

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CATEQUINA E EPICATEQUINA MINIMIZAM A TOXICIDADE
INDUZIDA PELA AMIODARONA EM FIBROBLASTO DE
PULMÃO HUMANO (MRC-5)

LUCIANA FERNANDES SILVA SANTOS

CAXIAS DO SUL

2015

LUCIANA FERNANDES SILVA SANTOS

**CATEQUINA E EPICATEQUINA MINIMIZAM A TOXICIDADE
INDUZIDA PELA AMIODARONA EM FIBROBLASTO DE PULMÃO
HUMANO (MRC-5)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade de Caxias do Sul, visando à
obtenção de grau de Mestre em
Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mirian Salvador

CAXIAS DO SUL

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

S237c Santos, Luciana Fernandes Silva, 1970-
Catequina e epicatequina minimizam a toxicidade induzida pela
amiodarona em fibroblasto de pulmão humano (MRC-5) / Luciana
Fernandes Silva Santos. – 2015.
xi, 82 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.
Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.
Orientadora: Profa. Dra. Mirian Salvador.

1. Biotecnologia farmacêutica. 2. Medicamentos -
Desenvolvimento. 3. Arritmia - Tratamento. 4. Fenóis. I. Título.

CDU 2. ed.: 60:615.12

Índice para o catálogo sistemático:

- | | |
|-----------------------------------|----------------|
| 1. Biotecnologia farmacêutica | 60:615.12 |
| 2. Medicamentos - Desenvolvimento | 615.012 |
| 3. Arritmia - Tratamento | 616.12-008.318 |
| 4. Fenóis | 547.562.1 |

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Roberta da Silva Freitas – CRB 10/1730

LUCIANA FERNANDES SILVA SANTOS

**CATEQUINA E EPICATEQUINA MINIMIZAM A TOXICIDADE
INDUZIDA PELA AMIODARONA EM
FIBROBLASTO DE PULMÃO HUMANO (MRC-5)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Salvador

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20 DE NOVEMBRO DE 2015.


Orientadora: Profa. Dra. Mirian Salvador


Profa. Dra. Adriane Belló Klein


Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes


Prof. Dr. Jomar Pereira Laurino

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a **Mirian Salvador**, por ter me orientado com extrema competência, profissionalismo e sabedoria. Meu profundo respeito e admiração.

Aos professores da banca de acompanhamento **Jomar Pereira Laurino e Suelen Osmarina Paesi**, pela disponibilidade, acompanhamento crítico e pelas sugestões a este trabalho.

Ao Prof Dr **Aldo Dillon** e a **todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**, por contribuírem com o meu crescimento e com minha formação acadêmica.

As agências de fomento **CAPES, FAPERGS e CNPq** e à **Universidade de Caxias do Sul** pelo apoio e suporte financeiro que possibilitaram a realização deste trabalho.

À bolsista de iniciação científica e futura colega farmacêutica **Adriana Stolfo**, pela amizade, dedicação, disponibilidade e entusiasmo na realização das atividades.

Ao acadêmico **Tiago Selau Rodrigues**, pelas importantes contribuições a este trabalho.

A todo o grupo do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, **Bruna Mara Postingher, Caroline Calloni, Caroline Zuanazzi, Cátia Branco, Elisa Pavão, Emilin Lima, Fábio Marcon, Gabriela Gambato, Jéssica Mattos, Kelly Todescatto, Juliane Sene, Larissa Lopes da Silva, Luana Martinez, Luciana Bavaresco Touguinha, Mariana Pozzer, Marisa de Campos Santana, Natalia Stédile, Paulina Ampessan, Tairena Pereira Menegola e Thiago De Marchi** pela colaboração, parceria e amizade.

Ao meu marido **Miguel Royes dos Santos** e meus filhos **Bruno e Marina** pelo incentivo e encorajamento. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 ARRITMIAS CARDÍACAS E SEU TRATAMENTO COM AMIODARONA.....	3
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES	9
2.3 CÉLULAS DE MAMÍFEROS COMO MODELO DE ESTUDO PARA AVALIAÇÃO DE DANOS MITOCONDRIAIS E OXIDATIVOS.....	17
3. OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO GERAL.....	45
6. CONCLUSÕES	53
7. PERSPECTIVAS.....	54
8. REFERÊNCIAS	55
9. ANEXO	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais classes de flavonoides, suas estruturas básicas e exemplos de cada classe.....	15
Tabela 2. Resumo das funções das sirtuinas em mamíferos.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da amiodarona	04
Figura 2. Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.....	10
Figura 3. Principais defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas.....	12
Figura 4. Estrutura do esqueleto carbonado dos flavonoides.....	14
Figura 5. Estrutura química dos flavan-3-ol catequina e epicatequina.....	16
Figura 6. Microscopia da cultura de células de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5).....	17
Figura 7. Resumo de eventos moleculares que participam na regulação do estresse oxidativo tecidual em amostras de músculo esquelético de humanos e/ou de camundongos.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
ER	Espécies Reativas
ERO	Espécies Reativas do Oxigênio
FA	Fibrilação Atrial
FADH₂	Dinucleotídeo de flavina-adenina
FDA	Food and Drug Administration
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSR	Glutathione redutase
GSSG	Glutathione oxidada
MDA	Malondialdeído
MPP⁺	Cloridrato de N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinium
MRC-5	Fibroblastos de pulmão humano
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NAC	N-acetilcisteína
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
NADPH	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina-fosfato
NOS	Óxido nítrico sintase
QH₂	Ubiquinona
SOD	Superóxido dismutase
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

RESUMO

A amiodarona é um dos fármacos mais usados para o tratamento de arritmias cardíacas, tanto ventriculares como supraventriculares. Apesar de sua eficácia, o uso da amiodarona está associado a vários efeitos adversos, incluindo a toxicidade pulmonar. O mecanismo pelo qual a amiodarona causa lesão nas células pulmonares humanas não é inteiramente conhecido, mas estudos em cultura de células hepáticas humanas e pulmonares de ratos têm sugerido que a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo têm um papel importante na citotoxicidade da amiodarona. Os compostos fenólicos, incluindo catequina e epicatequina são amplamente distribuídos na natureza e conhecidos por sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo. Além disso, alguns compostos fenólicos são capazes de modular a atividade mitocondrial. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade dos compostos fenólicos catequina e epicatequina em a disfunção mitocondrial e os danos oxidativos causados pela amiodarona em células de fibroblasto de pulmão humano (MRC-5). Para atingir os objetivos as células MRC-5 foram tratadas com diferentes concentrações de catequina e epicatequina e após foram expostas a amiodarona 100 μ M. A disfunção mitocondrial foi determinada através da atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons e a biossíntese de ATP usando kits específicos. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de 3-[4,5-dimetiltiazol 2-il]-2,5 difenil brometo de tetrazolina. A atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase foram determinadas espectrofotometricamente. Os danos oxidativos a lipídeos e proteínas foram verificados através dos ensaios de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e a proteínas carboniladas, respectivamente, e os níveis de óxido nítrico foram avaliados usando o método de Griess. Os resultados mostraram que a amiodarona inibiu a atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons em 53%

e a biossíntese de ATP em 9,5% e tanto a catequina como a epicatequina foram capazes de evitar estes efeitos em todas as concentrações (5, 10, 20 μ M) testadas. Verificou-se que a amiodarona reduziu a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase (indicando produção de superóxido e peróxido de hidrogênio) e aumentou os danos oxidativos a lipídeos e proteínas. Os compostos fenólicos catequina e epicatequina foram capazes de minimizar as alterações no metabolismo redox induzidos pela amiodarona e aumentar a viabilidade nas células MRC-5. Catequina e epicatequina reduziram a depleção de óxido nítrico causada pela amiodarona. Este trabalho mostrou, pela primeira vez, que o mecanismo de toxicidade da amiodarona em células MRC-5 está associado à disfunção mitocondrial, principal causa de geração de dano oxidativo celular e que estes efeitos tóxicos são em parte reduzidos pela catequina e epicatequina. Embora outros estudos sejam necessários, estes dados abrem novas perspectivas para estudos visando o desenvolvimento de medicamentos que minimizem os efeitos tóxicos da amiodarona.

Palavras-chaves: arritmia, doença cardiovascular, estresse oxidativo, mitocôndria.

ABSTRACT

Amiodarone is among the most widely used drugs for the treatment of ventricular and supraventricular cardiac arrhythmias. However, the use of amiodarone is associated with several side effects including pulmonary toxicity. The mechanism of amiodarone toxicity is not well known, but studies in human liver cells and rats lung cells have been suggested that mitochondrial dysfunction and oxidative stress play important role in the amiodarone cytotoxicity. Phenolic compounds, including catechin and epicatechin are widespread in nature and known for their ability to reduce oxidative stress. In addition, some phenolic compounds are able to modulate mitochondrial activity. Therefore, the objective of this study was to evaluate the ability of phenolic compounds catechin and epicatechin to minimize the mitochondrial dysfunction and oxidative damage induced by amiodarone in human lung fibroblast cells (MRC-5). To achieve the objectives, MRC-5 cells were treated with different concentrations of catechin and epicatechin and then amiodarone 100 μ M. Mitochondrial dysfunction was determined by the activity of complex I of the electron transport chain and ATP biosynthesis using specific kits. Cell viability was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. The activity of the enzymes superoxide dismutase and catalase were determined spectrophotometrically. The oxidative damage to lipids and proteins have been verified through the test substances reactive to the thiobarbituric acid and carbonyl protein, respectively, and nitric oxide levels were evaluated using the Griess method. The results showed that amiodarone inhibit 53% of the activity of complex I of the electron transport chain and 9.5% of ATP biosynthesis and both catechin and epicatechin were able to avoid these effects in all concentrations (5 10, 20 mM) tested. It was found that amiodarone reduced the superoxide dismutase and catalase activities (indicating the production of

radicals superoxide and hydrogen peroxide) and increased oxidative damage to lipids and proteins. Phenolic compounds catechin and epicatechin were able to minimize alterations in the redox metabolism and increase in viability of MRC-5 cells. Furthermore, catechin and epicatechin reduced nitric oxide depletion caused by amiodarone. This study showed, for the first time, that toxicity of amiodarone in human lung cultured cells is associated, at least, in part, with mitochondrial dysfunction which was avoided by catechin and epicatechin. Although further studies are needed, these data open new perspectives for studies aiming the development of drugs that minimize the toxic effects of amiodarone.

Keywords: arrhythmia, cardiovascular disease, oxidative stress, mitochondria.

1. INTRODUÇÃO

As arritmias cardíacas são caracterizadas pela frequência, formação e/ou condução anormal do impulso elétrico a partir do miocárdio (Pastore *et al.*, 2009). A amiodarona é um dos fármacos mais usados para o tratamento de arritmias cardíacas, sendo indicada, especialmente, para o tratamento de arritmias ventriculares e supraventriculares (Albayrak *et al.*, 2009).

Apesar de sua alta eficácia, o uso da amiodarona está associado a vários efeitos adversos como disfunção da tireoide, toxicidade hepática e pulmonar. A toxicidade pulmonar está relacionada ao tempo prolongado do tratamento e/ou às altas doses do fármaco (Oyama *et al.*, 2005) e pode levar à necessidade de interrupção do tratamento. O mecanismo pelo qual a amiodarona causa lesão nas células pulmonares não é inteiramente conhecido, mas estudos têm sugerido que disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo têm um papel importante nos mecanismos de citotoxicidade (Fromenty *et al.*, 1990; Bolt *et al.*, 2001; Serviddio *et al.*, 2011; Felser *et al.*, 2013).

De fato, estudos *in vitro* demonstraram que a amiodarona foi capaz de inibir o complexo I da cadeia de transporte de elétrons em células de fígado de camundongos (Fromenty *et al.*, 1990), em células de pulmão de hamster (Bolt *et al.*, 2001), e em células de hepatoma humano (HepG₂) (Felser *et al.*, 2013). O mesmo foi observado em um estudo realizado *in vivo*, em fígado de ratos (Serviddio *et al.*, 2011). O complexo I é a principal fonte endógena de geração de espécies reativas, principalmente de superóxido (Kussmaul & Hirst, 2006). Alterações na cadeia de transporte de elétrons levam à redução da síntese de ATP, e a geração de danos oxidativos (Murphy, 2009; Che *et al.*, 2014).

Entre os antioxidantes, os compostos fenólicos são os mais amplamente distribuídos na natureza, e podem ser classificados em flavonoides e não flavonoides. Os flavan-3-ol são a subclasse mais complexa dos flavonoides e incluem a catequina e seu epímero epicatequina (Crozier *et al.*, 2009). Embora ainda pouco estudados, sabe-se que alguns compostos fenólicos podem modular a atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Carrasco-Pozo *et al.*, 2012). Já foi demonstrado que a catequina é capaz de reduzir danos oxidativos e a disfunção mitocondrial induzida por rotenona e outros agentes pró-oxidantes em mesencéfalo de embriões de ratos (Mercer *et al.*, 2005). Estudo analisando biópsia de músculo de quadríceps femoral de pacientes com diabetes tipo 2 e insuficiência cardíaca, após a ingestão de chocolate rico em epicatequina, demonstrou que epicatequina modulou a expressão e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase (Ramirez-Sanchez *et al.*, 2013). No entanto, até o momento não há estudos avaliando os danos causados pela amiodarona em células MRC-5 nem os efeitos de compostos fenólicos nestes tratamentos.

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a disfunção mitocondrial e os danos oxidativos causados pela amiodarona em células de fibroblasto de pulmão humano (MRC-5), e a capacidade dos compostos fenólicos catequina e epicatequina de minimizar estes danos. Os resultados deverão contribuir para um maior esclarecimento do mecanismo da ação dos compostos fenólicos em processos associados a o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial causados pela amiodarona.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ARRITMIAS CARDÍACAS E SEU TRATAMENTO COM AMIODARONA

As arritmias cardíacas são caracterizadas pelo ritmo irregular dos batimentos cardíacos, que podem ser muito lentos (<60 batimentos/min) ou muito rápidos (> 100 batimentos/min) (Fu, 2015). As arritmias incluem alteração na regularidade, ou local de origem do impulso, ou anormalidade na condução deste impulso, modificando a sequência normal de despolarização de átrios e ventrículos (Porto, 1998).

As arritmias podem ser classificadas em ventriculares e supraventriculares. Dentre as arritmias cardíacas, a fibrilação atrial (FA) é uma arritmia supraventricular em que ocorre uma completa desorganização na atividade elétrica atrial, fazendo com que os átrios percam sua capacidade de contração, não gerando sístole atrial. Devido a isso, a FA é comumente associada à insuficiência cardíaca congestiva e acidente vascular cerebral (Zimmerman *et al.*, 2009). O risco de desenvolver um acidente vascular cerebral é cinco vezes maior em pacientes com FA. Além disso, estima-se que nas próximas décadas, devido ao aumento de idosos na população, a incidência de FA aumente, pois a prevalência da FA aumenta com o avançar da idade (WHO, 2011).

A amiodarona foi desenvolvida originalmente como um fármaco antianginoso na Bélgica, em 1962 (Singh, 1983). Posteriormente foram observadas suas propriedades antiarrítmicas, primeiro na Europa e na América do Sul, onde sua utilização como antianginoso e antiarrítmico teve grande aceitação. Nos EUA, foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1985, para adultos com arritmias ventriculares potencialmente fatais quando outros tratamentos são ineficazes ou não são tolerados. O uso da amiodarona intravenosa foi aprovado pela FDA em 1995, com a mesma indicação (Herendael & Dorian, 2010). A amiodarona é um dos fármacos mais usados para o

tratamento de arritmias cardíacas, sendo indicado para o tratamento e profilaxia de arritmias ventriculares e arritmias supraventriculares (Singh, 2008).

A amiodarona, (2-*n*-butil-3-benzofuranil)-[4-[2-(dietilamino)-etoxi]-3,5-diiodofenil]-metanona) (Figura 1), com a fórmula molecular $C_{25}H_{29}I_2NO_3$, é derivada dos benzofuranos e possui um peso molecular de 645,3116 g/mol (Han *et al.*, 2009). É um análogo estrutural dos hormônios da tireoide, e é composta por um anel benzofurano com um grupo lateral butil, uma parte diiodobenzoil altamente lipofílica, e pela parte dietilamino- β -etoxi. Os dois átomos de iodo, ligados ao mesmo anel benzênico, são responsáveis por 37% do peso total da sua molécula (Han *et al.*, 2009).

