

## PESQUISA CLÍNICA

### Remifentanil reduz a toxicidade do glutamato em neurônios do bulbo olfatório de rato em cultura

Muhammet Emin Naldan<sup>a\*</sup>, Ali Taghizadehghalehjoughi<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Erzurum Regional Training and Research Hospital, Department of Anesthesiology and Reanimation, Erzurum, Turkey

<sup>b</sup> Atatürk University, Faculty of Veterinary Science, Department of Pharmacology and Toxicology, Erzurum, Turkey

#### PALAVRAS-CHAVE:

Remifentanil;  
Neurônio do bulbo olfatório;  
Glutamato;  
Neurotoxicidade.

#### RESUMO:

**Justificativa:** Os opioides são amplamente usados como analgésicos em ambiente cirúrgico. O remifentanil é um opioide de ação ultracurta com afinidade seletiva para o receptor mu ( $\mu$ ) e também exibe efeitos agonistas GABA. O objetivo deste estudo foi estudar o efeito neurotóxico ou neuroprotetor de diferentes doses de remifentanil na toxicidade induzida por glutamato em cultura de células de neurônios olfatórios.

**Materiais e métodos:** Os neurônios olfatórios foram obtidos de filhotes de ratos Sprague Dawley recém-nascidos. Glutamato  $10^{-5}$  mM foi adicionado a todas as placas de cultura, exceto para o grupo de controle negativo. Remifentanil foi adicionado em três doses diferentes por 24 horas, após o que a avaliação foi realizada usando brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), capacidade antioxidante total (TAC), status oxidante total (TOS) e anexina V.

**Resultados:** Os valores de viabilidade mais altos e mais baixos foram obtidos com as doses baixa e alta de remifentanil em aproximadamente 91% e 75%, respectivamente. TAC e TOS foram correlacionados com os resultados do MTT. TAC, TOS e MTT mais próximos dos valores do grupo sham no grupo remifentanil 0,02 mM.

**Conclusões:** Nossos resultados sugerem que o remifentanil tem o potencial de reduzir a toxicidade do glutamato e aumentar a viabilidade celular em cultura de neurônios do bulbo olfatório de rato.

## Introdução

Os neurônios olfatórios regulam funções biológicas complexas e coordenam comportamentos motores e sensoriais complexos. Esses neurônios funcionam amplamente por meio de glutamato e GABA <sup>(1,2)</sup>. Os opioides são comumente usados para o tratamento de qualquer dor aguda ou crônica no período perioperatório <sup>(3)</sup>. O remifentanil é amplamente utilizado como analgésico, inclusive em crianças pequenas e parturientes /

**Autor correspondente:** Muhammet Emin Naldan  
Email: muhammetnaldan@gmail.com

gestantes expostas à anestesia cirúrgica <sup>(4)</sup>. O remifentanil é um opioide de ação ultracurta com afinidade seletiva para o receptor  $\mu$ , além de exibir efeitos agonistas do GABA <sup>(5)</sup>. Estudos recentes demonstraram que o remifentanil pode ser empregado em vários ambientes, desde a anestesia até a proteção de órgãos (rins e coração) <sup>(6)</sup>. No entanto, há divergências sobre se o remifentanil exibe efeitos neuroprotetores ou neurotóxicos.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central <sup>(7)</sup>. Níveis elevados de glutamato extracelular induzem dano neuronal <sup>(8)</sup>. Na hipóxia / anóxia cerebral e na maioria das doenças do sistema nervoso, a função do transportador de glutamato é prejudicada e os níveis de glutamato extracelular aumentam e resultam em dano neuronal irreversível <sup>(9)</sup>. Além disso, ao se ligar aos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e AMPA por mais tempo do que os níveis fisiológicos, o glutamato causa influxo de  $Ca^{++}$  e  $Na^{+}$  <sup>(10)</sup>. Zhao e Joo demonstraram que remifentanil induziu aumentos agudos dependentes da concentração e do subtipo do receptor nas respostas de NMDA <sup>(5)</sup>. Também existem fortes evidências de que a toxicidade do glutamato está significativamente associada aos receptores NMDA <sup>(11)</sup>. Esses receptores também estão significativamente envolvidos nos processos de sensibilização central associados à hiperalgesia <sup>(12)</sup>.

O objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes doses de remifentanil para determinar sua aplicabilidade em um modelo de toxicidade do glutamato.

## Materiais e metodologia

### Produtos químicos e reagentes

Remifentanil (Ultiva) foi adquirido em (Genval, Bélgica), enquanto meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Soro fetal de bezerro (FCS), meio Neurobasal (NBM), 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2, Brometo de 5-difeniltetrazólio (MTT), solução tampão de fosfato (PBS), solução antibiótica antimetabólica (100x), L-glutamina e tripsina-EDTA e dimetilsulfóxido (Sigma, EUA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A capacidade antioxidante total (TAC) e o status oxidante total (TOS) foram obtidos em Rel Assay Diagnostics (Turquia), e a anexina V foi adquirida em bioVision (San Francisco, EUA).

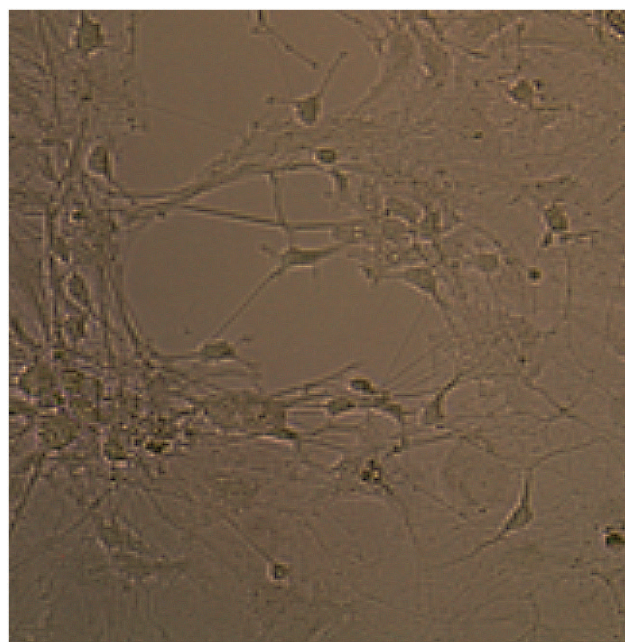
## Estudos in vitro

### Consentimento ético

Este estudo foi conduzido no Centro de Pesquisa Experimental Médica da Universidade Ataturk (Erzurum, Turquia). O comitê de ética da Universidade Ataturk aprovou o protocolo do estudo (36643897-000-E.1800108979) de acordo com as diretrizes ARRIVE 2.0.

### Culturas de células

Resumidamente, o isolamento e centrifugação das células neuronais foram feitos a 1200 rpm por 5 minutos. As células colapsadas foram suspensas com meio fresco



**Figura 1** Linha celular coletada  $\times 10$ : células do neurônio olfatório.

(meio Neurobasal, FBS 10%, B27 2% e antibiótico 0,01%) e, em seguida, as células foram semeadas em placas de 24 poços (Corning, EUA). A placa foi armazenada em incubadora (5%  $CO_2$ ; 37°C) <sup>(13, 14)</sup> (Figura 1).

### A toxicidade do Glutamato

Foram observados ramos adequados formados nas células no dia 10. Meio e glutamato  $10^{-5}$  mM para indução de toxicidade foram então adicionados a cada poço, exceto para os controles negativos (grupo sham). Após 10 minutos, as concentrações finais de remifentanil (2, 0,2 e 0,02 mM de remifentanil) foram adicionadas a cada poço, exceto para os grupos sham, e incubadas por 24 horas (5%  $CO_2$ ; 37°C). Além disso, 150  $\mu$ L de NBM foram adicionados apenas como um controle negativo a cada poço, enquanto os controles positivos continham apenas 10-5 mM de glutamato, e deixados por 24 h <sup>(15)</sup>.

