

VICENTE LIEBERKNECHT

**ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA MIRTAZAPINA
E IMIPRAMINA E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO
GÊNICA DE PROTEÍNAS APOPTÓTICAS**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina para
a obtenção do Grau de Mestre
em Neurociências.
Orientador: Prof. Dr. Nelson
Horácio Gabilan

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

L716e Lieberknecht, Vicente

Estudo do efeito neuroprotetor da mirtazapina e imipramina e sua relação com a expressão gênica de proteínas apoptóticas [dissertação] / Vicente Lieberknecht ; orientador, Nelson Horácio Gabilan. - Florianópolis, SC, 2012.

78 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Imipramina. 3. Neuroblastoma. 4. Agentes neuroprotetores. I. Gabilan, Nelson Horácio. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.


CDU 612.82

VICENTE LIEBERKNECHT

**"ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA
MIRTAZAPINA E IMIPRAMINA E SUA RELAÇÃO
COM A EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS
APOPTÓTICAS"**

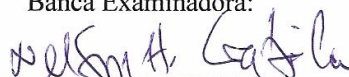
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 15 de fevereiro de 2012.



Prof. Ana Lúcia S. Rodrigues
Coordenadora do Curso


Banca Examinadora:




Prof. Nelson Horácio Gabilan
Orientador – UFSC



Prof. Carlos Alberto S. Gonçalves
Membro da Banca Externo



Prof. Marcelo Farina
Membro - UFSC



Prof. Rodrigo Bainy Leal
Membro-UFSC

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha irmã, que mesmo distantes sempre me apoiaram.

Ao professor Dr. Nelson Horácio Gabilan, pelo apoio, dedicação e paciência.

Às minhas colegas, Andréa Dias Elpo Zomkowski, Daiane Engel e Suelen Mazzuco que me ajudaram durante o meu tempo de mestrado.

Ao professor Marcelo Farina, pela sua amizade e doação das células de neuroblastoma humano.

À professora Célia Barardi e seus alunos que possibilitaram a quantificação de RNA em seu equipamento NanoVue.

Ao professor Rodrigo Bainy Leal que possibilitou a minha ida à Porto Alegre.

À professora Ana Lúcia Severo Rodrigues pela ajuda na correção do artigo.

À todos os professores com quem tive o privilégio de aprender durante a pós-graduação.

À aluna da professora Marguerita Danielle Ferraz Mello, pela troca de informações sobre RT-PCR.

Às alunas do professor Marcelo Farina, Alessandra Antunes, Danúbia Bonfanti dos Santos, Dirleise Colle, Renata Pietsch Ribeiro, Juliana Montagna Hartwig, Aline Naime; e às pós-docs Mariana Appel Hort e Luciana Zimmermann que dividiram o laboratório e a sala de cultura comigo, pelos momentos de descontração e que possibilitaram uma grande troca de experiências.

Ao Nivaldo M. Vicente, secretário da pós-graduação de Neurociências.

Aos meus amigos e colegas, Maurício Peña Cunha, Francis Leonardo Pazini, Gianni Mancini, Paulo Cesar Lock Silveira, Josiane Budni, Filipe José de Matos, Bianca Fiuza, Mark William Lopes, Roberta de

Paula Martins, Jade de Oliveira, Débora Kurrle Rieger, Morgana Moretti, Tiago Bortolotto, Priscila Graziela Alves Martins, Fabiane Kalyne Ludka, Amanda Virtuoso Jacques, Juliana Ben, Leandra Constantino, Larissa Kochenborger, Lucas Kniess Debarba, Daniela Felício, André Roberto Colla, Luiz Eduardo Beltrão Bettio, Vivian Binder Neis, Luana Meller Manosso, Juliana Daufenbach, Daniele Guilhermano Machado, Wagner Carbolin Martins e todos outros que me ajudaram a ter momentos de descontração e crescer como pessoa e na carreira.

"Só quem se arrisca a ir longe demais é capaz de descobrir o quão longe pode ir." T.S. Eliot

RESUMO

Neste estudo foram investigados a ação neuroprotetora dos antidepressivos mirtazapina e imipramina e os efeitos destes compostos sobre a expressão gênica de proteínas anti- e pró-apoptóticas em células de neuroblastoma humano (SH-5YSY). Mirtazapina e imipramina mostraram baixa citotoxicidade sobre neuroblastoma humano e nas concentrações de 1-10 μM aumentaram a viabilidade celular. As células de neuroblastoma humano foram pré-tratadas com mirtazapina e imipramina e depois incubadas na presença de tapsigargina ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O pré-tratamento com mirtazapina e imipramina protegeu as células de neuroblastoma da citotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio. As células foram incubadas com mirtazapina e imipramina e a expressão gênica (RNAm) das proteínas envolvidas na sobrevivência (Bcl-2) e na morte celular (Bax, Bad e p53) foram determinadas por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase quantitativa (qRT-PCR). A mirtazapina reduziu e a imipramina não afetou a expressão gênica da proteína Bcl-2. A expressão gênica das proteínas Bax e p53 foi bastante reduzida pela mirtazapina e imipramina. A mirtazapina e a imipramina (2 μM) aumentaram a razão Bcl-2/Bax e Bcl-2/p53, indicando um efeito positivo na sobrevivência celular. Os resultados sugerem que o efeito neuroprotetor da mirtazapina e da imipramina envolve a redução da expressão gênica das proteínas pró-apoptóticas Bax e p53.

Palavras-chave: Antidepressivos, mirtazapina, imipramina, neuroblastoma, SH-SY5Y, neuroproteção, Bcl-2.

ABSTRACT

In this study we investigated the neuroprotective effect of mirtazapine and imipramine and how these compounds affect the gene expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins in human neuroblastoma cells SH-SY5Y. Mirtazapine and imipramine showed low cytotoxicity on neuroblastoma cells and at concentrations of 1-10 μM they increased the cell viability. Human neuroblastoma cells were pre-treated with mirtazapine and imipramine and then incubated with thapsigargin or hydrogen peroxide (H_2O_2). The pre-treatment with mirtazapine and imipramine protected the cells against H_2O_2 -induced cell death. Cells were incubated with mirtazapine and imipramine and gene expression (mRNA) was determined for anti-apoptotic (Bcl-2) and pro-apoptotic proteins (Bax, Bad and p53) through qRT-PCR. Mirtazapine reduced and imipramine did not affect the expression level of the anti-apoptotic protein Bcl-2. The expression of Bax and p53 were strongly reduced by mirtazapine and imipramine. Both antidepressants increased the expression ratio of Bcl-2/Bax and Bcl-2/p53. These data suggest that the neuroprotective effect of mirtazapine and imipramine might be due the downregulation of pro-apoptotic Bax and p53 expression.

Keywords: Antidepressants, mirtazapine, imipramine, neuroblastoma, SH-SY5Y, neuroprotection.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – Serotonina
Akt = PKB – Proteína cinase B
ANOVA – Análise de variância
AMPC – Adenosina monofosfato cíclico
CAD – Composto(s) antidepressivo(s)
CaMK – Proteína cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulin
CREB – Proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc
cDNA – DNA complementar
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*
DMSO – Dimetilsulfóxido
e.p.m. – Erro padrão da média
ERK – Proteína cinase regulada por sinal extracelular
EROS – Espécies reativas de oxigênio
FCS – Soro fetal bovino
GPCR – Receptores ligados à proteína G
GSH – Glutathiona
GSK-3 β – Glicogênio sintase cinase 3 beta
HEPES – Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-Etanossulfônico
ISRS – Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
LPS – Lipopolissacarídeo
MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno
MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
MTT – Brometo de 3-(4,5-Dimetilazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NE – Norepinefrina, noradrenalina
PBS – Tampão salina fosfato
PI3K – Fosfoinositídeo 3 Cinase
PKA – Proteína cinase ativada por AMPc
PLC – Fosfolipase C
qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
SOD – Enzima superóxido dismutase
TG – Tapsigargina
TrkB – Receptor tirosina cinase do tipo B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Depressão.....	17
1.2	Compostos antidepressivos.....	17
1.3	Antidepressivos e proteínas neuroprotetoras.....	19
	Justificativa.....	24
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivos específicos.....	25
3	METODOLOGIA	27
3.1	Materiais.....	27
3.2	Cultura de células SH-SY5Y e tratamentos.....	27
3.3	Ensaio de viabilidade celular: Redução do MTT.....	28
3.4	Extração de RNA total.....	28
3.5	Síntese de DNA complementar (cDNA) por transcriptase reversa.....	28
3.6	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).....	29
3.7	Análise estatística.....	29
4	RESULTADOS	31
4.1	Efeito da mirtzapina sobre a viabilidade celular de neuroblastoma humano.....	31
4.2	Efeito da imipramina sobre a viabilidade celular de neuroblastoma humano.....	31
4.3	Efeito da tapsigargina na viabilidade celular de neuroblastoma humano.....	34
4.4	Efeito do peróxido de hidrogênio na viabilidade celular de neuroblastoma humano.....	34
4.5	Efeito do pré-tratamento com mirtazapina ou imipramina na morte celular induzida por tapsigargina em neuroblastoma humano.....	37
4.6	Efeito do pré-tratamento com mirtazapina ou imipramina na morte celular induzida por peróxido de hidrogênio em neuroblastoma humano.....	37
4.7	Efeito da mirtazapina e imipramina na expressão gênica (RNAm) em neuroblastoma.....	42
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÕES	59
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

A depressão é um transtorno psiquiátrico que afeta cerca de 20% da população e tem origem em uma complexa interação de suscetibilidade múltipla relacionada a fatores genéticos e ambientais (BERTON & NESTLER, 2006). Os indivíduos afetados apresentam vários sintomas como melancolia, anedonia, fadiga, pessimismo, sentimento de culpa, baixa autoestima, tendência suicida, alterações no peso corporal, na ingestão alimentar, no sono e também psicomotores (WONG & LICINIO, 2001). A Organização Mundial de Saúde (WHO) estima que até 2020, a depressão seja a segunda causa de incapacitação no mundo (SANACORA et al., 2008). As bases biológicas da depressão e o mecanismo de eficácia dos compostos antidepressivos (CAD) ainda não estão bem esclarecidos. Os sistemas cerebrais que têm recebido maior atenção nos estudos da neurobiologia da depressão são os sistemas monoaminérgicos (D'SA & DUMAN, 2002; RACAGNI & POPOLI, 2010). A *hipótese monoaminérgica* postula que a depressão resulta de uma deficiência de serotonina, noradrenalina ou de seus receptores ineficientes (WONG & LICINIO, 2001; KISS, 2008). Os CAD atuam aumentando os níveis de monoaminas (serotonina e/ou noradrenalina) na fenda sináptica. Entretanto, apesar do aumento nos níveis de monoaminas ocorrer quase que imediatamente após o início do tratamento, para a maioria dos pacientes, os efeitos terapêuticos são observados apenas depois de algumas semanas (WONG & LICINIO, 2001). Isto sugere que o aumento de monoaminas ativa algumas vias de transdução de sinal que induzem, a médio e longo prazo, alterações neuroquímicas no SNC, resultando nos efeitos terapêuticos dos CAD (LESCH, 2001).

1.2 Compostos antidepressivos

Os compostos químicos utilizados para tratar os transtornos depressivos ou sintomas depressivos incluem: i) inibidores das monoamina oxigenases (ex. tranilcipromina e moclobemida); ii) inibidores da recaptação de dopamina (ex. amineptina); iii) inibidores da recaptação de noradrenalina e dopamina (ex. bupropiona); iv) inibidores da recaptação de noradrenalina (ex. reboxetina); v) inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (ex. duloxetina, venlafaxina); vi) inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ex. fluoxetina, citalopram, paroxetina e sertralina); vii) antidepressivos tricíclicos, inibem a recaptação de monoaminas (ex. amitriptilina, desipramina, imipramina e nortriptilina); viii) acelerador seletivo da recaptação de

serotonina (ex. tianeptina); ix) antidepressivos tetracíclicos (ex. maprotilina, mianserina, mirtazapina) (BALDESSARINI, 2005; MCKERNAN et al., 2009). Apesar destes compostos pertencerem a distintas classes e exercerem diferentes mecanismos de ação, todos eles atuam aumentando a concentração de monoaminas na fenda sináptica (WONG & LICINIO, 2004; BERTON & NESTLER, 2006; SLATTERY et al., 2004).

Neste trabalho foi utilizada a mirtazapina, um dos “novos” compostos antidepressivos que apresenta algumas propriedades interessantes como descrito a seguir. A mirtazapina indicada como antidepressivo e ansiolítico (THASE et al., 2010, CROOM et al., 2009), foi desenvolvido mais recentemente e vem sendo utilizada por induzir menores efeitos adversos, como a disfunção sexual (BALDWIN, 1998; PEÑA, 2005). Além disso, o seu uso também pode evitar a “síndrome serotoninérgica”, às vezes provocada pelos inibidores da recaptação de serotonina. Esta síndrome é caracterizada por estado mental alterado (confusão, agitação, convulsões), diarreia, hipertensão, febre, midríase, taquicardia e modificações neuromusculares (mioclonia, tremor, ataxia, rigidez) (TEPPER, 2012). A mirtazapina aumenta a neurotransmissão de serotonina e noradrenalina, mas não atua sobre a recaptação desses neurotransmissores. O efeito da mirtazapina ocorre através do bloqueio dos receptores serotoninérgicos 5-HT₂ e 5-HT₃ e ativação dos receptores 5-HT_{1A} pós-sináptico e por antagonizar os α_2 -heteroreceptores e α_2 -autoreceptores noradrenérgicos (PEÑA et al., 2005; CROOM et al., 2009). Experimentos clínicos comprovaram a eficácia da mirtazapina: durante as semanas 1 a 4, houve diferença entre os grupos tratado e placebo; na quarta semana as taxas eram de 51% de melhora para os tratados contra 23% do grupo placebo. Quando foi avaliada a sua segurança, não houve diferença significativa entre o grupo da mirtazapina e o tratado com placebo (CLAGHORN & LESEM, 1995). Recentemente, diversos trabalhos de ensaios clínicos foram avaliados e mostraram que pacientes tratados com mirtazapina tiveram respostas clínicas semelhantes ao tratamento com inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS); a taxa de resposta para o tratamento com mirtazapina foi de 62,1% e para os ISRS foi de 67,1%. Também não houve diferenças na taxa de descontinuidade do tratamento entre os grupos tratados com estes dois compostos (PAPAKOSTAS & HOMBERGER, 2008).

1.3 Antidepressivos e proteínas neuroprotetoras

Dados obtidos de amostras *post-mortem* e de análises de neuroimagem revelaram, dentre outras, as seguintes alterações morfológicas nos cérebros de pacientes depressivos: aumento dos ventrículos, redução do volume, atrofia e/ou perda (morte) de neurônios e células gliais em regiões específicas do córtex e do sistema límbico (MANJI et al., 2003). Alguns autores sugeriram que estas alterações pareciam ter semelhança com o processo de “deprivação de fatores neurotróficos”, o que foi chamado de *hipótese neurotrófica* da depressão. Assim, vários trabalhos começaram a investigar se os CAD induzem efeitos “tipo” neurotróficos. A administração crônica do CAD tianeptina reverteu a atrofia de neurônios da região CA3 induzida por estresse (WATANABE et al., 1992). Entretanto, não se conhecia como o CAD provocava o efeito neurotrófico e quais seriam os fatores que possibilitavam reverter os danos neuroquímicos observados na depressão. A *hipótese neurotrófica* ganhou reforço quando foi demonstrado que o tratamento crônico com mianserina, desipramina e fluoxetina induzem a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo e no córtex de ratos (NIBUYA et al., 1995; SIUCIAK et al., 1997; ALTAR, 1999). As neurotrofinas ou fatores neurotróficos são uma família de proteínas que medeiam a diferenciação e sobrevivência neuronal, bem como modulam a neurotransmissão e a plasticidade sináptica (PATAPOUTIAN & REICHARDT, 2001; POO, 2001). Alguns dos membros da família das neurotrofinas são: BDNF (a neurotrofina mais abundante do SNC), fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e a neurotrofina-3 (NT-3). As neurotrofinas são secretadas nos dendritos e atuam retrogradamente nos terminais pré-sinápticos. Essas proteínas se ligam a receptores do tipo tirosina cinase (Trk) ativam diferentes vias de transdução de sinal e induzem respostas neuroquímicas geralmente de médio e longo prazo (PATAPOUTIAN & REICHARDT, 2001; POO, 2001).

