação ao controle nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{mol/L}$ de imipramina, sugerindo apenas pequena atividade *scavenger* de ânions superóxido.

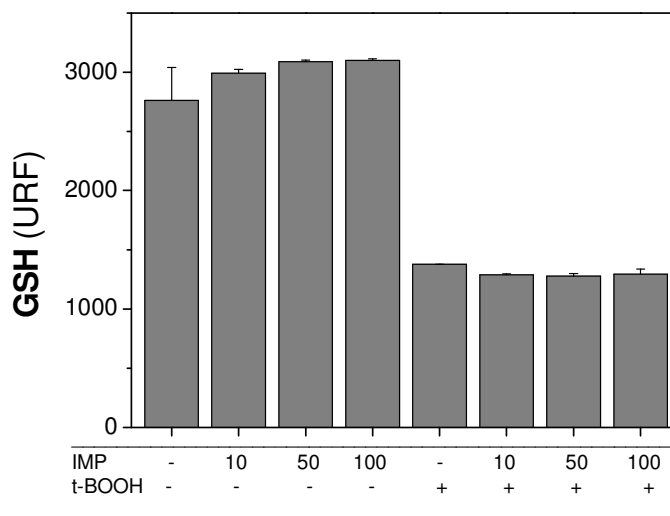


Figura 14: Efeito da imipramina sobre o conteúdo de glutatona reduzida (GSH) na ausência ou presença de *t*-butilhidroperóxido (*t*-BOOH). As mitocôndrias (0,4 mg/ml) foram incubadas em meio padrão contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4 a 30°C, adicionado de succinato de potássio 5 mmol/L, rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$ e citrato 0,2 mol/L, incubada a 37°C por 30 minutos. A diminuição dos níveis de GSH foi avaliada na presença de imipramina a 10, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ e na presença de *t*-BOOH (0,6 mmol/L) juntamente com a droga nestas concentrações. As figuras são representativas de no mínimo três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

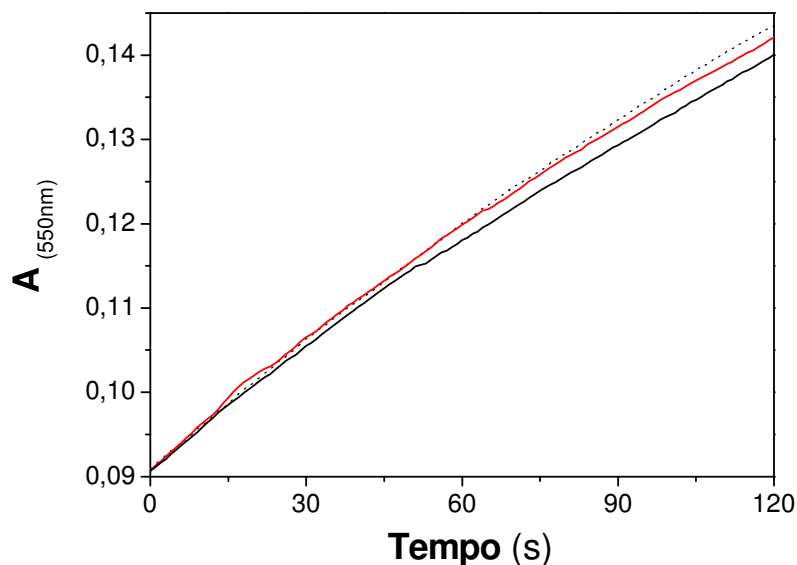
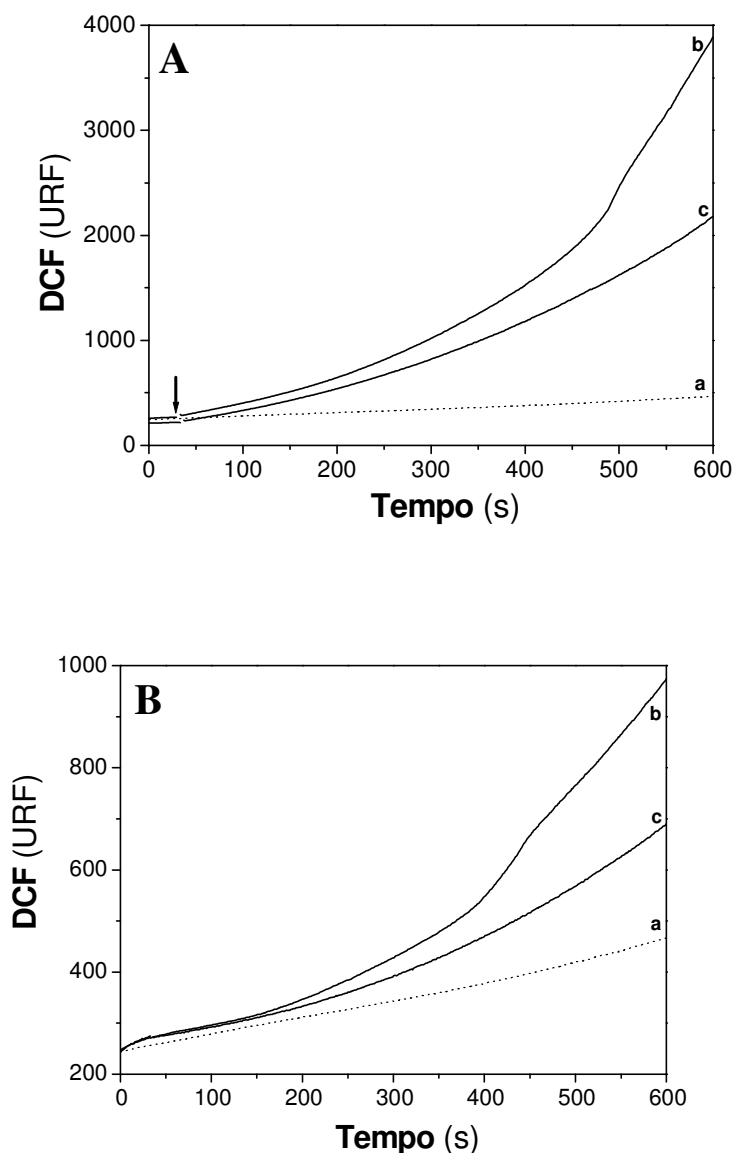


Figura 15: Inibição da redução do citocromo *c* por ânions superóxido pela imipramina. A reação foi realizada em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 7,8, adicionado de EDTA 0,1 mmol/L, ferricitocromo *c* 20 µmol/L, xantina 50 µmol/L. A geração de superóxido foi iniciada pela adição de xantina oxidase e a cinética de redução do citocromo *c* foi acompanhada espectrofotometricamente em 550 nm a 25°C por 120 segundos. Linha pontilhada: controle (ausência de imipramina); linha vermelha: presença de imipramina 100 µmol/L; linha preta: presença de imipramina 200 µmol/L. O traçado é representativo de três experimentos diferentes. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m.

4.5 Efeito da imipramina sobre a geração de EROs mitocondrial durante estresse oxidativo

Nós verificamos ainda a geração de EROs pela mitocôndria na presença de imipramina em uma condição de estresse oxidativo. O ensaio foi realizado fluorimetricamente utilizando uma sonda não fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFDA), substância que detecta a presença de EROs, situação em que se torna fluorescente, formando 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). O experimento foi realizado nas mesmas condições do *swelling* utilizando a concentração de imipramina que mostrou maior efeito protetor na TPM (100 µmol/L). A capacidade da droga de inibir a geração de EROs mitocondrial foi verificada pela diminuição da fluorescência relativa determinada. Foi utilizado como agente pró-oxidante *t*-BOOH e elevada concentração de Ca²⁺ (50 µmol/L), em um segundo experimento. Os resultados demonstraram que a imipramina 100 µmol/L apresenta possível atividade antioxidante frente à produção de EROs. O que foi verificado pela diminuição da fluorescência relativa quando comparado ao traçado representativo do controle positivo, em

que se utilizou apenas *t*-BOOH (figura 16A). A figura 16B mostra o mesmo efeito da imipramina, na mesma concentração, na presença de 50 $\mu\text{mol/L}$ de Ca^{2+} como agente pró-oxidante, também revelado pela diminuição da fluorescência relativa em comparação com o traçado do controle positivo.