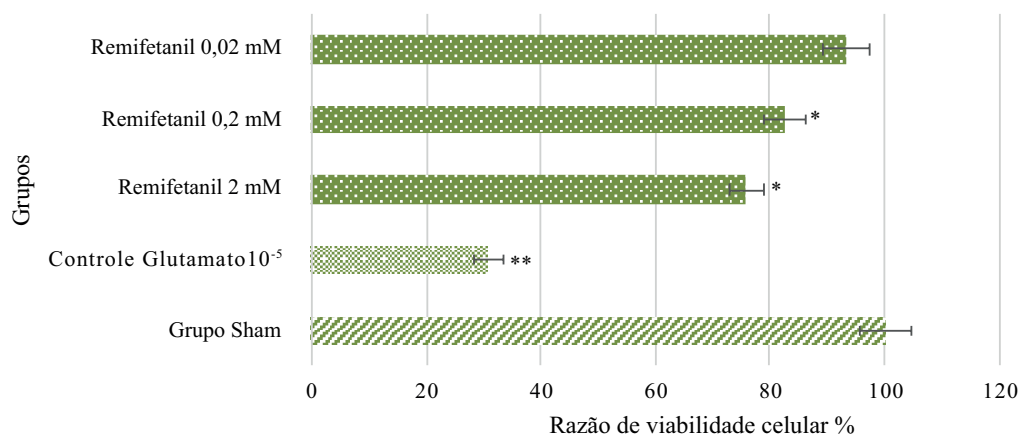
### Ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

O ensaio de MTT foi de acordo com o protocolo do kit comercial. Resumidamente, o reagente MTT (10  $\mu$ L) foi adicionado a cada poço e incubado (5%  $CO_2$ ; 37°C) por 4 horas. O meio foi removido e, em seguida, 100  $\mu$ L de sulfóxido de dimetil foram adicionados a cada poço. A densidade óptica foi avaliada em 570 nm usando um leitor de espectrofotômetro de microplaca Multiskan™ GO (Thermo Scientific, Canadá, EUA). A viabilidade celular (%) foi calculada <sup>(16)</sup> usando a fórmula:

Viabilidade % razão =

$$\frac{\text{Valor de absorção da amostra}}{\text{Valor de absorção do grupo controle}} \times 100 = \frac{\text{Valor de absorção da amostra}}{\text{Valor de absorção do grupo controle}} \times 100$$

## Teste do Ensaio MTT



**Figura 2** Resultados do ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) para a linha celular olfatória após tratamento com remifentanil de 24 h.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  em comparação com o grupo sham.

### Status oxidante total (TOS)

O ensaio TOS foi feito de acordo com o protocolo do kit de fabricação comercial. Resumidamente, 500  $\mu$ l de Solução reativa 1 foram adicionados aos poços e o valor de absorção inicial a 530 nm. Então, 25  $\mu$ l de Solução reativa 2 foram adicionados ao mesmo poço, e a segunda absorção foi lida a 530nm. Os níveis de TOS foram determinados como mmol Trolox equiv / mmol-1.

A avaliação foi feita de acordo com a fórmula <sup>(17)</sup>

$$\text{TOS} = \Delta \text{exemplo} / \Delta \text{ST2} \times 20$$

$\Delta$  ST2 ( $\Delta$  padrão 2 = segunda leitura de ST2 - primeira leitura de ST2),  $\Delta$  Amostra ( $\Delta$  Amostra = segunda leitura de amostra - primeira leitura de amostra)

### Capacidade antioxidante total (TAC)

O ensaio TAC foi feito de acordo com o protocolo do kit de fabricação comercial. Resumidamente, 500  $\mu$ l de solução Reativa 1 foram adicionados aos poços e a primeira absorvância foi lida a 660 nm. A seguir, 75  $\mu$ l de Reactivo 2 foram adicionados aos mesmos poços e o segundo valor de absorvância foi lido a 660 nm. Os níveis de TAC foram expressos em mmol equiv / mmol-1.

A avaliação foi feita de acordo com a fórmula <sup>(18)</sup>;

$\text{TAC} = (\Delta \text{ST1} - \Delta \text{exemplo}) / (\Delta \text{ST1} - \Delta \text{ST2})$ ;  $\Delta \text{ST1}$  ( $\Delta$  padrão 1 = segunda leitura de ST1 - primeira leitura de ST1),  $\Delta \text{ST2}$  ( $\Delta$  padrão 2 = segunda leitura de ST2 - primeira leitura de ST2),  $\Delta$  Amostra ( $\Delta$  Amostra = segunda leitura de amostra - primeira leitura de amostra).