Vários estudos têm demonstrado que o tratamento crônico com os CAD afeta a expressão de neurotrofinas. A amitriptilina elevou os níveis da proteína BDNF nas células piramidais de CA1-CA4 e em neurônios granulares do giro dentado de ratos (XU et al., 2003). Fluoxetina, paroxetina e a sertralina aumentaram a expressão (RNAm) de BDNF no giro dentado de ratos (COPPELL et al., 2003). A fluoxetina também elevou os níveis de BDNF, GDNF e dos receptores Trk em culturas de astrócitos de ratos (MERCIER et al., 2004). O tratamento com

fluoxetina aumentou os níveis de BDNF no hipocampo e córtex frontal de camundongos (HODES et al., 2010a,b). Além disso, o co-tratamento de fluoxetina com o anti-psicótico olanzapina aumentou os níveis de neurotrofina NT-3 no córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo de ratos (AGOSTINHO et al., 2011). Astrócitos corticais tratados com fluoxetina e paroxetina mostraram um aumento dos níveis de VEGF (ALLAMAN et al., 2011).

Uma característica comum encontrada na depressão é a redução da neurogênese, semelhante àquela causada pelo estresse (MALBERG et al., 2000; DUMAN, 2004). A neurogênese ocorre no cérebro de indivíduos adultos na zona subgranular do giro dentado do hipocampo e na zona subventricular. O tratamento crônico, mas não agudo, com alguns CAD aumenta a neurogênese hipocampal (MALBERG et al., 2000; DUMAN, 2004). O VEGF apresenta um forte efeito na neurogênese e vem sendo investigada para definir seu possível papel na etiologia e no tratamento da depressão (FOURNIER & DUMAN, 2012). Entretanto, não está bem esclarecido se os efeitos benéficos dos CAD estão relacionados com a neurogênese hipocampal e qual a sua importância em pacientes humanos adultos (MANJI et al., 2003; FOURNIER & DUMAN, 2012).

A maioria dos trabalhos tem estudado o efeito dos CAD sobre o BDNF, pois esta neurotrofina parece estar diretamente relacionada com a depressão. A injeção de BDNF no hipocampo de ratos produz efeito antidepressivo (SHIRAYAMA et al., 2002). A administração de BDNF por via periférica através de cápsulas implantadas sob a pele de camundongos, também demonstrou ter efeito antidepressivo (SCHMIDT & DUMAN, 2010). Além disso, os níveis de BDNF estão diminuídos no soro de pacientes com depressão e o tratamento com antidepressivos reverte este efeito (BRUNONI, et al., 2008; MOLENDIJK et al., 2010). Inclusive, a determinação dos níveis de BDNF foi proposta como um possível marcador biológico da depressão (SHIMIZU et al., 2003; LANG et al., 2004). O conjunto destes dados mostra que o BDNF parece modular a atividade de sistemas neuroquímicos envolvidos na depressão e pode ter um importante papel na neuropatologia e no tratamento da doença.

Além disso, foi demonstrado que vários CAD atuam através das vias de sinalização celular AMPc-PKA/CREB e MEK/ERK-CREB, utilizadas por neurotrofinas, neuropeptídeos e neurotransmissores para exercer seus efeitos neurotróficos e neuroprotetores (DUMAN et al., 1999; D'SA & DUMAN, 2002). Isto sugeriu que os CAD atuariam estas vias de sinalização resultando em efeitos neurotróficos e

neuroprotetores. Os efeitos neurotróficos podem ser considerados uma estratégia terapêutica para aumentar a proliferação, diferenciação, crescimento e regeneração; enquanto os efeitos neuroprotetores retardariam a progressão da atrofia ou morte neuronal depois de iniciada a doença ou ainda, a redução dos sintomas clínicos (MANJI et al., 2003).

Embora os fatores neurotróficos induzidos pelos CAD aumentem a sobrevivência celular por promover o suporte trófico necessário, os seus efeitos neuroprotetores são mediados, em grande parte, pela inibição da cascata de morte celular (RICCIO et al., 1999). Várias evidências sugerem que os fatores neurotróficos ativam a via de sinalização MEK/ERK-CREB, inibindo a cascata de morte celular e aumentando a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (BONNI et al., 1999; FINKBEINER, 2000).

A proteína Bcl-2 foi o primeiro membro identificado de uma grande família de proteínas regulatórias da apoptose (MERRY & KORSMEYER, 1997; ADAMS e CORY, 1998; BRUCKHEIMER et al., 1998). A família das proteínas Bcl-2 consistem em: proteínas anti-apoptóticas (por exemplo, Bcl-2 e Bcl-xL) e pró-apoptóticas (por exemplo, Bax e Bak, Bad, Bim, Bik e Bid) (ADAMS e CORY, 1998; BRUCKHEIMER et al., 1998). A proteína anti-apoptótica Bcl-2 é reconhecida como a principal proteína neuroprotetora, pois a sua super-expressão protege os neurônios de diversos insultos como isquemia, MPTP (droga utilizada para induzir a doença de Parkinson), proteína β -amilóide (modelo da doença de Alzheimer), radicais livres, excitotoxicidade e privação de fatores neurotróficos (MANJI et al., 2001b). Vários autores demonstraram que os CAD afetam as proteínas da família da Bcl-2 e/ou apresentam uma ação neuroprotetora em ensaios *in vivo* e *in vitro*. O tratamento com citalopram aumenta os níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (MURRAY & HUTSON, 2007). Imipramina e desipramina elevaram os níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e protegeram células precursoras neuronais contra a citotoxicidade induzida pelo LPS (HUANG et al., 2007; PENG et al., 2008). Ratos submetidos a estresse apresentam uma redução na expressão da proteína Bcl-2 no córtex e na amígdala. O tratamento com fluoxetina reverte o efeito do estresse e aumenta os níveis de Bcl-2 naquelas regiões, além de reduzir a expressão da proteína pró-apoptótica Bax no hipocampo (KOSTEN et al., 2008). A administração crônica de paroxetina foi capaz de proteger neurônios dopaminérgicos da morte celular induzida pelo MPTP e o mecanismo de proteção envolve a redução de estresse oxidativo (CHUNG et al., 2010). Estes autores

utilizaram o mesmo modelo de insulto com MPTP e demonstraram que o tratamento com fluoxetina reduz a perda de neurônios dopaminérgicos na região nigro-estriatal em camundongos (CHUNG et al., 2011).

A Figura 1 apresenta um esquema dos efeitos dos CAD sobre as vias de sinalização celular e na expressão de proteínas envolvidas na sobrevivência e morte celular, que serão abordados neste trabalho (MCKERNAN et al., 2009). Os CAD regulam as monoaminas noradrenalina e serotonina, que ativam os receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, que são da família de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (VAN OEKELLEN et al., 2003; CHEN et al., 2007). Estes receptores ativam, através da PKA ou da CaMK, a proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc (CREB), responsável por transcrever as proteínas BDNF e Bcl-2 (DROZDOV et al., 2011). O BDNF formado é liberado e pode se ligar ao receptor Trk e ativar a via das MEK/ERK-CREB elevando ainda mais os níveis das proteínas BDNF e Bcl-2 (D'SA & DUMAN, 2002; HASHIMOTO et al., 2004; MCKERNAN et al., 2009). Além disso, o BDNF pode atuar pelo receptor TrkB e ativar a via PI3K/Akt. A Akt fosforila e inativa a enzima glicogênio sintase cinase-3 β (GSK-3 β). Quando a GSK-3 β não é inativada pela Akt, ela tem a função de diminuir a afinidade do CREB pelo DNA (BULLOCK & HABENER, 1998) e impedir a transcrição das proteínas neuroprotetoras (BDNF e Bcl-2) causando a morte celular. Akt pode também fosforilar a Bad (DATTA et al., 2000), impedindo a união desta com as proteínas Bcl-2 e Bcl-xL, protegendo as células da morte celular (CHEN et al., 2005). Além disso, a Akt ativa a proteína Mdm2 (GOTTLIEB et al., 2002) que impede a proteína p53 de se ligar ao DNA, bloqueando a morte da célula. A p53, mais conhecida como proteína supressora tumoral, induz a ativação do gene promotor para a transcrição das proteínas Bax (SHAW et al., 1992; MIYASHITA & REED, 1995) e Bad (JIANG et al., 2006), indutoras de morte celular (TANIS et al., 2007; HU et al., 2009; XIA et al., 2010; ROBSON et al., 2011). A p53 também atua fosforilando as proteínas Bax (CHIPUK et al., 2004), Bad (JIANG et al., 2006) e Bak (LEU et al., 2004); a Bax e Bak formam oligômeros entre si, criando o *poro de transição mitocondrial* e a consequente liberação do *citocromo c* para o citosol (ZHOU & CHENG, 2008). O *citocromo c* liberado vai formar junto com o fator ativador de apoptose (Apaf-1) o complexo apoptossoma e iniciar a cascata de caspases que leva a célula à apoptose (LI et al., 1997; NECHUSHTAN et al., 2001; POLZIEN et al., 2011). As proteínas Bad, Bid, Bik e Bim atuam como “sentinelas” para os sinais de morte celular podendo heterodimerizar com as

proteínas anti-apoptóticas da família das Bcl-2 e Bcl-xL ativando a oligomerização entre Bax e Bak (WILLIS & ADAMS, 2005).

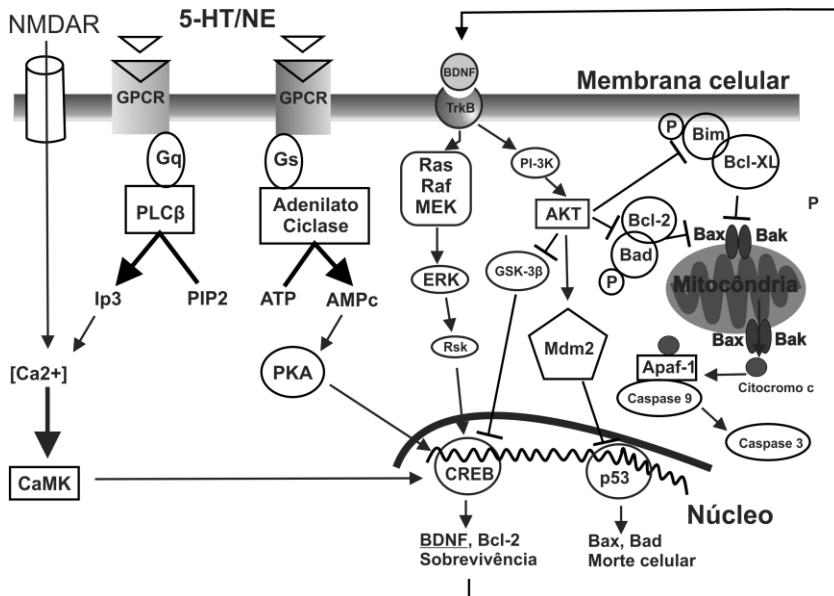


Figura 1. Vias de sinalização celular envolvidas na ação de compostos antidepressivos e seus efeitos sobre a sobrevivência celular. Os compostos antidepressivos aumentam os níveis de serotonina (5-HT) e noradrenalina (NE) que se ligam aos receptores de membrana (GPCR) e ativam as vias de sinalização celular: AMPc-PKA/CREB e PLC-CaMK/CREB, induzindo a expressão de genes para a síntese protéica de BDNF e Bcl-2 (envolvidas na sobrevivência celular). O BDNF sintetizado e liberado pode atuar sobre os receptores Trk e ativar a via Ras-MEK/ERK-CREB, induzindo mais síntese de BDNF e de Bcl-2. O BDNF pode ativar a via PI3K/Akt que bloqueia a proteína p53, reduzindo a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bad (envolvidas na morte celular) (com base em HASHIMOTO et al., 2004; MCKERNAN et al., 2009).

Justificativa

A maioria dos trabalhos anteriores descreve os efeitos dos CAD sobre BDNF, Bcl-2 ou suas propriedades neuroprotetoras. Em relação à mirtazapina, os seguintes resultados de experimentos *in vivo* são conhecidos: i) aumenta a expressão (RNAm) de BDNF no hipocampo e no córtex cerebral de ratos (ROGÓŹ et al., 2005); ii) aumenta a proteína Bcl-2 no hipocampo de camundongos (MURRAY & HUTSON, 2007); iii) aumenta GSH e SOD (ação antioxidante) em células do estômago de ratos tratados com a indometacina (BILICI et al., 2009); iv) protege células renais de ratos de isquemia por reperfusão (TOK et al., 2012). Apesar de a mirtazapina induzir BDNF e Bcl-2, não há dados sobre o seu possível efeito protetor em células neuronais. As cascatas de sinalização ativadas pelos CAD atuam mantendo a proporção entre os níveis dos fatores de sobrevivência (proteínas anti-apoptóticas) e da morte celular (proteínas pro-apoptóticas). Alterações, mesmo que modestas na proporção dos níveis das proteínas da família Bcl-2 certamente afetam a viabilidade celular (YOUNG, 2002; MANJI et al., 2003). Assim, é necessário investigar se o tratamento de células neuronais com mirtazapina afeta a expressão e a proporção de proteínas anti-apoptóticas e pro-apoptóticas. Como “controle positivo” foi utilizado a imipramina em todos os experimentos. Este CAD foi escolhido porque induz o aumento da expressão (RNAm) de BDNF e de Bcl-2 em culturas de células precursoras neuronais. Além disso, ela apresenta efeito neuroprotetor, protegendo as células precursoras neuronais da citotoxicidade induzida pelo lipopolissacarídeo-LPS (PENG et al., 2008).

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da mirtazapina e da imipramina na expressão gênica de proteínas envolvidas na sobrevivência e na morte celular, além do efeito neuroprotetor.

2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar a citotoxicidade da mirtazapina e imipramina em culturas de células de neuroblastoma humano;
2. Analisar se o pré-tratamento de neuroblastoma humano com mirtazapina e imipramina tem efeito protetor contra a citotoxicidade induzida por taspigargina e peróxido de hidrogênio;
3. Investigar o efeito da mirtazapina e imipramina na expressão gênica de proteínas anti-apoptótica (BDNF e Bcl-2) e pró-apoptóticas (Bax, Bad e p53)

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais

Dulbecco's modified Eagle's medium: Nutrient mixture F-12 (Ham) (DMEM/F12), Antibiotic-Antimycotic 100X, Soro Fetal Bovino (FCS) adquiridos da GIBCO® (Grand Island, NY, USA). Mirtazapina (Remeron®) obtida da Cima Laboratories Inc. (Eden Praire – Minnesota, USA). Hidrocloreto de imipramina e brometo de 3-(4,5-Dimetilazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). SV Total RNA Isolation kit adquirido da Promega (Madison, WI, USA). Reagentes TaqMan RT para PCR, placas e SYBR-Green Master Mix para RT-PCR adquiridos da Applied Biosystems (Branchburg, NJ, USA). Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e Dimetilsulfóxido (DMSO) de qualidade P.A.

3.2 Cultura de células e tratamentos

Neste trabalho foi utilizada uma linhagem de células tumorais de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), doadas pelo Dr. Marcelo Farina (Departamento de Bioquímica, UFSC), adquiridas do Banco de Células do RJ (Rio de Janeiro, RJ). As células foram cultivadas em placas e frascos de cultura, contendo meio de cultura DMEM-F12 (Invitrogen), tamponado com 2g/L de HEPES, suplementado com 10% de soro fetal bovino. As culturas foram mantidas em estufa com 95% de umidade, 5% CO₂ a 37°C (ARIAS et al., 2004). Após a confluência (2-3 dias), as células foram retiradas com solução e tripsina (tripsina 0,1% em tampão fosfato salino [PBS], pH 7,4) e transferidas para placas de cultura de 96 poços (20.000 células/poço). Primeiramente, as células de neuroblastoma humano foram incubadas durante 24 e 48 horas com diferentes concentrações de mirtazapina e imipramina (1-20 µM) para determinar a citotoxicidade destes compostos. Para verificar o efeito protetor dos CAD, as células foram pré-tratadas durante 24 horas na presença de meio de cultura (controle), mirtazapina ou imipramina. A seguir, foi adicionado a cada poço taspigargina ou peróxido de hidrogênio, na presença dos CAD, durante mais 24 horas e depois avaliada a viabilidade celular. Para investigar o efeito dos CAD na expressão gênica, as células SH-SY5Y foram incubadas na ausência (controle) ou presença de 2 e 10 µM de mirtazapina e de imipramina por 48 horas. A seguir, as células foram lisadas em tampão e congeladas em freezer a -80°C para posterior extração de RNA total e análise da expressão gênica.