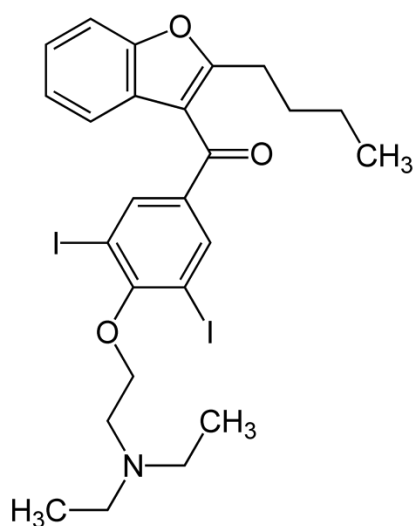


Figura 1. Estrutura química da amiodarona (adaptado de Golli-Bennour *et al.*, 2012).

O principal mecanismo pelo qual a amiodarona exerce seu efeito antiarrítmico é a diminuição da condutância para o potássio, o que ocasiona um prolongamento na duração do potencial de ação e consequentemente do período refratário em todo o tecido cardíaco, sem afetar significativamente o potencial transmembrana diastólico (Nattel & Singh, 1999; Han *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2010). Afeta em menor grau a condutância

para a entrada de sódio e de cálcio, com efeito reduzido na amplitude do potencial de ação e na velocidade de despolarização. Além disso, a amiodarona é um inibidor não competitivo α e β adrenérgico (Nattel & Singh, 1999).

As dosagens usadas para o tratamento com a amiodarona variam de acordo com o tipo de arritmia cardíaca. Em geral, para adultos (por via oral), com arritmias ventriculares refratárias deve-se usar 800 mg a 1,6 g por dia, inicialmente, seguida por 600 a 800 mg ao dia após uma ou duas semanas e, em seguida, 400 a 800 mg diariamente. Para arritmias supraventriculares, inicia-se com 600 mg ao dia divididos em três porções, durante uma semana, seguidos por 200 a 400 mg ao dia. Em alguns pacientes, pode ser suficiente uma dose de manutenção de 200 mg em dias alternados. Para a síndrome bradicardia-taquicardia, inicia-se o tratamento com 200 mg duas vezes ao dia, seguidos por 200 a 600 mg ao dia. Para crianças, são utilizados 3 a 20 mg/kg diariamente. Quando a administração for por via intravenosa, para adultos, recomenda-se inicialmente, até 5 mg/kg administrados durante um período de 5 a 15 minutos. Esta dose não deve ser repetida em 15 minutos. O fármaco pode então ser infundido na dose de 600 mg a 1,2 g, a cada 12 a 24 horas, durante vários dias (França, 2015).

Quando administrada por via oral, a absorção da amiodarona é variável, incompleta e lenta (período de latência de trinta minutos a três horas). A sua biodisponibilidade oral é em torno de 50%. O pico plasmático é atingido em três a sete horas (Han *et al.*, 2009). A amiodarona distribui-se amplamente nos tecidos, com predomínio no fígado, seguindo-se o tecido adiposo, pulmão, tecido linfático, miocárdio e músculo esquelético, o que provoca um atraso no início da ação (2 a 3 dias). Após administração de dose única endovenosa, a amiodarona apresenta início de ação cardíaca entre um e trinta minutos, com duração de efeito de uma a três horas. A concentração plasmática terapêutica é de 1 a 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após a interrupção do tratamento por via oral

o efeito da amiodarona permanece por semanas ou meses. Concentrações plasmáticas de amiodarona são detectáveis até seis meses após a interrupção do tratamento (WHO-NHS, 2009). A amiodarona é capaz de atravessar a placenta em mulheres grávidas e é excretada em quantidades variáveis no leite materno. Este fármaco tem excreção biliar, é metabolizado no fígado, e o seu metabólito ativo é a N-desetilamiodarona, que também possui atividade antiarrítmica, e aumenta a citotoxicidade da amiodarona “*in vitro*” (Roth *et al.*, 2013). A metabolização de amiodarona para N-desetilamiodarona é catalisada pelo citocromo P450 (CYP450-3A4) (Han *et al.*, 2009).

O uso da amiodarona pode ocasionar vários efeitos adversos, os quais são mais frequentes em doses diárias maiores ou iguais a 400 mg (Garg *et al.*, 2012) ou em concentrações menores utilizadas por tempo prolongado (Nacca, 2012). A incidência de efeitos adversos é de 15% durante o primeiro ano de uso de amiodarona, podendo chegar a 50% quando utilizada por longos períodos (Goldschlager *et al.*, 2007). Entre os efeitos adversos causados pela amiodarona estão a disfunção da tireoide, microdepósitos de lipídeos na córnea, manifestações neuromusculares, exacerbação da arritmia, lesão hepática e toxicidade pulmonar. Dentre estes, os que mais preocupam são exacerbação da arritmia, que é um efeito adverso secundário a qualquer antiarrítmico, distúrbios da tireoide, lesão hepática grave e toxicidade pulmonar (Garg *et al.*, 2012).

A amiodarona tem estrutura semelhante aos hormônios da tireoide, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), e contém uma grande quantidade de iodo, especificamente, um comprimido de 100 mg contém 250 vezes a exigência diária de iodo que é de (150–200 µg). Por isso, o uso de amiodarona pode causar danos à tireoide como o hipotireoidismo, ou hipertireoidismo (Park & Kim, 2014; Jabrocka-Hybel *et al.*, 2015). O principal mecanismo pelo qual a amiodarona interfere no funcionamento da tireoide é a inibição da enzima iodotirosina deiodinase responsável pela formação do T3 a partir do

T4. Além disso, a amiodarona é muito semelhante estruturalmente ao T3, e alguns de seus efeitos tem sido atribuído a sua interferência em transportadores e receptores de hormônios tireoidianos. Além de sua citotoxicidade nas células da tireoide (Park & Kim, 2014).

As manifestações hepáticas podem ser caracterizadas pelo aumento moderado das transaminases (1 a 2 vezes o valor normal), podendo retornar ao normal, espontaneamente, ou com a redução da dose, e ocorrem em mais de 15 a 30% dos pacientes. A hepatite e a cirrose ocorrem em até 3% dos pacientes (Goldschlager *et al.*, 2007). Ao contrário da toxicidade a tireoide em que o mecanismo de ação é bem determinado, o mecanismo da toxicidade hepática ainda não é bem esclarecido.

A toxicidade pulmonar é um dos mais sérios efeitos adversos induzidos pela amiodarona e pode levar a necessidade de interrupção do tratamento. A toxicidade pulmonar pode ocorrer em qualquer momento durante o tratamento ou, mesmo, após a descontinuação da terapia. Os fatores de risco mais importantes são a idade do paciente, o tempo do tratamento e a dosagem de amiodarona. O maior risco ocorre quando a administração de amiodarona é de 400 mg/dia, por tempo superior a dois meses, ou 200 mg/dia, durante dois anos. Outros fatores de risco são: sexo masculino, doença pulmonar pré-existente, e altas doses de oxigenoterapia com ou sem ventilação mecânica (Oyama *et al.*, 2005; Nacca *et al.*, 2012). Um estudo entre os indivíduos japoneses demonstrou uma incidência cumulativa relativamente alta de 4,2%, 7,8% e 10,6% em um, três e cinco anos, respectivamente, com uma dose média de manutenção de 141 mg de amiodarona por dia (Yamada *et al.*, 2007). A amiodarona concentra-se em tecidos periféricos o que pode estar relacionado à sua toxicidade pulmonar, sendo que a concentração de amiodarona nas células pulmonares é maior do que no coração. Além disso, a via de

administração é importante, já que a amiodarona acumula-se rapidamente nos pulmões de pacientes que receberam amiodarona por administração endovenosa (Nacca *et al.*, 2012).

A toxicidade pulmonar (pneumonite alveolar /intersticial ou fibrose, pleurite, bronquiolite obliterante com pneumonia em organização), às vezes fatal, ocorre em até 13% dos pacientes (Oyama *et al.*, 2005), podendo levar a morte em 10 a 23% dos casos (WHO-NHS, 2009).

Embora o mecanismo responsável pela toxicidade da amiodarona ainda não esteja totalmente esclarecido, já foi descrito que a amiodarona pode inibir a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e exercer um efeito pró-oxidante. De fato, estudos *in vitro* realizados com amiodarona mostraram que este fármaco foi capaz de inibir o complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e diminuir a produção de ATP em mitocôndria de fígado de camundongos (Fromenty *et al.*, 1990), em células de pulmão de hamster (Bolt *et al.*, 2001), e em células de hepatoma humano (HepG₂) (Felser *et al.*, 2013). Também foi observada a disfunção mitocondrial *in vivo* em células hepáticas de ratos onde amiodarona inibiu a atividade do complexo I, reduziu os níveis de ATP e diminuiu o potencial de membrana. No mesmo estudo, amiodarona causou danos oxidativos como peroxidação da cardiolipina, peroxidação lipídica e 4-hidroxinonenal adutos de proteínas (Serviddio *et al.*, 2011).

Em vista disso, estudos com antioxidantes como a N-acetilcisteína (NAC) e a vitamina E foram realizados com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios da amiodarona. A NAC, em células hepáticas de ratos tratados com amiodarona, não conseguiu reverter aos níveis basais os danos causados pela amiodarona, principalmente a atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons e a produção de ATP, também não reverteu totalmente a peroxidação lipídica, por outro lado, foi capaz de evitar a peroxidação da cardiolipina, a formação de 4-hidroxinonenal adutos de proteínas e

evitou a diminuição do potencial de membrana (Serviddio *et al.*, 2011). A vitamina E reduziu os danos teciduais pulmonares em hamsters (Card *et al.*, 2003), mas não foi capaz de reverter danos mitocondriais como inibição do complexo I e alteração do potencial de membrana, nem em células pulmonares de hamster (Card *et al.*, 2003) e nem em hepatócitos de ratos (Deng *et al.*, 2014) tratados com amiodarona.

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

As espécies reativas ER mais conhecidas são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o óxido nítrico (ON^{\bullet}), o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), o radical hidroxila (HO^{\bullet}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Normalmente as ER são contrabalanceadas pelas defesas antioxidantes, no entanto quando o número de ER ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes, ou quando estas defesas estão diminuídas, ocorre o estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ser associado a doenças, uma vez que, quantidades aumentadas de metabólitos oxidativos têm sido detectadas em pacientes com diabetes mellitus, doenças imunodegenerativas e câncer (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A formação de ER intracelular pode ser induzida por fatores externos tais como irradiação (ultravioleta, raios-X e gama), poluentes atmosféricos, como dióxido de nitrogênio (NO_2), constituintes do tabaco, etanol, pesticidas e fármacos (Lobo *et al.*, 2010).

Entre os fármacos capazes de induzir a formação de ER estão o paracetamol, e drogas antitumorais como o metotrexato, doxirrubicina e cisplatina (Deavall *et al.*, 2012). Estes fármacos aumentam a produção de ER que causam danos a macromoléculas principalmente no fígado e nos rins. Além dos fatores externos que podem induzir a geração de ER, estas podem ser geradas por fatores internos, principalmente pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Rahal *et al.*, 2014).

A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é constituída por carreadores de elétrons que consistem em cinco complexos proteicos (I-V), inseridos na membrana mitocondrial interna. O complexo I (NADH- desidrogenase) e o complexo II (succinato-desidrogenase) catalisam a transferência de elétrons para a ubiquinona a partir de dois doadores de elétrons diferentes, NADH e FADH₂, respectivamente. O complexo III (ubiquinona: citocromo C-oxirredutase), transfere os elétrons do ubiquinol (QH₂) para o citocromo C. Os elétrons são então carregados do citocromo C para o oxigênio molecular, sendo reduzidos a H₂O pelo complexo IV (citocromo-oxidase). À medida que os elétrons fluem/passam pelos complexos I, III e IV, prótons (H⁺) são bombeados da matriz para o espaço intermembrana. A força próton-motriz impulsiona a síntese de ATP, à medida que os prótons fluem passivamente de volta a matriz, através de um poro para prótons associados com a ATP-sintase, também conhecida como complexo V (Figura 2) (Nelson & Cox, 2011).

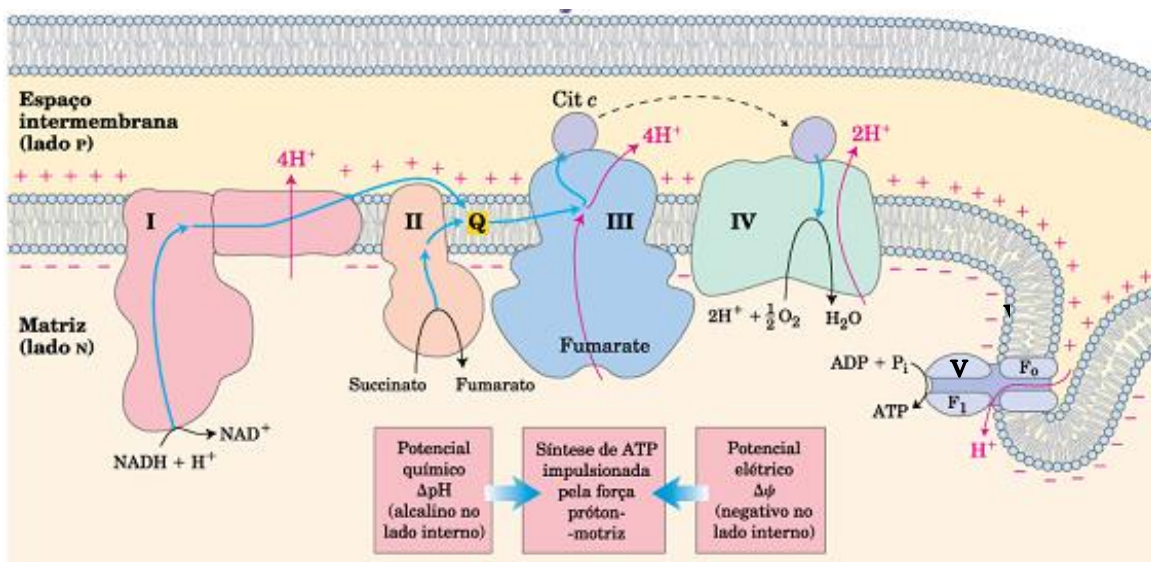


Figura 2. Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana, produzindo tanto um gradiente químico (ΔpH) quanto um gradiente elétrico ($\Delta\psi$). A membrana mitocondrial interna é impermeável a prótons, e os prótons retornam a matriz através de canais específicos de prótons (F_0). A força próton-motriz que direciona os prótons de volta para a matriz proporciona a energia para a síntese de ATP, catalisada pelo complexo F_1 e associada ao F_0 (ATP sintase) (adaptado de Nelson & Cox, 2011).

A diminuição na atividade do complexo I leva a um aumento na geração de $O_2^{\cdot-}$ o qual é formado a partir do escape de elétrons da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Kussmaul & Hirst, 2006; Carrasco-Pozo *et al.*, 2011; Carrasco-Pozo *et al.*, 2012). Disfunções na cadeia de transporte de elétrons levam à redução da síntese de ATP, e a geração de danos oxidativos. Os danos oxidativos mitocondriais podem aumentar a tendência das mitocôndrias para liberar o citocromo C do espaço intermembrana para o citosol por permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) e assim ativar as caspases levando a apoptose celular (Murphy, 2009; Che *et al.*, 2014).

Os efeitos deletérios das ER são minimizados pelos sistemas antioxidantes (Tomé *et al.*, 2010) (Figura 3). Fazem parte das defesas antioxidantes enzimáticas a superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GSR) e a glicose-6-fosfato desidrogenase. A superóxido dismutase converte o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , o qual se torna substrato para a enzima catalase ou GPx. A enzima GSR converte a glutatona de sua forma oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH) e a glicose-6-fosfato desidrogenase, regenera o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) no ciclo das pentoses para manter um ambiente redutor (Rahman, 2007; Carocho & Ferreira, 2013).

Em células eucariotas, há várias isoformas da enzima superóxido dismutase, geralmente presentes em compartimentos celulares distintos (Fridovich, 1998; Blokhina *et al.*, 2003). A SODCuZn, a primeira a ser caracterizada, é um homodímero contendo cobre e zinco e que se encontra quase, exclusivamente, no espaço citoplasmático (Fridovich, 1998; Zelko *et al.*, 2002). A SODMn é uma proteína que contém manganês em seu sítio ativo e na maioria dos animais e leveduras pode ser encontrada na mitocôndria (Fridovich, 1998). A superóxido dismutase 3 ou ECSOD, mais recentemente caracterizada, é um tetrâmero que contém cobre e zinco em seu sítio ativo e possui um

peptídeo sinalizador que direciona essa enzima exclusivamente para o espaço extracelular (Zelko *et al.*, 2002).