### Ensaio de coloração com anexina V-FITC (isotiocianato de fluoresceína) e iodeto de propídio (PI)

O experimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, (1 x 10<sup>5</sup>) células lavadas com PBS. Adicionou-se 500  $\mu$ L de tampão de ligação e depois adicionou-se anexina v-FITC e PI durante 10 minutos à

temperatura ambiente. As amostras coradas foram então analisadas em citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter, EUA) <sup>(19)</sup>.

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio de Análise de Variância One-Way (ANOVA) e teste de Tukey HSD no software SPSS 21.0.

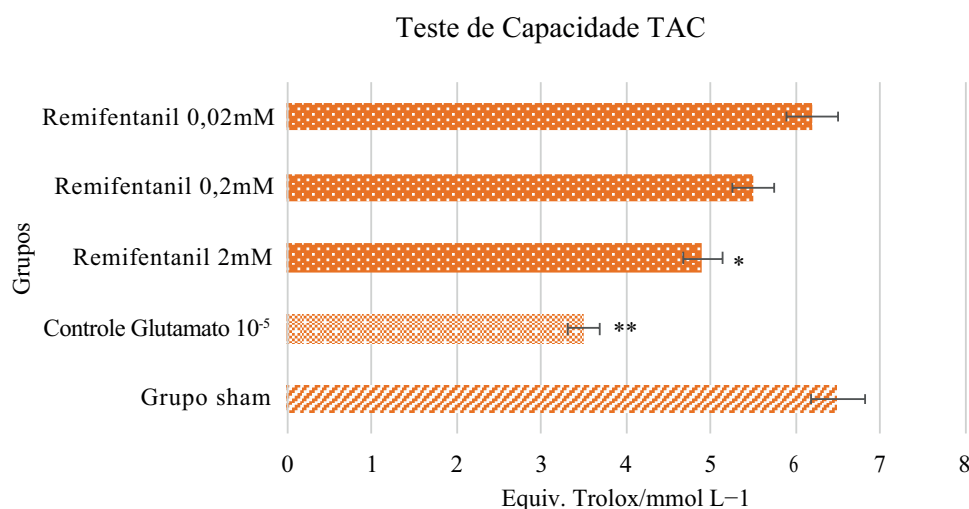
## Resultados

### Ensaio MTT

A cultura olfatória foi preparada primeiro. Após 24 horas de exposição ao remifentanil (nas doses de 2, 0,2 ou 0,02 mM de remifentanil), o experimento foi concluído com a adição de solução de MTT. Os dados foram submetidos à análise e os resultados são mostrados na Figura 2. A maior razão de viabilidade foi observada com a menor dose de remifentanil. Além disso, o grupo de controle positivo (recebendo apenas 10<sup>-5</sup> mM de glutamato) apresentou uma razão de viabilidade próxima a 30%. Remifentanil a 2 e 0,2 mM exibiu taxas de viabilidade de 75% e 82%, respectivamente. Além disso, remifentanil 0,02 mM exibiu a maior razão de viabilidade celular, em até 92% ( $p < 0,05$ ) (Figura 2).