3.3 Ensaio de viabilidade celular: redução do MTT

Esta reação se baseia na conversão do sal de tetrazólio MTT em um formazan (de coloração azulada) pelas desidrogenases mitocondriais. A mitocôndria desempenha um papel importante na morte celular e esta reação é um indicador de viabilidade e proliferação celular. A solução de MTT (Sigma, 5 mg/mL) foi preparada em tampão Krebs-HEPES (em mM: NaCl, 144; KCl, 5,9; MgCl₂, 1,2; CaCl₂, 2; HEPES 10; glicose 11; pH=7,3), filtrada para esterilização (filtros Millipore 0,22µm) e congelada em alíquotas, protegidas da luz. Após os tratamentos, o meio foi removido dos poços. Para o ensaio o MTT foi diluído 10x em tampão Krebs-HEPES e adicionado 100µL a cada poço. A placa foi incubada a 37°C durante 1 hora, protegida da luz (BOIX et al., 1997). Após esse período a solução de MTT foi removida cuidadosamente e descartada. Para dissolver o formazan, foi adicionado em cada poço, 100µL de DMSO e a placa agitada por 10 minutos. Após foi realizada leitura da absorbância a 540nm. A amostra controle sem tratamento foi considerada como 100% de viabilidade celular.

3.4 Extração de RNA total

As células de neuroblastoma foram incubadas na ausência (controle) ou presença de mirtazapina ou imipramina durante 48 horas. A seguir as amostras foram lisadas utilizando um tampão de lise do kit “SV Total RNA Isolation kit” (Promega). O RNA total foi extraído de amostras controle e tratadas, utilizando o mesmo kit, de acordo com o protocolo indicado no produto. A concentração de RNA total foi determinada através de um microanalisador NanoVue (Laboratório da Profa. Celia Barardi, Depto de Microbiologia e Parasitologia, UFSC).

3.5 Síntese de DNA complementar (cDNA) por transcriptase reversa

Cerca de 400 a 500 ng de RNA total foi utilizado na síntese de cDNA, utilizando o kit “Taqman Reverse Transcriptase” (Applied Biosystems). A reação foi realizada num microtubo de 0,2 mL contendo 1x do tampão RT TaqMan, 5,5 mM MgCl₂, 2 mM de “dNTP”, 2,5 mM dos “Random hexamers”, 0,4 U/ml RNase inhibitor” e 1,25 U/ml da enzima transcriptase reversa (Multiscribe II e uma quantidade de água suficiente para completar 20 µL. Também foram preparados tubos “controle negativo”, contendo todos os reagentes, sem a enzima transcriptase reversa. Os tubos foram colocados para reação num termociclador Mastercycler personal da Eppendorf (Laboratório do Prof. Marcelo Farina, Depto de Bioquímica), de acordo com o seguinte

protocolo: 25°C por 10 minutos (“primer annealing”), 48°C durante 1 hora (síntese) e 95°C por 5 minutos (para inativação da enzima), seguindo as instruções do manual do produto e descrito previamente (JIANG et al., 2006).

3.6 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

A reação foi realizada utilizando o kit “Power SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems), contendo cerca de 10-100 ng de cDNA, volume final de 25 µl e na presença de 0,3 µM de “primers” dos tipos “forward” ou “reverse”, de acordo com a Tabela 1. Os “primers” mostrados na Tabela 1 foram obtidos de trabalhos publicados ou desenhados utilizando o programa “Primer Express” (Applied Biosystems). As sequências dos genes foram pesquisadas no sítio do National Center for Biotechnology Information (NCBI) na base de dados “Gene” e os “primers” desenhados de acordo com os exons específicos para cada proteína. As reações foram realizadas num equipamento ABI PRISM série 7900HT (Applied Biosystems), instalado no Laboratório de Equipamentos Multiusuários do CCB, UFSC. A reação foi realizada com o seguinte protocolo: 50°C por 2 minutos (incubação), 95°C por 10 minutos (ativação da Taq polimerase), seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 1 minuto, como descrito previamente (JIANG et al., 2010). Para cada amostra, a expressão dos genes foi quantificada utilizando uma curva-padrão de cDNA de lisado total de células SH-SY5Y controle. Os resultados foram analisados utilizando o software Sequence Detection Systems (SDS) versão 2.4. Os dados foram normalizados pela expressão de genes padrões (“housekeeping genes”): Actina B (ACTB) ou gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Para ter certeza de que não foram amplificados dímeros de primers, DNA contaminante e produtos de PCR de primers mal alinhados reação de qRT-PCR, foram adicionados mais alguns passos chamados de “melting curves”.

3.7 Análise estatística

Os resultados foram avaliados através de ANOVA de uma via, seguido do teste *post-hoc* de Tukey, quando apropriado, utilizando o programa GraphPad versão 5.0. Cada experimento foi feito em quadruplicatas para o ensaio do MTT e em duplicatas para o PCR, os dados são apresentados como média ± E.P.M. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$.

Tabela 1 – Lista de primers.

Gene	Sequência sense (5'-3') Sequência anti-sense (5'-3')	Localização	Referências
β -actina	AGCCTCGCCTTTGCCGA CTGGTGCTGGGGCG	Exon 1	Bäckman et al., 2006
BDNF PAN	CCTCCTCTTCTCTTTCTGCTG AATTCTCTTTTTGCTATCCAT	Exon 2/ CDS	Wordinger et al., 2000
BDNF PAN	TGTTGGATGAGGACCAGAAAGTT GAGGCTCCAAAGGCACTGA	Exon 2/ CDS	PE
BDNF Iso. IV	CGGAGCAGCTGCCTTGATGG ATCCAACAGCTCTTCTATCACG	Exon 1	Donnicci et al., 2008
BDNF Iso. IV	CGCCATGCAATTTCCACTATC TTTCACGTTCCCTTCGCTTAA	Exon 1	PE
Bcl-2 iso. α	GGTGAAGTGGGGGAGGATTGT CTTCAGAGACAGCCAGGAGAA	Exon 2/ CDS	Bourgarel-Rey et al., 2009
Bax iso. α , β e δ	AGAGGATGATTGCCGCCGT CAACCACCCTGGTCTTGGATC	CDS	Bar-Am et al., 2005
Bad var. 1 e 2	AGCCAACCAGCAGCAGCCATCAT CTCCCCATCCCTTCGTCGTC	Exon 1/ CDS	Tee et al., 2008
p53 PAN	GCACTGGTGT TTTGTTGTGG GTGGTTTCAAGGCCAGATGT	Exon 10	Pecere et al., 2003

Iso – isoforma; CDS – região codificadora; PE – “primers” desenhados utilizando o programa “Primer Express”; PAN – todas as isoformas

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da mirtzapina sobre a viabilidade celular de neuroblastoma humano

Primeiramente foi investigado se os CAD apresentavam neurotoxicidade sobre células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). Com esse objetivo, as células SH-SY5Y foram incubadas durante 24 e 48 horas na ausência (amostras controle) ou presença de diferentes concentrações (1 a 20 μM) de mirtzapina e de imipramina. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de redução do MTT. A Figura 2 mostra que após 24 horas de incubação, as concentrações de 2 e 10 μM de mirtzapina aumentaram a viabilidade celular das culturas de neuroblastoma humano. O mesmo efeito foi provocado na presença de mirtzapina (1 e 2 μM) após 48 horas. Até a concentração de 20 μM , este composto não mostrou citotoxicidade.

4.2 Efeito da imipramina sobre a viabilidade celular de neuroblastoma humano

A incubação das células de neuroblastoma humano por 24 horas com imipramina (2 e 10 μM) também aumentou a viabilidade celular (Figura 3). Depois de 48 horas de incubação com as células de neuroblastoma, a imipramina (2 μM) provocou um aumento na viabilidade celular, mas foi citotóxico na concentração de 20 μM .

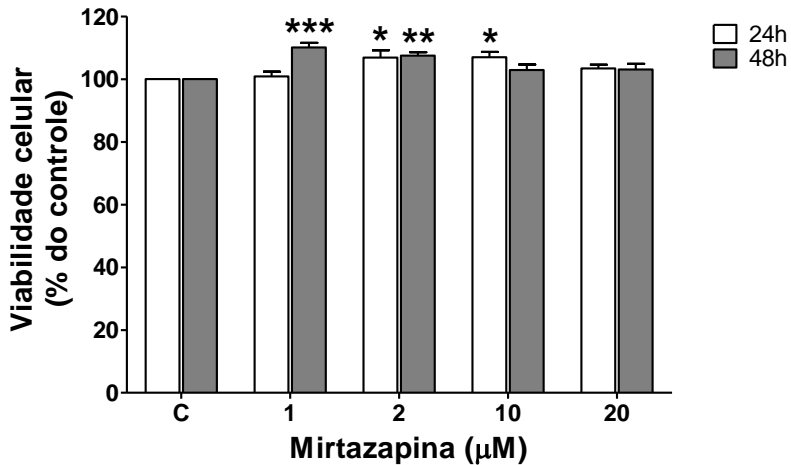


Figura 2. Efeito da mirtazapina na viabilidade celular em neuroblastoma humano (SH-SY5Y). As células foram incubadas com mirtazapina (1 a 20 μM) durante 24 e 48 horas e a viabilidade determinada pelo método da redução do MTT. As células controle (tratadas com meio de cultura) foram consideradas como 100% de viabilidade celular. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. ($n=3$, em quadruplicata). * $p\leq 0,05$, ** $p\leq 0,01$, *** $p\leq 0,001$, quando comparados com o controle (dados analisados por ANOVA de uma via, seguido de Tukey).

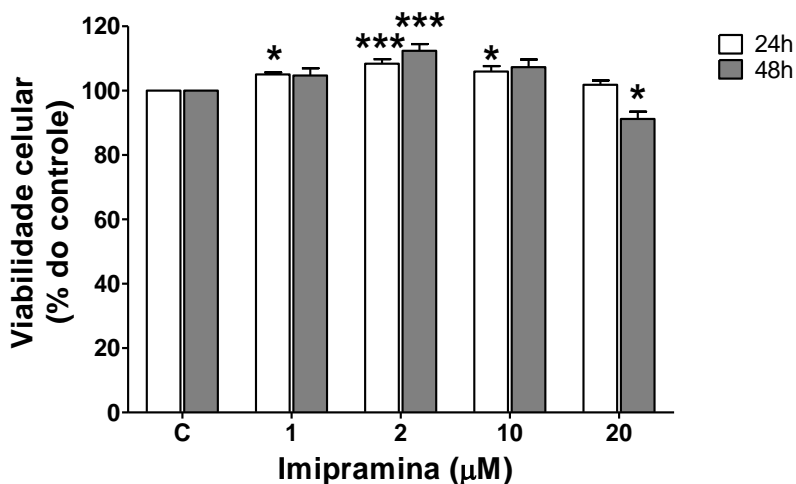


Figura 3. Efeito da imipramina na viabilidade celular em neuroblastoma humano (SH-SY5Y). As células foram incubadas com imipramina (1 a 20 µM) durante 24 e 48 horas e a viabilidade determinada pelo método da redução do MTT. As células controle (tratadas com meio de cultura) foram consideradas como 100% de viabilidade celular. Os resultados são expressos como média ± e.p.m. (n=3, em quadruplicata). * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, quando comparados com o controle (dados analisados por ANOVA de uma via, seguido de Tukey).

4.3 Efeito da tapsigargina na viabilidade celular de neuroblastoma humano

Para estabelecer um modelo de insulto citotóxico, as culturas de neuroblastoma foram incubadas com tapsigargina. A tapsigargina é um inibidor irreversível da SERCA que induz a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático e causa morte celular em neuroblastoma humano, como demonstrado em nosso trabalho (ARIAS et al., 2004). Desta maneira, a tapsigargina parece ser um bom modelo para estudos de citotoxicidade “in vitro”. A viabilidade celular foi reduzida entre 22 e 32% na presença de diferentes concentrações de tapsigargina (10 a 100 nM, Figura 4).

4.4 Efeito do peróxido de hidrogênio na viabilidade celular de neuroblastoma humano

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um agente indutor de estresse oxidativo, tem sido utilizado como modelo de insulto citotóxico sobre células de neuroblastoma humano (XIONG et al., 2009; REGULSKA et al., 2010). As células de neuroblastoma humano foram incubadas durante 24 horas na presença de diferentes concentrações (50 a 400 μM) de H_2O_2 (Figura 5). A viabilidade celular foi reduzida por 200 e 400 μM de H_2O_2 entre 10 e 31%, respectivamente.

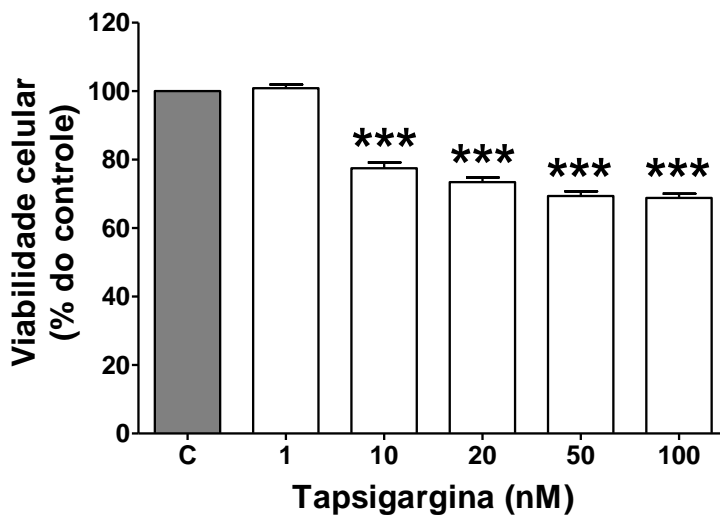


Figura 4. Efeito da taspigargina na viabilidade celular em neuroblastoma humano (SH-SY5Y). As células foram incubadas na ausência e presença de taspigargina (1 a 100 nM) durante 24 horas e a viabilidade determinada pelo método da redução do MTT. As células controle (tratadas com meio de cultura) foram consideradas como 100% de viabilidade celular. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. (n=3, em quadruplicata). *** $p \leq 0,001$, quando comparados com o controle (dados analisados por ANOVA de uma via, seguido de Tukey).

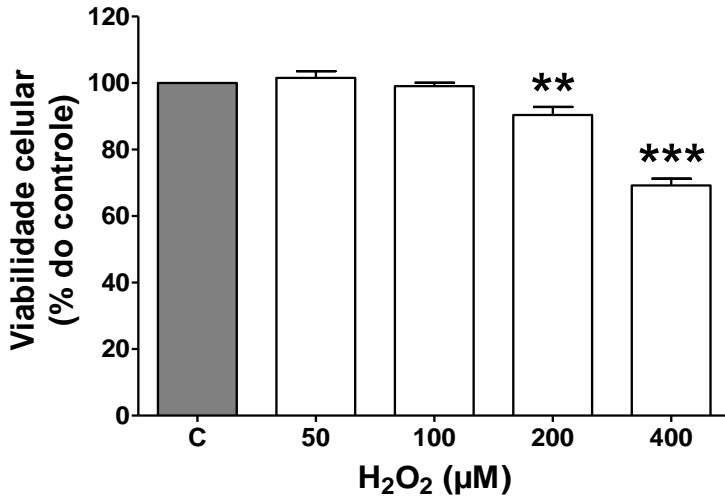


Figura 5. Efeito do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na viabilidade celular em neuroblastoma humano (SH-SY5Y). As células foram incubadas na ausência e presença de peróxido de hidrogênio (50 a 400 µM) durante 24 horas e a viabilidade determinada pelo método da redução do MTT. As células controle (tratadas com meio de cultura) foram consideradas como 100% de viabilidade celular. Os resultados são expressos como média ± e.p.m. (n=3, em quadruplicata). **p≤0,01, ***p≤0,001 quando comparados com o controle (dados analisados por ANOVA de uma via, seguido de Tukey).

4.5 Efeito do pré-tratamento com mirtazapina ou imipramina na morte celular induzida por tapsigargina em neuroblastoma humano

Para verificar o efeito neuroprotetor da mirtazapina e imipramina, as células foram tratadas durante 24 horas com concentrações não citotóxicas dos compostos antidepressivos (1 a 20 μM) e depois por mais 24 horas na presença de tapsigargina, o indutor de morte celular. A neuroproteção (redução da morte celular provocada por tapsigargina) foi determinada através dos ensaios de viabilidade celular. A Figura 6 mostra que nas concentrações testadas, a mirtazapina não protegeu as células de neuroblastoma contra a citotoxicidade provocada pela tapsigargina. A imipramina também não afetou a morte celular induzida pela tapsigargina (Figura 7).