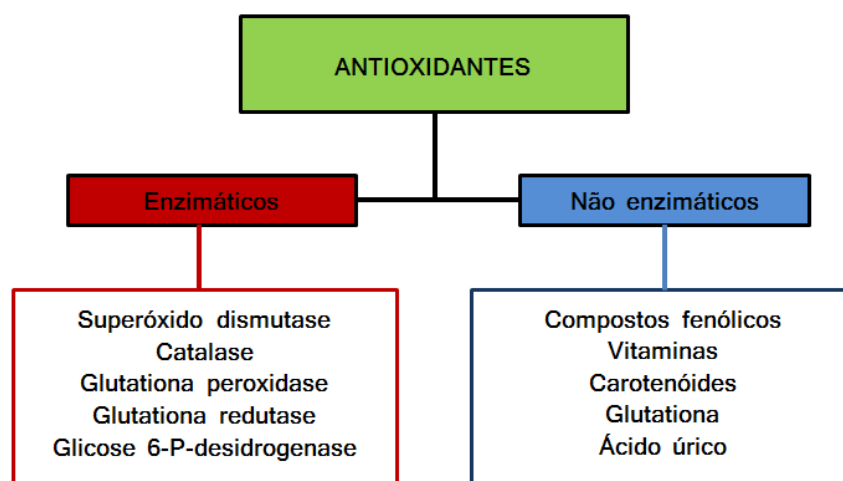


Figura 3. Principais defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (adaptado de Carochó & Ferreira, 2013).

A catalase é um tetrâmero formado por unidades idênticas, sendo que cada monômero contém um grupo prostético heme no centro catalítico. Em animais, a enzima catalase está presente nos eritrócitos e em praticamente todos os principais órgãos, encontrando-se, por exemplo, em maior concentração, no fígado e no rim e em menores quantidades no cérebro e coração (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Fazem parte dos antioxidantes não enzimáticos as vitaminas, principalmente a vitamina A (retinol), vitamina C (ácido ascórbico) e vitamina E (tocoferol); os carotenoides, como o β -caroteno, licopeno e a luteína; compostos diversos como o ácido úrico, o selênio, a glutaciona; e os compostos fenólicos (Halliwell & Gutteridge, 2007; Carochó & Ferreira, 2013). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos pelas plantas em resposta ao estresse ambiental e fisiológico, tais como a ação de agentes patogênicos, ataque de insetos e radiação ultravioleta. Constituem um dos mais numerosos grupos de compostos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal

(Tsao, 2010). Apesar de nas últimas cinco décadas os compostos fenólicos terem sido considerados moléculas principalmente antioxidantes, agora eles são cada vez mais reconhecidos como moléculas pleiotrópicas, capazes de exercer várias atividades, entre elas, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica. Mais recentemente estudos têm demonstrado que os compostos fenólicos podem modular a atividade mitocondrial (Sandoval-Acunã, 2014). Compostos fenólicos, como a quercetina, conseguem reestabelecer a atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e aumentar a biossíntese de ATP em células epiteliais de intestino humano Caco-2, quando a atividade mitocondrial destas células esta inibida pelo fármaco indometacina (Carrasco-Pozo *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos apresentam, pelo menos, um anel fenólico em sua composição, com um ou mais grupos hidroxila ligados, e são classificados em não flavonoides e flavonoides (Del Rio *et al.*, 2013). Fazem parte dos não flavonoides os ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos e os estilbenos. Os ácidos hidroxibenzoicos apresentam a estrutura C6-C1, como por exemplo, o ácido gálico. Os ácidos hidroxicinâmicos, por outro lado, são compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos (C6-C3), como por exemplo, o ácido cafeico (Balasundram *et al.*, 2006; Russell & Duthie, 2011). Os estilbenos apresentam uma estrutura C6-C2-C6, e o principal representante é o resveratrol (Del Rio *et al.*, 2013).

Os flavonoides (C6-C3-C6) são compostos fenólicos que possuem 15 carbonos com dois anéis aromáticos conectados por três pontes de carbono (Figura 4). A maioria dos flavonoides ocorre naturalmente como glicosídeos e não como agliconas. As principais subclasses dos flavonoides são: flavonol, flavona, isoflavona, antocianidinas, flavanona e flavan-3-ol (Tabela 1) (Del Rio *et al.*, 2013).

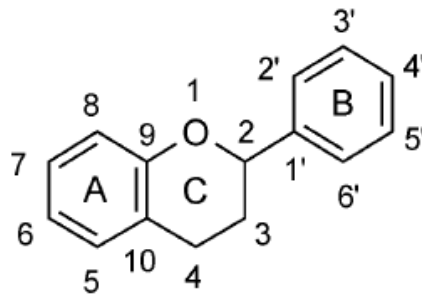
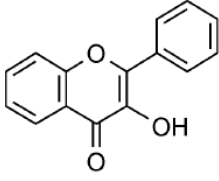
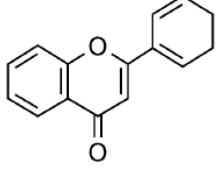
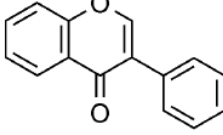
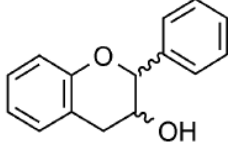
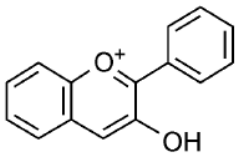
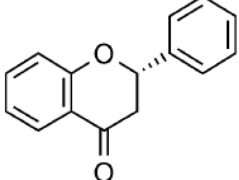


Figura 4. Estrutura do esqueleto carbonado dos flavonoides (adaptado de Del Rio *et al.*, 2013).

Os compostos flavan-3-ols, são a subclasse mais complexa de flavonoides, em virtude de apresentarem dois centros quirais em C2 e C3, o que permite a formação de isômeros como a catequina e a epicatequina. Catequina e epicatequina podem ser hidroxilados em C5' para a forma de galocatequina e epigalocatequina e também podem sofrer esterificação com o ácido gálico, por meio de estruturas complexas, incluindo as proantocianidinas oligoméricas e poliméricas, que são conhecidos como taninos condensados (Crozier *et al.*, 2009).

As catequinas estão presentes em uma grande variedade de produtos de origem vegetal como chá-verde (Manach *et al.*, 2005; Crozier *et al.*, 2009), cacau (Manach *et al.*, 2005), uva, sucos de uvas, vinho (Crozier *et al.*, 2009), chocolates (Manach *et al.*, 2005; Spadafranca *et al.*, 2009) entre outros. O chá verde (*Camellia sinensis*) não fermentado contém cerca de 80% de flavonoides e o chá preto (fermentado) cerca de 20 – 30%. As principais catequinas do chá verde são epicatequina; epicatequina-3-galato; epigalocatequina; epigalocatequina-3-galato; catequina; galocatequina e galocatequina-galato. O consumo das catequinas presentes no chá verde reduz eventos inflamatórios e agregação plaquetária, previne aterosclerose, hipertensão, disfunção endotelial, doenças isquêmicas cardíacas, cardiomiopatia, hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca congestiva.

Tabela 1. Principais classes de flavonoides, suas estruturas básicas e exemplos de cada classe (adaptado de Del Rio *et al.*, 2013; Sandoval-Acuña *et al.*, 2014).

Classe	Estrutura básica	Principais representantes
Flavonol		Quercetina, miricetina, canferol e
Flavona		Apigenina e luteonina
Isoflavona		Genisteína e daidzeína
Flavan-3-ol		Catequina e epicatequina
Antocianidinas		Cianidina, delphinidina, Petunidina
Flavanona		Hesperidina e naringenina

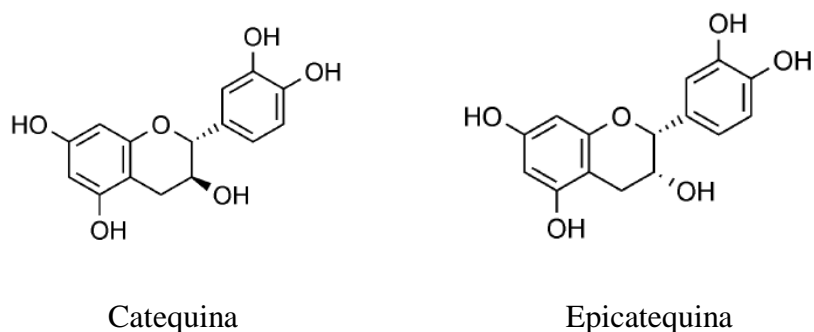


Figura 5. Estrutura química dos flavan-3-ol catequina e epicatequina (adaptado de Del Rio *et al.*, 2013).

Acredita-se que estes benefícios sejam, em parte, decorrentes da redução de danos oxidativos (Islam, 2012; Bhardwaj & Khanna, 2013). A catequina é capaz de proteger cultura de mesencéfalo de embriões de ratos de danos oxidativos induzidos por cloridrato de N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinium (MPP⁺), peróxido de hidrogênio, 4-hidroxinonenal, rotenona e 6-hidroxidopamina. Neste mesmo estudo catequina foi capaz de reestabelecer a função do complexo I mitocondrial alterada por MPP⁺ e rotenona (Mercer *et al.*, 2005). Além disso, um estudo em músculo esquelético de pacientes com diabetes tipo 2 e insuficiência cardíaca, que consumiram chocolate rico em epicatequina durante três meses, demonstrou que houve uma recuperação nos níveis de glutatona e uma diminuição dos níveis de carbonilação e nitrosilação de proteínas. No mesmo estudo, observou-se um aumento da atividade e expressão das enzimas superóxido dismutase mitocondrial e catalase. O que foi demonstrado, também, em músculo esquelético de camundongos tratados por quinze dias com epicatequina isolada (Ramirez-Sanchez *et al.*, 2013).

2.3 CÉLULAS DE MAMÍFEROS COMO MODELO DE ESTUDO PARA AVALIAÇÃO DE DANOS MITOCONDRIAIS E OXIDATIVOS

A cultura de células constitui um importante instrumento para a avaliação da atividade biológica de várias moléculas principalmente, em um momento em que a ciência busca cada vez mais métodos capazes de proporcionar a redução, o refinamento ou a substituição do uso de animais como modelos experimentais.

Com o objetivo de estimular o uso de modelos alternativos ao uso de animais, foi criada aqui no Brasil, a Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de animais (RENAMA) através da portaria nº 491, de 03 de fevereiro de 2012, do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI). Sua criação vem ao encontro do panorama internacional que fomenta e privilegia o princípio dos 3Rs. A Redução (*Reduction*) significa a obtenção de nível equiparável de informação com o uso de menos animais em experimentação; o Refinamento (*Refinement*) promove o alívio ou a minimização da dor, sofrimento ou estresse do animal utilizado na experimentação e a Substituição (*Replacement*) significa que o nível equiparável de informação é alcançado sem o uso de animais vertebrados vivos.

As células de fibroblasto de pulmão humano (MRC-5) (Figura 6) foram isoladas por Jacobs em setembro de 1966 e são derivadas de tecido pulmonar humano de feto com 14 semanas de gestação, do sexo masculino. Estas células crescem em cultura aderente, com tempo de divisão em torno de 24 horas e duplicação de tamanho da população 42-46 vezes, antes do início da senescência (Jacobs *et al.*, 1970). Esta cultura celular permite avaliar diversas atividades biológicas, entre elas, danos mitocondriais, parâmetros de estresse oxidativo e viabilidade celular.

ATCC número: CCL-171
Denominação: MRC-5

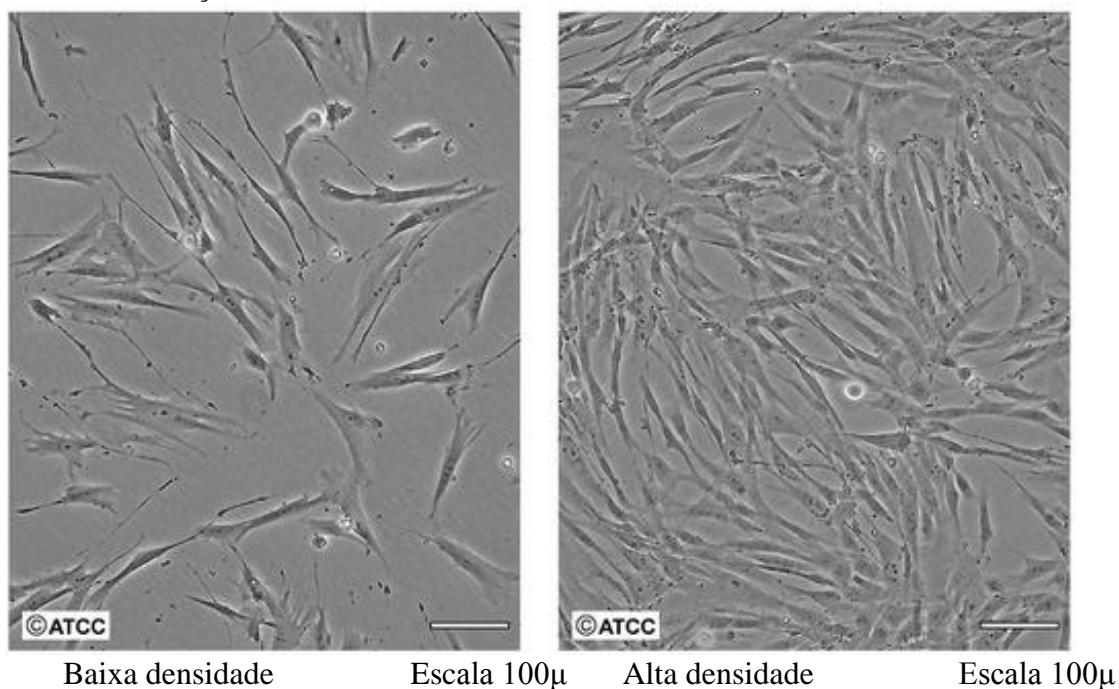


Figura 6. Microscopia da cultura de células de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5). (A) Baixa densidade de crescimento, (B) alta densidade de crescimento (adaptado de American Type Culture Collection (ATCC)).

É possível avaliar a viabilidade celular em cultura de células eucarióticas usando ensaios como o do 3-[4,5-dimetiltiazol 2-il]-2,5 difenil brometo de tetrazolina (MTT). Neste ensaio o MTT é oxidado formando cristais de formazan, sendo que a coloração formada pelo cristal de formazan é proporcional à viabilidade celular (Denizot & Lang, 1986). Além da viabilidade celular, o cultivo de células de mamíferos permite quantificar parâmetros de estresse oxidativo, como lesões aos lipídeos, proteínas e produção de óxido nítrico (Ryter *et al.*, 2007).

Os lipídeos são alvos fáceis de ER e, normalmente, aparecem oxidados em condições de estresse oxidativo. Os danos nessas macromoléculas ocorrem através de reações em cadeia, iniciando com ataque de ER e provocando um aumento da permeabilidade da membrana celular para substâncias que normalmente não atravessam a

bicamada lipídica levando a inúmeros eventos intracelulares. Entre os produtos finais da peroxidação lipídica estão os compostos de baixo peso molecular, como hidrocarbonetos e aldeídos como, por exemplo, o malondialdeído (MDA). O conteúdo de MDA formado pode lesar as proteínas e também reagir com o DNA causando danos oxidativos (Halliwell & Gutteridge, 2007). A determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é o método mais antigo e utilizado para medir a peroxidação de ácidos graxos e membranas celulares, sendo um importante indicativo dos níveis de dano oxidativo lipídico. Esse método detecta não somente o MDA, mas também outros aldeídos produzidos na lipoperoxidação (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Os danos oxidativos às proteínas podem afetar a função de receptores, enzimas, anticorpos e proteínas de transporte. A carbonilação de proteínas pode ocorrer pela oxidação direta dos aminoácidos das cadeias laterais, pela interação das proteínas com produtos finais da peroxidação lipídica, como o 4-hidroxinonal, e também através de reações de glicação (Chakravarti & Chakravarti, 2007). A reação dos grupos carbonílicos com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), formando 2,4-dinitrofenilhidrazona, tem sido bastante utilizada como método de avaliação do conteúdo de proteínas carboniladas (Levine, 1990).