4.6 Efeito da imipramina no efluxo de cálcio mitocondrial

A mitocôndria participa ativamente da homeostase de Ca^{2+} na célula. E a disfunção mitocondrial induzida pela TPM pode ser consequência da sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} , o que propicia a formação do PTPM com consequente inchamento osmótico mitocondrial (CROMPTON, 1999). Como a imipramina protege a TPM, nós investigamos a participação da droga no transporte de Ca^{2+} mitocondrial, monitorando o efluxo de Ca^{2+} da mitocôndria nas mesmas condições do *swelling* mitocondrial. A figura 17 mostra o efluxo de Ca^{2+} na presença de imipramina na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ (inibição máxima TPM), monitorado espectrofotometricamente utilizando o indicador metalocrômico arsenazo III (AL-Nasser; CROMPTON, 1986). Os resultados mostrados na figura 17A indicam que a presença da droga nesta concentração foi capaz de retardar o efluxo de Ca^{2+} porém, não o impediu na presença de um indutor de TPM/EROs *t*-BOOH. Evidenciado pela significativa variação na absorbância, revelado pelo arsenazo III, em comparação com o controle (C) (ausente de droga e indutor) e com o controle positivo (ausente apenas de droga). Esta figura mostra ainda que somente a imipramina nesta concentração, não é capaz de proporcionar o efluxo de Ca^{2+} da mitocôndria. A figura 17B demonstra o efluxo de Ca^{2+} pela mitocôndria utilizando como agente indutor de TPM/EROs o próprio cálcio em excesso (50 $\mu\text{mol/L}$). Os resultados mostram que a presença de imipramina (100 $\mu\text{mol/L}$) impediu o efluxo de Ca^{2+} e que também houve significativo efluxo de Ca^{2+} pela mitocôndria na presença de um excesso de Ca^{2+} e ausência da droga.

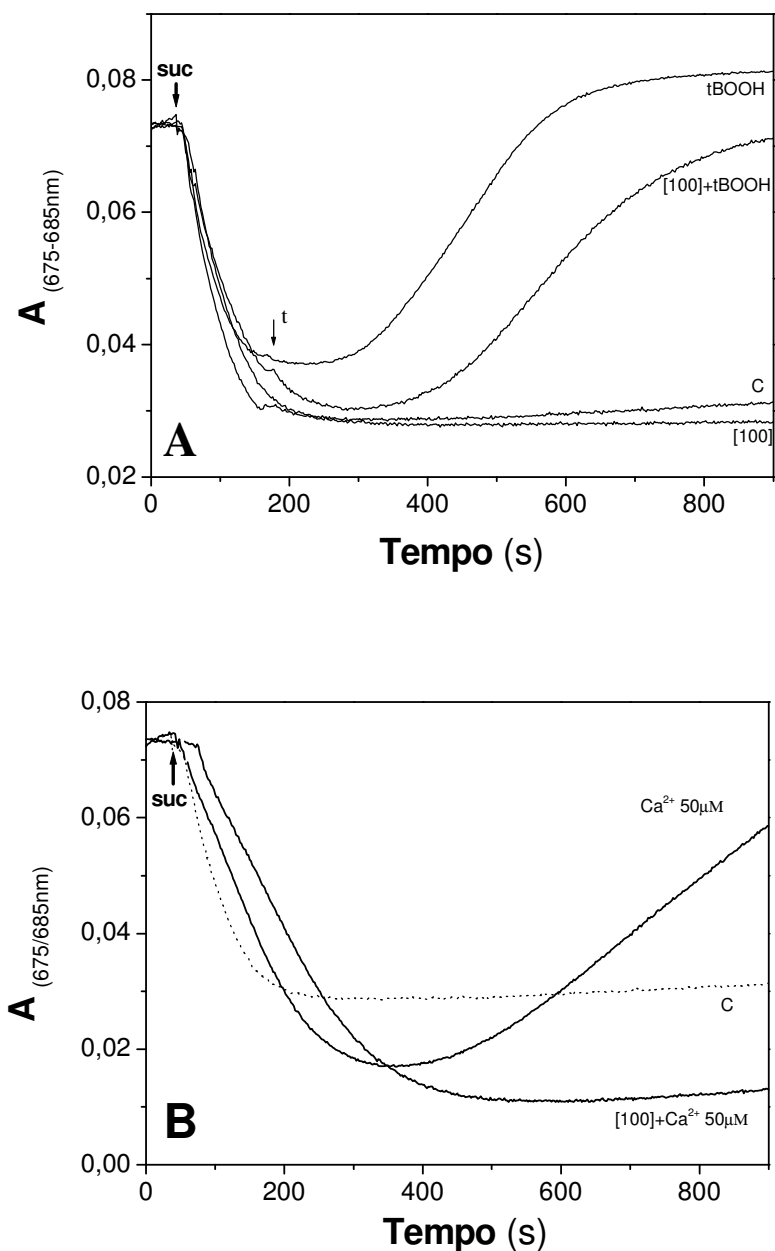


Figura 17: Efeito da imipramina (100 μ mol/L) sobre o efluxo de cálcio mitocondrial. As mitocôndrias (0,4 mg/ml) foram incubadas em meio padrão composto por sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4 a 30°C, adicionado de succinato de potássio (5 mmol/L), rotenona (2,5 μ mol/L), CaCl₂ (10 μ mol/L) (em B foi adicionado 50 μ mol/L de CaCl₂). O efluxo de Ca²⁺ foi avaliado pela variação na absorbância relativa em 675/685 nm. As setas indicam o ponto de adição: de succinato (seta suc) e *t*-BOOH (0,6 mmol/L) (seta t). As figuras são representativas de no mínimo três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. Em A: 100 μ mol/L de imipramina pré-incubada, após a adição de succinato foi adicionado *t*-BOOH. Em B: em meio contendo 50 μ mol/L de Ca²⁺, 100 μ mol/L de imipramina foi pré-incubada e adicionada de succinato. A linha C representa o ensaio controle realizado com 10 μ mol/L de Ca²⁺.

4.7 Efeito da imipramina sobre o potencial de membrana e respiração mitocondrial

A formação do PTPM está na dependência de um conjunto de eventos que somados levam ao complexo poro na membrana mitocondrial interna e conseqüentemente a TPM. A literatura descreve que instalação do PTPM com conseqüente TPM, promove a despolarização da membrana mitocondrial, (CROMPTON, 1999; LEUNG, 2008). Desta forma, nós avaliamos o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) nas mesmas condições em que a droga foi capaz de inibir o inchamento osmótico mitocondrial. A figura 18 mostra os efeitos da imipramina nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ sobre o potencial de membrana avaliado espectrofluorimetricamente utilizando a rodamina 123, em mitocôndrias isoladas energizadas com succinato de potássio (seta suc). A figura 18A mostra que somente a imipramina nas referidas concentrações não foi capaz de dissipar significativamente o ($\Delta\Psi$). O que é visto pela ausência de aumento da fluorescência relativa da rodamina 123 em comparação com o controle (C). Os resultados mostrados na figura 18B também revelam que a imipramina nas mesmas concentrações (10, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$) não protege significativamente a dissipação do $\Delta\Psi$ na presença do agente indutor de TPM (*t*-BOOH). Neste ensaio foi observado um retardo sobre a dissipação do potencial de membrana pela imipramina (50 e 100 $\mu\text{mol/L}$), fato provavelmente atribuído ao efeito *scavenger* da droga. Foi avaliado ainda, o $\Delta\Psi$ mitocondrial na presença de excesso Ca^{2+} (50 $\mu\text{mol/L}$) como agente indutor de TPM em associação com a imipramina a 100 $\mu\text{mol/L}$. Os resultados mostraram não ocorrer dissipação do $\Delta\Psi$ na presença de Ca^{2+} 50 $\mu\text{mol/L}$, embora tenha havido inchamento e efluxo de cálcio nestas condições (resultados não mostrados).

Através da análise dos parâmetros respiratórios mitocondriais nós verificamos o consumo de oxigênio mediante as variações na velocidade de respiração do estado 4, com intuito de identificar um possível efeito desacoplador da imipramina sobre a fosforilação oxidativa. Este ensaio foi realizado com as mesmas concentrações de imipramina a qual foi capaz de proteger a TPM (50 e 100 $\mu\text{mol/L}$) e também a 200 $\mu\text{mol/L}$ com o objetivo de verificar um aumento do efeito desacoplador dependente da concentração da droga. Foi verificada ainda, a influência da imipramina nestas concentrações, sobre a cadeia respiratória mitocondrial, avaliado pela velocidade do estado 3 da respiração. Somente a imipramina não interferiu na velocidade do estado 3 da respiração (resultados não mostrados). A figura 19 mostra que a adição de imipramina nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{mol/L}$ estimula o estado 4 da respiração mitocondrial, ou seja, promove um aumento na velocidade de

respiração deste estado em cerca de 2 vezes (imipramina 100 $\mu\text{mol/L}$). Para uma Razão de Controle Respiratório (RCR) estimado em 5,68 verificamos que, com a adição de 0,4 mmol/L de ADP, iniciando o estado 3 da respiração, houve um consumo de O_2 de 93,7 ngAtO/min/mg (Velocidade do estado 3), após a fosforilação total do ADP há um retorno ao estado 4 respiratório com consumo de O_2 de 16,4 ngAtO/min/mg (velocidade do estado 4). A adição de 100 $\mu\text{mol/L}$ de imipramina durante o estado 4 promove um aumento no consumo de O_2 para 33,9 ngAtO/min/mg, o que pode ser visto na figura 20 que mostra o traçado representativo dos estados respiratórios. A adição de 50 e 200 $\mu\text{mol/L}$ de imipramina também promove um discreto estímulo na velocidade do estado 4 com consumo de oxigênio em torno de 22,9 e 36,5 ngAtO/min/mg respectivamente (resultados não mostrados).