4.6 Efeito do pré-tratamento com mirtazapina ou imipramina na morte celular induzida por peróxido de hidrogênio em neuroblastoma humano

O efeito neuroprotetor da mirtazapina e imipramina foi também testado contra a morte celular induzida pelo peróxido de hidrogênio. As células de neuroblastoma humano foram pré-tratadas durante 24 horas com os CAD e depois incubadas por mais 24 horas na presença de 400 μM de H_2O_2 . Como mostra a Figura 8, a mirtazapina nas concentrações de 1 e 2 μM aumentou a viabilidade celular das células tratadas com H_2O_2 de $64,1 \pm 1,1$ para $77,6 \pm 1,7$ e $76,1 \pm 2,7$, respectivamente. A imipramina, nas concentrações de 1, 2 e 10 μM , também reverteu a morte celular induzida pelo peróxido de hidrogênio ($70,3 \pm 1,6$), aumentando a viabilidade celular para $81,1 \pm 1,4$, $83,8 \pm 0,7$ e $78,0 \pm 1,2$, respectivamente (Figura 9).

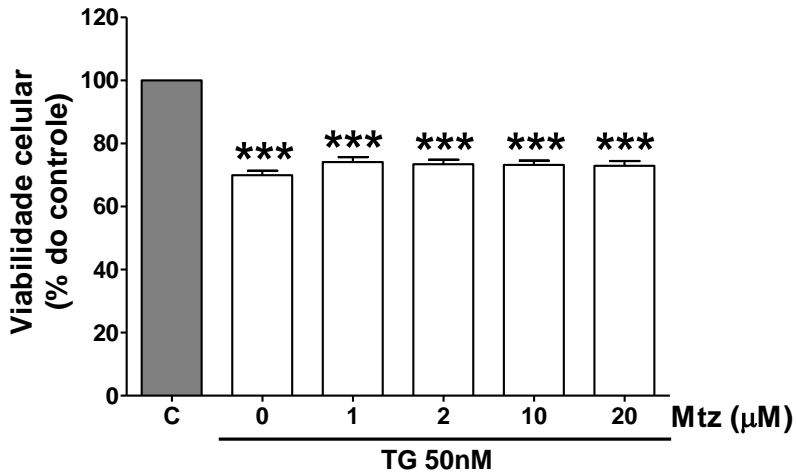


Figura 6. Efeito do pré-tratamento com mirtazapina na morte celular induzida por taspigargina. As células de neuroblastoma humano foram pré-tratadas com diferentes concentrações de mirtazapina (Mtz, 1 a 20 μM) por 24 horas e depois incubadas na presença de 50 nM de taspigargina por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. As células controle (tratadas com meio de cultura) foram consideradas como 100% de viabilidade celular. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. (n=3, em quadruplicata). *** $p \leq 0,001$, quando comparados com o controle (dados analisados por ANOVA de uma via, seguido de Tukey).

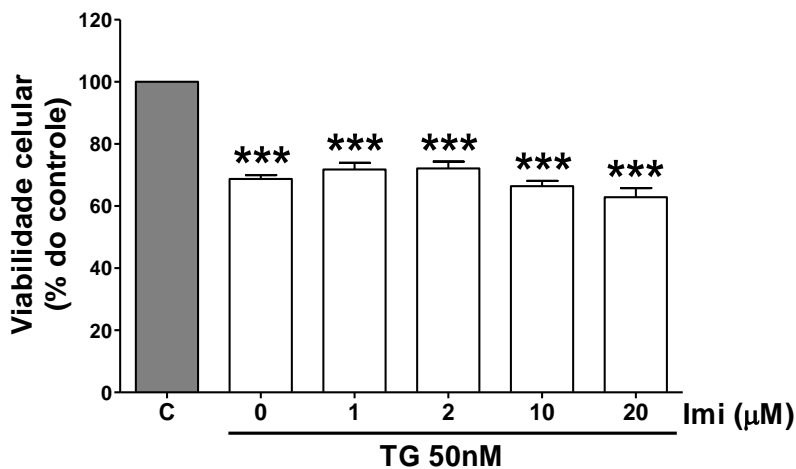


Figura 7. Efeito do pré-tratamento com imipramina na morte celular induzida por tapsigargina. As células de neuroblastoma humano foram pré-tratadas com diferentes concentrações de imipramina (Imi, 1 a 20 μM) por 24 horas e depois incubadas na presença de 50 nM de tapsigargina (TG) por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. As células controle (tratadas com meio de cultura) foram consideradas como 100% de viabilidade celular. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. ($n=3$, em quadruplicata). *** $p \leq 0,001$, quando comparados com o controle (dados analisados por ANOVA de uma via, seguido de Tukey).

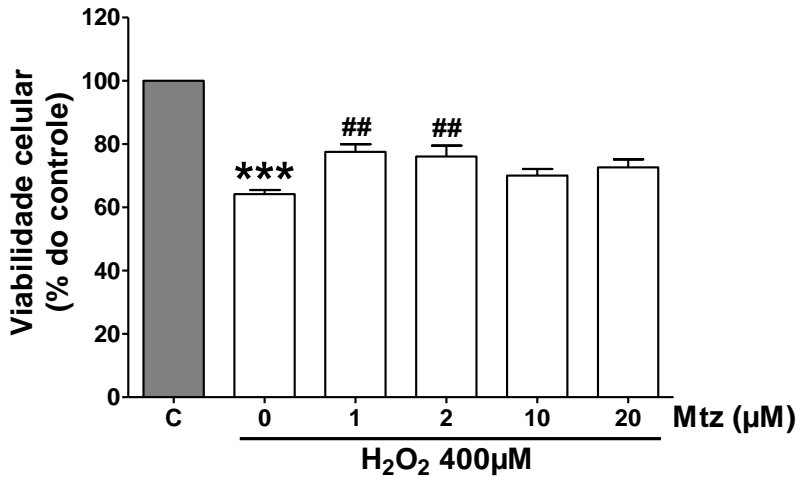


Figura 8. Efeito do pré-tratamento com mirtazapina na morte celular induzida pelo peróxido de hidrogênio. As células de neuroblastoma humano foram pré-tratadas com diferentes concentrações de mirtazapina (Mtz, 1 a 20 μM) por 24 horas e depois incubadas na presença de 400 μM de H₂O₂ por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. As células controle (tratadas com meio de cultura) foram consideradas como 100% de viabilidade celular. Os resultados são expressos como média ± e.p.m. (n=3, em quadruplicata). ***p≤0,001, quando comparados com o controle; ## p≤0,01, quando comparados com o peróxido de hidrogênio (dados analisados por ANOVA de uma via, seguido de Tukey).

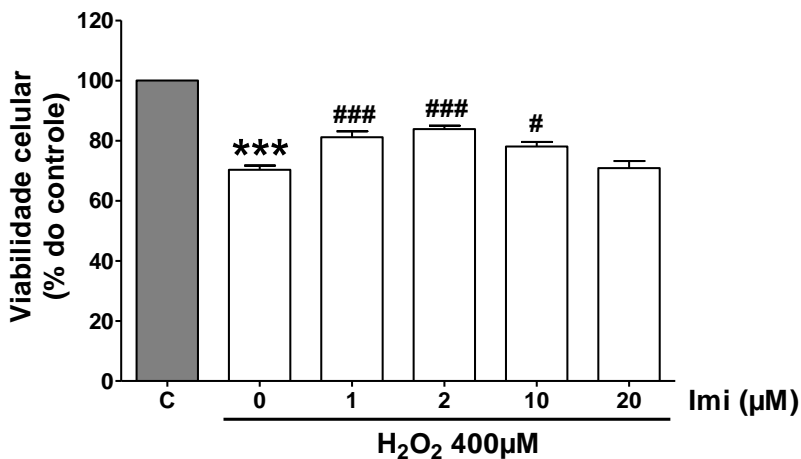


Figura 9. Efeito do pré-tratamento com imipramina na morte celular induzida por peróxido de hidrogênio. As células de neuroblastoma humano foram pré-tratadas com diferentes concentrações de imipramina (Imi, 1 a 20 μM) por 24 horas e depois incubadas na presença de 400 μM de H_2O_2 por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. As células controle (tratadas com meio de cultura) foram consideradas como 100% de viabilidade celular. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. ($n=3$, em quadruplicata). *** $p \leq 0,001$, quando comparados com o controle; ### $p \leq 0,001$, # $\leq 0,05$ quando comparados com o peróxido de hidrogênio (dados analisados por ANOVA de uma via, seguido de Tukey).

4.7 Efeito do tratamento com mirtazapina e imipramina na expressão gênica (RNAm) em neuroblastoma humano

Para estudar o mecanismo neuroprotetor dos CAD, foi investigado o efeito da mirtazapina e imipramina na expressão gênica de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. As células de neuroblastoma humano foram incubadas durante 48 horas na presença dos CAD, em concentrações (2 e 10 μM) que protegeram as células da citotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio. Após o tratamento, a expressão gênica (RNAm) das proteínas BDNF e Bcl-2 (envolvidas na sobrevivência celular), Bax, Bad e p53 (envolvidas na morte celular) foi determinada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR).

Ao contrário do esperado, o tratamento de células de neuroblastoma humano com mirtazapina (2 e 10 μM) reduziu em cerca de 25%, a expressão (RNAm) da proteína anti-apoptótica Bcl-2, envolvida na sobrevivência celular (Figura 10). Entretanto, 10 μM de imipramina, uma concentração que protegeu da citotoxicidade induzida por H_2O_2 , aumentou a expressão da proteína Bcl-2 em cerca de 48%, quando comparada à amostra controle (Figura 10). Não foi possível verificar o efeito dos CAD na expressão de BDNF, pois os “primers” utilizados para determinar BDNF total ou para as suas diferentes isoformas (Tabela 1) não mostraram resultados. O tratamento de células de neuroblastoma humano com 2 e 10 μM de mirtazapina reduziu a expressão da proteína pró-apoptótica Bax (envolvida na morte celular) em 41% e 37%, respectivamente (Figura 11). As células tratadas com imipramina mostraram um efeito ambíguo sobre a proteína Bax. A expressão de Bax foi reduzida em 56% por imipramina (2 μM) e aumentada em 31% após tratamento pelo composto na concentração de 10 μM (Figura 11). A Figura 12 mostra que apenas a mirtazapina (10 μM) foi capaz de reduzir a expressão da proteína pró-apoptótica Bad. Nas outras concentrações testadas, os CAD não mostraram efeito sobre a expressão de Bad. Os resultados do tratamento com mirtazapina e imipramina na expressão da proteína p53, mais conhecido como gene supressor tumoral, estão apresentados na Figura 13. A mirtazapina (10 μM) e imipramina (2 μM) reduziram a expressão da p53 em cerca de 51 e 58%, respectivamente. Entretanto, o tratamento com a imipramina (10 μM) aumentou a expressão de p53 em 62%.

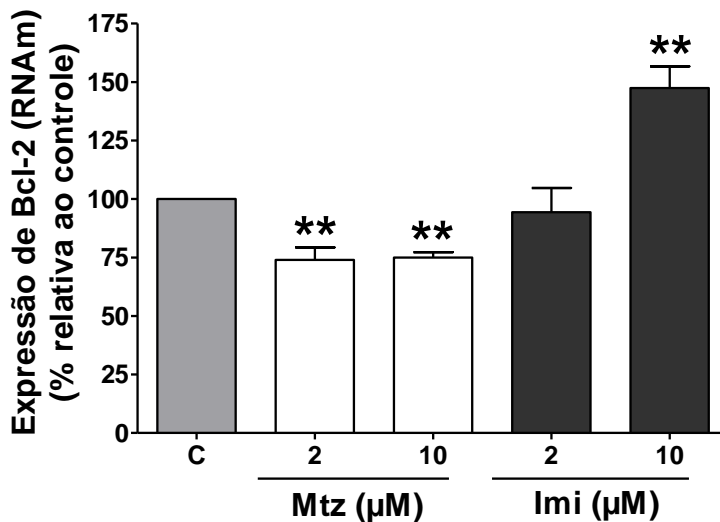


Figura 10. Efeito da mirtazapina e imipramina na expressão de Bcl-2 em células de neuroblastoma humano (SH-SY-5Y). As células foram incubadas durante 48 horas com mirtazapina (Mtz) ou imipramina (Imi) (2 e 10 μM) e a expressão de Bcl-2 (RNAm) quantificada por qRT-PCR. As células controle (tratadas com meio de cultura) foram consideradas como 100%. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. (n = 3). ** $p \leq 0,01$, quando comparados com o controle.

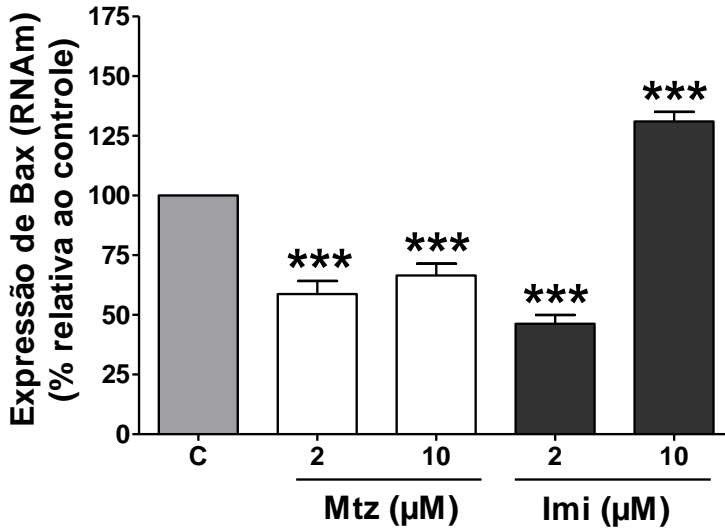


Figura 11. Efeito da mirtazapina e imipramina na expressão de Bax em células de neuroblastoma humano (SH-SY-5Y). As células foram incubadas durante 48 horas com mirtazapina (Mtz) e imipramina (Imi) (2 e 10 µM), e a expressão da Bax quantificada por qRT-PCR. As células controle (tratadas com meio de cultura) foram consideradas como 100%. Os resultados são expressos como média ± e.p.m. (n=3). ***p ≤ 0,001, quando comparados com o controle.

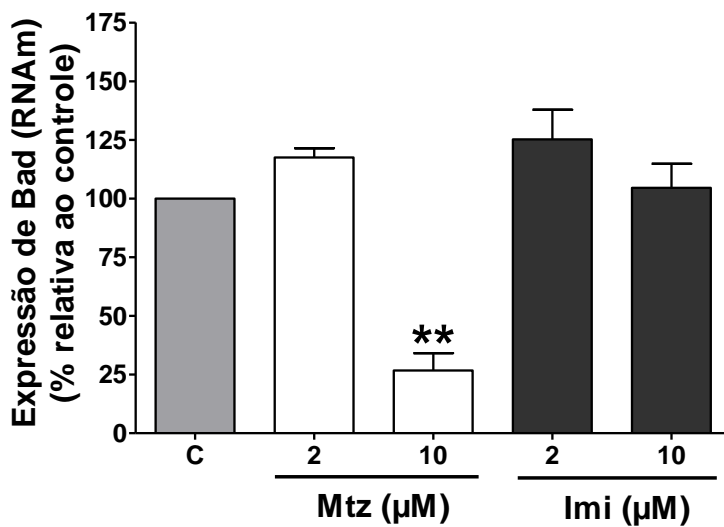


Figura 12. Efeito da mirtazapina e imipramina na expressão de Bad em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). As células foram incubadas durante 48 horas com mirtazapina (Mtz) e imipramina (Imi) (2 e 10 μM), e a expressão da Bcl-2 quantificada por qRT-PCR. As células controle (tratadas com meio de cultura) foram consideradas como 100%. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. (n=3). ** $p \leq 0,01$, quando comparados com o controle.