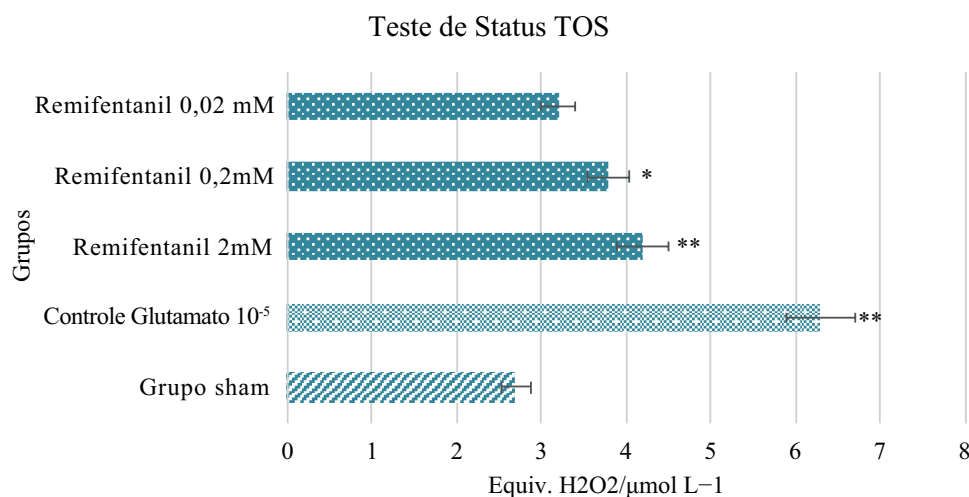
### Ensaio de TAC

A capacidade antioxidante total do neurônio (TAC) é mostrada na Figura 3. O grupo sham exibiu a maior capacidade antioxidante entre todos os grupos de estudo. Não houve diferença significativa nos grupos de remifentanil 0,02 e 0,2 mM em comparação com o grupo controle ( $p > 0,05$ ). Diferença estatística foi observada apenas no grupo de remifentanil 2 mM ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo sham. A menor capacidade antioxidante foi medida no grupo de controle de glutamato (Figura 3).



**Figura 3** Resultados do ensaio de capacidade antioxidante total para linhas de células olfativas após tratamento com remifentanil de 24 horas.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  em comparação com o grupo sham.



**Figura 4** Resultados do ensaio de status oxidante total para linhas celulares de neurônios olfatórios após tratamento com remifentanil de 24 horas.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  em comparação com o grupo sham.

### Ensaio de TOS

O nível de oxidante total do neurônio é mostrado na Figura 4. O nível de oxidante mais baixo e mais alto foi observado no grupo sham e no grupo controle de glutamato, respectivamente. Apenas remifentanil a 0,02 mM de remifentanil não exibiu diferença significativa em comparação ao grupo sham ( $p < 0,05$ ) (Figura 4).