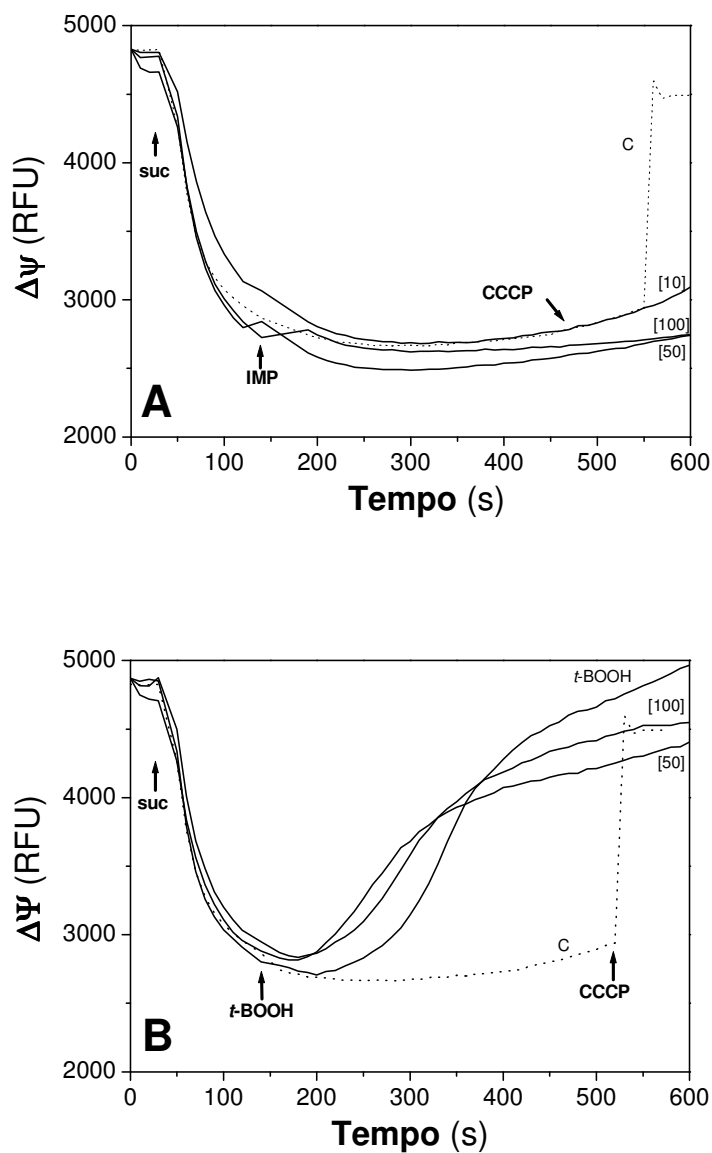


Figura 18: Efeito da imipramina sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). Em meio padrão contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4 a 30°C, adicionado de rotenona (2,5 $\mu\text{mol/L}$), CaCl_2 (10 $\mu\text{mol/L}$) e rodamina 123 (0,4 $\mu\text{mol/L}$). As mitocôndrias (0,4 mg/ml) foram incubadas com imipramina 10, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$, e após adição de succinato de potássio (Suc) (5 mmol/L) (volume final 2 ml); a $\Delta\Psi$ foi avaliada espectrofluorimetricamente pelo aumento da fluorescência relativa da rodamina 123, em comprimento de onda de 505/525 nm (emissão/excitação respectivamente), por 700 segundos. As setas indicam o ponto de adição da droga (IMP), indutores e substratos. As figuras são representativas de no mínimo três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. Em **A**: ($\Delta\Psi$) em preparação adicionada apenas das respectivas concentrações de imipramina. A linha C representa controle adicionado de CCCP (1,0 $\mu\text{mol/L}$) ao final. Em **B**: $\Delta\Psi$ em preparação contendo imipramina nas respectivas concentrações e adicionada de agente indutor *t*-BOOH (0,6 mmol/L).

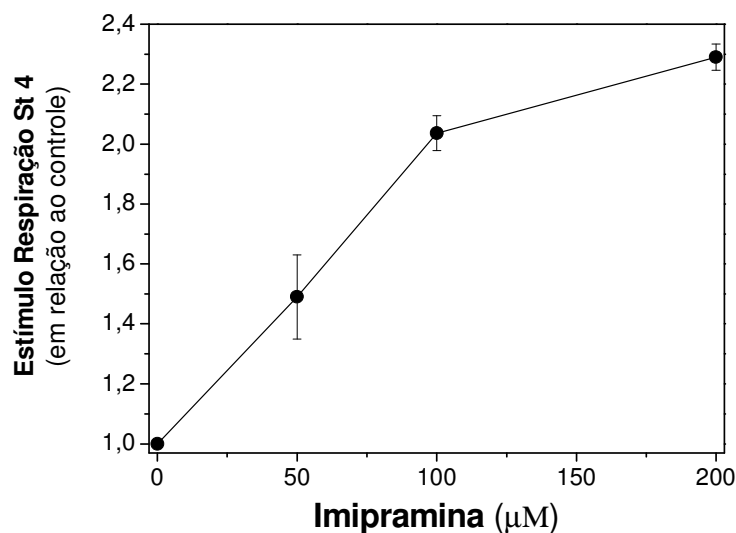


Figura 19: Efeito da imipramina sobre a velocidade de respiração do estado 4. As mitocôndrias (1,0 mg/mL) foram adicionadas em 1,5 mL de um meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, EGTA 0,5 mmol/L e K_2HPO_4 10 mmol/L, adicionado de succinato de potássio 5 mmol/L e rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$. O estímulo da respiração do estado 4 em função do controle foi avaliado após adição de 50, 100 e 200 $\mu\text{mol/L}$ de imipramina. A figura é representativa de pelo menos três ensaios com diferentes preparações mitocondriais.

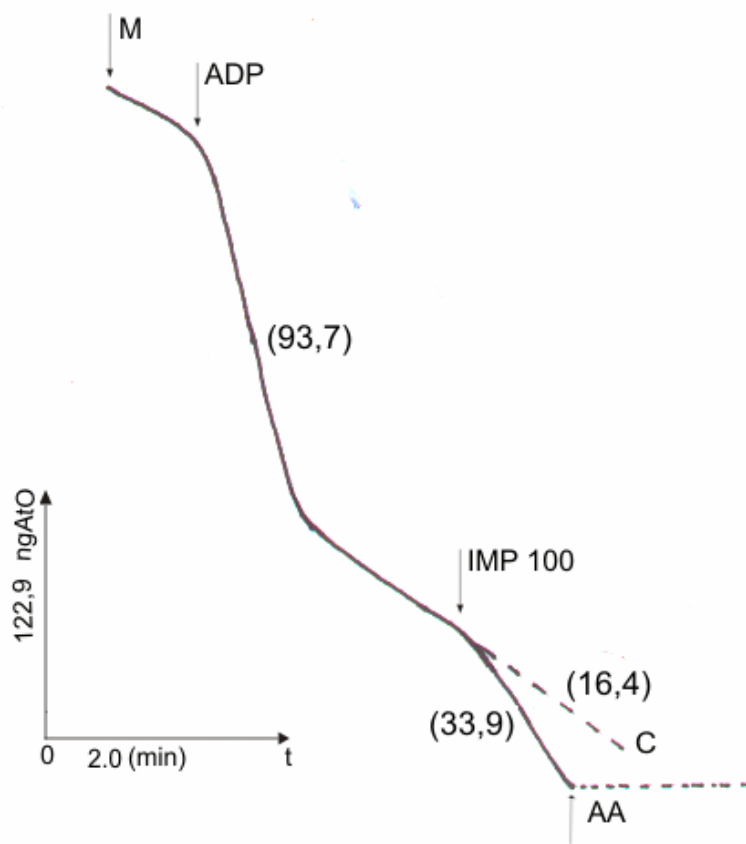


Figura 20: Efeito da imipramina (100 $\mu\text{mol/L}$) sobre o consumo de oxigênio mitocondrial. O traçado representativo da interferência da imipramina na velocidade de respiração do estado 4. As mitocôndrias (1,0 mg/ml) foram incubadas em meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, EGTA 0,5 mmol/L e K_2HPO_4 10 mmol/L e adicionadas de rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$ e succinato de potássio 5 mmol/L (substrato respiratório). A respiração foi iniciada com 0,4 mmol/L de ADP. O efeito desacoplador foi verificado após energização mitocondrial e fosforilação do ADP (estado 4), pela adição das concentrações de imipramina (50, 100 e 200 $\mu\text{mol/L}$) aqui demonstrado apenas o traçado referente a 100 $\mu\text{mol/L}$. Foi adicionado antimicina A (AA) (1 $\mu\text{g/ml}$) ao final do desacoplamento. As setas indicam o ponto de adição das substâncias. Os números entre parênteses indicam o consumo médio de oxigênio em ngAtO/min/mg. A figura é representativa de pelo menos três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