Os níveis de ON^* podem ser quantificados em células de mamíferos de forma indireta pela determinação de seu produto de decomposição, o nitrito (NO_2^-), através da reação de Griess. Essa reação é composta por duas etapas nas quais o agente nitrosante trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), gerado a partir da acidificação do NO_2^- ou pela autooxidação do ON^* , reage com a sulfanilamida formando um íon diazônio que, por sua vez, interage com o *N*-(1-naftil) etilenodiamina para formar um cromóforo diazo colorido que apresenta absorção em 550 nm (Bryan & Grisham, 2007).

A atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase pode ser determinada

espectrofotometricamente, como um marcador das defesas antioxidantes em células MRC-5. A atividade da enzima superóxido dismutase pode ser determinada de forma indireta através da medida da formação do adrenocromo, resultante da auto-oxidação da adrenalina. A atividade enzimática será inversamente proporcional à formação do adenocromo (Bannister & Calabrese, 1987). A avaliação da atividade da enzima catalase baseia-se na medida da velocidade de consumo do H_2O_2 na amostra estudada. Essa determinação é diretamente proporcional à atividade enzimática e obedece a uma cinética que mede a velocidade de decomposição de H_2O_2 em diferentes intervalos de tempo (Aebi, 1984).

Além da viabilidade celular, dos danos oxidativos e das defesas enzimáticas é possível verificar a atividade mitocondrial em células MRC-5 avaliando a atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e a biossíntese de ATP. Para avaliar a atividade do complexo I podem ser utilizados kits como o “Complex I Enzyme Activity Microplate Assay Kit” da Abcam® onde NADH é oxidado a NAD^+ com a redução simultânea de um corante. A intensidade de cor observada é proporcional à atividade do complexo I. A biossíntese de ATP pode ser determinada pelo Kit de bioluminescência CellTiterGlo® da Promega (Madison, WIS, USA), onde a enzima luciferase na presença de ATP oxida o luciferin formando um composto fluorescente, cuja intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de ATP produzida pelas células.

Em vista disso, optou-se por utilizar a linhagem MRC-5 como modelo de estudo para avaliar os danos mitocondriais e oxidativos induzidos pela amiodarona. Os compostos fenólicos catequina e epicatequina, da classe dos flavan-3-ol, tem mostrado importante atividade biológica em diferentes sistemas e por isso, foram escolhidos para este estudo. Os dados obtidos neste trabalho poderão contribuir para um melhor

entendimento do efeito biológico da amiodarona e, além disso, colaborar para uma melhor compreensão dos mecanismos que podem reduzir a toxicidade deste fármaco. Embora não seja possível extrapolar os resultados de estudos em cultura de células para situações clínicas, estes dados podem ser importantes para um possível uso terapêutico.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo causados pela amiodarona em células de fibroblasto de pulmão humano (MRC-5) e a capacidade de catequina e epicatequina em minimizar estes danos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Avaliar a viabilidade (MTT) de células de fibroblasto de pulmão humano MRC-5 tratadas com amiodarona em presença e ausência de catequina e epicatequina em modelos de pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento.

3.2.2 Determinar a atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons e a biossíntese de ATP em células MRC-5 tratadas com amiodarona em presença e ausência de catequina e epicatequina.

3.2.3 Avaliar a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase em células MRC-5 tratadas com amiodarona em presença e ausência de catequina e epicatequina.

3.2.4 Verificar o dano oxidativo a lipídeos, proteínas e os níveis de óxido nítrico em células MRC-5 tratadas com amiodarona em presença, e ausência de catequina e epicatequina.

4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigo científico a ser submetido para publicação em revista internacional.

Catechin and epicatechin reduce mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by amiodarone in human lung fibroblasts.

Luciana Fernandes Silva Santos, Adriana Stolfo, Caroline Calloni, Mirian Salvador*

Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, Instituto de Biotecnologia,

Universidade de Caxias do Sul, RS 95070-560, Brazil

*Corresponding author

Abstract

Amiodarone (AMD) is among the most widely used drugs for the treatment of cardiac arrhythmias; however, it presents some adverse effects, which include pulmonary toxicity. The mechanism of AMD toxicity is not well known, but some studies suggest that mitochondrial dysfunction and oxidative stress may play a role in these adverse effects. Catechin and epicatechin are recognized as important phenolic compounds able to decrease oxidative stress. Therefore, the aim of this study was to evaluate the potential of catechin and epicatechin to modulate the mitochondrial dysfunction and oxidative damage caused by AMD in human lung fibroblast cells (MRC-5). For this purpose, the mitochondrial dysfunction was assessed through the activity of mitochondrial complex I and ATP biosynthesis. Cell viability was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Superoxide dismutase and catalase activities were evaluated spectrophotometrically. Lipid and protein oxidative stresses were determined by thiobarbituric reactive substances and protein carbonyl assays, respectively. Nitric oxide (NO) levels were evaluated using Griess reaction method. Results showed that AMD was able to inhibit the activity of mitochondrial complex I (53.0%) and ATP biosynthesis (9.5%) in MRC-5 cells. Lipid and protein oxidative

markers and cell death increased, while superoxide dismutase and catalase activities and NO production decreased in AMD treatments. Both catechin and epicatechin avoid mitochondrial dysfunction restoring the activity of mitochondrial complex I and ATP biosynthesis. Furthermore the phenolic compounds were able to restore the imbalance in superoxide dismutase and catalase activities as well as NO levels induced by AMD. Protein and lipid oxidative damage and cell death were reduced by catechin and epicatechin in AMD treated cells. These data can contribute to the understanding of the mechanisms of the AMD toxicity on human lung fibroblasts cells and the development of new therapeutic strategies to reduce the adverse effects caused by AMD.

Keywords: arrhythmia, cardiovascular disease, mitochondria, toxicity.

1. Introduction

Cardiac arrhythmias are characterized by irregular heartbeat rhythm, which could be either too slow (<60 beats/min) or too fast (>100 beats/min) [1]. Amiodarone (AMD) (Figure 1) is an antiarrhythmic agent widely used to treat cardiac arrhythmias, mainly atrial fibrillation [1]. Despite its pharmacological properties, AMD presents some adverse effects, such as thyroid dysfunction, hepatic and pulmonary toxicity. Pulmonary toxicity occurs in approximately 13% of the patients who can have an associated mortality rate of 10% to 23% [2,3]. The mechanism by which AMD causes human toxicity is not well known, but some studies in mammalian cells [4,5,6] and *in vivo* rat model [7] suggest that mitochondrial dysfunction and oxidative stress may play a role in AMD toxicity.

Mitochondria are recognized for their key role not only in ATP biosynthesis, but also in the maintenance of redox metabolism and apoptosis regulation, making this organelle a potentially therapeutic target. Disruption of mitochondrial homeostasis is

associated with an increase of reactive oxygen species (ROS), mainly in the complex I (nicotinamide adenine dinucleotide/CoQ oxidoreductase) of the mitochondrial electron transport chain. In this complex, the superoxide radical (O_2^-) is formed from electron escape, leading to decreased electron transport, reduced ATP biosynthesis, and increased oxidative stress [9].

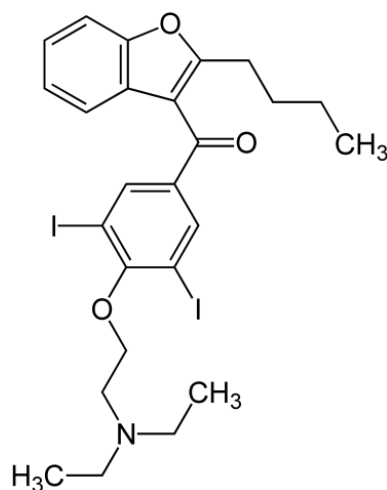


Figure 1. Chemical structure of amiodarone (adapted from [8]).

Phenolic compounds are one of the most studied and effective group of bioactive compounds [10]. Flavonoids catechin and epicatechin are among this class of compounds (Figure 2) [11]. It was already demonstrated that catechin can reduce the mitochondrial complex I inhibition induced by rotenone and N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinium hydrochloride in primary rat mesencephalic cultures [12].

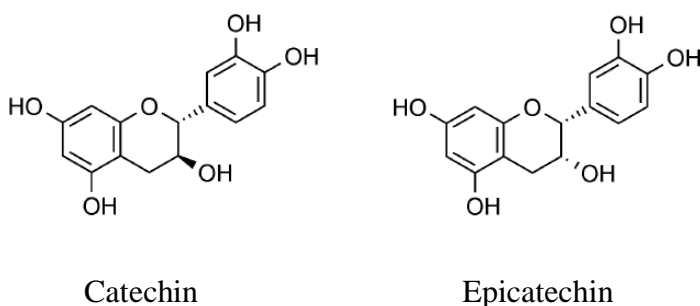


Figure 2. Chemical structures of catechin and epicatechin (adapted from [11]).

Therefore, the aim of this work was to evaluate the ability of catechin and epicatechin to minimize the mitochondrial dysfunction and oxidative damage induced by AMD in human lung fibroblasts (MRC-5).

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Amiodarone hydrochloride was obtained from Hipolabor (Brazil). Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA and penicillin-streptomycin were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). (\pm)-Catechin (CAT), (-)-epicatechin (EPI), thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents and solvents were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2. Cells culture

MRC-5 cell line was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells stocks were frozen in solution including 10% dimethyl sulfoxide. Cells were cultured in DMEM medium, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, penicillin 100UI/mL and streptomycin 100 μ g/mL. Before the assays, cells were incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ with 90% of humidity until to reach 80% of confluence. Cells of the seventh to tenth passage were used for the experiments.

2.3. Cell treatments

Initially three different models of treatment with the predefined concentrations of 100 μM of AMD were realized: (a) pre-treatment, where cells were treated for 30 minutes with CAT or EPI, washed with phosphate-buffered saline (PBS), exposed to 100 μM of AMD and incubated at 37 °C for 24 h; (b) co-treatment, where cells were treated simultaneously with CAT or EPI plus AMD 100 μM and incubated at 37 °C for 24 hours; and (c) post-treatment, where cells were treated with AMD 100 μM for 24h, washed with PBS, and then CAT or EPI were added and incubated for 30 min. Three non-cytotoxic concentrations (50, 100 and 500 μM) of CAT and EPI was used, and the viability was evaluated through MTT assay. The addition of CAT or EPI before AMD reduced cell death induced by antiarrhythmic; therefore, this condition (pre-treatment) was chosen to evaluate the effect of CAT and EPI on the modulation of the lipid and protein oxidative damage as well as levels of NO in MRC-5 cells.

For testing the activity of complex I, ATP biosynthesis, superoxide dismutase, and catalase enzymes activities, it was decided to maintain 100% cell viability, which was obtained with one hour of treatment with AMD. Thus, for these assays, the treatment time with AMD was reduced to one hour, and CAT and EPI were reduced to 5, 10, and 20 μM . Cells were treated for 30 min with CAT or EPI, washed with PBS exposed to 100 μM of AMD and incubated at 37 °C for one hour. Cells viability was evaluated through MTT assay.

2.4. MTT assay

To evaluate the cell viability, cells at a density of 1×10^5 were treated with phenolic compounds and AMD, and the MTT assay was used [13]. After the treatment, cells were washed with PBS, exposed to 1 mg/mL per well of MTT solution, and

incubated for 3 h at 37 °C. The precipitates were dissolved in 150 µL of dimethylsulfoxide per well, and the absorbance of the resultant solution was measured with a microplate reader (Victor-X3, Perkin Elmer, Finland) at 517 nm. The results were expressed as a percentage of the control.

2.5. Mitochondrial function assessment

Cells at a density of 1×10^7 were treated with phenolic compounds and AMD, washed with cold PBS, scraped and homogenized in PBS. An assay was performed using the Complex I Enzyme Activity Microplate Assay Kit (Mitoscience, Abcam, Cambridge, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as percentage of the control. To verify possible alterations in the ATP biosynthesis 5×10^4 cells/mL were treated and assayed for their ATP biosynthesis using the Cell-Titer-Glo[®] assay (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as percentage of the control.

2.6. Superoxide dismutase and catalase activities

Because mitochondrial dysfunctions can lead to a radical superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) production we also evaluated, the superoxide dismutase and catalase activities. To performed these assays, 1×10^7 cells were treated with phenolic compounds and AMD, washed with PBS, scraped, and homogenized in PBS. Cells were freeze-thawed 3 times for cell lysis. Then, the supernatants were used for both enzymatic assays. Superoxide dismutase activity was measured by the inhibition of self-catalytic adrenochrome formation rate at 480 nm, in a reaction medium containing 1 mmol/L adrenaline (pH 2.0) and 50 mmol/L glycine (pH 10.2) at 30 °C for 3 min according to [14]. Results were expressed as USod/mg of protein. One unit is defined as

the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation to 50%. Catalase activity was measured according to the method described by [15]. The assay determined the rate of H₂O₂ decomposition at 30 °C for 1 min in 240 nm. Results were expressed as UCat/mg of protein. One unit was defined as the amount of enzyme that decomposes 1 nmol of H₂O₂ in 1 min at pH 7.4. The protein concentration was determined by the Lowry method, using bovine serum albumin as the standard [16].

2.7. Oxidative stress markers

Oxidative stress assessment included the quantification of lipid and protein oxidative damage and NO production. For all assays, 1 x 10⁷ cells were treated with phenolic compounds and AMD 100uM. Cells were freeze-thawed 3 times for cell lysis. The supernatants were used for all tests.

Lipid oxidative damage was evaluated using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, according to Wills (1966) [17]. Briefly, samples containing 400 µL of cell lysates were combined with 600 µL of 15% TCA and 0.67% TBA. The mixture was heated at 100 °C for 20 min. After being cooled to room temperature, the samples were centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The supernatant fraction was isolated, and its absorbance was measured at 530 nm. 1,1,3,3-tetramethoxypropane was used as the standard, and the results were expressed as nmol of TMP/mg of protein.

Oxidative protein damage was evaluated as previously described [18]. Briefly, samples were solubilized in 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and precipitated by the addition of 20% TCA, and the absorbance was read in a spectrophotometer at 365 nm. Results were expressed as nmol DNPH/mg of protein.

The NO production was determined as nitrite (NO₂⁻), using the Griess reaction-based method described by Green (1981) [19]. Fifty µL of cell lysate was reacted with an

equal volume of Griess reagent (0.1% naphthyl ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄) for 10 min at room temperature, and the absorbance was read at 550 nm. Sodium nitroprusside was used as the standard. The results were expressed as nmol of nitrite/mg of protein. The protein concentration was determined by the Lowry method, using bovine serum albumin as the standard [16].

2.8. Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm standard derivation (SD) from at least three independent experiments. The normality of variables was evaluated by the Kolmogorov–Smirnov test. The data were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan’s multiple range test using statistics software package SPSS for Windows, V.21.0 (Chicago, IL, USA). Values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Catechin and epicatechin decrease the cell death induced by amiodarone

The results obtained in our work showed that in pre-treatment both CAT and EPI were able to reduce the cell death induced by AMD (Figure 3A). In co-treatment, only CAT (100 and 500 μ M) was capable of reducing AMD cytotoxicity (Figure 3B). The addition of CAT or EPI after AMD was not able to reverse the damage induced by AMD (Figure 3C). Therefore, the pretreatment condition was chosen for the other trials in our study.