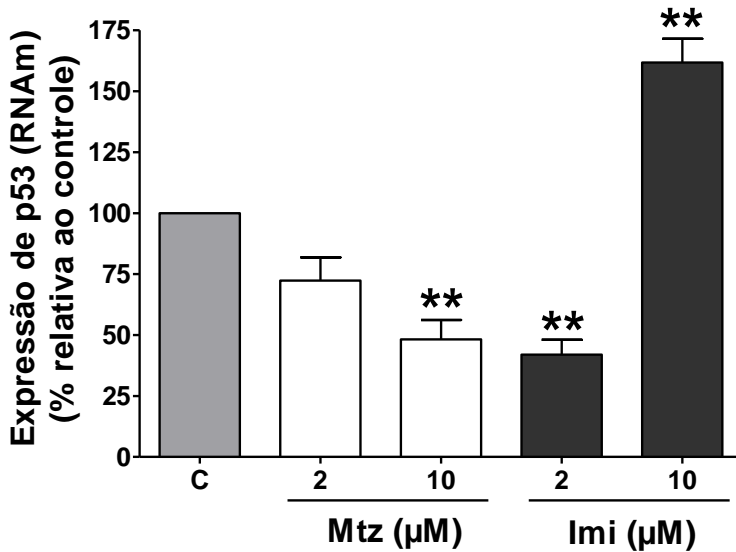


Figura 13. Efeito da mirtazapina e imipramina na expressão da p53 em células de neuroblastoma humano (SH-SY-5Y). As células foram incubadas durante 48 horas com mirtazapina (Mtz) e imipramina (Imi) (2 e 10 μM), e a expressão da p53 quantificada por qRT-PCR. As células controle (tratadas com meio de cultura) foram consideradas como 100% de expressão. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. (n=3). ** $p \leq 0,01$, quando comparados com o controle.

Os resultados mostraram que o tratamento de células de neuroblastoma humano com diferentes concentrações de mirtazapina e imipramina aumentou, não afetou ou reduziu a expressão de proteínas anti-apoptóticas e de pró-apoptóticas (Figuras 10 a 13). Além de afetar a expressão de proteínas, o efeito dos CAD na viabilidade celular pode também ser resultado da proporção entre os níveis dos fatores de sobrevivência (proteínas anti-apoptóticas) e da morte celular (proteínas pro-apoptóticas) (YOUNG, 2002; MANJI et al., 2003). Para uma melhor análise dos dados, foram calculadas as razões relativas da expressão de proteína anti-apoptótica (Bcl-2) contra aquelas que induzem a morte celular (Bax, Bad e p53). Como mostra a Figura 14, o tratamento com mirtazapina (2 e 10 μM) aumentou a razão Bcl-2/Bax em cerca de 20%, com os seguintes dados $1,26 \pm 0,02$ e $1,20 \pm 0,04$, respectivamente. A razão Bcl-2/Bax ($2,18 \pm 0,17$) foi aumentada em cerca de 120% nas células tratadas com imipramina (2 μM), indicando um efeito protetor bem maior do que observado com mirtazapina. A proporção Bcl-2/p53 foram elevados em cerca de 62 e 130%, após os tratamentos com mirtazapina (10 μM , $1,62 \pm 0,14$) e com imipramina (2 μM , $2,30 \pm 0,08$), respectivamente. A razão Bcl-2/Bad foi reduzida pelo tratamento com 2 μM de mirtazapina ou de imipramina. Ao contrário, a imipramina aumentou a razão Bcl-2/Bad em cerca de 28% ($1,28 \pm 0,07$).

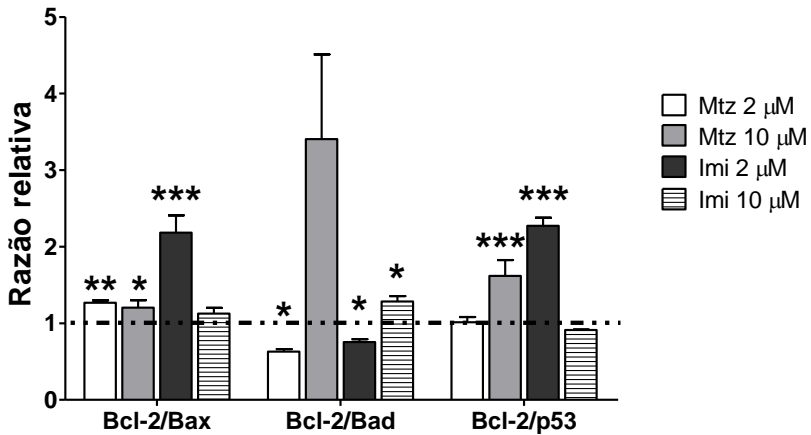


Figura 14. Efeito da mirtazapina (Mtz, 2 e 10 μM) e imipramina (Imi 2 e 10 μM) sobre a razão relativa da expressão gênica das proteínas Bcl-2/Bax, Bcl-2/Bad e Bcl-2/p53. Os resultados estão expressos como a razão das células tratadas comparadas às células controle (tratadas com meio de cultura e consideradas como valor 1,0) ($n=3$) *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi investigada a ação neuroprotetora dos antidepressivos mirtazapina e imipramina e os efeitos destes compostos sobre a expressão gênica de proteínas envolvidas na morte celular por apoptose. Os resultados mais relevantes deste estudo foram: i) mirtazapina e imipramina induzem aumento na viabilidade de células de neuroblastoma humano; ii) o pré-tratamento com mirtazapina e imipramina protege contra a citotoxicidade induzida por estresse oxidativo; iii) o tratamento com mirtazapina e imipramina reduz a expressão (RNAm) das proteínas pró-apoptóticas Bax e p53; mirtazapina também diminui Bad. iv) o efeito neuroprotetor destes compostos pode estar relacionado com a redução de proteínas pró-apoptóticas e com o aumento da razão Bcl-2/Bax e Bcl-2/p53.

A mirtazapina é um dos “novos” compostos antidepressivos (CAD) da classe dos tetracíclicos e seu uso provoca menos efeitos adversos do que outros utilizados na terapêutica da depressão. A administração crônica de mirtazapina aumentou a expressão gênica (RNAm) do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo e no córtex cerebral de ratos (ROGÓŽ et al., 2005). Além disso, o tratamento de ratos com mirtazapina protegeu células renais do estresse oxidativo causado por reperfusão (TOK et al., 2012). A mirtazapina foi escolhida para realizar este trabalho, pois apesar de induzir *in vivo* o BDNF e aparentemente ser citoprotetora, não há dados sobre o seu efeito neuroprotetor e os mecanismos envolvidos nessa ação em células neuronais. Para estudar os efeitos da mirtazapina, foram realizados ensaios em culturas de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), uma linhagem celular bem conhecida e utilizada em vários estudos na área de Neurobiologia. A imipramina foi selecionada e utilizada como “controle positivo” em todos os experimentos, pois este composto induz a expressão de proteínas neurotróficas e exerce efeito neuroprotetor *in vivo* e *in vitro*. O tratamento crônico com imipramina aumenta os níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2 no hipocampo de camundongos (MURRAY & HUTSON, 2007). Além disso, o tratamento com imipramina induz a expressão (RNAm) de BDNF e de Bcl-2 em culturas de células precursoras neuronais e protege as células contra a toxicidade induzida pelo LPS (PENG et al., 2008).

Primeiro, foram realizados experimentos para verificar a citotoxicidade da mirtazapina e imipramina em células de neuroblastoma humano. Os resultados mostraram que baixas concentrações (1 a 10 μM) de mirtazapina ou imipramina não apresentaram citotoxicidade e até aumentaram a viabilidade celular.

Nestas mesmas concentrações, a imipramina mostrou efeito semelhante sobre células precursoras neuronais (PENG et al., 2008). Estes dados parecem sugerir que os compostos aumentam a proliferação celular. Em concentrações acima de 250 μM , a mirtazapina foi citotóxica para células de osteosarcoma humano (PAN et al., 2006). Também a imipramina em concentrações mais altas, de 60 μM , induziu morte celular por autofagia em células de glioblastoma humano (U87MG) (JEON et al., 2011).

Para estudar o efeito neuroprotetor de um composto é preciso estabelecer um ou mais modelos de citotoxicidade. A redução da morte celular induzida pelo agente citotóxico indica um efeito neuroprotetor. Neste trabalho foi testado a tapsigargina, um composto que atua provocando estresse no retículo endoplasmático, um passo inicial e crucial para induzir morte neuronal por apoptose (LAI et al., 2006). A tapsigargina induz morte celular pela elevação do cálcio intracelular; isto ocorre pela inibição da SERCA (bomba de Ca^{2+}) do retículo endoplasmático. Desta forma o cálcio não consegue entrar no retículo endoplasmático, fazendo com que as reservas do retículo sejam depletadas e aumentando a captação de cálcio extracelular. Em células de neuroblastoma humano (SH-5YSY), a elevação do cálcio intracelular induz apoptose por ativação direta da caspase-3, de forma independente da liberação do *citocromo c* (LAI et al., 2006). Os efeitos induzidos pela tapsigargina servem como modelo de neurotoxicidade por apresentar semelhança com a degeneração neuronal encontrada no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer (PUTNEY & BIRD, 1993; NATH et al., 1997; JELLINGER & STADELMANN, 2001). Os resultados deste trabalho mostraram que o pré-tratamento com mirtazapina ou imipramina não protegeu as células de neuroblastoma da citotoxicidade induzida pela tapsigargina. Entretanto, a maprotilina foi capaz de inibir o aumento do cálcio intracelular induzido pela tapsigargina e aumentou a proliferação celular de células tumorais de próstata (HSU et al., 2004a; HSU et al., 2004b). Kim e colaboradores demonstraram que a fluoxetina inibiu o aumento do cálcio intracelular induzido pela tapsigargina de duas formas, inibindo o influxo extracelular e a liberação das reservas intracelulares em células de feocromocitoma de ratos PC12 (KIM et al., 2005). Porém, estes autores não investigaram se a fluoxetina poderia ter algum efeito sobre a viabilidade celular de células PC12 na presença de tapsigargina. A melatonina, um composto que possui efeito “tipo” antidepressivo em camundongos (MANTOVANI et al., 2003), protegeu leucócitos da apoptose induzida pela tapsigargina, por um mecanismo envolvendo a redução de EROs e inibição de caspase-3 (ESPINO et al.,

2011). Enfim, não há trabalhos demonstrando que compostos antidepressivos exerçam efeito protetor em células neuronais contra a morte celular induzida pela taspigargina.

Nas doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer foram encontrados níveis elevados de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no hipocampo, córtex frontal e temporal; e na doença de Parkinson, nos neurônios dopaminérgicos na substância nigra e em suas projeções para o estriado (GIASSON et al., 2002). A proteína β -amilóide, associada à patologia da doença de Alzheimer, foi capaz de induzir a formação de peróxido de hidrogênio em células PC12 (BEHL et al., 1994) e também em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (LEE et al., 2011b). O peróxido de hidrogênio é um dos modelos mais amplamente utilizados para induzir estresse oxidativo exógeno e estudar os mecanismos envolvidos na neurotoxicidade e na neuroproteção. Várias evidências indicam que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) altera os níveis de proteínas apoptóticas, aumentando a Bax e reduzindo a Bcl-2, com a consequente liberação do *citocromo c*, ativação de caspase-3 e causando a morte celular por apoptose (IWASHITA et al., 2007; CAI et al., 2008; PARK et al., 2011). O mecanismo de ação ou de sinalização celular pelo qual o peróxido de hidrogênio atua aumentando a Bax e reduzindo a Bcl-2 não é conhecido. Os resultados deste trabalho mostraram que o pré-tratamento com mirtazapina (1 e 2 μM) e imipramina (1, 2 e 10 μM) foi capaz de proteger as células de neuroblastoma humano contra a morte celular induzida pelo peróxido de hidrogênio. Este efeito “tipo” antioxidante pode ser devido ao fato de que a mirtazapina aumenta os níveis de glutatona e induz a expressão de SOD (BILICI et al., 2009). Assim, este compostos protegeu células estomacais de ratos contra o estresse oxidativo induzido por indometacina (BILICI et al., 2009). Além disso, a mirtazapina protegeu células renais de ratos submetidos à isquemia por reperfusão, um modelo de estresse oxidativo (TOK et al., 2012). A imipramina mostrou um resultado semelhante; o pré-tratamento de células precursoras neuronais com 3 μM de imipramina inibiu a citotoxicidade do LPS (PENG et al., 2008). Vários trabalhos têm demonstrado que alguns CAD podem reduzir o estresse oxidativo em ensaios *in vivo* e *in vitro*. Salzman e colaboradores mostraram que a mianserina, um composto da mesma classe da mirtazapina, apresentou efeito protetor em ratos que tiveram suas medulas espinhais lesionadas (SALZMAN et al., 1994), um modelo que envolve estresse oxidativo (HILLARD et al., 2004). O tratamento de células de feocromocitoma de ratos PC12 com amitriptilina, bupropiona, doxepina e venlafaxina, induziram o aumento na expressão gênica da SOD (LI et al., 2000). O

pré-tratamento com fluoxetina, imipramina e venlafaxina reverteu a redução dos níveis de glutatona e de enzimas antioxidantes em ratos submetidos ao estresse (ZAFIR et al., 2009). O tratamento crônico de camundongos com venlafaxina reduziu a formação de produtos oxidados, como o malondialdeído e aumentou os níveis de glutatona no hipocampo (ABDEL-WAHAB & SALAMA, 2011). O extrato de *Rosmarinus officinalis*, que apresenta atividade “tipo” antidepressiva em ratos (MACHADO et al., 2009), protegeu células de neuroblastoma SH-SY5Y da citotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio (PARK et al., 2010). Do mesmo modo, o extrato de *Ginkgo biloba*, que demonstra uma atividade “tipo” antidepressiva (ROJAS et al., 2011), também protegeu células de neuroblastoma humano contra o peróxido de hidrogênio (SHI et al., 2009a). Além disso, estes autores mostraram que o pré-tratamento de células SH-SY5Y com extrato de *Ginkgo biloba* protegeu contra a morte celular induzida pelo peptídeo β -amilóide (1-42) (SHI et al., 2009b), que induz a formação de peróxido de hidrogênio nestas células (LEE et al., 2011b). É importante lembrar que o tratamento com mirtazapina (ROGÓŽ et al., 2005) e imipramina (PENG et al., 2008) induziu aumento de BDNF. Pois, o BDNF é capaz de aumentar os níveis de glutatona e proteger células neuronais de ratos contra a citotoxicidade da cisplatina, um composto antitumoral que induz morte celular por estresse oxidativo (GABAIZADEH et al., 1997). Yamagata e colaboradores também demonstraram que o BDNF é capaz de proteger células PC12 da morte celular por estresse oxidativo, além de reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio (YAMAGATA et al., 1999). Assim, é possível que o efeito protetor dos CAD contra o estresse oxidativo possa estar relacionado, primeiro, por induzir BDNF e depois, devido à capacidade deste em aumentar as defesas antioxidantes. No estudo dos mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor de compostos/fármacos, a busca ocorre, em sua grande maioria, sobre os fatores neurotróficos e neurogênicos. Os fatores conhecidos ativam vias de transdução de sinal induzindo a diferenciação, divisão e sobrevivência celular. Na pesquisa sobre a ação dos antidepressivos não tem sido diferente, existem muitos trabalhos analisando seus efeitos sobre as neurotrofinas (BDNF, NGF, NT-3, VEGF) e proteínas neurogênicas/citoprotetoras (Bcl-2 e Bcl-xL) (DRZYŻGA et al., 2009; MCKERNAN et al., 2009). Em contraste, poucos são os trabalhos que investigaram as ações dos CAD sobre as proteínas indutoras de morte celular, Bax, Bad, p53 e outros. Assim sendo, neste trabalho foi estudado o efeito da mirtazapina e imipramina sobre a expressão gênica das proteínas anti-apoptóticas e também as pró-apoptóticas. Já é