5. DISCUSSÃO

Várias evidências apontam a mitocôndria como um importante alvo a ser estudado entre os locais que integram mecanismos envolvidos nas lesões celulares, entre elas aquelas provocadas por isquemia/reperfusão. Neste aspecto, eventos como a abertura do PTP, dissipação do gradiente eletroquímico, a ruptura da homeostase de Ca^{2+} , e o aumento da geração EROs que podem levar a TPM, são eventos críticos para o dano celular associado às lesões celulares causadas por necrose, apoptose e isquemia/hipóxia (STAVROSVSKAYA, 2004; CASTILHO *et al.*, 1995). Desta forma, substâncias que atuam na mitocôndria prevenindo esses eventos são prováveis candidatos a agentes terapêuticos para estes referidos danos celulares. Tais estudos fornecem ainda ferramenta (indutores ou inibidores) para melhor compreensão dos mecanismos moleculares que envolvem as lesões na célula mediada por eventos como apoptose, necrose ou autofagia em condições de estresse oxidativo com efetiva participação da mitocôndria.

Neste sentido, nossos resultados demonstraram que o antidepressivo tricíclico imipramina apresentou efeito inibidor da TPM induzida por vários mecanismos que envolvem ação pró-oxidante. Esta inibição foi significativa frente aos indutores já descritos como potentes agentes geradores de EROs, como *t*-BOOH, Fe^{2+} e excesso de Ca^{2+} . O *t*-BOOH é um hidroperóxido orgânico e sua toxicidade está relacionada à depleção intracelular de proteínas tiol (oxidação de grupos SH) e glutatona reduzida (GSH) (CASTILHO *et al.*, 1995), devido a grande quantidade de radicais livres formados oriundos da reação de Fento (REED, 1990). Esta situação condiz com um estado de estresse oxidativo, onde o sistema antioxidante celular está depletado. Vários estudos têm utilizado este modelo de geração de radicais livres com envolvimento de *t*-BOOH para obter uma condição celular de estresse oxidativo. Entretanto, seu mecanismo molecular de geração de EROs ainda não está completamente elucidado (KANUPRIYA *et al.*, 2007).

Os agentes pró-oxidantes *t*-BOOH, Fe^{2+} e excesso de Ca^{2+} utilizados em nossos experimentos, provocam uma condição de estresse oxidativo no modelo biológico mitocondrial estudado. Com a depleção dos sistemas antioxidantes de defesa as membranas mitocondriais ficam expostas à ação deletéria de EROs gerados pela cadeia respiratória durante a respiração mitocondrial. Entre estes efeitos a TPM, vista em nossos experimentos pelo inchamento osmótico mitocondrial. Desta forma, também é possível compreender que o efeito de inibição da TPM verificado em nossos resultados, quando a imipramina foi utilizada

conjuntamente com os referidos agentes pró-oxidantes, pode ser devido ao seu discreto efeito *scavenger* de EROs e ao pequeno desacoplamento da respiração mitocondrial. Eventos já descritos como relacionados à ação protetora frente a EROs gerados pela mitocôndria (KORSMEYER *et al.*, 2000). A oxidação das membranas mitocondriais que ocorre durante a formação de EROs no processo de TPM induzido por *t*-BOOH ou Ca^{2+} é devido à formação principalmente de H_2O_2 (CASTILHO *et al.*, 1995). Intermediários reativos como o $\bullet\text{OH}$ também podem se formar, principalmente na oxidação induzida por Fe^{2+} através da reação de Fento-Haber-Weiss (REED, 1990). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a imipramina foi capaz de diminuir a geração de radicais livres pela mitocôndria e consequentemente os danos oxidativos causados por estes intermediários reativos, inibindo de forma significativa a TPM. Considerando a estrutura química da imipramina, formada por três anéis interligados em uma estrutura básica de carbono e hidrogênio, é possível atribuir um provável efeito *scavenger* deste composto frente a EROs gerados na cadeia respiratória mitocondrial ou induzidos por pró-oxidantes. Ainda, as características estruturais proporcionam a este composto, uma alta lipossolubilidade, permitindo a fácil difusão pela membrana mitocondrial (BEAVIS, 1989).

Recentes estudos têm demonstrado que a TPM mediada pela formação de um PTP não específico na membrana mitocondrial interna, é em última análise, responsável pelo dano celular provocado em situações de isquemia/reperfusão no tecido, que podem resultar em morte celular por necrose e apoptose (LEUNG & HALESTRAP, 2008). Os eventos metabólicos que ocorrem durante o estado de hipóxia, tais como diminuição na síntese de ATP, aumento de Pi, aumento de Ca^{2+} citosólico, aumento de Na^+ intracelular e diminuição do pH intracelular, proporcionam durante a reoxigenação condições para a ocorrência da abertura do PTP (CROMPTON, 1999). É conhecida a ação da imipramina como bloqueador de canal de Na^+ em nível do miocárdio, fenômeno correlacionado a um dos efeitos adversos desta droga (BALDESSARINI, 1989). Tal efeito promove a alcalinização do citosol dos cardiomiócitos com o bloqueio do sistema de troca iônica Na^+/H^+ , o qual parece estar correlacionado à inibição de sinalização química intracelular pelo Ca^{2+} (WATTS, *et al.*, 1998). Estes fenômenos relacionados ao bloqueio de canal iônico, proporcionados pela imipramina, podem antagonizar os efeitos relacionados ao gradiente de pH, gerados durante a hipóxia, e consequentemente, contribuir para inibição do PTP durante situações de reoxigenação do tecido. O cálcio intramitocondrial está envolvido na ativação de sítios alostéricos de enzimas da fosforilação oxidativa, ciclo do ácido cítrico, ATP sintase e o próprio ANT (BROOKES *et al.*, 2004). Entretanto, o excesso de Ca^{2+} na mitocôndria propicia

a depleção de ATP e pode levar em última análise a formação de EROs devido ao inchamento osmótico mitocondrial mediado pelo PTP. A imipramina inibe de forma eficiente a TPM disparada por diversos indutores, seja em condições de estresse oxidativo ou de excesso de cálcio.

Em estudo realizado para triagem de substâncias capazes de inibir a TPM, foi demonstrado que compostos tricíclicos e heterocíclicos estão relacionados entre 1040 compostos com capacidade para inibir a TPM (STAVROVSKAYA *et al.*, 2004), incluindo a imipramina e a nortriptilina. Segundo os trabalhos de Zhang *et al.* (2008), o inchamento osmótico mitocondrial, em condições crescentes de Ca^{2+} , pode ser retardado pela presença de nortriptilina, um análogo estrutural da imipramina, pertencente também à classe dos antidepressivos tricíclicos, porém o mecanismo responsável por tal efeito não foi esclarecido. Em concordância com este trabalho, nossos resultados também demonstraram uma inibição do inchamento osmótico mitocondrial pela imipramina, frente a elevadas concentrações de Ca^{2+} . Como a TPM é um evento relacionado à lesão cerebral em condições de isquemia/hipóxia seguida de reperfusão com danos neurológicos devido à necrose ou apoptose associada à TPM, drogas que exercem sua ação farmacológica em sítios do SNC e com potencial efeito antioxidante, têm sido atualmente relacionadas como possíveis neuroprotetores, nestas situações associadas à abertura do PTP (ZHANG *et al.*, 2008; KARMAKAR *et al.*, 2001; STAVROVSKAYA *et al.*, 2004).

As membranas biológicas, incluindo as mitocondriais são organizadas estruturalmente por uma bicamada composta por lipídios e proteínas. A oxidação destes lipídios de membrana (lipoperoxidação) pode levar a perda de seletividade e alterar os gradientes iônicos e de outras substâncias, causando disfunção celular e mitocondrial (MELZACKA *et al.*, 1990). O processo de lipoperoxidação é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e propagada por radicais peroxílas. Isto resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos, entre eles o MDA, que pode ser detectado como medida da lipoperoxidação (LIMA; ABDALLA, 2001). A imipramina em nossos experimentos demonstrou significativa proteção contra lipoperoxidação de membranas mitocondriais nas mesmas concentrações em que protegeu efetivamente a TPM. Isto sugere que a inibição da TPM pode estar associada às propriedades antioxidantes da imipramina. Com relação ao aspecto neuroprotetor sugerido para imipramina, a proteção da oxidação de lipídios em condições de estresse oxidativo é particularmente relevante neste caso, pois esta droga atravessa a barreira hemato-encefálica, atuando no SNC.