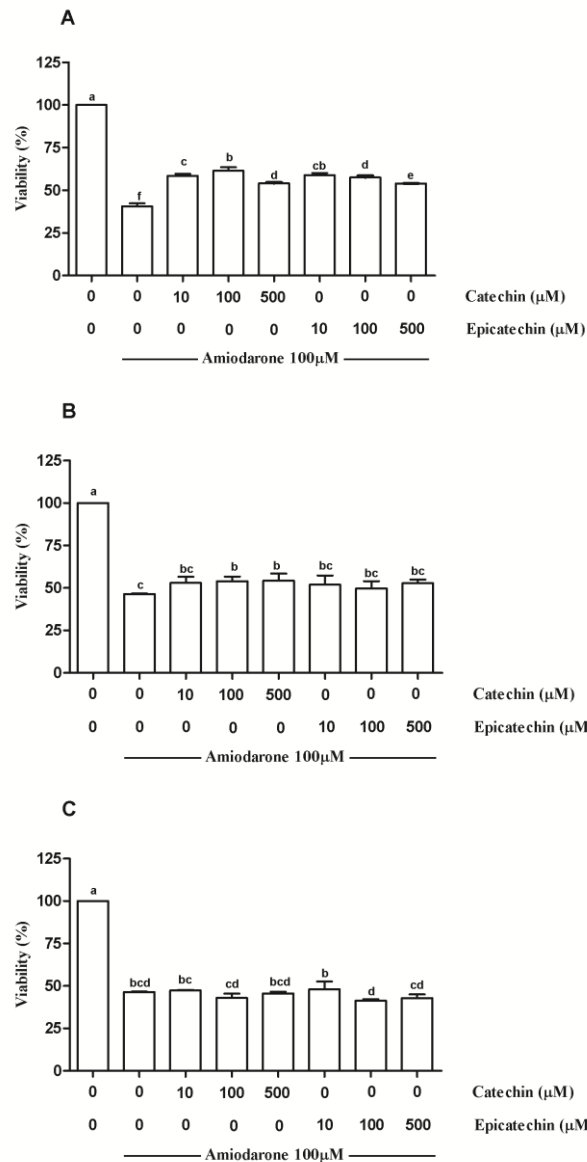


Figure 3. Viability of MRC-5 line pretreated with catechin or epicatechin for 30 min, and then amiodarone was and incubated 24 h (A); cells co-treated with catechin or epicatechin simultaneously with amiodarone and incubated for 24 h (B); cells treated with amiodarone for 24 h, and then catechin or epicatechin were added and incubated for 30 min (C). The results are expressed as mean \pm SD. Different letters indicate significantly different values according to the analysis of variance (ANOVA) and Duncan post-hot test. Statistical significance was determined at $p < 0.05$.

3.2. Mitochondrial dysfunction induced by amiodarone is avoided by both catechin and epicatechin

Mitochondrial dysfunction was evaluated through the mitochondrial complex I activity and the ATP biosynthesis in the treated cells. Amiodarone was able to reduce by 53.0% the activity of the mitochondrial complex I (Figure 4A) and by 9.5% the ATP biosynthesis (Figure 4B). These effects were completely prevented by CAT and EPI addition, at all concentrations tested (5-20 μM).

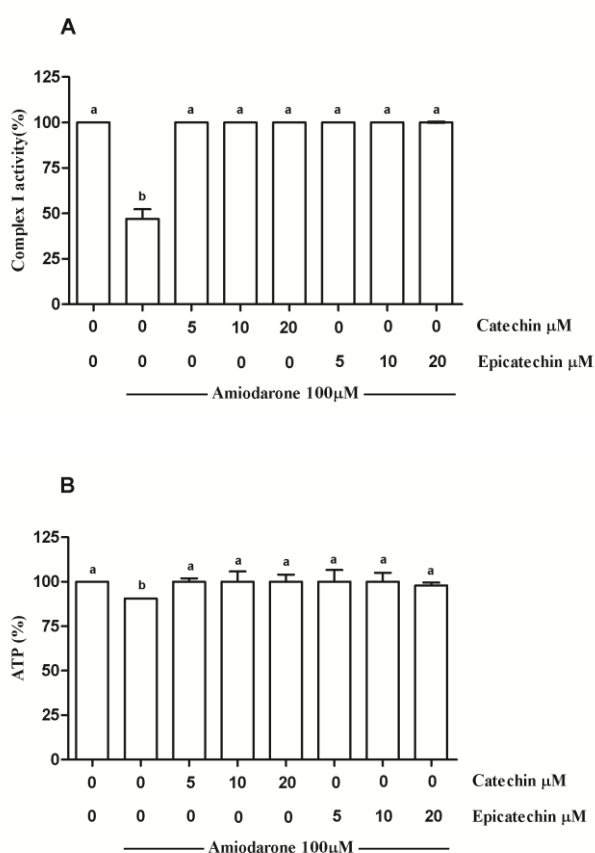


Figure. 4 Mitochondrial complex I activity (A) and ATP biosynthesis (B) of MRC-5 cells with catechin or epicatechin (5, 10, 20 μM) and AMD (100 μM). The results are expressed as the mean \pm SD. Different letters indicate significantly different values according to the analysis of variance (ANOVA) and Duncan post-hot test. Statistical significance was determined at $p < 0.05$.

3.3. MRC-5 redox metabolism is modulated by catechin and epicatechin

Considering that the mitochondrial dysfunction produces ROS, we evaluated the activities of the antioxidant superoxide dismutase and catalase enzymes, which can indicate the production of the $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 . In fact, cells treated with AMD showed a reduced activity of both enzymes. All the studied concentrations of CAT and EPI were able to minimize the depletion of superoxide dismutase and catalase activities induced by AMD (Table 1). Treatment of the MRC-5 cells with only phenolic compounds did not modify the activity of either evaluated enzyme (results not shown).

Table 1. Superoxide dismutase and catalase activities in MRC-5 cells treated with different concentrations of catechin (CAT) or epicatechin (EPI) and then 100 μ M amiodarone (AMD).

Treatments	Superoxide dismutase (USod/mg of protein)*	Catalase (UCat/mg of protein)**
Cell control	3.50 ± 0.20^b	3.66 ± 0.31^d
AMD 100 μ M	2.58 ± 0.14^a	1.79 ± 0.13^a
CAT 5 μ M + AMD	4.14 ± 0.01^c	4.63 ± 0.19^f
CAT 10 μ M + AMD	3.67 ± 0.07^b	4.33 ± 0.19^{ef}
CAT 20 μ M + AMD	3.48 ± 0.07^b	2.71 ± 0.13^b
EPI 5 μ M + AMD	3.54 ± 0.60^b	4.37 ± 0.36^e
EPI 10 μ M + AMD	4.67 ± 0.12^d	3.24 ± 0.00^{cd}
EPI 20 μ M + AMD	3.86 ± 0.10^{bc}	2.92 ± 0.23^{bc}

*One USod is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation by 50%. **One UCat is defined as the amount of enzyme that decomposes 1 mmol of H_2O_2 in 1 min at pH 7.4. The results are expressed as the mean \pm SD. Different letters indicate significantly different values for each enzyme assay according to the analysis of variance (ANOVA) and Duncan post-hot test. Statistical significance was determined at $p < 0.05$.

Reactive oxygen species can cause oxidative damage and, as expected, AMD was able to induce lipid and protein oxidative damage and reduces the NO production in MRC-5 cells. Both CAT and EPI minimize these effects at all evaluated concentrations (Table 2). Cells treated only with phenolic compounds showed neither increased oxidative damage nor changes in the NO levels (results not shown).

Table 2. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), carbonyl proteins (PC) and nitric oxid (NO) levels in MRC-5 cells treated with different concentrations of catechin (CAT) or epicatechin (EPI) and then 100 μ M amiodarone (AMD).

Treatments	TBARS (nmol of TMP/mg of protein)	PC (nmol of DNPH/mg of protein)	NO (nmol of nitrite/mg of protein)
Cell Control	5.97 \pm 0.05 ^a	2.73 \pm 0.57 ^a	3.71 \pm 0.07 ^a
AMD	12.69 \pm 0.62 ^f	6.93 \pm 0.81 ^d	2.83 \pm 0.02 ^d
CAT 10 μM + AMD	9.60 \pm 0.39 ^{bc}	4.55 \pm 0.01 ^c	2.93 \pm 0.04 ^{bc}
CAT 100 μM + AMD	10.61 \pm 0.01 ^d	4.59 \pm 0.34 ^c	2.99 \pm 0.01 ^b
CAT 500 μM + AMD	10.48 \pm 0.85 ^{cd}	3.62 \pm 0.14 ^b	2.92 \pm 0.03 ^{bc}
EPI 10 μM + AMD	9.43 \pm 1.09 ^b	3.76 \pm 0.20 ^b	2.91 \pm 0.03 ^{bc}
EPI 100 μM + AMD	10.28 \pm 0.01 ^{bcd}	3.60 \pm 0.18 ^b	2.90 \pm 0.09 ^{cd}
EPI 500 μM + AMD	11.68 \pm 0.11 ^c	4.04 \pm 0.22 ^{bc}	2.91 \pm 0.01 ^{bc}

The results are expressed as the mean \pm SD. Different letters indicate significantly different values according to the analysis of variance (ANOVA) and Duncan post-hot test. Statistical significance was determined at $p < 0.05$.

4. Discussion

The interest in phenolic compounds has grown during the last decades due to the recognition of their antioxidant properties and their probable role in the prevention of a number of pathologies associated with oxidative stress [20]. Taking into account the low bioavailability of phenolic compounds [21,22], their biological actions are likely more due to their indirect effects, e.g. by impacting signaling systems, than to their direct antioxidant effects [23]. In fact, researchers have already described how some phenolic compounds such as quercetin, resveratrol, and rutin showed the ability to reduce the mitochondrial dysfunction induced by indomethacin in Caco-2 cells [24]. Moreover, our group demonstrated that *Plinia cauliflora* polyphenolic rich extract was also able to reduce complex I inhibition and decrease the ATP biosynthesis induced by H₂O₂ in MRC-5 cells [25].

Although the exact mechanism of AMD toxicity is not completely elucidated, some studies conducted in mouse liver cells [4], hamster lung cells [5], human hepatocytes cells [6], and an *in vivo* study in a rat model [7] demonstrated that AMD can cause mitochondrial dysfunction. Therefore, our study aimed to assess whether phenolic compounds CAT and EPI could minimize mitochondrial dysfunction and oxidative damage induced by AMD in MRC-5 cells.

As observed in other models, our study showed that AMD was also able to inhibit complex I activity and ATP biosynthesis in MRC-5 cells. These effects were accompanied by an increase in lipid and protein oxidative damage and a decrease in superoxide dismutase and catalase activities, indicating the generation of the O₂⁻ and the H₂O₂ in the cells. One of the possible responses to the O₂⁻ is the reaction with NO to form peroxynitrite (ONOO⁻), which is a potent biological oxidant [26]. However, as

AMD decreased NO levels, it is likely that the oxidative damage induced by AMD is caused mainly by $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 .

Respiratory chain complex I is the most structurally complex and functionally respiratory enzyme [27, 28]. Complex I dysfunction increases $O_2^{\cdot-}$ production, which can be a substrate for superoxide dismutase originating H_2O_2 , which, in turn, can be a substrate for catalase. The $O_2^{\cdot-}$ and the H_2O_2 can also decrease complex I activity [29], which can feed a vicious cycle of complex I inhibition and maintain a state of cellular oxidative stress. Furthermore, the inhibition of complex I interferes with the biosynthesis of ATP produced by oxidative phosphorylation [30]. Among the factors able to trigger intrinsic apoptotic pathway is the decreased level of cellular ATP, depolarization of the mitochondrial inner membrane, and increased release of cytochrome C [31]. Studies have demonstrated that cytochrome C utilizes ATP to initiate the cascade of events leading to the activation of the caspases, which are the enzymatic executioners of apoptosis [32]. Therefore, the mitochondrial dysfunction induced by AMD could explain, at least, in part, MRC-5 cells death and, might, be related to the lung toxicity exhibited by this antiarrhythmic drug.

Both phenolic compounds CAT and EPI were able to avoid complex I inhibition and the decrease in the ATP biosynthesis induced by AMD in MRC-5 cells. Consequently, the formation of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 , the oxidative damage and the death of MRC-5 cells were reduced. In addition, CAT and EPI minimized the reduction in NO levels induced by AMD in MRC-5 cells (Figure 5). These results were similar for both CAT and EPI, which suggests that the chemical difference of the compounds (Figure 2) was not related to the biological effects demonstrated by CAT and EPI. A study, which evaluated the ability of CAT and EPI to scavenge the $O_2^{\cdot-}$ and reduce the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl in vitro [33], also did not observe a difference in the effect of

the two phenolic compounds. Other studies using different classes of phenolic compound would contribute to a better understanding of the relationship between structure and biological activity of these compounds.

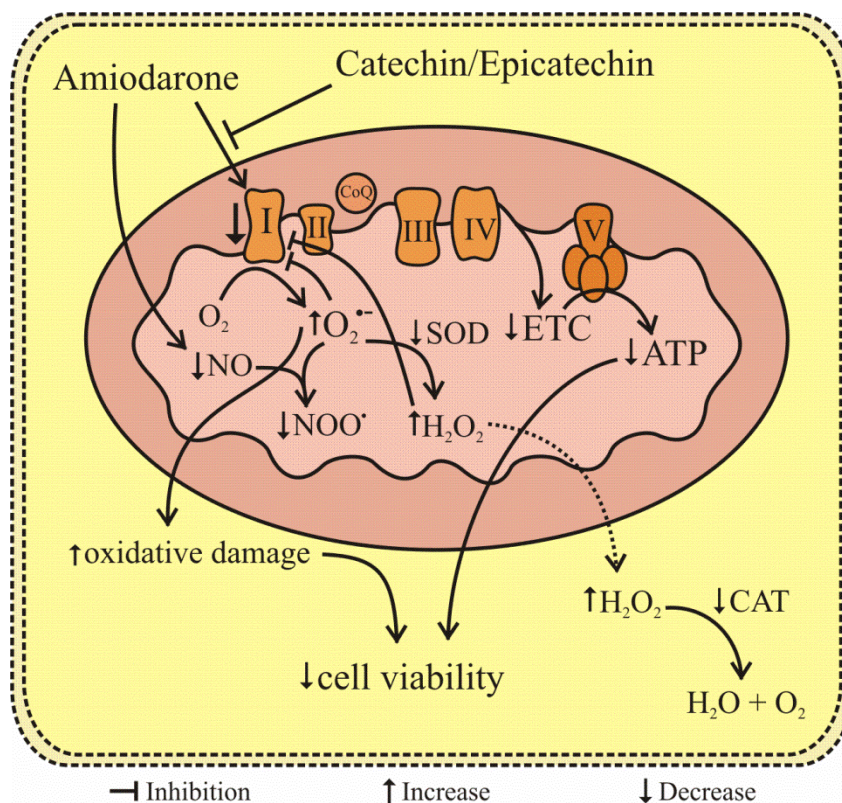


Figure 5. Effects of amiodarone, catechin and epicatechin in MRC-5 cells.

Amiodarone reduces NO levels and inhibits the complex I of the electron transport chain leading to a decrease in ATP production and an increase in oxidative damage. Catechin and epicatechin reduces these effects restoring cell viability. CAT (catalase); SOD (superoxide dismutase); ETC (electron transport chain).

The mechanism by which CAT and EPI modulate the activity of complex I is not yet fully known. However, studies have already shown that catechin, resveratrol, and quercetin [34] are capable of directly or indirectly increasing, proteins called sirtuins. These classes of molecules are mainly protein deacetylases involved in diverse cellular process and pathways, and they present different cell localization and functions. Seven

sirtuins have already been described in mammals, named SIRT1 to SIRT7. SIRT1 predominately localizes in the nucleus and regulates mitochondrial processes, stress response, cell proliferation, and apoptosis [35]. Furthermore, SIRT1 was found to be associated with vasodilation in the rat aortic endothelial cells by increasing the activity of nitric oxide synthase [36]. SIRT3 is the major mitochondrial deacetylase, and it regulates the complex I activity, keeping the electron chain functionally, and therefore the ATP biosynthesis [35]. Although, from the data obtained in our study it is not possible to say, CAT and EPI probably directly or indirectly target these sirtuins, keeping the complex I activity, ATP biosynthesis, and, consequently, the MRC-5 cell viability. It was already shown that epicatechin rich cocoa increased the expression of SIRT1 and SIRT3 in skeletal muscle of patients with type II diabetes and heart failure [23]. Other studies should be done to clarify this hypothesis and to provide perspectives for the use of sirtuins as new targets to treat AMD toxicity.

In conclusion, our data showed that the phenolic compounds CAT and EPI reduce cytotoxicity induced by AMD in MRC-5 cells. Although extrapolation of the results of cell culture studies to human clinical situations is uncertain, this is an important finding for possible therapeutic use and the development of new therapeutic agents that reduce the adverse effects of this arrhythmic drug.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Dr. Ricardo Luiz de Almeida (INCORGS-Instituto do Coração da Serra Gaúcha) for his advice. This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à

Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and from Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Luciana Fernandes Silva Santos is the recipient of a CAPES Research Fellowship and Mirian Salvador is recipient of a CNPq Research Fellowship.