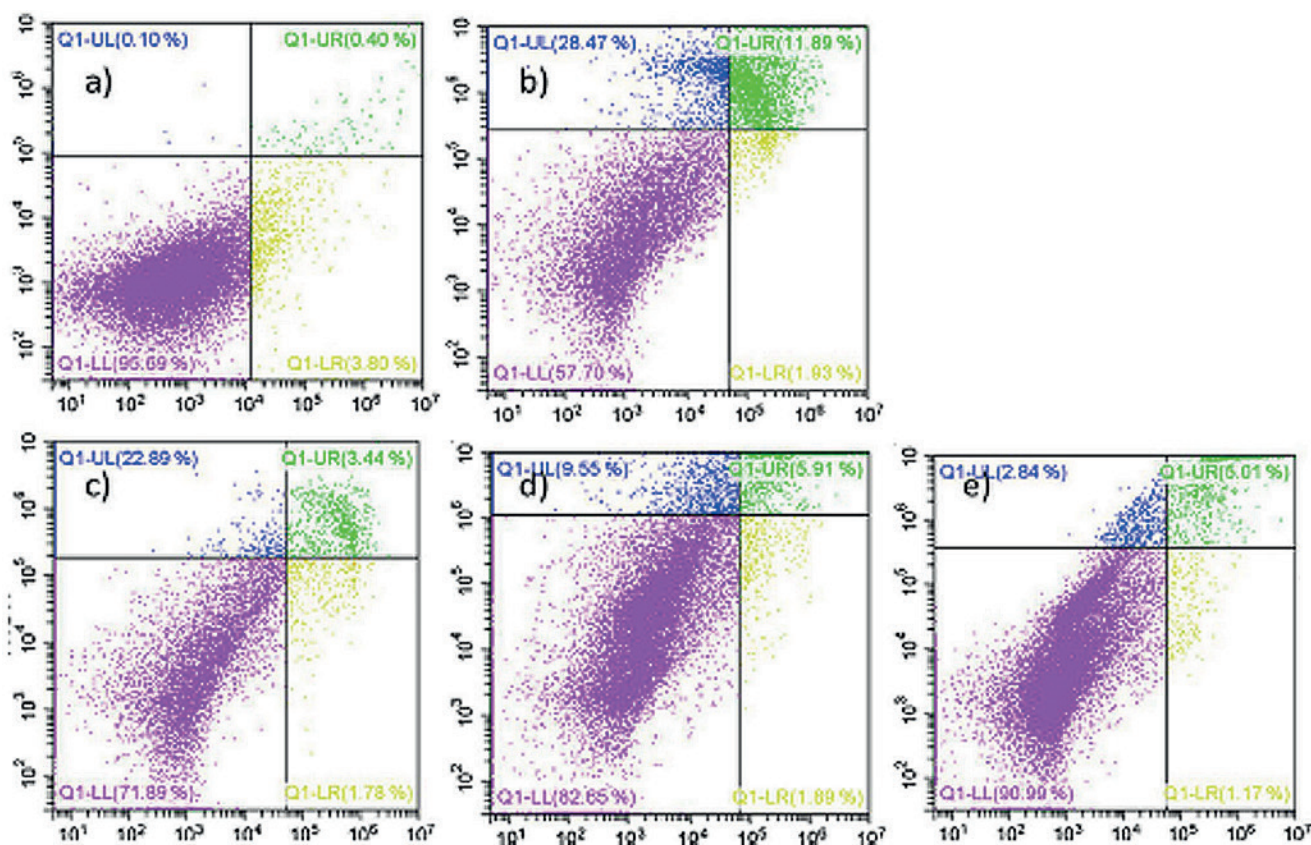
### Citometria de fluxo

Após 24 horas, as culturas de neurônios olfatórios foram coradas, e os resultados são mostrados na Figura 5. O grupo sham exibiu viabilidade de 95,69%, com taxas de apoptose precoce e tardia de 0,1% e 0,4%, respectivamente. O grupo controle com glutamato (grupo controle positivo) apresentou

viabilidade de 57,7%, com taxas de apoptose precoce e tardia de 28,5% e 11,9%. Nossos dados mostram uma correlação com os resultados do MTT. De acordo com nossos achados, o nível de apoptose inicial foi maior do que na apoptose tardia em todos os tratamentos, exceto para remifentanil 2 mM. O tratamento com remifentanil 2 mM produziu menor viabilidade, enquanto remifentanil 0,02 mM resultou em uma razão de viabilidade mais alta. Os níveis de apoptose tardia e necrose foram maiores no grupo de toxicidade por glutamato do que nos outros grupos de estudo (Figura 5).

### Discussão

Os neurônios têm diferentes tipos e funções no sistema olfatório. Os neurônios olfatórios regulam padrões motores



**Figura 5.** Resultados da citometria de fluxo para neurônios olfatórios corados com isotiocianato de fluoresceína (anexina V-FITC) e iodeto de propídio (PI) após um tratamento de 24 horas com remifentanil. a) grupo sham; b) controle de glutamato 10-5 mM; c) remifentanil 2 mM; d) remifentanil 0,2 mM; e) remifentanil 0,02 mM.

complexos e estão envolvidos em funções sensoriais. Esses neurônios operam por meio de neurotransmissores glutamato e GABA. O remifentanil é um agonista do receptor mu e regula as informações relacionadas à dor. Os agonistas do receptor Mu aumentam a hiperalgesia pós-operatória ao afetar os receptores NMDA mediados pelo glutamato (20). Além disso, o remifentanil é amplamente utilizado como analgésico em complicações cerebrais. O estudo atual fornece fortes evidências de que o cloridrato de remifentanil tem um efeito protetor sobre a toxicidade do glutamato.

Há fortes evidências de que os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) desempenham um papel importante nos processos de sensibilização central associados à hiperalgesia (10). Estudos recentes em animais (8,11) e humanos (12-16) confirmaram essa hipótese, fornecendo evidências de que o bloqueio dos receptores NMDA pode prevenir a hiperalgesia induzida por opioides. Estudos de Guntz et al. mostraram que o remifentanil não tem efeito direto sobre os receptores NMDA, mas aumenta a corrente NMDA mediada pela ativação do receptor opioide  $\mu$ , provavelmente por meio de uma via intracelular. Esses estudos envolveram análise eletrofisiológica e de corrente do receptor NMDA. Esse achado é particularmente significativo porque a corrente elevada do receptor NMDA induziu a toxicidade dos neurônios ao reduzir o limiar do potencial de ação (22).