A oxidação de grupos tiólicos de proteínas de membrana mitocondrial (grupos SH), com conseqüente formação de pontes de dissulfeto está associada à abertura do PTP resultando em TPM (FAGIAN *et al.*, 1990; VALLE *et al.*, 1993). Dados da literatura propõem que a oxidação de grupos SH de proteínas da membrana mitocondrial pode ser promovida também por EROs, sendo que, condições de estresse oxidativo podem, dessa forma, promover a abertura do PTP (CASTILHO; KOWALTOWSKI; VERCESI, 1996). Nossos resultados mostraram que a imipramina foi capaz de proteger a oxidação dos grupos SH de proteínas da membrana mitocondrial interna induzida por *t*-BOOH, nas mesmas condições em que inibiu a TPM. Assim, estes resultados sugerem que a imipramina reduz os danos oxidativos em lipídeos e proteínas mitocondriais causados por EROs, sendo que tal proteção está associada ao efeito inibidor da TPM exibido pela imipramina. Para um melhor entendimento dos mecanismos antioxidantes da imipramina responsáveis pelo seu efeito inibitório sobre a TPM, investigamos diversos aspectos relacionados à geração de EROs mitocondrial e ao sistema de defesa antioxidante. O sistema antioxidante mitocondrial é composto por diversas substâncias, com destaque especial para a glutatona reduzida (GSH), um substrato da enzima glutatona peroxidase que atua sobre o H₂O₂, transformando-o em O₂ e H₂O. A GSH é um tripeptídeo formado por glicina, glutamato e cisteína, sendo o composto tiólico redutor mais abundante no meio intracelular (RIBEIRO *et al.*, 2005). Assim, foi avaliado o efeito direto da imipramina sobre os níveis de GSH e os seus efeitos sobre a oxidação da GSH induzida por *t*-BOOH. Durante uma condição de estresse oxidativo, como ocorre na situação experimental descrita, os níveis mitocondriais de GSH são depletados. Esta condição predispõe ao dano mitocondrial por EROs produzidos pela própria mitocôndria, o que pode resultar em conseqüente TPM. Como a imipramina não interfere nos níveis de GSH, mas protege a TPM frente ação oxidante por *t*-BOOH, isto permite pressupor que esta droga atue como antioxidante na presença de EROs formados pela mitocôndria, em uma situação de estresse oxidativo.

O ânion superóxido (O₂^{-•}) é um radical formado pela redução monoelétrica do O₂ na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (FRIDOVICH, 1989). Além disso, o sistema xantina/xantina oxidase também é capaz de gerar esse radical *in vitro* (McCORD & FRIDOVICH, 1970). A formação de O₂^{-•} durante a conversão de hipoxantina a ácido úrico no catabolismo das purinas também pode ocorrer *in vivo* (RIBEIRO *et al.*, 2005). O radical superóxido possui um tempo de meia-vida bastante curto (1x10⁻⁶ s), ou seja, apresenta alta reatividade (HALLIWELL & CROSS, 1994). A reação deste radical com citocromo *c*, promovendo a sua redução, pode ser utilizada para determinar a atividade *scavenger* de

substâncias. Embora tenhamos observado que a imipramina diminui significativamente a geração mitocondrial de EROs e seus danos oxidativos às macromoléculas mitocondriais, observamos apenas discreto efeito *scavenger* de $O_2^{\cdot-}$ pela imipramina. Contudo, tal fato pode estar relacionado à relativa hidrofobicidade da imipramina, pois no modelo experimental *in vitro* usado, os ânions superóxido são gerados em ambiente aquoso, altamente polar, atacando preferencialmente o citocromo *c* e não a imipramina. Considerando que a imipramina é um composto com elevada lipossolubilidade (BALDESSARINI, 1989) capaz de interagir com membranas biológicas (AHYAYAUCH *et al.*, 2004), é possível que esta se particione preferencialmente na membrana mitocondrial, não atingindo a matriz mitocondrial. Esta observação é corroborada, ainda que de forma hipotética, pelos resultados demonstrados no ensaio onde foi possível verificar a atividade da imipramina sobre os níveis de GSH. Como este composto está amplamente presente na matriz mitocondrial, a imipramina não foi capaz de interferir em seus níveis mesmo em presença de EROs, situação de estresse oxidativo. Porém, a imipramina protege a TPM diante da formação de EROs gerados na cadeia respiratória mitocondrial, que neste caso pode ser devido, em parte ao efeito *scavenger*, considerando que os sítios de produção de EROs nesta situação ocorrem em nível da membrana mitocondrial.

Com o ensaio utilizando a sonda DCFDA em uma condição mitocondrial de estresse oxidativo, mediante ação dos pró-oxidantes: Ca^{2+} em concentração elevada e *t*-BOOH. A capacidade da imipramina de inibir a geração de EROs pela mitocôndria foi avaliada nesta condição. Este experimento foi realizado nas mesmas condições do *swelling* mitocondrial, situação em que a imipramina inibiu a TPM. Desta forma, a diminuição da geração de EROs mostrada neste ensaio poderia estar perfeitamente relacionada à inibição da TPM revelada no inchamento osmótico mitocondrial. Durante a situação definida como estresse oxidativo ocorre depleção significativa de GSH (MICHIELS, 1994). E isto é uma consequência do ataque das EROs produzidas por ação dos pró-oxidantes. Entretanto a durante a respiração mitocondrial ocorre a geração de EROs suficiente para afetar a integridade da membrana mitocondrial interna, pois os sistemas antioxidantes foram exauridos, condição esta, que permite a abertura do PTPM e consequente TPM (BROOKES *et al.*, 2004). Sabemos que a imipramina não afeta os níveis de GSH, desta forma é possível dizer que este sistema antioxidante foi depletado nesta condição experimental. Como a imipramina também protege a TPM nesta mesma condição, e o ensaio com a sonda DCFDA na presença de imipramina, realizado nesta situação de estresse oxidativo, mostrou significativa diminuição na geração de

EROs, podemos atribuir a imipramina participação neste evento que resultou na diminuição de EROs gerados pela mitocôndria.

A formação de $O_2^{\cdot-}$ ocorre naturalmente durante o citado catabolismo das purinas, porém sua produção pode ser intensificada em uma condição de isquemia seguida de reperfusão, onde esta via de reação catabólica é intensificada após reoxigenação do tecido, devido ao acúmulo de hipoxantina na fase de isquemia. O radical superóxido é prontamente convertido à H_2O_2 e O_2 , pela enzima superóxido dismutase (SOD), mas o peróxido de hidrogênio formado pode promover diversos danos em membranas se não for eliminado pelo sistema GSH/GPx (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Lembrando que, a eficiência deste sistema redox, depende da manutenção de níveis adequados de NADPH citosólico e mitocondrial (NELSON & COX, 2000), condição que pode não estar presente em situação de isquemia/hipóxia. Portanto, a eliminação do radical superóxido é fundamental na prevenção da lesão celular pelo peróxido de hidrogênio e propagação da seqüência de geração de EROs (HALESTRAP, 1998). Desta forma, compostos com perfil *scavenger* frente a EROs de grande reatividade como $O_2^{\cdot-}$, pode ser de grande significância em uma condição celular de estresse oxidativo.

Nos últimos anos alguns estudos têm sublinhado que as alterações na estabilidade estrutural e funcional da membrana mitocondrial estão envolvidas com a patogênese de danos celulares, e correlacionadas a situações que propiciam a formação de EROs, com efetiva perturbação da homeostase celular de Ca^{2+} (FAGIAN *et al.*, 1990; ARMSTRONG, 2006). O aumento na atividade de fosfolipases, proteases, produção de EROs; está associado ao influxo celular de Ca^{2+} . Tais fatores culminam com a captação mitocondrial de Ca^{2+} , o que predispõe a instalação do PTP (KRISTIÁN & SIESJÖ, 1998; GUNTER *et al.*, 2004). A participação do PTP durante a morte celular *in vivo* por isquemia/reperfusão, é sugerida devido ao efeito protetor demonstrado pela ciclosporina A (clássico inibidor do PTP) administrados a pacientes nestas condições (NORENBERG & RAO, 2007). Todavia, este efeito é limitado ao dano transcorrido nas primeiras horas no foco da lesão, assim há participação de outros eventos na manutenção do PTP. De qualquer modo, o Ca^{2+} participa do processo de morte celular isquêmica, independente do mecanismo (KRISTIÁN & SIESJÖ, 1998).