5. References

- [1] D. Fu, Cardiac Arrhythmias: Diagnosis, Symptoms, and Treatments. **Cell Biochemistry and Biophysics** 73(2) (2015) 291-296. Available online in: http://link.springer.com/article_/10.1007/s12013-015-0626-4.
- [2] N. Oyama, N. Oyama, H. Yokoshiki, T. Kamishima, T. Nambu, H. Tsutsui, K. Miyasaka, Detection of Amiodarone-Induced Pulmonary Toxicity in Supine and Prone Positions. **Circulation Journal**. 69 (2005) 466-470.
- [3] WHO - NHS Centre for the Evaluation of Effectiveness of Health Care (CeVEAS). 17th Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines. Proposal for the inclusion of amiodarone as an anti-arrhythmic and/or for the treatment of chronic heart failure in the who model list of essential medicines. Geneva, 2009. Available online in: http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/17/application/amiodarone_inclusion.pdf. Accessed on 5/7/2012.
- [4] B. Fromenty, C. Fisch, A. Berson, P. Letteron, D. Larrey, D. Pessay, (Dual Effect of Amiodarone on Mitochondrial Respiration. Initial Protonophoric uncoupling Effect Followed by Inhibition of the Respiratory Chain at the Levels of Complex I and Complex II. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 255(3) (1990) 1377-1384.
- [5] M.W. Bolt, J.W. Card, W.J. Racz, J.F. Brien, T.E. Massey, Disruption of Mitochondrial Function and Cellular ATP Levels by Amiodarone and *N*-

- sethylamiodarone in Initiation of Amiodarone-Induced Pulmonary Cytotoxicity. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 298 (2001). 1280-1289.
- [6] A. Felser, K. Blum, P.W. Lindinger, J. Bouitbir, S. Krahenbuhl, Mechanisms of Hepatocellular Toxicity Associated with Dronaderone-A Comparison to Amiodarone. **Toxicological sciences**. 131(2) (2013) 480-490.
- [7] G. Serviddio, F. Bellanti, A.M. Giudetti, G.V. Gnoni, N. Capitanio, R. Tamborra, A.D. Romano, M. Quinto, M. Blonda, G. Vendemiale, E. Altomare, Mitochondrial oxidative stress and respiratory chain dysfunction account for liver toxicity during amiodarone but not dronedarone administration. **Free Radical Biology & Medicine**. 51 (2011) 2234-2242.
- [8] E. Golli-Bennour, A. Bouslimi, O. Zouaoui, S. Nouria, A. Achour, H. Bacha, Cytotoxicity effects of amiodarone on cultured cells. **Experimental and Toxicologic Pathology** 64:5 (2012) 425-430.
- [9] H. Cui, H. Kong, H. Zhang, Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. **Journal of Signal Transduction**. 2012 (2012) 1-13.
- [10] C. Sandoval-Acuña, J. Ferreira, H. Speisky, Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. **Archives Biochemistry Biophysics**. 559 (2014) 75–90.
- [11] D. Del Rio, A.R. Mateos, J.P.E. Spencer, M. Tpgnolini, G. Borges, A. Crozier. Dietary (Poli)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox signaling**. 18 (14) (2013) 1818-1892.

- [12] L.D. Mercer, B.L. Kelly, M.K. Horne, P.M. Beart, Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. **Biochemical Pharmacology**. 69 (2005) 339–345.
- [13] F. Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**. 89(2) (1986) 271-7.
- [14] J.V. Bannister, L., Calabrese Assays for Sod. **Methods of Biochemical Analysis**. 32 (1987) 279-312.
- [15] H. Aebi, Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**. 105 (1984) 121-126.
- [16] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. 193 (1951) 265-275.
- [17] E.D. Wills, Mechanism of lipid peroxidation formation in animal tissues. **Biochemical Journal**. 3 (1966) 667-676.
- [18] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, E.R. Stadtman, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymology**. 186 (1990) 464–478.
- [19] L.C. Green, S.R. Tannenbaum, P. Goldman, Nitrate synthesis in the germ free and conventional rat. **Science**. 212 (1981) 56–58.
- [20] AN. Li, S. Li, YJ. Zhang, XR. Xu, YM. Chen, HB. Li, Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. **Nutrients**. 6 (2014). 6020-6047.
- [21] A. Crozier, I.B. Jaganath, N. Clifford, Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**. 26(8) (2009) 965-1096.
- [22] S. Wiese, T. Esatbeyoglu, P. Winterhalter, H. Kruse, S. Winkler, A. Bub, S.E. Kulling, Comparative biokinetics and metabolism of pure monomeric, dimeric, and polymeric flavan-3-ols: A randomized cross-over study in humans. **Molecular**

- Nutrition and Food Research.** Germany. (2014). 610-621. Available online in <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201400422/epdf>.
- [23] I. Ramirez-Sanchez, P.R. Taub, T.P. Ciaraldi, L. Nogueira, T. Coe, G. Perkins, M. Hogan, A.S. Maisel, R.R. Henry, G. Ceballos, F. Villarreal, (-)-Epicatechin rich cocoa mediated modulation of oxidative stress regulators in skeletal muscle of heart failure and type 2 diabetes patients. **International Journal of Cardiology.** 168 (2013) 3982–3990.
- [24] C. Carrasco-Pozo, M.L. Mizgier, H. Speisky, M. Gotteland, Differential Protective effects of quercetin, resveratrol, rutin and epigallocatechin gallate against mitochondrial dysfunction induced by indomethacin in Caco-2 cells. **Chemico-Biological Interactions.** 195 (2012) 199-205.
- [25] C. Calloni, R. Dall Agnol, L.S. Martínez, F.S. Marcon, S. Moura, M. Salvador, Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC-5). **Food Research International.** 70 (2015) 15-22.
- [26] H. P. Indo, H. Yen, I. Nakanishi, K. Matsumoto, M. Tamura, Y. Nagano, H. Matsui, O. Gusev, R. Cornette, T. Okuda, M. Minamiyama, H. Ichikawa, S. Suenaga, M. Oki, T. Sato, T. Ozawa, D.K. St. Clair, H.J. Majima, A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition .** 56(1) (2014) 1–7.
- [27] U. Fendel, M.A. Tocilescu, S. Kerscher, U. Brandt. Exploring the inhibitor binding pocket of respiratory complex I. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1777 (2008) 660–665.
- [28] M. Verkhovskaya, D.A. Bloch, Energy-converting respiratory Complex I: On the way to the molecular mechanism of the proton pump. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** 45(2) (2013) 491-511.

- [29] G.C. Brown, V. Borutaite, Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1658 (2004) 44-49.
- [30] A. Goldstein, L.A. Wolfe, The Elusive Magic Pill: Finding Effective Therapies for Mitochondrial Disorders. **Neurotherapeutics**. 10 (2013) 320–328.
- [31] K. Cosentino, A.J. García-Sáez, Mitochondrial alterations in apoptosis. **Chemistry and Physics of Lipids**. 181 (2014) 62-75.
- [32] S. Xiong, T. Tianyang, G. Wang, X. Jiang, Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. **Protein & Cell**. 5(10) (2014) 737–749.
- [33] F. Nanjo, M. Mori, K. Goto, Y. Hara, Radical Scavenging Activity of Tea Catechins and Their Related Compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 63(9) (1999) 1621-1623.
- [34] S. Chung, H. Yao, S. Caito, J. Hwang, G. Arunachalam, I. Rahman, Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 501 (2010) 79-90.
- [35] Dang, W. (2014). The controversial world of sirtuins. **Drug Discovery Today: Technologies Epigenetics**. 12: 9-17
- [36] I. Mattagajasingh, CS. Kim, A. Naqvi, T. Yamamori, T.A. Hoffman, SB. Jung, J. DeRicco, K. Kasuno, K. Irani, SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 104(37) (2007) 14855–14860.

5. DISCUSSÃO GERAL

De todas as arritmias cardíacas existentes, a que ocorre com maior frequência é a FA. Embora não existam dados recentes, em 2009 (Zimmerman *et al.*, 2009) estimou-se que nos EUA existiam 2,2 milhões de pacientes, na Europa 4,5 milhões e no Brasil em torno de 1,5 milhões de pessoas portadoras de FA. Pacientes portadores de FA possuem maior risco de desenvolver AVC e insuficiência cardíaca. De fato, a taxa de mortalidade em pacientes com FA é duas vezes maior do que a observada em pacientes com ritmo cardíaco normal (Zimmerman *et al.*, 2009).

Um dos fármacos antiarrítmicos mais utilizados para o tratamento da FA é a amiodarona (Albayrak *et al.*, 2009). Entre os diversos efeitos adversos causados pela amiodarona, estão o dano hepático e a toxicidade pulmonar, que podem levar a necessidade de interrupção do tratamento (Goldschlager *et al.*, 2007; Nacca, 2012). A toxicidade pulmonar inclui a fibrose pulmonar, a pleurite e a bronquiolite obliterante com pneumonia em organização (WHO-NHS, 2009), a toxicidade pulmonar pode ocorrer em até 13% dos pacientes (Oyama *et al.*, 2005) e ocasiona a morte em 10 a 23% dos casos (WHO-NHS, 2009). O mecanismo pelo qual a amiodarona causa toxicidade pulmonar ainda não é completamente conhecido, porém, alguns estudos demonstraram que a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo podem estar relacionados a esta toxicidade (Fromenty *et al.*, 1990; Bolt *et al.*, 2001; Felser *et al.*, 2013).

Considerando o exposto acima, torna-se importante estudar o mecanismo de toxicidade da amiodarona, bem como, compostos que apresentem potencialidade de minimizar os efeitos adversos induzidos por este medicamento. Em vista disso, este trabalho avaliou a disfunção mitocondrial e os danos oxidativos induzidos pela

amiodarona em células MRC-5, e a capacidade dos compostos fenólicos catequina e epicatequina de reverter estes danos.

A disfunção mitocondrial causada pela amiodarona nas células MRC-5 foi avaliada através da medida da atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons e da biossíntese de ATP. Para este ensaio, células MRC-5 foram pré-tratadas com catequina ou epicatequina durante 30 minutos e, após lavagem das células, adicionadas de amiodarona por 60 minutos. Este tempo foi escolhido a fim de manter a viabilidade celular em 100%. Verificou-se que a amiodarona inibiu o complexo I da cadeia de transporte de elétrons em 53% e diminuiu a produção de ATP em 9,5%. Estes resultados estão de acordo com outros estudos, onde a amiodarona inibiu o complexo I da cadeia de transporte de elétrons e diminuiu a produção de ATP em mitocôndrias de fígado de ratos (Fromenty *et al.*, 1990); células de pulmão de hamster (Bolt *et al.*, 2001); hepatócitos humanos (Felser *et al.*, 2013); e em modelos *in vivo* utilizando-se ratos (Serviddio *et al.*, 2011).

A maior fonte endógena de geração de ER é a mitocôndria, onde o $O_2^{\cdot-}$ é formado a partir do escape de elétrons da cadeia de transporte de elétrons, principalmente nos complexos I e III. Estudos têm demonstrado que a diminuição da atividade dos complexos I e III leva a um aumento na geração de $O_2^{\cdot-}$ (Kussmaul & Hirst, 2006). O $O_2^{\cdot-}$ é substrato da enzima superóxido dismutase gerando oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, o qual pode sofrer ação da catalase, gerando água e oxigênio molecular. Em vista disso, em nosso trabalho foram avaliadas as atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase, as quais mostraram-se reduzidas após tratamento com amiodarona, indicando um aumento na geração de ER pelo medicamento.

As ER podem causar danos a biomoléculas, como os lipídeos, que são especialmente suscetíveis à oxidação, principalmente aqueles encontrados na membrana

plasmática e na membrana de organelas intracelulares. A oxidação destas moléculas leva à formação e ao acúmulo de produtos da peroxidação lipídica, os quais podem ser quantificados através do ensaio de TBARS, um teste amplamente utilizado como marcador de dano estresse oxidativo (Ogino & Wang, 2007; Mangialasche *et al.*, 2009). Células tratadas com amiodarona apresentaram maior índice de dano a lipídeos, de forma semelhante ao observado por Golli-Bennour *et al.* (2012) em linhagens celulares de carcinoma hepatocelular (HepG₂), células epiteliais (EAhy) e células obtidas a partir de veia de cordão umbilical (A549). Além dos lipídeos, as proteínas também são facilmente oxidadas pelas ER, podendo sofrer o ataque direto das ER ou por interação com os produtos da oxidação lipídica (Chakravarti & Chakravarti, 2007). Os resultados mostraram que, assim como observado para os lipídeos, a amiodarona aumentou o dano a proteínas nas células MRC-5.

O ON[•] é um radical livre endógeno, produzido por isoformas da enzima óxido nítrico sintase, através da oxidação da L-arginina a L-citrulina (Quincozes-Santos *et al.*, 2013). Em concentrações elevadas, o ON[•] pode ser convertido a outros derivados mais reativos, produzidos através das reações do ON[•] com o O₂, O₂^{•-} e com o H₂O₂. Essas ER podem oxidar/nitrar outras moléculas ou serem decompostas e produzir outras ER (Calcerrada *et al.*, 2011). Os resultados obtidos em nosso trabalho demonstraram que amiodarona reduziu, significativamente, os níveis de óxido nítrico nas células MRC-5.

Durante décadas, os compostos fenólicos têm sido considerados excelentes antioxidantes e associados à redução da incidência de uma série de doenças vinculadas a danos oxidativos, como aterosclerose, doenças neurodegenerativas, câncer e diabetes (Sandoval-Acunã *et al.*, 2014). Este conceito surgiu a partir da constatação da capacidade dos compostos fenólicos de reduzirem ER e quelar metais de transição, capazes de participar das reações de Haber-Weiss e Fenton (Halliwell & Gutteridge,

2007). No entanto, na última década este conceito vem sendo questionado. Os compostos fenólicos são pouco absorvidos (Manach *et al.*, 2005; Spadafranca *et al.*, 2009), formam um número significativo de metabólitos e tem sido detectados em concentrações séricas muito baixas (nanomolar). Estas concentrações são, estequiometricamente, incompatíveis com as que seriam necessárias para reações diretas com ER e/ou quelação de metais *in vivo*. Apesar disso, a literatura científica continua mostrando os efeitos dos compostos fenólicos na redução de danos oxidativos *in vivo* (Lotito *et al.*, 2006). Estes efeitos, denominados por alguns autores de indiretos, vem sendo explicados pela capacidade destes compostos de regularem vias metabólicas, modular fatores de transcrição, promover alterações epigenéticas e, principalmente, pelos efeitos mitocondriais, como regulação da biogênese, produção de ATP e apoptose (Ramirez-Sanchez *et al.*, 2013; Sandoval-Acuña *et al.*, 2014).

Em nosso trabalho foram estudados os compostos fenólicos catequina e epicatequina, dois isômeros da classe flavan-3-ol, amplamente encontrados em alimentos e cuja atividade antioxidante já está bem descrita. O tratamento, tanto com catequina como epicatequina evitou em 100% a inibição do complexo I e a diminuição da produção de ATP causada pela amiodarona nas células MRC-5. Estes resultados corroboram os obtidos por Carrasco-Pozo *et al.* (2012), onde outro composto fenólico, a quercetina, reverteu a inibição do complexo I e aumentou a produção de ATP em células epiteliais de intestino humano (Caco-2) diminuída pela indometacina.

Tanto a catequina como a epicatequina modularam a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, reduzidas pelo tratamento com amiodarona, indicando redução de ER nas células MRC-5. Resultados semelhantes foram obtidos por Ramirez-Sanchez *et al.* (2013) em pacientes com diabetes tipo II e insuficiência cardíaca suplementados durante três meses com doses diárias de chocolate preto (equivalentes à

100 mg de epicatequina), os quais apresentaram aumento da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase e diminuição da geração de ER.