conhecido que estas proteínas são expressas e estão presentes nas células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (HAN et al., 2008; LEE et al., 2011a; LEE et al., 2011b). Como já descrito anteriormente, mirtazapina induz a expressão de BDNF (ROGÓZ et al., 2005) e a imipramina, de BDNF e de Bcl-2 (MURRAY & HUTSON, 2007; PENG et al., 2008). Além disso, é conhecido que o BDNF ativa vias de sinalização e induz a expressão da proteína protetora Bcl-2 (BONNI et al., 1999; FINKBEINER, 2000; D'SA & DUMAN, 2002). Para analisar e comparar o efeito dos CAD sobre a expressão gênica, as células foram tratadas com mirtazapina e imipramina nas mesmas concentrações (2 e 10 μM). Entretanto, somente 2 μM de mirtazapina mostrou ser neuroprotetora contra o peróxido de hidrogênio; imipramina foi nas duas concentrações. Assim, foi investigado se o tratamento com mirtazapina afeta a expressão gênica da Bcl-2, e se a imipramina confirma que induz a expressão da proteína, como já reportado (PENG et al., 2008). Ao contrário do esperado, o tratamento com mirtazapina 2 μM (concentração protetora) e 10 μM (concentração não protetora) reduziu a expressão de Bcl-2. Para a mirtazapina, se acreditava que a expressão de BDNF (ROGÓZ et al., 2005) deveria induzir um aumento e não a redução de Bcl-2. Porém, os dados de ROGÓZ et al. (2005) foram obtidos de ensaios *in vivo*, após tratamento crônico com mirtazapina por 14 dias em ratos. Entretanto, alguns autores mostraram que o tratamento com os CAD nem sempre afeta os níveis de BDNF ou da proteína Bcl-2. Experimentos *in vivo* mostraram que o tratamento crônico com amitriptilina e venlafaxina por 21 dias não modificou os níveis de Bcl-2 em ratos (XU et al., 2003). Além disso, a amitriptilina não alterou os níveis de BDNF, que foi até reduzido pela venlafaxina (XU et al., 2003). Em experimentos *in vitro*, o tratamento com clorgilina ou selegilina (inibidores da MAO) não afetaram os níveis de Bcl-2. Não há trabalhos mostrando a redução de Bcl-2 pelo tratamento com CAD, sugerindo que resultados negativos podem não ter sido publicados. Nas células tratadas com imipramina (2 e 10 μM , concentrações protetoras), a expressão da proteína Bcl-2, não se alterou e aumentou, respectivamente. Os resultados diferem dos de Peng e colaboradores, que mostraram um aumento da expressão de Bcl-2 pelo tratamento com 1 e 3 μM de imipramina (PENG et al., 2008). No trabalho de PENG et al. (2008), o tratamento com 10 μM de imipramina não afetou a expressão de Bcl-2. As diferenças de resultados podem ser devido ao uso de distintas linhagens celulares ou ao tempo de tratamento. A seguir, foi avaliada a expressão da proteína Bax. O tratamento de células de neuroblastoma humano com mirtazapina e imipramina (2 μM , concentração protetora)

reduziu a expressão gênica da proteína Bax, indutora de morte celular. Estes resultados são semelhantes ao demonstrado pela fluoxetina, que foi capaz de diminuir a expressão da Bax no hipocampo de ratos submetidos ao estresse (KOSTEN et al., 2008). Entretanto, a expressão de Bax em células precursoras neuronais não foi afetada pelo tratamento com imipramina (PENG et al., 2008) ou moclobemida (CHIOU et al., 2006). Curiosamente, a imipramina (10 μ M, concentração protetora) aumentou a expressão de Bax; e mirtazapina (10 μ M, concentração não protetora) também reduziu Bax. A interpretação dos resultados individuais se torna complexo, por exemplo, o mesmo tratamento com mirtazapina reduziu a expressão de Bcl-2 e reduziu a Bax. Alguns autores sugerem que os dados podem ser analisados em termos de proporção (razão) entre os fatores de sobrevivência (BDNF, Bcl-2) e de morte celular (Bax, Bad, p53) (FUKAMACHI et al., 1998 ; CHENG et al., 2001 ; ZHANG et al., 2011a; CHEN et al., 2012). Mudanças nestas razões, certamente resultariam em efeitos sobre a viabilidade celular (YOUNG, 2002; MANJI et al., 2003). No caso de redução da expressão de uma das proteínas com a qual a proteína Bcl-2 se complexa no processo de apoptose, por exemplo, a Bax, a razão Bcl-2/Bax terá um valor maior do que 1,0 e indicaria um efeito protetor (CHENG et al., 2001). O aumento da razão Bcl-2/Bax pelo tratamento com zinco, protegeu células humanas monocíticas U937 da citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio (FUKAMACHI et al., 1998). Outros autores demonstraram que o estresse oxidativo provoca o aumento de Bax e redução de Bcl-2, portanto reduzindo a razão Bcl-2/Bax e causando morte celular (ZHANG et al., 2011a; CHEN et al., 2012). O composto N-estearoiltilosina, um análogo da anandamida, protegeu cultura primária de neurônios corticais de ratos contra a proteína β -amilóide, por aumentar a razão Bcl-2/Bax (YANG et al., 2010). Os resultados obtidos mostram que a mirtazapina (2 e 10 μ M) reduziu a expressão de Bcl-2 e também da Bax, contudo aumentou a razão Bcl-2/Bax, mas apenas a concentração de 2 μ M foi neuroprotetora. A imipramina aumentou a razão Bcl-2/Bax, um composto que foi escolhido para este trabalho como “controle positivo”, pois nas concentrações de 1 a 3 μ M, ela induziu a maior expressão de BDNF e de Bcl-2 e protegeu células precursoras neuronais da citotoxicidade por LPS (PENG et al., 2008). O glicosídeo de Peony, que apresenta atividade antidepressiva, também foi capaz de aumentar a razão Bcl-2/Bax e proteger células PC12 da citotoxicidade por corticosterona (MAO et al., 2009). O efeito protetor da razão Bcl-2/Bax pode ser creditado a uma maior quantidade de Bcl-2 “disponível”, uma vez que esta proteína deve permanecer ligada à Bax

para evitar a morte celular. É importante salientar que neste trabalho está sendo avaliada a expressão gênica, se espera que o RNAm será traduzido em proteína para exercer a sua função na apoptose. Assim, aparentemente não é necessária a elevação da proteína Bcl-2 para induzir sobrevivência celular, bastaria reduzir os níveis de Bax. Embora provavelmente, o aumento de Bcl-2 teria um resultado melhor na sobrevivência celular e em outras funções que são atribuídas a esta proteína, como efeitos neurogênicos e antioxidantes (MANJI et al., 2003).

Além da Bax, a proteína Bcl-2 também pode permanecer ligada à Bad para proteger as células da morte celular (YANG et al., 1995; CHENG et al., 2001). De acordo com a Figura 1 (pág. 10), os antidepressivos que aumentam o BDNF que posteriormente ativa a via PI3K/Akt, podem ter um papel importante na regulação da proteína Bad, pois Akt regula esta proteína pró-apoptótica (TANIS et al., 2007). A proteína Bad é conhecida por ter um importante papel como indutor de apoptose pela formação do *poro de transição mitocondrial* (MCKERNAN et al., 2009; POLZIEN et al., 2011). Os resultados mostraram que a expressão de Bad foi bastante reduzida, mas somente pelo tratamento com 10 μ M de mirtazapina, uma concentração em que o composto não reverteu o efeito citotóxico do peróxido de hidrogênio. O tratamento com mirtazapina e imipramina (2 μ M) reduziu a razão Bcl-2/Bad (valor < 1,0). Apesar da redução, isto não interferiu no efeito protetor destes compostos. Isto pode ocorrer, pois a Bad também se liga à outra proteína antiapoptótica, a Bcl-xL (CHENG et al., 2001), não analisada neste trabalho. Entretanto, imipramina (10 μ M), uma concentração protetora, aumentou esta razão. Estes dados da razão Bcl-2/Bad sugerem que a quantidade de Bad não seja importante, assim como a de Bax, na indução da morte celular por peróxido de hidrogênio, mas sim, sua ativação. Isto parece indicar que a redução de Bad não é determinante para proteger as células e que talvez o aumento de Bad não seja necessário para induzir a morte celular em células tratadas com peróxido de hidrogênio. De fato, a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio promove o aumento de Bax (ZHANG et al., 2011a; CHEN et al., 2012), e é provável que somente a redução desta proteína seja suficiente para proteger as células. O tratamento com imipramina em concentrações protetoras também não alterou a expressão de Bad em células precursoras neuronais (PENG et al., 2008). A p53, mais conhecida como proteína supressora tumoral, induz a transcrição gênica e promove a oligomerização das proteínas Bax e Bad para a formação do *poro de transição mitocondrial* causando a apoptose (TANIS et al.,

2007; KROEMER et al., 2007; HU et al., 2009; XIA et al., 2010; ROBSON et al., 2011). A mirtazapina (10 μ M, concentração não protetora) e imipramina (2 μ M, concentração protetora) reduziram a expressão da proteína p53 em células de neuroblastoma SH-5YSY. Nas células tratadas com 10 μ M de imipramina (concentração protetora), foi observado um aumento da p53. Existem evidências de que a proteína p53 pode ligar-se ao DNA e transcrever tanto a Bax (MIYASHITA & REED, 1995) quanto a Bad (JIANG et al., 2006). Assim, a indução de p53 poderia levar ao aumento de Bax ou de Bad. É interessante notar a semelhança entre os resultados da expressão de Bax (Figura 11) e de p53 (Figura 13). Isto parece sugerir que o tratamento com mirtazapina induz uma possível correlação entre a expressão das duas proteínas. Entretanto, a análise das razões Bcl-2/Bax e Bcl-2/p53 não permitem afirmar sobre isso. Porém, para o tratamento com imipramina (2 μ M, concentração protetora), os dados comparativos de Bcl-2/Bax e Bcl-2/p53 foram bastante semelhantes, indicando uma possível relação entre o aumento da expressão de p53 e a indução da expressão de Bax. Para confirmar esta relação, seriam necessários outros experimentos, como estudar a cinética de expressão das duas proteínas ou inibir a expressão de cada uma delas separadamente, por exemplo, utilizando RNA de interferência (RNAi). Entretanto é preciso ter cuidado com estes dados, pois a transcrição do gene da Bax pode também ser induzida pela proteína p73, outra proteína supressora de tumores e que possui homologia com a p53 (ŠTROS et al., 2002). A p73 se liga ao DNA na mesma região codificante da proteína Bax (ŠTROS et al., 2002). Além disso, outro fator de transcrição, o c-myc também pode transcrever o gene da Bax (ROBSON et al., 2011). Isto indica a importância da proteína Bax na regulação da apoptose, pois a sua expressão parece estar sob um controle “fino” de vários fatores de transcrição e possivelmente por diferentes vias de sinalização celular. Apesar de alguns trabalhos mostrarem que a proteína p53 induz a apoptose (SHAW et al., 1992; MIYASHITA & REED, 1995; JIANG et al., 2006), outros estudos apontam para seu papel protetor em células de osteosarcoma humano U2OS-VP16 (PETERSEN et al., 2010) e em células tumorais de cólon humano HCT116 e RKO (CARVAJAL et al., 2005). Um aumento expressivo e bem claro da razão Bcl-2/Bax e Bcl-2/p53 foi demonstrado pelo “controle positivo” deste trabalho, a imipramina (2 μ M), uma concentração que mostrou ser neuroprotetora em células de neuroblastoma humano. O tratamento de células de neuroblastoma humano com 10 μ M de mirtazapina aumentou as razões Bcl-2/Bax e Bcl-2/p53, mas não teve efeito sobre o peróxido de

hidrogênio. Novos experimentos poderão ser realizados para verificar se nesta concentração, o composto seria protetor em outros modelos de citotoxicidade.

O fato da mirtazapina e imipramina protegerem as células contra o peróxido de hidrogênio e não frente à taspigargina pode ser devido ao tipo de célula testada. O tratamento com lítio na concentração de 1 mM por 7 dias foi capaz de proteger as células de neuroblastoma humano (o mesmo deste trabalho) da toxicidade pelo peróxido de hidrogênio, mas não teve efeito protetor contra a taspigargina (LAI et al., 2006). Porém, em outro trabalho, o tratamento com lítio pelo mesmo tempo e concentração foi capaz de reduzir a morte de células PC12 contra a taspigargina (HIROI et al., 2005). Outra possível causa para que ambos os antidepressivos tenham protegido as células apenas do peróxido de hidrogênio é porque atuam diretamente sobre a expressão de Bcl-2 e Bax, aumentando a razão entre essas proteínas e desta forma inibindo a morte celular em seu início (proteínas de ativação, Bcl-2, Bax, Bad). Ocorre que em células SH-5YSY, a taspigargina pode induzir a morte celular ativando diretamente a proteína de execução, caspase-3, independente da liberação de *citocromo c* e sem participação das proteínas anti- e pró-apoptótica (LAI et al., 2006). Neste caso, as proteínas de ativação não exercem nenhum papel.

Neste trabalho foram realizados experimentos para avaliar o efeito do tratamento de células de neuroblastoma humano com mirtazapina e imipramina na expressão (RNAm) de BDNF. Primeiramente, foram utilizados *primers* para BDNF citados no artigo de autores que utilizaram células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (DONNICCI et al., 2008). As sequências dos *primers* foram checadas com o gene para BDNF humano. Entretanto, os *primers* testados não mostraram resultados que pudessem ser analisados e validados. Novos *primers* foram desenhados utilizando o programa “Primer Express”, mas também não forneceram resultados. Novos experimentos serão realizados para determinar a expressão de BDNF. Porém, nosso grupo investigou o efeito do tratamento crônico com mirtazapina durante 21 dias em camundongos. A mirtazapina aumentou a expressão (RNAm) de BDNF no córtex e no hipocampo de camundongos (dados não publicados). Além disso, neste trabalho foi mostrado que a mirtazapina tem ação protetora sobre células de neuroblastoma humano. Porém, o composto não protegeu contra a excitotoxicidade induzida por glutamato (exposição aguda) em fatias de hipocampo de camundongos (dados não publicados). É possível que o efeito neuroprotetor seja observado somente após o tratamento prolongado com mirtazapina, tempo

necessário para induzir o aumento de BDNF e a redução das proteínas Bax e p53, não necessariamente nesta ordem.

Os resultados deste trabalho sugerem que os tratamentos com mirtazapina e imipramina induzem um efeito neuroprotetor que parece estar relacionado com a capacidade destes compostos em reduzir a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e p53. Os dados deste trabalho contribuem para o conhecimento do mecanismo molecular de ação dos compostos antidepressivos. Estes resultados podem auxiliar na busca de novos alvos terapêuticos para melhorar e aperfeiçoar o tratamento da depressão.

6 CONCLUSÕES

1. A mirtazapina e imipramina apresentam baixa citotoxicidade e aumentam a viabilidade celular em neuroblastoma humano;
2. O pré-tratamento com os antidepressivos mirtazapina e imipramina protegeram as células de neuroblastoma humano contra a citotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio;
3. O tratamento de células de neuroblastoma humano com mirtazapina e imipramina reduziu a expressão gênica (RNAm) das proteínas pró-apoptóticas Bax e p53 e aumentou as razões relativas de Bcl-2/Bax e Bcl-2/p53.
4. O efeito neuroprotetor exercido pela mirtazapina e imipramina parece ser devido a manter positiva a razão entre os fatores de sobrevivência e de morte celular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHAB, B.A.; SALAMA, R.H. Venlafaxine protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 100, p. 59-65, 2011.

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*, v. 281, p. 1322–1326, 1998.

AGOSTINHO, F.R.; RÉUS, G.Z.; STRINGARI, R.B.; RIBEIRO, K.F.; PFAFFENSELLER, B.; STERTZ, L.; PANIZZUTTI, B.S.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Olanzapine plus fluoxetine treatment increases Nt-3 protein levels in the rat prefrontal cortex. *Neurosci. Lett.*, v. 497, p. 99-103, 2011.

ALLAMAN, I.; FIUMELLI, H.; MAGISTRETTI, P.J.; MARTIN, J.L. Fluoxetine regulates the expression of neurotrophic/growth factors and glucose metabolism in astrocytes. *Psychopharmacology*, v. 216, p. 75-84, 2011.

ALMEIDA, R.D.; MANADAS, B.J.; MELO, C.V.; GOMES, J.R.; MENDES, C.S.; GRÃOS, M.M.; CARVALHO, R.F.; CARVALHO, A.P.; DUARTE, C.B. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell. Death. Differ.*, v. 12, p. 1329-1343, 2005.

ALTAR, C.A.; WHITEHEAD, R.E.; CHEN, R.; WÖRTWEIN, G.; MADSEN, T.M. Effects of electroconvulsive seizures and antidepressant drugs on brain-derived neurotrophic factor protein in rat brain. *Biol. Psychiatry.*, v. 54, p. 703-709, 2003.

ARIAS, E.; ALES, E.; GABILAN, N.H.; CANO-ABAD, M.F.; VILLARROYA, M.; GARCIA, A.G.; LOPEZ, M.G. Galantamine prevents apoptosis induced by beta-amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, v. 46, p. 103-114, 2004.