A imipramina inibe a TPM induzida por excesso de Ca^{2+} e também impede o efluxo mitocondrial de Ca^{2+} . Como o excesso intramitocondrial de Ca^{2+} promove condições para abertura do PTPM, é possível atribuir a este composto, uma estreita participação no mecanismo que relaciona o Ca^{2+} à TPM. Este evento também reforça a hipótese da discreta atividade *scavenger* da imipramina e sua capacidade antioxidante frente à formação de EROs

pela mitocôndria. Dados da literatura sugerem que o sequestro de Ca^{2+} pela mitocôndria, como mecanismo de regulação da homeostase deste íon, pode estar correlacionada à oxidação de grupos tiol de proteínas. Parece haver a formação de agregados protéicos referente à oxidação de grupos SH, quando ocorre alteração estrutural na membrana mitocondrial devido ao excesso de Ca^{2+} como pró-oxidante (FAGIAN *et al.*, 1990; CASTILHO *et al.*, 1996). Em concordância com estes dados, verificamos que a imipramina protege a oxidação de grupos SH da membrana mitocondrial interna, e a TPM na presença de Ca^{2+} como agente pró-oxidante.

Contudo, outros estudos sugerem que a abertura do PTP como consequência da sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} , seja um mecanismo de efluxo rápido deste cátion. E, a finalidade deste rápido efluxo mitocondrial de Ca^{2+} , além de minimizar danos metabólicos na matriz mitocondrial, seria a manutenção do $\Delta\Psi$ mitocondrial, conservando, assim o equilíbrio funcional da organela (CHALMERS & McCARRON, 2008; SMAILI & RUSSELL, 1999). O $\Delta\Psi$ mitocondrial depende de uma série de fatores, como concentração de ATP, pH através da membrana, velocidade de respiração, produção de EROs e da concentração de Ca^{2+} intramitocondrial, que pode influenciar a maioria destes fatores. Assim, é perfeitamente coerente que diante da elevação das concentrações de Ca^{2+} na matriz mitocondrial, ocorra a abertura de um PTP funcional que promova o efluxo deste íon evitando a dissipação do $\Delta\Psi$ e consequente dano mitocondrial. A literatura ressalta que a abertura do PTP promove a dissipação do $\Delta\Psi$ (CASTILHO *et al.*, 1995). Entretanto, parece que a ocorrência do PTP devido à sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} , como mecanismo de efluxo deste íon, tende a manter o $\Delta\Psi$ e preservar o metabolismo mitocondrial.

De fato, nossos resultados são coerentes com estes estudos, pois a sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} induziu o PTPM, porém não dissipou o $\Delta\Psi$. Isto permite pressupor que nesta circunstância, apesar de ocorrer a abertura do PTP, evento verificado através do inchamento osmótico mitocondrial; o $\Delta\Psi$ é preservado por meio do efluxo mitocondrial de Ca^{2+} via PTP. Atualmente tem sido descrito a atividade de antidepressivos tricíclicos, entre eles a imipramina, sobre o bloqueio de canais de Ca^{2+} sensível a voltagem. De acordo com estes estudos, esta classe de medicamentos pode inibir o influxo de Ca^{2+} em células pancreáticas secretoras de insulina (ANTOINE *et al.*, 2004) e em células de músculo estriado (BECKER *et al.*, 2004). Desta forma, este composto pode realmente influenciar o movimento mitocondrial de Ca^{2+} , afetando de forma categórica suas concentrações citoplasmáticas e mitocondriais. Este achado é de substancial importância, principalmente se considerarmos os

efeitos adversos desta droga e seu sítio de ação no sistema nervoso central, visto que o movimento mitocondrial de Ca^{2+} está intimamente correlacionado a eventos como apoptose, necrose e autofagia. Entretanto, ainda que amplamente referido, o mecanismo homeostático mitocondrial de Ca^{2+} ainda requer melhor compreensão (GUNTER *et al.*, 2004).

Outro achado de relevância está relacionado à respiração mitocondrial e conseqüentemente ao metabolismo do ATP. A síntese do ATP que ocorre devido à fosforilação oxidativa do ADP é dependente de um gradiente eletroquímico de prótons (H^+), produzido pela respiração mitocondrial e mantido pela impermeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons (MITCHELL, 1961). A única forma de retorno destes prótons é através da enzima F_1F_0 -ATP sintase, com conseqüente síntese de ATP. Desta forma, a fosforilação oxidativa está perfeitamente acoplada a respiração mitocondrial. Compostos protonofóricos, capazes de deslocar H^+ através da membrana mitocondrial interna, podem dissipar o potencial eletroquímico da membrana, desacoplando a fosforilação oxidativa (HATEFI, 1985). Esta condição proporciona um aumento da velocidade de transporte de elétrons pelos complexos respiratórios e conseqüentemente do consumo de O_2 que dependendo da intensidade pode não ser suficiente para restabelecer o gradiente eletroquímico, diminuindo a síntese de ATP (CASTILHO *et al.*, 1996; BROOKES, 2005).

A literatura sugere que a imipramina, em longo prazo, pode estimular a respiração mitocondrial (KATYARE, 1995). Verificamos *in vitro* que este composto promove um pequeno desacoplamento da respiração mitocondrial, com aumento do consumo de O_2 no estado 4 respiratório. Estudos recentes têm mencionado que um discreto desacoplamento da cadeia respiratória diminui a geração de EROs e está associado à proteção de organelas e células de condições de estresse oxidativo (ANDREWS *et al.*, 2005; CALDEIRA DA SILVA *et al.*, 2008). Durante a respiração em mitocôndrias isoladas energizadas com succinato ocorre uma força próton-motriz suficiente para estabelecer um fluxo reverso de elétrons e permitir a formação de superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (LIU *et al.*, 2002) e um pequeno ou discreto desacoplamento permite uma diminuição na geração de EROs pela mitocôndria. Este leve desacoplamento pode não alterar de forma significativa ou mensurável o potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e a síntese de ATP, mas é capaz de diminuir a geração de EROs. Desta forma, parece que a formação de EROs não é totalmente dependente ou não é sensível ao $\Delta\Psi$ (LASZLO & ADAM-VIZI, 2007; TRETTER *et al.*, 2007), condizente com nossos resultados referentes ao efeito da imipramina sobre o potencial de membrana mitocondrial. Assim, o efeito antioxidante demonstrado pela imipramina, parece ter como principal mecanismo o leve desacoplamento da cadeia respiratória, associado a um pequeno efeito *scavenger*. O bloqueio

espacial do PTP pela imipramina, em situação de excesso de Ca^{2+} intramitocondrial, impendendo desta forma seu efluxo, ou mesmo em uma condição de estresse oxidativo inibindo o inchamento osmótico mitocondrial, embora improvável, é uma hipótese a ser considerada que requer maiores estudos.

A geração de EROs pela mitocôndria ocorre em condições normais durante a respiração mitocondrial, porém essa produção eleva-se em condições patológicas. Um fator importante com potencial para regular a geração de EROs na cadeia respiratória mitocondrial, pode ser o pequeno desacoplamento da fosforilação oxidativa, o que ocorre mesmo em detrimento a síntese de ATP (BROOKES, 2005). Neste sentido, como o discreto desacoplamento da fosforilação oxidativa tende a promover diminuição na geração das EROs (LASZLO & ADAM, 2007), marcadamente este evento tem implicações sobre o metabolismo energético, sendo de significativa importância na pesquisa de EROs mitocondrial, bem como, os diversos danos celulares provocados por estresse oxidativo com participação da mitocôndria.

A elucidação dos mecanismos que envolvem a participação de compostos como a imipramina na proteção da TPM é de grande relevância para o aspecto farmacológico desta classe de drogas, principalmente considerando o dano celular cerebral provocado em condições de isquemia/hipóxia. Outro aspecto de importância revelado pela capacidade antioxidante desta droga, é o desenvolvimento de estratégias terapêuticas com a participação desta classe de compostos, visando a possibilidade da manipulação mitocondrial da geração de EROs.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

1. A imipramina 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ inibiu a TPM induzida pelos pró-oxidantes *t*-BOOH, Fe^{2+} /Citrato e sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} ,
2. ocorre proteção da lipoperoxidação e proteção a oxidação de grupos SH da membrana mitocondrial interna na presença de imipramina nas mesmas concentrações em que inibiu a TPM,
3. a imipramina 10, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ não interfere *in vitro* nos níveis de GSH, mesmo em condições de estresse oxidativo,
4. é possível atribuir uma ação antioxidante à imipramina 100 e 200 $\mu\text{mol/L}$, mediado por pequeno efeito *scavenger* frente ao radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$),
5. a imipramina 100 $\mu\text{mol/L}$ é capaz de retardar o efluxo mitocondrial de Ca^{2+} na presença do pró-oxidante *t*-BOOH e impedir este efluxo em situação de sobrecarga de Ca^{2+} ,
6. a imipramina 10, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ não dissipa o $\Delta\Psi$ mitocondrial e não é capaz de impedir sua dissipação de modo significativo durante a geração de EROs induzida por *t*-BOOH,
7. entretanto a imipramina 100 e 200 $\mu\text{mol/L}$ estimulou a velocidade do estado 4 da respiração mitocondrial, possivelmente por um discreto desacoplamento da fosforilação oxidativa,
8. estes achados permitem atribuir uma atividade antioxidante a imipramina, fato relevante para futuro terapêutico desta droga, principalmente considerando a proteção contra o dano celular cerebral provocado nas condições de isquemia/reperfusão.