Além disso, a ligação do remifentanil ao receptor opioide  $\mu$  aumenta indiretamente a toxicidade do glutamato, levando à degeneração neuronal e epilepsia em pacientes. Zhao M e Joo DT mostraram que as concentrações de remifentanil de 4, 6 e 8 nM aumentaram a corrente NMDA na cultura de gânglio da raiz dorsal de rato saudável em até 37%. No entanto, existem algumas diferenças entre o estudo de Zhao e Joo e a presente pesquisa. Por exemplo, esses autores não induziram a toxicidade do glutamato nesses neurônios, e nossa concentração de dose também foi maior (5). No presente estudo, o remifentanil reduziu a toxicidade do glutamato causada principalmente pelos receptores NMDA.

Modelos de dor neuropática podem ser induzidos pela ativação do receptor NMDA via espécies reativas de oxigênio que foram administradas na medula espinhal (22). No presente estudo, investigamos a capacidade antioxidante e oxidante total dos neurônios das células após um tempo de exposição de 24 horas. A observação mostrou que o remifentanil age de forma diferente em altas e baixas doses. Em altas doses, encontramos uma diminuição significativa na capacidade antioxidante revertida para o estado oxidante (o estado oxidante estava elevado).

Ji-Young Yoon et al mostraram que remifentanil previne a apoptose induzida por peróxido de hidrogênio em células cos 7 (23). Esse achado é compatível com os dados do nosso estudo. Os achados do presente estudo mostram que uma

dose menor de remifentanil reduziu efetivamente os níveis de TOS e as taxas de apoptose tardia. Especialmente remifentanil 0,02 mM mostrou efeito neuroprotetor. Mas o remifentanil em altas doses age revertido e aumenta o status oxidante. Nossos resultados indicaram ainda que a proteção ocorreu não apenas pelo aumento dos níveis de TAC, mas também pela redução do status de TOS.

Bo Pan et al. investigaram os efeitos neuroprotetores do remifentanil na apoptose induzida por isoflurano no cérebro de rato neonatal <sup>(24)</sup>. Os resultados desse estudo mostraram que o remifentanil sozinho apresenta efeitos neuroprotetores leves. No entanto, após a administração de isoflurano, o remifentanil reduziu a formação de células apoptóticas no córtex e na área talâmica.

Em resumo, este estudo demonstrou que a baixa concentração de remifentanil pode causar efeitos neuroprotetores ao prevenir a toxicidade induzida por glutamato em culturas de neurônios do bulbo olfatório de rato. No entanto, novos estudos ainda são necessários e devem investigar melhor o papel dos transportadores de glutamato e das vias enzimáticas da glutamina na neuroproteção induzida por remifentanil.

## Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses. O artigo não foi publicado anteriormente em nenhum outro lugar, total ou parcialmente.