Em resumo, verificou-se que os compostos fenólicos catequina e epicatequina foram capazes de evitar a inibição do complexo I, minimizar a redução na biosíntese de ATP e a produção de ER provocada pela amiodarona. Em consequência, o dano oxidativo a lipídeos e proteínas foi reduzido e a viabilidade das células MRC-5 foi aumentada. Não foi observada diferença nos resultados obtidos com a utilização dos dois isômeros, sugerindo que a posição dos substituintes de C2 e C3 não está relacionada com os efeitos biológicos estudados em nosso trabalho. Estes resultados estão de acordo com o relatado por Nanjo *et al.* (1999), onde não foi observada diferença na habilidade da catequina e epicatequina em varrer o ânion superóxido e reduzir o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

Os ensaios de viabilidade (MTT) demonstraram que a catequina e a epicatequina foram capazes de reduzir, significativamente, os danos causados pela amiodarona no modelo de pré-tratamento. No entanto, os resultados diferiram nos modelos de co-tratamento e pós-tratamento, indicando que os compostos fenólicos necessitam estar presentes no meio celular antes da adição da amiodarona. Resultados semelhantes foram observado por Deng *et al.* (2014) em estudos onde o co-tratamento com epigalocatequina não alterou a viabilidade celular diminuída pela amiodarona em células de hepatócitos de ratos. Cabe ressaltar ainda, que os efeitos biológicos apresentados pela catequina e epicatequina puderam ser observados mesmo em concentrações (10 μM) de catequina e epicatequina dez vezes inferiores às de amiodarona (100 μM). Embora a extrapolação dos resultados de estudos em cultura de células para situações clínicas algumas vezes não seja linear, estes dados podem ser importantes para um possível uso terapêutico. Neste sentido, cabe mencionar que as catequinas são pouco absorvidas em humanos (Crozier *et*

al., 2009; Wiese *et al.*, 2014) e a sua biodisponibilidade deve ser melhorada a fim de otimizar seus possíveis benefícios farmacológicos.

O mecanismo pelo qual a amiodarona diminui a atividade do complexo I da cadeia de mitocondrial ainda não é totalmente conhecido. Por outro lado, sabe-se que alguns compostos fenólicos são capazes de aumentar, direta ou indiretamente a atividade e/ou expressão de sirtuínas. Estas proteínas são predominantemente desacetilases de histonas, amplamente distribuídas e que regulam uma expressiva variedade de processos fisiopatológicos, incluindo biossíntese de ATP por fosforilação oxidativa, metabolismo redox, apoptose/proliferação celular. Atualmente, são conhecidas sete sirtuínas: SIRT1 a SIRT7. SIRT1 está localizada no núcleo e controla a função mitocondrial, sobrevivência, apoptose e resposta ao estresse, entre outras. SIRT3 está localizada na mitocôndria e controla o metabolismo redox, o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa (Tabela 2) (Chung *et al.*, 2010; Dang, 2014). Já foi demonstrado que a epigallocatequina galato, epicatequina galato, quercetina e resveratrol (Boer *et al.*, 2006) podem aumentar, indiretamente, a expressão de SIRT1. Extratos ricos em compostos fenólicos de *Aronia melanocarpa* mostraram-se capazes de aumentar a expressão tanto de SIRT1 quanto de SIRT3 (Kim *et al.*, 2013). Além disso, observou-se que a suplementação com cacau (rico em epicatequina) modulou a expressão de SIRT 1 e a atividade de SIRT 3 em músculo esquelético de pacientes com insuficiência cardíaca e diabetes tipo 2, ocasionando modificações na atividade/expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, conforme esquematizado na Figura 7 (Ramirez-Sanches *et al.*, 2013). Embora outros estudos sejam necessários, cada vez mais, as sirtuínas são apontadas como possíveis alvos terapêuticos para o tratamento de doenças associadas à disfunção mitocondrial (Srivastava & Haigis, 2011).

Tabela 2. Resumo das funções das sirtuínas em células de mamíferos (adaptado de Dang, 2014).

	Localização	Função molecular e celular
SIRT 1	Núcleo	Regulação mitocondrial, sinalizador de insulina, tumorigênese, apoptose, proliferação e sobrevivência celular, regeneração tecidual, diferenciação e resposta ao estresse.
SIRT 2	Citoplasma	Mitose, mielinização e regeneração nervosa, envelhecimento cerebral, diferenciação de adipócitos, integridade genômica, catabolismo oxidativo.
SIRT 3	Mitocôndria	Oxidação de ácidos graxos, ciclo dos ácidos tricarboxílicos, fosforilação oxidativa, estresse oxidativo.
SIRT 4	Mitocôndria	Oxidação de ácidos graxos, ciclo dos ácidos tricarboxílicos.
SIRT 5	Mitocôndria	Ciclo da ureia
SIRT 6	Núcleo	Estabilidade do genoma, silenciamento dos telômeros
SIRT 7	Nucléolo	Transcrição do DNA ribossômico.

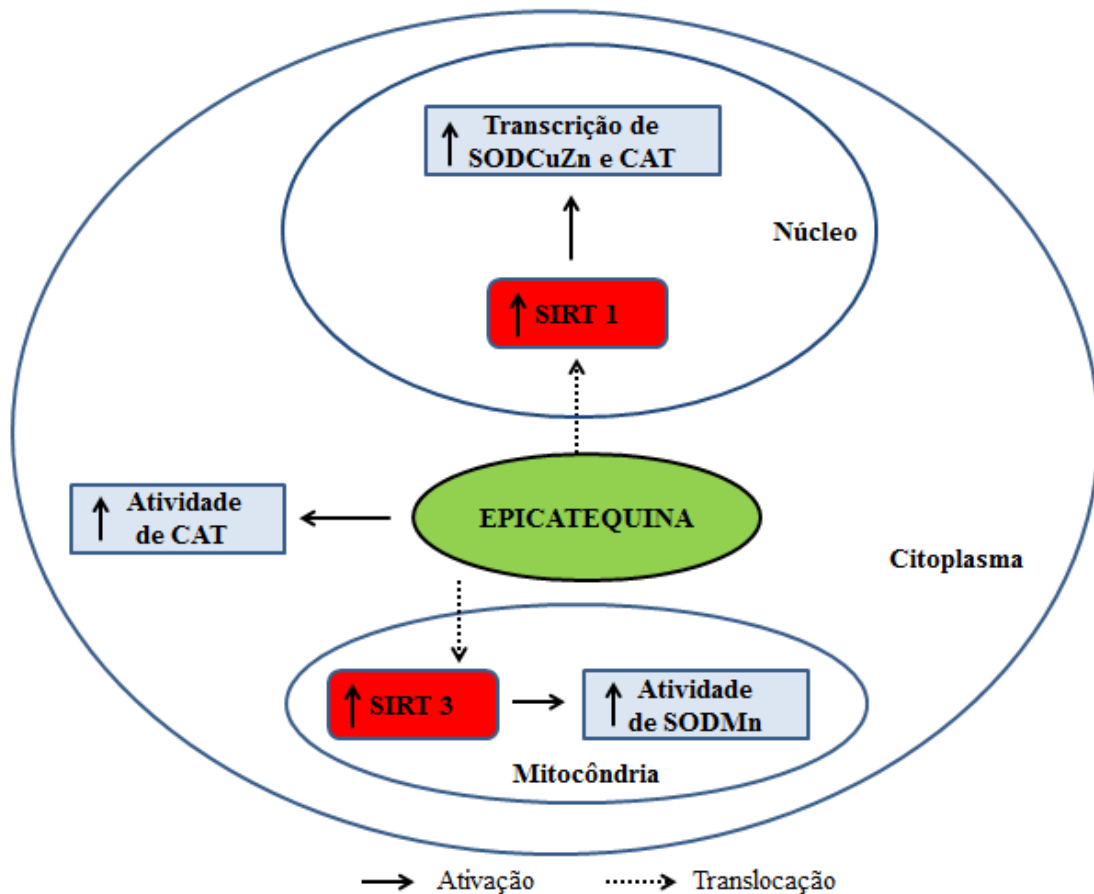


FIGURA 7. Resumo de eventos moleculares, já propostos, que participam na regulação do estresse oxidativo tecidual em amostras de músculo esquelético de humanos e/ou de camundongos tratados com epicatequina. SIRT1 (sirtuina nuclear); SIRT3 (sirtuina mitocondrial); SODCuZn (superóxido dismutase citoplasmática); SODMn (superóxido dismutase mitocondrial); CAT (catequina) (adaptado de Ramirez-Sanches *et al.*, 2013).

Este estudo mostrou, pela primeira vez, que, nas condições testadas, os compostos fenólicos catequina e epicatequina são capazes de minimizar os efeitos induzidos pela amiodarona nas mitocôndrias de células MRC-5. Este efeito é acompanhado pela redução de estresse oxidativo e, conseqüentemente, da morte celular. Estas informações podem colaborar para o melhor entendimento dos mecanismos associados à toxicidade da amiodarona e da descoberta de possíveis compostos com potencialidade terapêutica.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- 6.1 A amiodarona causou a inibição do complexo I da cadeia de transporte de elétrons e reduziu a produção de ATP nas células MRC-5.
- 6.2 A atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase foi reduzida pela amiodarona nas células MRC-5.
- 6.3 A amiodarona provocou danos a lipídeos e proteínas e causou a morte celular nas células MRC-5.
- 6.4 Os níveis de óxido nítrico foram reduzidos pela amiodarona nas células MRC-5.
- 6.5 Catequina e epicatequina evitaram os danos mitocondriais e minimizaram a depleção da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase causados pela amiodarona nas células MRC-5.
- 6.6 Os danos a lipídeos e proteínas, bem como a morte celular induzidos pela amiodarona, foram reduzidos pela catequina e epicatequina nas células MRC-5.
- 6.7 Catequina e epicatequina aumentaram os níveis de óxido nítrico diminuídos pela amiodarona nas células MRC-5.

7. PERSPECTIVAS

Como continuidade deste trabalho, seria importante:

- 7.1 Avaliar a atividade dos complexos II, III e IV da cadeia de transporte de elétrons, a expressão de subunidades dos complexos, e o potencial de membrana, em células MRC-5 tratadas com amiodarona em presença, e ausência de compostos fenólicos.
- 7.2 Determinar a atividade de caspases e apoptose em células MRC-5 tratadas com amiodarona em presença, e ausência de compostos fenólicos.
- 7.3 Avaliar o mecanismo de toxicidade e de sua prevenção do metabólito da amiodarona, N-desetilamiodarona, em células MRC-5 tratadas com amiodarona em presença, e ausência de compostos fenólicos.
- 7.4 Determinar a expressão da sirtuina1 e sirtuina 3 e de seus fatores de transcrição em células MRC-5 tratadas com amiodarona em presença, e ausência de compostos fenólicos.
- 7.5 Estudar outros compostos fenólicos a fim de relacionar estrutura química e atividade biológica.

8. REFERÊNCIAS

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.** 105:121-126.
- Albayrak, F.; Bayir, Y.; Halici, C.; Kabalar, E.; Bayram, E.; Ozturk, C.; Suleyman, H.; Keles, M.S.; Kurt, M.; Bakan E.(2009). Preventive effect of Amiodarone During Acute Period in Isoproterenol-Induced Myocardial Injury in wistar rats. **Cardiovasc. Toxicology.** 9:161-168.
- Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity occurrence, and potential uses. **Food Chemistry.** 99: 191-203.
- Bannister, J.V.; Calabrese, L. (1987). Assays for Sod. **Methods Biochem Analysis.** 32:279-312.
- Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals Botany.** 91:179-194.
- Boer, V.C.J.; Goffau, M.C.; Arts, I.C.W.; Hollman, P.C.H.; Keijer, J. (2006). SIRT1 stimulation by polyphenols is affected by their stability and metabolism. **Mechanisms of Ageing and Development.** 127:618–627.
- Bolt, M.W.; Card, J.W.; Racz, W.J.; Brien, J.F.; Massey, T. E. (2001). Disruption of Mitochondrial Function and Cellular ATP Levels by Amiodarone and *N*-sethylamiodarone in Initiation of Amiodarone-Induced Pulmonary Cytotoxicity. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** 298: 1280-1289.
- Bhardwaj, P.; Khanna, D. (2013). Green tea catechins: defensive role in cardiovascular disorders. **Chinese Journal of Natural Medicines.** 11(4):345-353.
- Branco, C.S.; Lima, E.D.; Rodrigues, T.S.; Scheffel, T.B.; Scola, G.; Laurino, C.C.F.C.; Moura, S.; Salvador, M. (2015). Mitochondria and redox homoeostasis as

- chemotherapeutic targets of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze in human larynx HEP-2 cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**. 231:108–118.
- Bryan, N.S.; Grisham, M.B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology & Medicine**. 43(5):645–657.
- Calcerrada, P., Peluffo, G., & Radi, R. (2011). Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. **Current Pharmaceutical Design**. 17(35):3905-3932.
- Calloni, C.; Dall Agnol, R.; Martínez, L.S.; Marcon, F.S.; Moura, S.; Salvador, M. (2015). Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC-5). **Food Research International**. 70:15-22.
- Card, J.W.; Racz W.J.; Brien, J.F.; Massey, T.E.(2003) Attenuation of amiodarone-induced pulmonary fibrosis by vitamin E is associated with suppression of transforming growth factor- β_1 gene expression but not prevention of mitochondrial dysfunction. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 304:277-283.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food mical Toxicology**. 51: 15–25.
- Carrasco-Pozo, C.; Gotteland, M.; & Speisky, H. (2011). Apple peel polyphenol extract protects against indomethacin-induced damage in Caco-2 cells by preventing mitochondrial Complex i inhibition. **J. Agric. Food Chem.**, 59(21), 11501–11508.
- Carrasco-Pozo, C.; Mizgier, M.L.; Speisky, H; Gotteland, M. (2012). Differential protective effects of quercetin, resveratrol, rutin and epigallocatechin gallate against mitochondrial dysfunction induced by indomethacin in Caco-2 cells. **Chemico-Biological Interactions**. 195:199-205.

- Chakravarti, B.; Chakravarti, D.N. (2007). Oxidative modification of proteins: age-related changes. **Gerontology**. 53:128-139.
- Che, R.; Yuan, S.; Zhang, A. (2014). Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. **American physiological society**. 306: F367-F378.
- Chung, S.; Yao, H.; Caito, S.; Hwang, J.; Arunachalam, G.; Rahman, I. (2010). Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 501: 79–90.
- Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**. 26(8):965-1096.
- Deavall, D.J.; Martin, E.A.; Horner, J.M.; Roberts, R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. (2012). **Journal of Toxicology**. Disponível (online) <http://dx.doi.org/10.1155/2012/645460>.
- Dang, W. (2014). The controversial world of sirtuins. **Drug Discovery Today: Technologies Epigenetics**. 12: 9-17.
- Del Rio, D.; Mateos, A.R.; Spencer, J.P.E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. (2013) Dietary (Poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox signaling**. 18(14): 1818-1892.
- Deng, X.; Shen, C.; Meng, Q. (2014) Screening of herbal components for attenuating amiodarone-induced hepatotoxicity on gel-entrapped rat hepatocytes. **Drug and Chemical Toxicology**. 37(1): 100–106.
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**. 89(2): 271–7.

- Felser, A.; Blum, K; Lindinger, P.W.; Bouitbir, J.; Krahenbuhl, S. (2013). Mechanisms of Hepatocellular Toxicity Associated with Dronaderone-A Comparison to Amiodarone. **Toxicological sciences**. 131(2):480-490.
- França, F.F.A.C. (2015). Dicionário Terapêutico Guanabara. (2015-2016) ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**. 201 (8): 1203-1209.
- Fromenty, B.; Fisch, C; Berson, A; Letteron, P.; Larrey, D.; Pessay, D. (1990). Dual Effect of Amiodarone on Mitochondrial Respiration. Initial Protonophoric uncoupling Effect Followed by Inhibition of the Respiratory Chain at the Levels of Complex I and Complex II. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 255(3):1377-1384.
- Fu, D.G. (2015). Cardiac Arrhythmias: Diagnosis, Symptoms, and Treatments. **Cell Biochem Biophys**. Disponível (online) <http://link.springer.com/article/10.1007/s12013-015-0626-4> (29 de julho).
- Fuchs, F.D.; Wannmacher, L. (2010). Farmacologia Clínica - Fundamentos da Terapêutica Racional. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 876-889.
- Garg, J.; Agrawal, N.; Marballi, A.; Agrawal, S.; Rawat, N., Sule, S.; Lehrman, S. G.(2012). Amiodarone induced pulmonary toxicity: An unusual response to steroids. **American Journal of Case Reports**. 13:62-65.
- Goldschlager, N.; Epstein, A. E.; Naccarelli, G.V.; Olshansky, B.; Singh, B.; Collard, H.R.; Murphy, E. (2007). A Practical Guide for Clinicians Who Treat Patients with Amiodarone. **Heart Rhythm Society**. (4) 9: 1250-1259.

