

EFEITOS AGUDOS DA CLOMIPRAMINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM HEPATÓCITOS PRIMÁRIOS ISOLADOS DE RATO

Tawany Aparecida Valério dos santos (PIC/Uem), Nathalia Miranda, Paulo Francisco Veiga Bizerra, Fernanda Sayuri Itou da Silva, Rodrigo Polimeni Constantin (Co-Orientador), Eduardo Hideo Gilglioni (Orientador), e-mail: eduardo.hideo.gilglioni@ulb.be

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas /Maringá, PR.

Área: 20800002 – Bioquímica / Subárea: 20803001 – Metabolismo e bioenergética

Palavras-chave: Clomipramina, Antidepressivo, Hepatotoxicidade.

Resumo: A clomipramina é um antidepressivo tricíclico amplamente utilizado no tratamento de transtornos como depressão e ansiedade. Alguns relatos indicam que a clomipramina pode causar hepatotoxicidade e intoxicação, mas seus efeitos sobre o fígado e a função mitocondrial não são completamente descritos. Com isso o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da clomipramina sobre o consumo de oxigênio mitocondrial em hepatócitos primários isolados e parâmetros relacionados a viabilidade celular. A clomipramina afetou o consumo de oxigênio mitocondrial em hepatócitos, aumentando o consumo de oxigênio no estado II da respiração. Estes resultados suportam que a clomipramina atue como um desacoplador da fosforilação oxidativa, podendo comprometer a homeostase energética celular. Os efeitos da clomipramina sobre a função mitocondrial afetaram a viabilidade celular conforme indicado pelo extravasamento de enzimas intracelulares e aumento da morte celular após a incubação dos hepatócitos com clomipramina.

Introdução

A clomipramina é um dos antidepressivos tricíclicos mais comumente utilizados no tratamento de depressão e transtornos de ansiedade, particularmente transtornos obsessivo-compulsivos e pânico. As propriedades antidepressivas e ansiolíticas da clomipramina estão relacionadas à sua especificidade no sistema serotoninérgico juntamente com a inibição do transportador de norepinefrina, e a interação com outros receptores (TAVISH, 1990).

Quando administrada oralmente, a clomipramina é rapidamente absorvida pelo trato digestivo, liga-se a proteínas plasmáticas e se torna amplamente distribuída nos tecidos. No fígado sofre biotransformação pelo sistema enzimático citocromal P450 (KRUGER, et al., 1986), tornando o

fígado um órgão susceptível a lesões induzidas pela clomipramina. Foram relatados casos de lesão hepática aguda clinicamente aparente em indivíduos sob o tratamento com a clomipramina (ALDERMAM, et al., 1993; VOICAN, et al., 2014; WIERSMA, 2000).

Os mecanismos pelos quais a clomipramina causa hepatotoxicidade ainda não estão claramente definidos, desta forma, o objetivo desse trabalho foi analisar os efeitos causados pela clomipramina em hepatócitos primários isolados de rato.

Materiais e métodos

Neste trabalho foram utilizados ratos machos albinos da linhagem Wistar pesando entre 180 e 220g. O manejo, anestesia, eutanásia e todo o procedimento cirúrgico foram realizados amparados pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (protocolo n. 2033170517).

Os hepatócitos foram isolados de ratos pelo método de perfusão hepática com colagenase tipo IV como descrito previamente por Bizerra et al. (2020). Depois do procedimento de isolamento, a viabilidade dos hepatócitos foi determinada pelo método do azul de tripano (0,16%) e a viabilidade celular inicial para todos os experimentos foram maiores do que 85%. Os hepatócitos foram suspensos em tampão Krebs-Henseleit pH 7,6 contendo 0,2% de albumina de soro bovino, e mantidos a 4 °C.

O consumo de oxigênio dos hepatócitos foi determinado pelo método polarográfico descrito por Clark (1956) com modificações descrito por Bizerra et al. (2020). O RC e a razão ADP/O foram calculados de acordo com Chance e Williams (1956).

Para os testes de viabilidade celular, os hepatócitos (10^6 de células. mL⁻¹) foram incubados em frascos Erlenmeyer de 25 mL contendo Krebs-Henseleit pH 7,6 com 0,1% de albumina de soro bovino e as concentrações de clomipramina 50, 100, 200 e 300µM. Os hepatócitos foram mantidos sob agitação constante (30 rpm) à 37 °C com 95% O₂ e 5% CO₂. O experimento foi iniciado após a adição dos hepatócitos nos Erlenmeyers e então, foram realizadas coletas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos para analisar a viabilidade celular pelo método de azul de tripano e pelo método de dosagem da atividade enzimática no sobrenadante das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) utilizando kits Gold Analisa, Brasil, de acordo com as instruções do fabricante.