7. REFERÊNCIAS

- AHYAYAUCH, H.; GOÑI, M.F.; BENNOUNA, M. Interaction of electrically neutral and cationic forms of imipramine with liposome and erythrocyte membranes. **Int J Pharm.**, v. 279, n. 1-2, p. 51-8, 2004.
- AI NASSER, I.; CROMPTON, M. The reversible Ca²⁺-induced permeabilization of rat liver mitochondria. **Biochem J.**, v. 239, n. 1, p. 19-29, 1986.
- ANDREWS, Z.B.; DIANO, S.; HORVATH, T.L. Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. **Nat.Rev.Neurosci.**, v. 6, n. 11, p. 829-840, 2005.
- ANTOINE, M.H., GALL, D., SCHIFFMANN, S.N., LEBRUN, P. Tricyclic antidepressant imipramine reduces the insulin secretory rate in islet cells of Wistar albino rats through a calcium antagonistic action. **Diabetologia**, v. 47, n. 5, p. 909-16, 2004.
- ARMSTRONG, J.S. The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. **Mitochondrion**, v. 6, p. 225-234, 2006.
- ASAKURA, T.; OHKAWA, K. Chemotherapeutic agents that induce mitochondrial apoptosis. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 4, n. 7, p. 577-590, 2004.
- BALDESSARINI, R.J.; TARAZI, F.I. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**, 10^a ed. New York: Mc Graw-Hill, 1989. p. 485-87.
- BEAVIS, A.D. On the inhibition of the mitochondrial inner membrane anion uniporter by cationic amphiphiles and other drugs. **J Biol Chem.**, v. 264, n. 3, p. 1508-15, 1989.
- BECKER, B.; MOREL, N.; VANBELLINGHEN, A.M.; LEBRUN, P. Blockade of calcium entry in smooth muscle cells by the antidepressant imipramine. **Biochem Pharmacol.**, v. 68 n. 5, p. 833-42, 2004.
- BENETELLO P; FULRNAUT M; ZARA G, Imipramine pharmacokinetics in depressed geriatric patients. **Int J Clin Pharmacol Res.**, v. 10, p. 191-195, 1990.
- BERNARDI, P. KRAUSKOPF, A.; BASSO, E.; PETRONILLI, V.; BLACHLY-DYSON, E.; DI LISA, F.; FORTE, M. A. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. **FEBS J.**, v. 273, p. 2077-2099, 2006.
- BRENNER, C.; GRIMM, S. The permeability transition pore complex in cancer cell death **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4744-56, 2006.
- BROOKES, P.S. Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple. **Free Radic Biol Med.**, v. 38, p. 12-23, 2005.
- BROOKES, P.S.; YOON, Y.; ROBOTHAM, J.L.; ANDERS, M.W.; SHEU, S.S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **Am. J. Physiol.**, v. 287, p. c817-c833, 2004.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. Gleischer, S.; Packer, L. In: **Methods in Enzymology**, Academic press, New York, v. 52C, p. 302-310, 1978.

CAIN, K.; SKILLETER., D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. **Biochemical Toxicology**, Oxford, IRL Press, p. 217-254, 1987.

CALDEIRA DA SILVA, C.C.; CERQUEIRA, F.M.; BARBOSA, L.F.; MEDEIROS, M.H.; KOWALTOWSKI, A.J. Mild Mitochondrial Uncoupling in Mice Affects Energy Metabolism, Redox Balance and Longevity. **Aging Cell.**, v. 7, n. 4, 2008.

CARRERAS, M.C.; FRANCO, M.C.; PERALTA, J.G.; PODEROSO, J.J. Nitric oxide, complexo I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, n. 1-2, p. 125-139, 2004.

CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; MEINICKE, A.R.; BECHARA, E.J.H.; VERCESI, A.E. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by t-Butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Radic Biol Med.**, v. 18, n. 3, p. 479-486, 1995.

CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 28, n. 6, p. 523-529, 1996.

CHALMERS, S.; McCARRON, J.G. The mitochondrial membrane potential and Ca^{2+} oscillations in smooth muscle. **Journal of Cell Science**, v. 121, p.75-85, 2008.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv. Enzymol.**, v.17, p.65-134, 1956.

CROMPTON, M. The Mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochem J.**, v. 341, p. 233-49, 1999.

CROMPTON, M.; COSTI, A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca^{2+} , inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca^{2+} overload. **Eur J Biochem.**, v. 178, n. 2, p. 489-501, 1988.

ETO, K.; FUKUDA, T.; ARAKI, Y.; INOUE, B.; OGATA, M. Effect of tricyclic drugs on mitochondrial membrane. **Acta Med Okayama.**, v. 39, n. 4, p. 289-95, 1985.

FAGIAN, M.M.; PEREIRA, da S.L.; MARTINS, I.S.; VERCESI, A.E. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. **J Biol Chem.**, v. 265, n. 32, p. 19955-60, 1990.

FAUSTIN, B.; ROSSIGNOL, R.; ROCHER, C.; BENARD, G.; MALGAT, M.; LETELLIER, T. Mobilization of adenine nucleotide translocators as molecular bases of the biochemical threshold effect observed in mitochondrial diseases. **J Biol Chem.**, v. 279, n. 19, p. 20411-21, 2004.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An adaptation to a paramagnetic gas. **J Biol Chem.**, v. 264, n. 14, p. 7761-4, 1989.

GLASSMAN, A.H., ROOSE, S.P., BIGGER, J.T.Jr. The safety of tricyclic antidepressant in cardiac patients: risk-benefit reconsidered. **JAMA**, v. 269, p. 2673-75, 1993.

GLASS-MARMOR, L.; MORGENSTERN, H.; BEITNER, R. Calmodulin antagonists decrease glucose 1,6-biphosphate, fructose 1,6-biphosphate, ATP and viability of melanoma cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 313, n. 3, p. 265-271, 1996.

GUNTER, T.E.; YULE, D.I.; GUNTER, K.K.; ELISEEV, R.A.; SALTER, J.D. Calcium and mitochondria. **FEBS Lett.**, v. 567, n. 1, p. 96-102, 2004.

HALESTRAP, A.P. Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. **Biochem J.**, v. 278, p. 715-9, 1991.

HALESTRAP, A.P.; KERR, P.M.; JAVADOV, S.; WOODFIELD, K.Y. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1366, n. 1-2, p. 79-94, 1998.

HALESTRAP, A.P.; MCSTAY, G.P.; SAMANTHA, J. Clarke. The permeability transition pore complex: another view, **Biochimie**, v. 84, p. 153-166, 2002.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ Health Perspect**, v. 102, Suppl 10, p. 5-12, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Protection against oxidants in biological systems: The superoxide theory of oxygen toxicity. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radic Biol Med.**, Clarendon Press, 1989. p. 86.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186B, 1990. p. 1-85.

HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 1015-1069, 1985.

HIGUCHI Y. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 8, n. 4, p. 455-464, 2004.

JOCELYN, P. C. Spectrophotometric assay of thiols. **Methods Enzymology**, v. 143, p. 44-67, 1987.

KANUPRIYA, D.P.; RAM, M.S.; SAWHNEY, R.C.; ILAVAZHAGAN, G.; BANERJEE, P.K. Mechanism of *tert*-butylhydroperoxide induced cytotoxicity in U-937 macrophages by alteration of mitochondrial function and geration of ROS. **Toxicology in vitro**, v. 21, p. 846-854, 2007.

KARMAKAR, P.; NATARAJAN, A.T.; PODDAR, R.K.; DASGUPTA, U.B. Induction of apoptosis by phenothiazine derivatives in V79 cells. **Toxicology Letters**, v. 125, p. 19-28, 2001.

KATYARE, S.S.; RAJAN, R.R. Effect of long-term in vivo treatment with imipramine on the oxidative energy metabolism in rat brain mitochondria. **Comp Biochem Physiol.**, v. 112C, n. 3, p. 353-7, 1995.