BÄCKMAN, C.M.; SHAN, L.; ZHANG, Y.J.; HOFFER, B.J.; LEONARD, S.; TRONCOSO, J.C.; VONSATEL, P.; TOMAC, A.C. Gene expression patterns for GDNF and its receptors in the human putamen affected by Parkinson's disease: a real-time PCR study. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 252, p. 160-166, 2006.

BALDESSARINI, R.J. Drug therapy of depression and anxiety disorders. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw-Hill. 2006, ed. 11.

BALDWIN, D.S. Monoamine systems in depression: towards better understanding of the disorder and improved treatment options. *Human Psychopharmacol. Clin. Exp.*, v. 13, p. 293-295, 1998.

BAR-AM, O.; WEINREB, O.; AMIT, T.; YOUDIM, M.B. Regulation of Bcl-2 family proteins, neurotrophic factors, and APP processing in the neurorescue activity of propargylamine. *FASEB J.*, v. 19, p. 1899-1901, 2005.

BEHL, C.; DAVIS, J.B.; LESLEY, R.; SCHUBERT, D.; Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*, v. 77, p. 817-827, 1994.

BERTON, O.; NESTLER, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Rev. Neurosci.*, v. 7, p. 137-51, 2006.

BILICI, M.; OZTURK, C.; DURSUN, H.; ALBAYRAK, F.; SAGLAM, M.B.; UYANIK, A.; GULABOGLU, M.; TEKIN, S.B. Protective effect of mirtazapine on indomethacin-induced ulcer in rats and its relationship with oxidant and antioxidant parameters. *Dig. Dis. Sci.*, v. 54, p. 1868-1875, 2009.

BOIX, J.; LLECHA, N.; YUSTE, V.J.; COMELLA, J.X. Characterization of the cell death process induced by staurosporine in human neuroblastoma cell lines. *Neuropharmacology*, v. 36, p. 811-821, 1997.

BONNI, A.; BRUNET, A.; WEST, A.E.; DATTA, S.R.; TAKASU, M.A.; GREENBERG, M.E. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*, v. 286, p. 1358-1362, 1999.

BOURGAREL-REY V, SAVRY A, HUA G, CARRÉ M, BRESSIN C, CHACON C, IMBERT J, BRAGUER D, BARRA Y. Transcriptional down-regulation of Bcl-2 by vinorelbine: identification of a novel binding site of p53 on Bcl-2 promoter. *Biochem. Pharmacol.*, v. 78, p. 1148-1156, 2009.

BRUCKHEIMER, E.M.; CHO, S.H.; SARKISS, M.; HERRMANN, J.; MCDONNELL, T.J. The Bcl-2 gene family and apoptosis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, v. 62, p. 75-105, 1998.

BRUNONI, A.R.; LOPES, M.; FREGNI, F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, v. 11, p. 1169-1180, 2008.

BULLOCK, B.P.; HABENER, J.F. Phosphorylation of the cAMP response element binding protein CREB by cAMP-dependent protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 alters DNA-binding affinity, conformation, and increases net charge. *Biochemistry.*, v. 37, p.3795-3809, 1998.

CAI, L.; WANG, H.; LI, Q.; QIAN, Y.; YAO, W. Salidroside inhibits H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade. *Acta. Biochim. Biophys. Sin.*, v. 40, p. 796-802, 2008.

CARVAJAL, D.; TOVAR, C.; YANG, H.; VU, B.T.; HEIMBROOK, D.C.; VASSILEV, L.T. Activation of p53 by MDM2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors. *Cancer Res.*, v. 65, p. 1918-1924, 2005.

CHEN, R.W.; CHUANG, D.M. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 6039-6042, 1999.

CHEN, L.; WILLIS, S.N.; WEI, A.; SMITH, B.J.; FLETCHER, J.I.; HINDS, M.G.; COLMAN, P.M.; DAY, C.L.; ADAMS, J.M.; HUANG, D.C. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell*, v. 17, p. 393-403, 2005.

CHEN, M.J.; NGUYEN, T.V.; PIKE, C.J.; RUSSO-NEUSTADT, A.A. Norepinephrine induces BDNF and activates the PI-3K and MAPK cascades in embryonic hippocampal neurons. *Cell Signal*, v. 19, p. 114-128, 2007.

CHEN, Y.H.; YEH, C.W.; LO, H.C.; SU, S.L.; HSEU, Y.C.; HSU, L.S. Generation of reactive oxygen species mediates butein-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncol. Rep.*, v. 27, p. 1233-1237, 2012.

CHENG, E.H.; WEI, M.C.; WEILER, S.; FLAVELL, R.A.; MAK, T.W.; LINDSTEN, T.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2, Bcl-XL sequester bh3 domain-only molecules preventing bax- and bak-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell*, v. 8, p. 705-711, 2001.

CHIOU, S.H.; KU, H.H.; TSAI, T.H.; LIN, H.L.; CHEN, L.H.; CHIEN, C.S.; HO, L.L.; LEE, C.H.; CHANG, Y.L. Moclobemide upregulated Bcl-2 expression and induced neural stem cell differentiation into serotonergic neuron via extracellular-regulated kinase pathway. *Br. J. Pharmacol.*, v. 148, p. 587-98, 2006.

CHUNG, Y.C.; KIM, S.R.; JIN, B.K. Paroxetine prevents loss of nigrostriatal dopaminergic neurons by inhibiting brain inflammation and oxidative stress in an experimental model of Parkinson's disease. *J. Immunol.*, v. 185, p. 1230-1237, 2010.

CHUNG, Y.C.; KIM, S.R.; PARK, J.Y.; CHUNG, E.S.; PARK, K.W.; WON, S.Y.; BOK, E.; JIN, M.; PARK, E.S.; YOON, S.H.; KO, H.W.; KIM, Y.S.; JIN, B.K. Fluoxetine prevents MPTP-induced loss of dopaminergic neurons by inhibiting microglial activation. *Neuropharmacology*, v. 60 p. 963-974, 2011.

CHIPUK, J.E.; KUWANA, T.; BOUCHIER-HAYES, L.; DROIN, N.M.; NEWMAYER, D.D.; SCHULER, M.; GREEN, D.R.; Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, v. 303, p. 1010-1014, 2004.

CLAGHORN, J.L.; LESEM, M.D. A double-blind placebo-controlled study of Org3770 in depressed outpatients. *J. Affect. Disord.*, v. 34, p. 165-171, 1995.

COPPELL, A.L.; PEI, Q.; ZETTERSTRÖM, T.S. Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment. *Neuropharmacology*, v. 44, p. 903-910, 2003.

CROOM, K.F.; PERRY, C.M.; PLOSKER, G.L. Mirtazapine: a review of its use in major depression and other psychiatric disorders. *CNS Drugs*, v. 23, p. 427-452, 2009.

D'SA, C.; DUMAN, R.S. Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord.*, v. 4, p. 183-194, 2002.

DATTA, S.R.; KATSOV, A.; HU, L.; PETROS, A.; FESIK, S.W.; YAFFE, M.B.; GREENBERG, M.E. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol. Cell*, v. 6, p. 41-51, 2000.

DONNICI, L.; TIRABOSCHI, E.; TARDITO, D.; MUSAZZI, L.; RACAGNI, G.; POPOLI, M. Time-dependent biphasic modulation of human BDNF by antidepressants in neuroblastoma cells. *BMC Neurosci.*, v. 9, p. 61-67, 2008.

DROZDOV, I.; SVEJDA, B.; GUSTAFSSON, B.I.; MANE, S.; PFRAGNER, R.; KIDD, M.; MODLIN, I.M. Gene network inference and biochemical assessment delineates GPCR pathways and CREB targets in small intestinal neuroendocrine neoplasia. *PLoS One*, v. 6, p. e22457, 2011.

DRZYZGA, Ł.R.; MARCINOWSKA, A.; OBUCHOWICZ, E. Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies. *Brain. Res. Bull.*, v. 79, p. 248-257, 2009.

DUMAN, R.S. Depression: a case of neuronal life and death? *Biol. Psychiatry.*, v. 56, p. 140-145, 2004.

ESPINO, J.; BEJARANO, I.; PAREDES, S.D.; BARRIGA, C.; RODRÍGUEZ, A.B.; PARIENTE, J.A. Protective effect of melatonin against human leukocyte apoptosis induced by intracellular calcium overload: relation with its antioxidant actions. *J. Pineal. Res.*, v. 51, p. 195-206, 2011.

FINKBEINER S. Calcium regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 57, p. 394-401, 2000.

FOURNIER, N.M.; DUMAN, R.S. Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: Implications for the pathophysiology and treatment of depression. *Behav. Brain. Res.*, v. 227, p. 440-449, 2012.

FUKAMACHI, Y.; KARASAKI, Y.; SUGIURA, T.; ITOH, H.; ABE, T.; YAMAMURA, K.; HIGASHI, K. Zinc suppresses apoptosis of u937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of the bcl-2/bax ratio. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 246, p. 364-369, 1998.

GABAIZADEH, R.; STAECKER, H.; LIU, W.; VAN DE WATER, T.R. BDNF protection of auditory neurons from cisplatin involves changes in intracellular levels of both reactive oxygen species and glutathione. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.*, v. 50, p. 71-78, 1997.

GIASSON, B.I.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V.M.; TROJANOWSKI, J.Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 32, p. 1264-1275, 2002.

GOTTLIEB, T.M.; LEAL, J.F.; SEGER, R.; TAYA, Y.; OREN, M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene*, v. 21, p. 1299-1303, 2002.

HAN, J.Y.; JEONG, E.Y.; KIM, Y.S.; ROH, G.S.; KIM, H.J.; KANG, S.S.; CHO, G.J.; CHOI, W.S. C-jun N-terminal kinase regulates the interaction between 14-3-3 and Bad in ethanol-induced cell death. *J. Neurosci. Res.*, v. 86, p. 3221-3229, 2008.

HASHIMOTO, K.; SHIMIZU, E.; IYO, M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res. Rev.*, v. 45, p. 104-114, 2004.

HILLARD, V.H.; PENG, H.; ZHANG, Y.; DAS, K.; MURALI, R.; ETLINGER, J.D.; ZEMAN, R.J. Tempol, a nitroxide antioxidant, improves locomotor and histological outcomes after spinal cord contusion in rats. *J. Neurotrauma*, v. 21, p. 1405-1414, 2004.

HIROI, T.; WEI, H.; HOUGH, C.; LEEDS, P.; CHUANG, D.M. Protracted lithium treatment protects against the ER stress elicited by thapsigargin in rat PC12 cells: roles of intracellular calcium, GRP78 and Bcl-2. *Pharmacogenomics J.*, v. 5, p. 102-111, 2005.

HODES, G.E.; HILL-SMITH, T.E.; LUCKI, I. Fluoxetine treatment induces dose dependent alterations in depression associated behavior and neural plasticity in female mice. *Neurosci. Lett.*, v. 484, p. 12-16, 2010a.

HODES, G.E.; HILL-SMITH, T.E.; SUCKOW, R.F.; COOPER, T.B.; LUCKI, I. Sex-specific effects of chronic fluoxetine treatment on neuroplasticity and pharmacokinetics in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 332, p. 266-273, 2010b.

HSU, S.S.; CHEN, W.C.; JIANN, B.P.; CHEN, J.S.; HUANG, J.K.; CHANG, H.T.; CHENG, H.H.; LO, Y.K.; HO, C.M.; JAN, C.R. Effect of the antidepressant maprotiline on calcium movement and the viability of renal tubular cells. *Arch. Toxicol.*, v. 78, p. 453-459, 2004a.

HSU, S.S.; CHEN, W.C.; LO, Y.K.; CHENG, J.S.; YEH, J.H.; CHENG, H.H.; CHEN, J.S.; CHANG, H.T.; JIANN, B.P.; HUANG, J.K.; JAN, C.R. Effect of the antidepressant maprotiline on Ca²⁺ movement and proliferation in human prostate cancer cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v. 31, p. 444-449, 2004b.

HU, L.; SUN, Y.; HU, J. Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced endothelium by activating the PI3K/Akt signaling pathway and modulating expression of Bcl-2 and Bax. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 628, p. 155-163, 2010.

HUANG, Y.Y.; PENG, C.H.; YANG, Y.P.; WU, C.C.; HSU, W.M.; WANG, H.J.; CHAN, K.H.; CHOU, Y.P.; CHEN, S.J.; CHANG, Y.L. Desipramine activated Bcl-2 expression and inhibited lipopolysaccharide-induced apoptosis in hippocampus-derived adult neural stem cells. *J. Pharmacol. Sci.*, v. 104, p. 61-72, 2007.

IWASHITA, A.; MURAMATSU, Y.; YAMAZAKI, T.; MURAMOTO, M.; KITA, Y.; YAMAZAKI, S.; MIHARA, K.; MORIGUCHI, A.; MATSUOKA, N. Neuroprotective efficacy of the peroxisome proliferator-activated receptor delta-selective agonists in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 320, p. 1087-1096, 2007.

JELLINGER, K.A.; STADELMANN, C. Problems of cell death in neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers. Dis.*, v. 3, p. 31-40, 2001.

JEON, S.H.; KIM, S.H.; KIM, Y.; KIM, Y.S.; LIM, Y.; LEE, Y.H.; SHIN, S.Y. The tricyclic antidepressant imipramine induces autophagic cell death in U-87MG glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 413, p. 311-317, 2011.

JIANG, P.; DU, W.; HEESE, K.; WU, M. The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, v. 26, p. 9071-9082, 2006.

JIANG, L.; SAETRE, P.; RADOMSKA, K.J.; JAZIN, E.; CARLSTRÖM, E. L. QKI-7 regulates expression of interferon-related genes in human astrocyte glioma cells. *PLoS One*, v. 5, p. e13079-e13087, 2010.

KARLNOSKI, R.; WILCOCK, D.; DICKEY, C.; RONAN, V.; GORDON, M.N.; ZHANG, W.; MORGAN, D.; TAGLIALATELA, G. Up-regulation of Bcl-2 in APP transgenic mice is associated with neuroprotection. *Neurobiol. Dis.*, v. 25, p. 179-188, 2007.

KIM, H.J.; CHOI, J.S.; LEE, Y.M.; SHIM, E.Y.; HONG, S.H.; KIM, M.J.; MIN, D.S.; RHIE, D.J.; KIM, M.S.; JO, Y.H.; HAHN, S.J.; YOON, S.H. Fluoxetine inhibits ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in PC12 cells by inhibiting both extracellular Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release from intracellular stores. *Neuropharmacology*, v. 49, p. 265-274, 2005.

KISS, P.J. Theory of active antidepressants: a nonsynaptic approach to the treatment of depression. *Neurochem. Int.*, v. 52 p. 34–39, 2008.

KOSTEN, T.A.; GALLOWAY, M.P.; DUMAN, R.S.; RUSSELL, D.S.; D'SA C. Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, p. 1545-1558, 2008.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.*, v. 87, p. 99-163, 2007.

LAI, J.S.; ZHAO C.; WARSH J.J.; LI P.P. Cytoprotection by lithium and valproate varies between cell types and cellular stresses. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 539, p. 18–26, 2006.

LANG, U.E.; HELLWEG, R.; GALLINAT, J. BDNF serum concentrations in healthy volunteers are association with depression-related personality traits. *Neuropsychopharmacology*, v. 29, p. 795-798, 2004.

LEE, B.H.; MYINT, A.M.; KIM, Y.K. Psychotropic drugs on in vitro brain-derived neurotrophic factor production in whole blood cell cultures from healthy subjects. *J. Clin. Psychopharmacol.*, v. 30, p. 623-627, 2010.

LEE, J.E.; KANG, J.S.; SHIN, I.C.; LEE, S.J.; HYUN, D.H.; LEE, K.S.; KOH, H.C. Fluazinam-induced apoptosis of SH-SY5Y cells is mediated by p53 and Bcl-2 family proteins. *Neurotoxicology*, v. 32, p. 702-710, 2011a.

LEE, C.; PARK, G.H.; KIM, C.Y.; JANG, J.H. [6]-Gingerol attenuates β -amyloid-induced oxidative cell death via fortifying cellular antioxidant defense system. *Food Chem. Toxicol.*, v. 49, p. 1261-1269, 2011b.

LESCH, K.P. Serotonergic gene expression and depression: implications for developing novel antidepressants. *J. Affect. Disord.*, v. 62, p. 57-76, 2001.

LEU, J.I.; DUMONT, P.; HAFEY, M.; MURPHY, M.E.; GEORGE, D.L. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol.*, v. 6, p. 443-50, 2004.

LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHardjo, I.; SRINIVASULA, S.M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E.S.; WANG, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. v. 91, p. 479-489, 1997.

LI, X.M.; CHLAN-FOURNEY, J.; JUORIO, A.V.; BENNETT, V.L.; SHRIKHANDE, S.; BOWEN, R.C. Antidepressants upregulate messenger RNA levels of the neuroprotective enzyme superoxide dismutase (SOD1). *J. Psychiatry Neurosci.*, v. 25, p. 43-47, 2000 .

MACHADO, D.G.; BETTIO, L.E.; CUNHA, M.P.; CAPRA, J.C.; DALMARCO, J.B.; PIZZOLATTI, M.G.; RODRIGUES, A.L. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 33, p. 642-650, 2009.

MAES, M.; YIRMYIA, R.; NORABERG, J.; BRENE, S.; HIBBELN, J.; PERINI, G.; KUBERA, M.; BOB, P.; LERER, B.; MAJ, M. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab. Brain Dis.*, v. 24, p. 27-53, 2009.

MALBERG, J.E.; EISCH, A.J.; NESTLER, E.J.; DUMAN, R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.*, v. 20, p. 9104-9110, 2000.

MANJI, H.K.; DREVETS, W.P.; CHARMEY, D.S. The cellular neurobiology of depression. *Nature Med.*, v. 7, p. 541-547, 2001a.

MANJI, H.K.; MOORE, G.J.; CHEN, G. Bipolar disorder: Leads from the molecular and cellular mechanisms of action of mood stabilizers. *Br. J. Psychiatry*, v. 178, p. S107-S119, 2001b.

MANJI, H.K.; QUIROZ, J.A.; SPORN, J.; PAYNE, J.L.; DENICOFF, K.; GRAY, N.A.; ZARATE, J.R.; CHARNEY, D.S. Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. *Biol. Psychiatry*, v. 53, p. 707-74, 2003.

MANTOVANI, M.; PÉRTILE, R.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.; RODRIGUES, A.L. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci. Lett.*, v. 343, p. 1-4, 2003.

MAO, Q.Q.; IP, S.P.; KO, K.M.; TSAI, S.H.; ZHAO, M.; CHE, C.T. Peony glycosides protect against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Cell. Mol. Neurobiol.*, v. 29, p. 643-647, 2009.

MCKERNAN, D.P.; DINAN, T.G.; CRYAN, J.F. "Killing the Blues": a role for cellular suicide (apoptosis) in depression and the antidepressant response? *Prog. Neurobiol.*, v. 88, p. 246-263, 2009.

MERCIER, G.; LENNON, A.M.; RENOUF, B.; DESSOUROUX, A.; RAMAUGE, M.; COURTIN, F.; PIERRE, M. MAP kinase activation by fluoxetine and its relation to gene expression in cultured rat astrocytes. *J. Mol. Neurosci.*, v. 24, p. 207-216, 2004.

MERRY, D.E.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* v. 20, p. 245-267, 1997.

MIYASHITA, T.; REED, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, v. 80, p. 293-299, 1995.

MOLENDIJK, M.L.; BUS, B.A.; SPINHOVEN, P.; PENNINX, B.W.; KENIS, G.; PRICKAERTS, J.; VOSHAAR, R.C.; ELZINGA, B.M. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in major depressive disorder: state-trait issues, clinical features and pharmacological treatment. *Mol. Psychiatry*, v. 16, p. 1088-1095, 2011.

MURRAY, F.; HUTSON, P.; H. Hippocampal Bcl-2 expression is selectively increased following chronic but not acute treatment with antidepressants, 5-HT(1A) or 5-HT(2C/2B) receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 569, p. 41-47, 2007.

NATH, R.; RASER, K.J.; HAJIMOHAMMADREZA, I.; WANG, K.K. Thapsigargin induces apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells and cerebrocortical cultures. *Biochem Mol Biol Int.*, v. 43, p. 197-205, 1997.

NECHUSHTAN, A.; SMITH, C.L.; LAMENSDORF, I.; YOON, S.H.; YOULE, R.J. Bax and bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J. Cell Biol.*, v. 153, p. 1265-1276, 2001.

NIBUYA, M.; MORINOBU, S.; DUMAN, R.S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci.*, v. 15, p. 7539-7547, 1995.

PARK, S.E.; KIM, S.; SAPKOTA, K.; KIM, S.J. Neuroprotective effect of *Rosmarinus officinalis* extract on human dopaminergic cell line, SH-SY5Y. *Cell. Mol. Neurobiol.*, v. 30, p. 759-767, 2010.

PAN, C.C.; CHENG, H.H.; HUANG, C.J.; LU, Y.C.; CHEN, I.S.; LIU, S.I.; HSU, S.S.; CHANG, H.T.; HUANG, J.K.; CHEN, J.S.; JAN, C.R. The antidepressant mirtazapine-induced cytosolic Ca²⁺ elevation and cytotoxicity in human osteosarcoma cells. *Chin. J. Physiol.*, v. 49, p. 290-297, 2006.

PAPAKOSTAS, G.I.; HOMBERGER, C.H.; FAVA, M. A meta-analysis of clinical trials comparing mirtazapine with selective serotonin reuptake inhibitors for the treatment of major depressive disorder. *J. Psychopharmacol.*, v. 22, p. 843-848, 2008.

PATAPOUTIAN, A.; REICHARDT, L.F. Trk receptors: Mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 11, p. 272-280, 2001.

PECERE, T.; SARINELLA, F.; SALATA, C.; GATTO, B.; BET, A.; DALLA VECCHIA, F.; DIASPRO, A.; CARLI, M.; PALUMBO, M.; PALÙ, G. Involvement of p53 in specific anti-neuroectodermal tumor activity of aloe-emodin. *Int. J. Cancer*, v. 106, p. 836-847, 2003.

PEÑA, S.; BACCICHET, E.; URBINA, M.; CARREIRA, I.; LIMA, L. Effect of mirtazapine treatment on serotonin transporter in blood peripheral lymphocytes of major depression patients. *Int. Immunopharmacol.*, v. 5, p. 1069-1076, 2005.

PENG, C.; CHIOU, S.; CHEN, S.; CHOU, Y.; KU, H.; CHENG, C.; YEN, C.; TSAI, T.; CHANG, Y.; KAO, C. Neuroprotection by imipramine against lipopolysaccharide-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cells mediated by activation of BDNF and the MAPK pathway. *Eur. Neuropsychopharmacology*, v. 18, p.128–140, 2008.

PETERSEN, L.; HASVOLD, G.; LUKAS, J.; BARTEK, J.; SYLJUÅSEN, R.G. p53-dependent G(1) arrest in 1st or 2nd cell cycle may protect human cancer cells from cell death after treatment with ionizing radiation and Chk1 inhibitors. *Cell. Prolif.*, v. 43, p. 365-371, 2010.

POLZIEN, L.; BALJULS, A.; ROTH, H.M.; KUPER, J.; BENZ, R.; SCHWEIMER, K.; HEKMAN, M.; RAPP, U.R. Pore-forming activity of BAD is regulated by specific phosphorylation and structural transitions of the C-terminal part. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1810, p. 162-169, 2011.

POO, M.M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 2, p. 24–32, 2001.

PUTNEY, J.W. JR.; BIRD, G.S. The signal for capacitative calcium entry. *Cell*, v. 75, p. 199-201, 1993.

RACAGNI, G.; POPOLI, M. The pharmacological properties of antidepressants. *Int. Clin. Psychopharmacol.*, v. 25, p. 117-131, 2010.

REGULSKA, M.; POMIERNY, B.; BASTA-KAIM, A.; STAREK, A.; FILIP, M.; LASOŃ, W.; BUDZISZEWSKA, B. Effects of ethylene glycol ethers on cell viability in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Pharmacol. Rep.*, v. 62, p. 1243-1249, 2010.

RÉUS, G.Z.; STRINGARI, R.B.; DE SOUZA, B.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; HALLAK, J.E.; ZUARDI, A.W.; CRIPPA, J.A.; QUEVEDO, J. Harmine and imipramine promote antioxidant activities in prefrontal cortex and hippocampus. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, v. 3, p. 325-331, 2010.

RICCIO, A.; AHN, S.; DAVENPORT, C.M.; BLENDY, J.A.; GINTY, D.D. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF dependent survival of sympathetic neurons. *Science*, v. 286, p. 2358-2361, 1999.

ROBSON, S.C.; WARD, L.; BROWN, H.; TURNER, H.; HUNTER, E.; PELENGARIS, S.; KHAN, M. Deciphering c-MYC-regulated genes in two distinct tissues. *BMC Genomics*, v. 12, p. 476-496, 2011.

ROGÓŻ, Z., SKUZA, G., LEGTKO, B. Repeated treatment with mirtazapine induces brain-derived neurotrophic factor gene expression in rats. *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 56, p. 661-671, 2005.

ROJAS, P.; SERRANO-GARCÍA, N.; MEDINA-CAMPOS, O.N.; PEDRAZA CHAVERRI, J.; OGREN, S.O.; ROJAS, C. Antidepressant-like effect of a *Ginkgo biloba* extract (EGb761) in the mouse forced swimming test: role of oxidative stress. *Neurochem. Int.*, v. 59, p. 628-636, 2011.

SALZMAN, S.K.; KELLY, G.; CHAVIN, J.; WANG, L.; PUNIAK, M.A.; AGRESTA, C.A.; AZIM, S. Characterization of mianserin neuroprotection in experimental spinal trauma: dose/route response and late treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 269, p. 322-328, 1994.

SANACORA, G.; ZARATE, C.A.; KRYSTAL, J.H.; MANJI, H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, v. 7, p. 426-437, 2008.

SCHMIDT, H.D.; DUMAN, R.S. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. *Neuropsychopharmacology*, v. 35, p. 2378-2391, 2010.

SHAW, P.; BOVEY, R.; TARDY, S.; SAHLI, R.; SORDAT, B.; COSTA, J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 89, p. 4495-4499, 1992.

SHI, C.; ZHAO, L.; ZHU, B.; LI, Q.; YEW, D.T.; YAO, Z.; XU, J. Dosage effects of EGb761 on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Chem. Biol. Interact.*, v. 180, p. 389-397, 2009a.

SHI, C.; ZHAO, L.; ZHU, B.; LI, Q.; YEW, D.T.; YAO, Z.; XU, J. Protective effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against beta-amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Chem Biol Interact.*, v. 181, p. 115-123, 2009b.

SHIRAYAMA, Y.; CHEN, A.C.; NAKAGAWA, S.; RUSSELL, D.S.; DUMAN, R.S. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J. Neurosci.*, v. 22, p. 3251-3261, 2002.

SIUCIAK, J.A.; LEWIS, D.R.; WIEGAND, S.J.; LINDSAY, R.M. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 56, p. 131-137, 1997.

SLATTERY, D.A.; HUDSON, A.L.; NUTT, D.J. Invited review: the evolution of antidepressant mechanisms. *Fundam. Clin. Pharmacol.* v. 18, p. 1-21, 2004.

ŠTROS, M.; OZAKI, T.; BACIKOVA, A.; KAGEYAMA, H.; NAKAGAWARA, A. HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 7157-7164. 2002.

TANIS, K.Q.; NEWTON, S.S.; DUMAN R.S. Targeting neurotrophic/growth factor expression and signaling for antidepressant drug development. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, v. 6, p. 151-160, 2007.

TEE, M.K.; VIGNE, J.L.; YU, J.; TAYLOR, R.N. Natural and recombinant human glycodelin activate a proapoptotic gene cascade in monocyte cells. *J. Leukoc. Biol.*, v. 83, p. 843-852, 2008.

TEPPER, S.J. Serotonin syndrome: SSRIS, SNRIS, triptans, and current clinical practice. *Headache*, In press, 2012

THASE, M.E.; NIERENBERG, A.A.; VRIJLAND, P.; VAN OERS, H.J.; SCHUTTE, A.J.; SIMMONS, J.H. Remission with mirtazapine and selective serotonin reuptake inhibitors: a meta-analysis of individual patient data from 15 controlled trials of acute phase treatment of major depression. *Int. Clin. Psychopharmacol.*, v. 25 p. 189-198, 2010.

TOK, A.; SENER, E.; ALBAYRAK, A.; CETIN, N.; POLAT, B.; SULEYMAN, B.; AKCAY, F.; SULEYMAN, H. Effect of mirtazapine on oxidative stress created in rat kidneys by ischemia-reperfusion. *Ren. Fail.*, v. 34, p. 103-110, 2012.

VAN OEKELLEN, D.; LUYTEN, W.H.; LEYSEN, J.E. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties. *Life. Sci.*, v. 72, p. 2429-49, 2003.

WATANABE, Y.; GOULD, E.; DANIELS, D.C.; CAMERON, H.; MCEWEN, B.S. Tianeptine attenuates stress-induced morphological changes in the hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 222, p. 157-162, 1992.

WILLIS, S.N.; ADAMS, J.M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.*, v. 17, p. 617-625, 2005.

WORDINGER, R.J.; LAMBERT, W.; AGARWAL, R.; TALATI, M.; CLARK, A.F. Human trabecular meshwork cells secrete neurotrophins and express neurotrophin receptors (Trk). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 41, p. 3833-3841, 2000.

WONG, M.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 2, p. 343-351, 2001.

WONG, M.; LICINIO, J. From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, v. 3, p. 136-151, 2004.

XIA, Y.; WANG, C.Z.; LIU, J.; ANASTASIO, N.C.; JOHNSON, K.M. Brain-derived neurotrophic factor prevents phencyclidine-induced apoptosis in developing brain by parallel activation of both the ERK and PI-3K/Akt pathways. *Neuropharmacology*, v. 58, p. 330-336, 2010.

XIONG, Y.; DING, H.; XU, M.; GAO, J. Protective effects of asiatic acid on rotenone- or H₂O₂-induced injury in Sh-Sy5y cells. *Neurochem. Res.*, v. 34, p. 746-754, 2009.

XU, H.; STEVEN, R.J.; LI, X.M. Dose-related effects of chronic antidepressants on neuroprotective proteins BDNF, Bcl-2 and Cu/Zn-SOD in rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, v. 28, p. 53-62, 2003.

XU, G.; GONG, Z.; YU, W.; GAO, L.; HE, S.; QIAN, Z. Increased expression ratio of Bcl-2/Bax is associated with crocin-mediated apoptosis in bovine aortic endothelial cells. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, v. 100, p. 31-35, 2007.

YAMAGATA, T.; SATOH, T.; ISHIKAWA, Y.; NAKATANI, A.; YAMADA, M.; IKEUCHI, T.; HATANAKA, H. Brain-derived neurotrophic factor prevents superoxide anion-induced death of PC12h cells stably expressing TrkB receptor via modulation of reactive oxygen species. *Neurosci. Res.*, v. 35, p. 9-17, 1999.

YANG, E.; ZHA, J.; JOCKEL, J.; BOISE, L.H.; THOMPSON, C.B.; KORSMEYER, S.J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, v. 80, p. 285-291, 1995.

YANG, Z.H.; SUN, K.; SUO, W.H.; YAO, L.Y.; FU, Q.; CUI, Y.Y.; FU, G.H.; CHEN, H.Z.; LU, Y. N-stearoyltyrosine protects primary neurons from A β -induced apoptosis through modulating mitogen-activated protein kinase activity. *Neuroscience*, v. 169, p. 1840-1847, 2010.

YOUNG, L.T. Neuroprotective effects of antidepressant and mood stabilizing drugs. *J. Psychiatry Neurosci.*, v. 27, p. 8-9, 2002.

ZAFIR, A.; ARA, A.; BANU, N. *In vivo* antioxidant status: a putative target of antidepressant action. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 33, p. 220-228, 2009.

ZHANG, Q.; MA, Y.; CHENG, Y.F.; LI, W.J.; ZHANG, Z.; CHEN, S.Y. Involvement of reactive oxygen species in 2-methoxyestradiol-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. *Cancer Lett.*, v. 313, p. 201-210, 2011.

ZHOU, L.; CHANG, D.C. Dynamics and structure of the Bax-Bak complex responsible for releasing mitochondrial proteins during apoptosis. *J. Cell Sci.*, v. 121, p. 2186-2196, 2008.

ZIMMERMANN, K.A.; LOUCKS, F.A.; SCHROEDER, E.K.; BOUCHARD, R.J.; TYLER, K.L.; LINSEMAN, D.A. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: A molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. *J. Biol. Chem.*, v. 282, p. 29296-29304, 2007.