A significância estatística dos dados experimentais foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de comparação de Dunnet ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

No estado II da respiração mitocondrial, quando foram utilizados malato e glutamato como substratos oxidáveis no complexo I da cadeia respiratória, o consumo de oxigênio aumentou em 167% com 200µM

clomipramina atingindo estímulo máximo de 186% na presença de 300µM de clomipramina.

Quando foram utilizados succinato como substrato oxidável no complexo II da cadeia respiratória, na presença de 100µM de clomipramina o consumo de oxigênio aumentou em 120% atingindo 135% com 300µM de clomipramina. Ainda com succinato, o consumo de oxigênio no estado IV também foi afetado, aumentando em 66% na concentração de 300µM de clomipramina. Em geral, independentemente dos substratos oxidáveis utilizados em altas concentrações (200 e 300 µM) a clomipramina diminuiu significativamente o RC e a razão ADP/O em alguns casos a razão ADP/O não pode ser determinada.

Nossos resultados foram reprodutivos aos primeiros relatos desse efeito desacoplador, descritos por Weinbach et al., (1986) que avaliou as mesmas condições em mitocôndrias isoladas de fígado, demonstrando assim que em hepatócitos há predominância o efeito desacoplador da fosforilação oxidativa, podendo afetar funções mitocondriais na produção de ATP.

Nas análises de viabilidade celular, medindo o extravasamento de ALT e AST, em altas concentrações de clomipramina (200 e 300 µM) com elevados tempos de exposição (90 e 120 minutos) apresentaram valores elevados, atingindo com 120 minutos de incubação na concentração de 300 µM, valores 311% maiores da liberação da ALT em comparação com o controle. A liberação da AST na concentração de 300 µM, com 120 minutos de incubação, apresentou valores 165% maior em comparação com o controle.

As observações desse estudo de que as atividades da AST e ALT no meio de incubação tiveram aumento significativo causado pela exposição das células à clomipramina, demonstram dano à membrana plasmática dos hepatócitos *in vitro* (diminuição da viabilidade celular), efeito corroborado pelos resultados dos experimentos com a coloração de azul de tripano, que nos tempos de 90 e 120 minutos de incubação com a clomipramina, apresentaram mortalidade de 99% dos hepatócitos. Na literatura, a clomipramina é relatada por ser eficaz em matar células de glioblastoma por meio de apoptose mediada por mitocôndria (VOICAN, et al., 2014), aumento de marcadores apoptóticos como a liberação do citocromo C e fragmentação de DNA em células glioma e neuroblastoma (WIERSMA, 2000). No entanto, com nossos resultados não podemos afirmar os mecanismos pelos quais está ocorrendo a morte dos hepatócitos, e mais experimentos estão sendo realizados para maior entendimento dos efeitos mecanísticos da clomipramina sobre as mitocôndrias e hepatócitos primários, a fim de fornecer conhecimentos para auxílio no tratamento de eventuais casos de intoxicação.

Conclusões

Os resultados deste estudo mostram que a clomipramina afeta de maneira dose dependente as células do fígado. Esse efeito ocorre por meio

de alterações na função das mitocôndrias, organelas essenciais para a bioenergética celular. Como consequência, a clomipramina também causou morte dos hepatócitos, corroborando evidências de que o uso de clomipramina pode causar hepatotoxicidade.

Agradecimentos:

Agradeço ao meu orientador, ao departamento de Bioquímica e a UEM pela oportunidade.

Referências:

Alderman, C. P.; Atchison, M. M.; McNeece, J. I. Concurrent agranulocytosis and hepatitis secondary to clomipramine therapy. **Br J Psychiatry**. v. 162, p. 688-689, 1993.

Bizerra, P. F. V.; Guimaraes, A.; Miranda, C. A., Constantin, R. P.; Utsunomiya, K. S.; Gilglioni, E. H.; Constantin, J.; Mingatto, F. E. Enhanced cytotoxicity of imidacloprid by biotransformation in isolated hepatocytes and perfused rat liver. **Pestic Biochem Physiol**. v. 164, p. 183-190, 2020.

Chance, B. W. G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**. v. 17, p. 65-134, 1956.

Clark, L. C. J. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. **Trans Am Soc Artif Intern Organs**. v. 2, p. 41-48. 1956.

Kruger, R.; Holzl, G.; Kuss, H. J.; Schefold, L. Comparison of the metabolism of the three antidepressants amitriptyline, imipramine, and chlorimipramine in vitro in rat liver microsomes. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 88, p. 505-513, 1986.

Tavish, D. B. P. Clomipramine. **Drugs**. v. 39, p.136-153, 1990.

Voican, C. S.; Corruble, E.; Naveau, S.; Perlemuter, G.; Antidepressant-induced liver injury: a review for clinicians. **Am J Psychiatry**. v. 171, p. 404-415, 2014.

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, p. 445-451, 1986.

Wiersma, A. H. F. P. J. Clomipramine-induced allergic hepatitis: A case report. **Int J Psychiatry Clin Pract**. v. 4, p. 69-71, 2000.