KOOLMAN, J; RÖHM, K H. **Bioquímica texto e atlas**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KORSMEYER, S.J.; WEI, M.C.; SAITO, M.; WEILER, S.; OH, K.J.; SCHLESINGER, KOWALTOWSKI, A.J. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. **Braz J Med Biol Res.**, n. 33, n. 2, p. 241-250, 2000.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**, v. 26, n. 3-4, p. 463-471, 1999.

KRISTENSEN C.B. Imipramine serum protein binding in healthy subjects. **Clin Pharmacol Ther**, v. 35, n. 689-694, 1983.

KRISTIÁN, T.; SIESJÖ, B.K. Calcium in ischemic cell death. **Stroke**, v. 29, n. 3, p. 705-18, 1998.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiol Rev.**, v. 87, p. 99-163, 2007.

LASZLO, T.; ADAM-VIZI, V. Uncoupling is without an effect on the production of reactive oxygen species by in situ synaptic mitochondria. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, p. 1864-71, 2007.

LE QUOC, K.; LE QUOC, D. Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 265, p. 249-257, 1988.

LEUNG, A.W.; HALESTRAP, A.P. Recent progress in elucidating the molecular of the mitochondrial permeability transition pore. **Biochim Biophys Acta**, v. 1777, n. 7-8, p. 946-52, 2008.

LEVKOVITZ, Y.; GIL-AD, I.; ZELDICH, E.; DAYAG, M.; WEIZMAN, A. Differential induction of apoptosis by antidepressants in glioma and neuroblastoma cell lines: evidence for p-c-Jun, cytochrome c, and caspase-3 involvement. **J Mol Neurosci.**, v. 27, n. 1, p. 29-42, 2005.

LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **J Neurochem.**, v. 80, n. 5, p. 780-7, 2002.

MARTINO, I.; GREEN D. R. Breaking the mitochondrial barrier. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 2, n. 1, p. 63-7, 2001.

MARTINOU, J.C. The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. **J Cell Biol.**, v. 144, n. 5, p. 883-9, 1999.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. **J Biol Chem.**, v. 245, n. 6, p. 1374-7, 1970.

McCORMACK, J.G.; DELTON, R.M. Intracellular calcium ions and intramitochondrial Ca^{2+} in the regulation of energy metabolism in mammalian tissues. **Proc Nut Soc.**, v. 49, n. 1, p. 57-75, 1990.

MELZACKA, M.; SAS-KORCZYNSKA, A.; SYREK, M. The effect of imipramine on lipid peroxidation in the rat cerebral cortex. **Pol J Pharmacol.**, v. 47, n. 1, p. 25-30, 1995.

MICHIELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Rad Biol Med.**, v. 17, n. 3, p. 235-48, 1994.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p. 144-8, 1961.

MORENO, A.R.; MORENO, H.D.; SOARES, M.B.M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v. 21, Supl. 1, 1999.

MURPHY, E.; STEENBERGEN, C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. **Physiol Rev**, v. 88, p. 581-609, 2008.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3ed. São Paulo: Savier, 2000.

NIEMINEN, A.L.; BYRNE, A.M.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J.J. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. 1286-94, 1997.

PETROSILLO, G.; RUGGIERO, F.M.; PISTOLÉESE, M.; PARADIES, G. Ca^{2+} -induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms. **J Biol Chem.**, v. 279, p. 53103-08, 2004.

POTTER, W.Z.; HOLLISTER, L.E. Fármacos antidepressivos. In: KATZUNG, B.G., **Farmacologia básica e clínica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 404-15.

REED, D.J. Glutathione: Toxicological implications. **Annu. Rev. Toxicol.**, v. 30, p. 603 - 31, 1990.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **J Biosci.**, v. 21, n. 3, p. 133-49, 2005.

RODRIGUES, T.; SANTOS A.C.; PIGOSO A.A.; MINGUATTO F.E.; UYEMURA S.A.; CURTI, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis – potentially implicated mechanisms. **British journal of Pharmacology**, v. 136, p. 136-142, 2002.

SADOCK, J.B.; SADOCK, A.V. **Manual de farmacologia psiquiátrica de Kaplan e Sadock**. 3ª ed. São Paulo: Artmed, 2002.

SAUTER C, Cytostatic activity of commonly used tricyclic antidepressants. **Oncology**, v. 46, p. 155-7, 1989.

SIES, H. Biological redox systems and oxidative stress. **Cell Mol Life Sci.**, v. 64, n. 17, p. 2181-8, 2007.

SKULACHEV, V.P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. **Apoptosis**. v. 11, n. 4, p. 473-85, 2006.

SMAILI, S.S.; RUSSELL, J.T. Permeability transition pore regulates both mitochondrial membrane potential and agonist-evoked Ca²⁺ signals in oligodendrocyte progenitors. **Cell Calcium**. v. 26, n. 3-4, p. 121-130, 1999.

STAHL, S M. **Psicofarmacologia. Base neurocientífica e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Medsi, 2002.

STAVROSVSKAYA, I.G.; NARAYANAN, M.V.; ZHANG, W.; KRASNIKOV, B.F.; HEEMSKERK, J.; YOUNG, S.S.; BLASS, J.P.; BROWN, A.M.; BEAL, M.F.; FRIEDLANDER, R.M.; KRISTAL, B.S. Clinically approved heterocyclics act on a mitochondrial target and reduce stroke-induced pathology. **J Exp Med.**, v. 200, n. 2, p. 211-22, 2004.

TRETTNER, L.; MAYER-TAKACS, D.; ADAM-VIZI, V. The effect of bovine serum albumin on the membrane potential and reactive oxygen species generation in succinate-supported isolated brain mitochondria. **Neurochem Int.**, v. 50, n. 1, p. 139-47, 2007.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol.**, v. 552, p. 335-44, 2003.

VALLE, V.G.R.; FAGIAN, M.M.; PARENTONI, L.S.; MEINICKE, A.R.; VERCESI, A.E. The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization. **Arch Biochem Biophys.**, v. 307, n. 1, p. 1-7, 1993.

VOET, D; VOET, J.G. **Biochemistry**, 2ª ed., New York: Ie-Willey, 1995. p. 563-98.

VOET, D; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 492-525.

WEINBACH, E.C.; COSTA, J.L.; NELSON, B.D.; CLAGGETT, C.E.; HUNDAL, T.; BRADLEY, D.; MORRIS, S.J. Effects of tricyclic antidepressant drugs on energy-linked reactions in mitochondria. **Biochem Pharmacol.**, v. 35, n. 9, p. 1445-51, 1986.

XIA, Z.; BERGSTRAND, A.; DE PIERRE, J.W.; NÄSSBERGER, L. The antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram induce apoptosis in human acute myeloid leukemia HL-60 cells via caspase-3 activation. **J Biochem Mol Toxicol.**, v. 112, n. 3, p. 353-7, 1999a.

XIA, Z.; KARLSSON, H.; DE PIERRE, J.W.; NÄSSBERGER, L. Tricyclic antidepressants induce apoptosis in human T lymphocytes. **Int J Immunopharmacol.**, v. 19, n. 11-12, p. 645-54, 1997.

XIA, Z.; LUNDGREN, B.; BERGSTRAND, A.; De PIERRE, J.W.; NÄSSBERGER, L. Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-X(L). **Biochem Pharmacol.**, v. 57, n. 10, p. 1199-208, 1999b.

YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K.; KIM, C.N.; IBRADO, A.M.; CAI, J.; PENG, T.I.; JONES, D.P.; WANG, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**, v. 275, n. 5303, p. 1129-32, 1997.

ZAMZAMI N, KROEMER G. Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization-the (w)hole story? **Curr Biol.**, v. 13, n. 2, p. 71-3, 2003.

ZHANG, W.H.; WANG, H.; WANG, X.; NARAYANAN, M.V.; STAVROVSKAYA, I.G.; KRISTAL, B.S.; FRIEDLANDER, R.M. Nortriptyline protects mitochondrial and reduce cerebral ischemia/hypoxia injury. **Stroke**, v. 39, n. 2, p. 455-62, 2008.

ZHAO, K.; ZHAO, G.M.; WU, D.; SOONG, Y.; BIRK, A.V.; SCHILLER, P.W.; SZETO, H.H. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. **J Biol Chem.**, v. 279, n. 33, p. 34682-90, 2004.

ZHU, L.P.; YU, X.D.; LING, S.; BROWN, R. A.; KUO, T.H. Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in the regulation of apoptotic and necrotic cell death. **Cell Calcium**, v. 28, n. 2, p. 107-17, 2000.

ZORATTI, M.; SZABÒ, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1241, n. 2, p. 139-76, 1995.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)