## Referências

- Carotenuto A, Costabile T, Moccia M, Falco F, Scala MR, Russo CV, et al. Olfactory function and cognition in relapsing-remitting and secondary-progressive multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Dis*. 2019;27:1-6.
- Okazaki S, Haramaki T, Nishino H. A Safe Driving Support Method Using Olfactory Stimuli. *Adv Intell Syst*. 2019;772:958-67.
- Anderson B. The Use of Remifentanil as the Primary Agent for Analgesia in Parturients. *Crit Care Nurs Clin*. 2017;29(4):495-+.
- Tourrel F, de Lendeu PK, Abily-Donval L, Chollat C, Marret S, Dufresne F, et al. The Antiapoptotic Effect of Remifentanil on the Immature Mouse Brain: An Ex Vivo Study. *Anesth Analg*. 2014;118(5):1041-51.
- Zhao M, Joo DT. Enhancement of spinal N-methyl-D-aspartate receptor function by remifentanil action at delta-opioid receptors as a mechanism for acute opioid-induced hyperalgesia or tolerance. *Anesthesiology*. 2008;109(2):308-17.
- Sakai W, Yoshikawa Y, Hirata N, Yamakage M. Effect of remifentanil during cardiopulmonary bypass on incidence of acute kidney injury after cardiac surgery. *J Anesth*. 2017;31(6):895-902.
- Gundogdu G, Taghizadehghalehjoughi A, Senol O, Cicek B, Nalci KA, Hacimuftuoglu A. Investigation of Protective Effect of Parietin against Glutamate Excitotoxicity in Primary Cortical Neuron Culture. *Acta Physiol*. 2017;221:228-.
- Sevim C, Dogan E, Taghizadehghalehjoughi A, Gedikli S, Ozkaraca M, Comakli S, et al. Tissue-protective effects of French maritime pine bark (Pycnogenol) on glutamate-induced cytotoxicity in adult human dermal fibroblasts. *Toxicol Lett*. 2017;280:5159-5.
- Lian YN, Lu Q, Chang JL, Zhang Y. The role of glutamate and its receptors in central nervous system in stress-induced hyperalgesia. *Int J Neurosci*. 2018;128(3):283-90.
- Lacresse A, Moore CM, LaClair M, Payne L, King JA. Glutamine/glutamate (Glx) concentration in prefrontal cortex predicts reversal learning performance in the marmoset. *Behav Brain Res*. 2018;346:11-5.
- Gupta K, Hardingham GE, Chandran S. NMDA receptor-dependent glutamate excitotoxicity in human embryonic stem cell-derived neurons. *Neurosci Lett*. 2013;543:95-100.
- Marcos JL, Galleguillos D, Pelissier T, Hernandez A, Velasquez L, Villanueva L, et al. Role of the spinal TrkB-NMDA receptor link in the BDNF-induced long-lasting mechanical hyperalgesia in the rat: A behavioural study. *Eur J Pain*. 2017;21(10):1688-96.
- Minovi A, Aguado A, Brunert D, Kurtenbach S, Dazert S, Hatt H, et al. Isolation, culture optimization and functional characterization of stem cell neurospheres from mouse neonatal olfactory bulb and epithelium. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2017;274(8):3071-85.
- Kamalak H, Kamalak A, Taghizadehghalehjoughi A. Cytotoxic effects of new-generation bulk-fill composites on human dental pulp stem cells. *Cell Mol Biol*. 2018;64(3):62-71.
- Emin NM, Taghizadehghalehjoughi A. Should we use remifentanil in every dose and every case? *Journal of Clinical and Analytical Medicine*. 2019;10(1):21-5.
- Abel SDA, Baird SK. Honey is cytotoxic towards prostate cancer cells but interacts with the MTT reagent: Considerations for the choice of cell viability assay. *Food Chem*. 2018;241:70-8.
- Rowicka G, Dylag H, Ambroszkiewicz J, Riahi A, Weker H, Chelchowska M. Total Oxidant and Antioxidant Status in Prepubertal Children with Obesity. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:5621989.
- Makedou KG, Vagdatli E, Patziarella E, Konstantinidou V, Poimenidou E, Lymperaki E. Total Antioxidant Capacity, Haematological and Coagulation Parameters after Orthodox Christian Fast. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018;6(2):284-6.
- Eray M, Matto M, Kaartinen M, Andersson L, Pelkonen J. Flow cytometric analysis of apoptotic subpopulations with a combination of annexin V-FITC, propidium iodide, and SYTO 17. *Cytometry*. 2001;43(2):134-42.
- Angst MS, Koppert W, Pahl I, Clark DJ, Schmelz M. Short-term infusion of the mu-opioid agonist remifentanil in humans causes hyperalgesia during withdrawal. *Pain*. 2003 Nov;106(1-2):49-57. doi: 10.1016/s0304-3959(03)00276-8. PMID: 14581110.
- Guntz E, Dumont H, Roussel C, Gall D, Dufresne F, Cuvelier L, et al. Effects of remifentanil on N-methyl-D-aspartate receptor - An electrophysiologic study in rat spinal cord. *Anesthesiology*. 2005;102(6):1235-41.
- Ye L, Xiao L, Bai X, Yang SY, Li Y, Chen Y, et al. Spinal mitochondrial-derived ROS contributes to remifentanil-induced postoperative hyperalgesia NMDA receptor in rats via modulating. *Neurosci Lett*. 2016;634:79-86.
- Kim CH, Jeong SS, Yoon JY, Yoon JU, Yu SB, Kim EJ. Remifentanil reduced the effects of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human keratinocytes via autophagy. *Connect Tissue Res*. 2017;58(6):597-605.
- Pan B, Huang SQ, Sun S, Wang TT. The neuroprotective effects of remifentanil on isoflurane-induced apoptosis in the neonatal rat brain. *Am J Transl Res*. 2017;9(10):4521-33.