- Golli-Bennour, E.E.; Bouslimi, A.; Zouaoui, O.; Nouira, S.; Achour, A.; Bacha, H. (2012). Cytotoxicity effects of amiodarone on cultured cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**. 64:425-430.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. C. (2007). **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed. New York :Oxford.
- Han, T.S.; Williams, G.R.; Vanderpump, M. P. J. (2009). Benzofuran derivatives and the thyroid. **Clinical Endocrinology**. 70:2–13.
- Herendael, H.V. & Dorian, P. Amiodarone for the treatment and prevention of ventricular fibrillation and ventricular tachycardia. (2010). **Vascular Health and Risk Management**. 6: 465-472.
- Islam, M.A. (2012). Cardiovascular effects of green tea catechins: progress and promise. **Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery**. 7:88-99.
- Jabrocka-Hybel, A.; Bednarczuk, T.; Bartalena, L.; Pach, D.; Ruchała, M.; Kamiński, G.; Kostecka-Matyja, M.; Hubalewska-Dydejczyk, A. (2015). Amiodarone and the thyroid. **Endokrynologia Polska**.66(2):176-196.
- Jacobs, J.P.; Jones, C.M.; Baille, J.P. (1970). Characteristics of a Human Diploid Cell Designated MRC-5. **Nature**. 227: 168-170.
- Kim, B.; Park, Y.; Wegner, C.J.; Bolling, B.W.; Lee, J. (2013). Polyphenol-rich black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extract regulates the expression of genes critical for intestinal cholesterol flux in Caco-2 cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 24: 1564–1570.
- Kussmaul, L. & Hirst, J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. **PNAS**, 103 (20): 7607–12.

- Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymology**. 186: 464–478.
- Lobo, V.; Phatak, A.; Chandra, N. (2010). Free radicals and functional foods: impact on human health. **Pharmacognosy Review**. 4 (8): 118–126.
- Lotito, S.B.; Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? **Free Radical Biology & Medicine**. 41(12):1727–1746.
- Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **American Journal of Clinical Nutrition**. 8: 230-242.
- Mangialasche, F.; Polidori, M. C.; Monastero, R.; Ercolani, S.; Camardad, C.; Cecchetti, R.; Mecocci, P. (2009). Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Ageing Research Reviews**. 8: 285–305.
- Mercer, L. D.; Kelly, B. L.; Horne, M. K.; Beart, P. M. (2005). Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. **Biochemical Pharmacology**. 69:339–345.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**. 417, 1–13.
- Nacca, N.; Bhamidipati, C.M.; Yuhico, L.S.; Pinnamaneni, S.; Szombathy, T. (2012). Severe amiodarone induced pulmonary toxicity. **Journal Thoracic Disease**. 4(6):667-670.

- Nanjo, F.; Mori, M.; Goto, K.; Hara, Y.(1999). Radical Scavenging Activity of Tea Catechins and Their Related Compounds. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 63 (9) 1621-1623.
- Nattel, S.; Singh, B.N. (1999). Evolution, mechanisms, and classification of antiarrhythmic drugs: focus on class III actions. **American Journal of Cardiology**. 84:11R-19R.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2011). Princípios de bioquímica de Lehninger. 5ed. Porto Alegre: Artmed. p. 707-772.
- Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Bio. Med.**, 49: 503–515.
- Ogino, K.; & Wang, D.H. (2007). Biomarkers of Oxidative/Nitrosative Stress: An Approach to Disease Prevention. **Acta Medica**. 61(4): 181–89.
- Oyama, N.; Oyama, N; Yokoshiki, H; Kamishima,T; Nambu, T; Tsutsui, H; Miyasaka, K . (2005). Detection of Amiodarone-Induced Pulmonary Toxicity in Supine and Prone Positions. **Circulation Journal**. 69:466-470.
- Park, H.S. & Kim, Y.N. (2014). Adverse effects of long-term amiodarone therapy. **The Korean Journal Internal Medicine**.29:571-573.
- Pastore, C.A.; Pinho, C.; Germiniani, H.; Samesima, N.; Mano, R. e cols. (2009). Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Análise e Emissão de Laudos Eletrocardiográficos (2009). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 93(3 supl.2):1-19.
- Porto, C.C. (1998). **Doenças do coração:** prevenção e tratamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 1124 p.
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L. D., Latini, A., Wajner, M., Souza, D. O., Gonçalves, C.-A., Gottfried, C. (2013). Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against

- hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1. **PloS One**. 8(5):e64372.
- Rahal, A.; Kumar, A.; Yadav, B.; Tiwari, R.; Chakraborty, S.; Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. **Hindawi Publishing Corporation**. 2014:1-19.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**. 2: 219–236.
- Ramassamy, C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. **European Journal of Pharmacology**. 545: 51–64
- Ramirez-Sanchez, I.; Taub, P.R.; Ciaraldi, T.P.; Nogueira, L.; Coe, T.; Perkins, G.; Hogan, M.; Maisel, A.S.; Henry, R.R.; Ceballos, G.; Villarreal, F. (2013). (–)-Epicatechin rich cocoa mediated modulation of oxidative stress regulators in skeletal muscle of heart failure and type 2 diabetes patients. **International Journal of Cardiology** 168:3982–3990.
- Rasmussen, S.E.; Frederiksen, A.; Krogholm, K.S.; Poulsen, L. (2005). Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. **Molecular Nutrition & Food Research**. 49:159-174.
- Roth, F.C.; Mulder, J. E.; Brien, J. F., Takahashi, T., Massey, T. E. (2013). Cytotoxic interaction between amiodarone and desethylamiodarone in human peripheral lung epithelial cells. **Chemico-Biological interactions**. 204: 135-139.
- Russell, W.; Duthie, G. (2011). Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. **Proceedings of The Nutrition Society**. 70: 389-96.

- Ryter, S.W.; Kim, H.P.; Hoetzel, A.; Park, J.W.; Nakahira, K.; Wang, X.; Choi, A.M.K. (2007). Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**. 9(1): 49-89.
- Sandoval-Acuña, C.; Ferreira, J.; Speisky, H. (2014). Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. **Archives Biochemistry Biophysics**. 559: 75–90.
- Serpeloni, J.M.; Barcelos, G.R.M.; Angeli, J.P.F.; Mercadante, A.Z.; Bianchi, M.L.P.; Antunes, L.M.G. (2012). Dietary carotenoid lutein protects against DNA damage and alterations of the redox status induced by cisplatin in human derived HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**. 26:288–294.
- Serviddio, G.; Bellanti, F.; Giudetti, A.M.; Gnoni, G.V.; Capitano, N.; Tamborra, R.; Romano, A.D.; Quinto, M.; Blonda, M.; Vendemiale, G.; Altomare, E.; (2011). Mitochondrial oxidative stress and respiratory chain dysfunction account for liver toxicity during amiodarone but not dronedarone administration. **Free Radical Biology & Medicine**. 51:2234-2242.
- Singh, B.N. (1983). Amiodarone: Historical development and pharmacologic profile. **American Heart Journal**. 106:788–797.
- Singh, B.N. (2008). Amiodarone as paradigm for developing new drugs for atrial fibrillation. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. 52:300-305.
- Spadafranca, A.; Martinez Conesa, C., Sirini, S; Testolin, G. (2009). Effect of dark chocolate on plasma epicatechin levels, DNA resistance to oxidative stress and total antioxidant activity in healthy subjects. **British Journal of Nutrition**. 1008-1014.
- Srivastava, S. and Haigis, M.C. (2011) Role of sirtuins and calorie restriction in neuroprotection: implications in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Current Pharmaceutical Desing**. 17: 3418–3433

- Tomé, A.R.; Feng, D.; Freitas, R.M. (2010). The effects of alpha-tocopherol on hippocampal oxidative stress prior to in pilocarpine-induced seizures. **Neurochem Research**. 35: 580-587.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, 2: 1231-46.
- Zelko, I.N.; Mariani, T.J.; Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: Cu-Zn-Sod (Sod1), Mn-Sod (Sod2) and EC-Sod (Sod3) gene structures, evolution and expression. **Free Radical Biology and Medicine Meeting**. 33 (3): 337-49.
- Zickermann, V.; Wirth, C.; Nasiri, H.; Siegmund, K.; Schwalbe, H.; Hunte, C.; Brandt, U. (2015). Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I. **Structural Biology**. 347(6217): 44-49.
- Zimmerman LI, Fenelon G, Martinelli Filho M, Grupi C, Atié J, Lorga Filho A, e cols. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes Brasileiras de Fibrilação Atrial. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. 2009; 92(6 supl.1):1-39.
- Zucco, F.; De Angelis, I.; Testai, E.; Stamatii, A. (2004). Toxicology investigations with cell culture systems: 20 year after. **Toxicol. in Vitro**. 18: 153-163.
- Wiese, S. et al. (2014). Comparative biokinetics and metabolism of pure monomeric, dimeric, and polymeric flavan-3-ols: A randomized cross-over study in humans. **Molecular Nutrition and Food Research**. Germany, p. 610-621, nov. 2014. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201400422/epdf> (09 de junho de 2015).
- WHO - NHS Centre for the Evaluation of Effectiveness of Health Care (CeVEAS). 17th Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines. (2009). Proposal for the inclusion of amiodarone as an anti-arrhythmic and/or for the treatment of chronic heart failure in the who model list of essential medicines. Geneva.

Disponível (online) http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/17/application/amiodarone_inclusion.pdf. (junho de 2015).

WHO. World Health Organization. (2011). Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. Mendis, S.; Puska, P.; Norrving, B. editors. Geneva.

Yamada, Y.; Shiga, T.; Matsuda, N.; Hagiwara, N.; Kasanuki, H. (2007). Incidence and predictors of pulmonary toxicity in japanese patients receiving low-dose amiodarona. **Circulation Journal**. 71: 1610-1616.

Zucco, F.; De Angelis, I.; Testai, E.; Stammati, A. (2004). Toxicology investigations with cell culture systems: 20 year after. **Toxicology in Vitro**. 18: 153-163.

9. ANEXO

Luciana Fernandes Silva Santos

Curriculum Vitae

Outubro, 2015

Luciana Fernandes Silva Santos

Curriculum Vitae

Formação acadêmica/titulação

- 2006 - 2007** Especialização em Farmácia Hospitalar.
Escola Superior de Gestão e Ciências da Saúde, IAHCS, Brasil.
Título: Dispensação de Materiais e Medicamentos por Turno em um Hospital Filantrópico de Caxias do Sul.
Orientador: Prof. Josué Schostack
- 1999 - 2000** Especialização em Farmacêutico Bioquímico - Lab. Análises Clínicas.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
Título: Determinação da eficiência do forno de micro-ondas (doméstico) na esterilização de meios de cultura.
Orientador: Prof. Fernando Jorge Schreiner.
- 1992 - 1997** Graduação em Farmácia.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
Título: Piper methysticum Forst (piperaceae): um novo ansiolítico? Ano de obtenção: 1997
Orientador: Prof. Dra. Stela Maris Kuse Rates

Formação complementar

- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Farmacologia de ativos para osteoporose.
Associação de Farmácias Magistrais do RS, ANFARMAG, Brasil.
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em farmacologia de ativos para reumatologia.
Associação de Farmácias Magistrais do RS, ANFARMAG, Brasil.
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Introdução a atenção farmacêutica.
Associação de Farmácias Magistrais do RS, ANFARMAG, Brasil.
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Dispensação de antibióticos.
Associação de Farmácias Magistrais do RS, ANFARMAG, Brasil.
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Nutracêuticos na Farmácia Magistral.
Instituto Magistral, IM, Brasil.
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Nutracêuticos e Fitofármacos à Nutrição.
Associação de Farmácias Magistrais do RS, ANFARMAG, Brasil.
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Formulações Avançadas em Cosmetologia.
Instituto Magistral, IM, Brasil.

- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Excipientes e Sachês.
Instituto Magistral, IM, Brasil.
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Desenvolvimento de Produtos Para Uso em Estética.
Instituto Magistral, IM, Brasil.
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Workshop Multidisciplinar em Diabetes.
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil.
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em II Jornada do Atendimento integrado do Hospital Tacchini.
Hospital Tacchini, Brasil.
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Curso Itinerante de Terapia Nutricional Parenteral.
Sociedade Gaúcha de Nutrição Parenteral e Enteral, SGNPE, Brasil.
- 2000 - 2000** Curso de curta duração em Administração de Medicamentos Via Parenteral.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
- 1999 - 1999** Curso de curta duração em Bioquímica Aplicada ao Diabete Mérito.
Associação dos Farmacêuticos do Rio Grande do Sul, AFARGS, Brasil.
- 1998 - 1998** Curso de curta duração em Preparações Farmacêuticas para Tratamento de Discromias.
Consulcom, CONSULCOM, Brasil.
- 1997 - 1997** Curso de curta duração em Ortomoleculares.
Associação dos Farmacêuticos do Rio Grande do Sul, AFARGS, Brasil.
- 1996 - 1996** Curso de curta duração em 1º Jornada de Medicina Biomolecular na Serra Gaúcha.
Sociedade Brasileira de Medicina Biomolecular e Radical Livre, MBRL, Brasil.

1. Universidade de Caxias do Sul - UCS

Vínculo institucional

2015 - 2015	Vínculo: Estagiário, enquadramento funcional: Estágio de docência, Carga horária: 2h. Regime: Parcial
2013 - Atual	Vínculo: Bolsista, enquadramento funcional: aluna de mestrado, Carga horária: 40h. Regime: Dedicção exclusiva.
2012 - 2013	Vínculo: Estágio voluntário, enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 20h, regime: Parcial.

Atividades

11/2012 - Atual	Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Biotecnologia - UCS. <i>Linhas de pesquisa:</i> <i>Danos oxidativos e antioxidantes</i>
------------------------	--

2. Farmácia Natufarma Ltda. – NATUFARMA.

Vínculo institucional

2007 - 2012	Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacêutico Responsável Técnico Regime: Dedicção exclusiva.
1997 - 1999	Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacêutico. Responsável Técnico, Regime: Dedicção exclusiva.

3. Círculo Operário Caxiense – COC.

Vínculo institucional

2000 - 2006	Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacêutico Responsável Técnico, Regime: Dedicção exclusiva.
--------------------	--

4. Farmácia Santo Antônio Ltda. – FSA.

Vínculo institucional

1999 - 2000	Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacêutico Responsável Técnico, Carga horária: 4h. Regime: Parcial
--------------------	---

Linhas de pesquisa

1. Danos oxidativos e antioxidantes

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. RATES, S. M. K., SANTOS, L. F. S.

Piper methysticum forst (Piperaceae): um novo ansiolítico? Revista Brasileira de Farmácia / Brazilian Journal of Pharmacy. , v.78, p.44 - 48, 1997.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SALVADOR, M., SANTOS, L. F. S., STOLFO, A., ALMEIDA, R. L.

Catequina protege contra os efeitos tóxicos da amiodarona em células de fibroblasto de pulmão humano In: XXXVI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2015, São Paulo.

Suplemento Especial da Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo 2015. São Paulo: Farol editora. (2015) 25: 164 – 164

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Pôster / Painel no (a) IV Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, 2015. (Simpósio). Brazilian berry modulates mitochondrial function and reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC5).

2. Apresentação de Pôster / Painel no (a) IV Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, 2015. (Simpósio) Can phenolic Pleurotus albidus extract protect endothelial cells against oxidative estresse induced by Hyperglycemia?

3. Apresentação de Pôster / Painel no (a) IV Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, 2015. (Simpósio). Epicatechin Reduces Oxidative Estresse Induced By Amiodarone On Human Lung Fibroblasts Cells (MRC5).

4. Avaliador no (a) XXII Encontro de Jovens Pesquisadores e IV Mostra Acadêmica de Inovação e Tecnologia, 2014. (Encontro) Coordenação da apresentação oral dos acadêmicos da área de ciências da vida.

5. IV Workshop sobre Produtos naturais, 2014. (Congresso).

6. III Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, 2014. (Simpósio).

7. II Workshop UCS de Ética em Pesquisa e Experimentação com Animais de Laboratório, 2014. (Simpósio).

8. FisioNews IV Simpósio de Atualização em Fisiologia, 2014. (Simpósio).

9. II Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, 2013. (Simpósio).

10. III Workshop Sobre Produtos Naturais, 2013. (Congresso).

11. VI Pharma RS, 2009. (Congresso).

12. III Simpósio Sul brasileiro de Terapia Nutricional, 2000. (Simpósio).

13. Apresentação de Pôster / Painel no (a) I Congresso Latino-americano de Farmácia Clínica y Atención Farmacéutica, 1997. (Congresso) *Piper methysticum*. Um Novo Ansiolítico?
