

EPICATEQUINA REDUZ O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR AMIODARONA EM FIBROBLASTOS DE PULMÃO HUMANO



Adriana Stolfo, Luciana F. S. Santos e Mirian Salvador

Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul - RS



INTRODUÇÃO

A amiodarona (AMD) é um dos fármacos mais utilizados para o tratamento de arritmias cardíacas (Singh, 2008), sendo indicada para o tratamento de arritmias ventriculares e supraventriculares (Albayrak *et al.*, 2009). No entanto, em alguns pacientes este medicamento pode causar efeitos adversos potencialmente fatais, incluindo toxicidade hepática e pulmonar e levando 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 o estresse oxidativo e alterações mitocondriais têm um papel importante no seu desenvolvimento (Card *et al.*, 2003; Serviddio *et al.*, 2011). Estudos apontam que polifenóis como a epicatequina, composto com reconhecida ação antioxidante, apresentam efeito benéfico em doenças cardiovasculares, reduzindo o estresse oxidativo em aterosclerose, hipertensão, disfunção endotelial, doenças isquêmicas cardíacas e cardiomiopatias (Bhardwaj & Khanna, 2013).

OBJETIVO

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da epicatequina, polifenol encontrado no chá verde, uvas e derivados, de minimizar os danos oxidativos e mitocondriais induzidos pela amiodarona em fibroblastos de pulmão humano MRC-5.

METODOLOGIA

Manutenção da linhagem celular

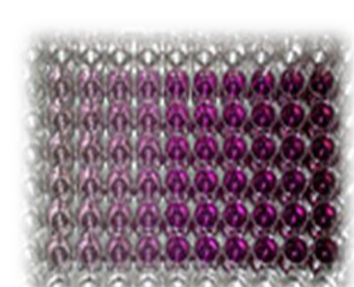
✓ Células MRC-5 cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado, mantidas em atmosfera umidificada (5% CO₂) a 37°C;

✓ Ao atingir 80% de confluência, as células foram pré-tratadas com diferentes concentrações de epicatequina e tratadas com amiodarona 100µM e, em seguida, foram utilizadas para a determinação do dano celular.

Viabilidade celular

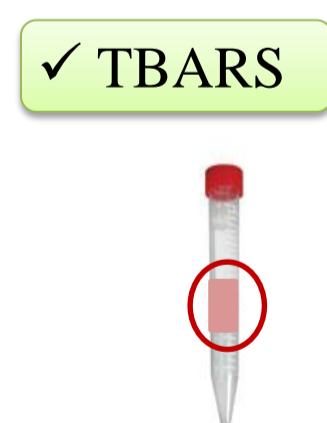
✓ Ensaio de MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)

EPI 10, 100 e 500µM
30 minutos
+
Amiodarona 100µM
24 horas



Leitura a 517nm em leitor de microplaca

Danos oxidativos

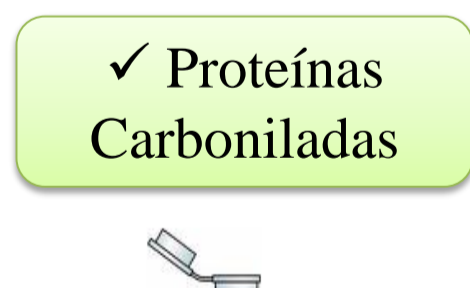


✓ TBARS
Aldeídos resultantes da peroxidação lipídica lidos a 530nm

EPI 10, 100 e 500µM
30 minutos
+
Amiodarona 100µM
24 horas

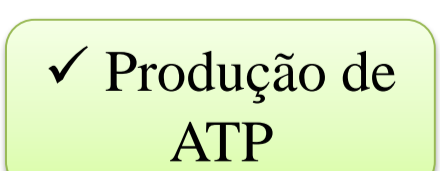


Lisado celular



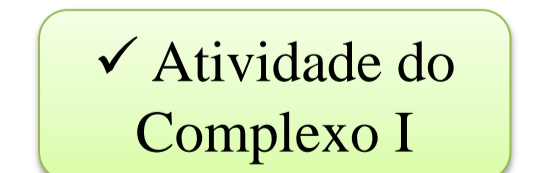
✓ Proteínas Carboniladas
Proteínas oxidadas lidas espectrofotometricamente a 365nm

Função mitocondrial



✓ Produção de ATP
Ensaio avaliado por luminescência (Kit Cell Titer-Glo®)

EPI 5, 10 e 20µM
30 minutos
+
Amiodarona 100µM
60 minutos



✓ Atividade do Complexo I
Kit Mitoscience, Abcam, Cambridge, MA, USA

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Níveis de óxido nítrico (ON), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteínas carboniladas (PC) em células MRC-5 pré-tratadas com diferentes concentrações de epicatequina (EPI) e, posteriormente, tratadas com amiodarona (AMD).

Concentrações	ON (nmol de nítrito/mg de proteína)	TBARS (nmol de TMP/mg de proteína)	PC (nmol de DNPH/mg de proteína)
Controle de células	3,71 ± 0,07 ^a	5,97 ± 0,05 ^a	2,73 ± 0,57 ^a
AMD 100µM	2,83 ± 0,02 ^d	12,69 ± 0,62 ^d	6,93 ± 0,81 ^d
EPI 10µM + AMD 100µM	2,91 ± 0,03 ^{bc}	2,93 ± 0,04 ^{bc}	3,76 ± 0,20 ^b
EPI 100µM + AMD 100µM	2,90 ± 0,09 ^{cd}	2,99 ± 0,01 ^b	3,60 ± 0,18 ^b
EPI 500µM + AMD 100µM	2,91 ± 0,01 ^{bc}	2,92 ± 0,03 ^{bc}	4,04 ± 0,22 ^{bc}

Resultados expressos como média ± DP. Letras diferentes mostram diferenças estatísticas de acordo com a análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan. A significância estatística é de 5% (p ≤ 0,05).

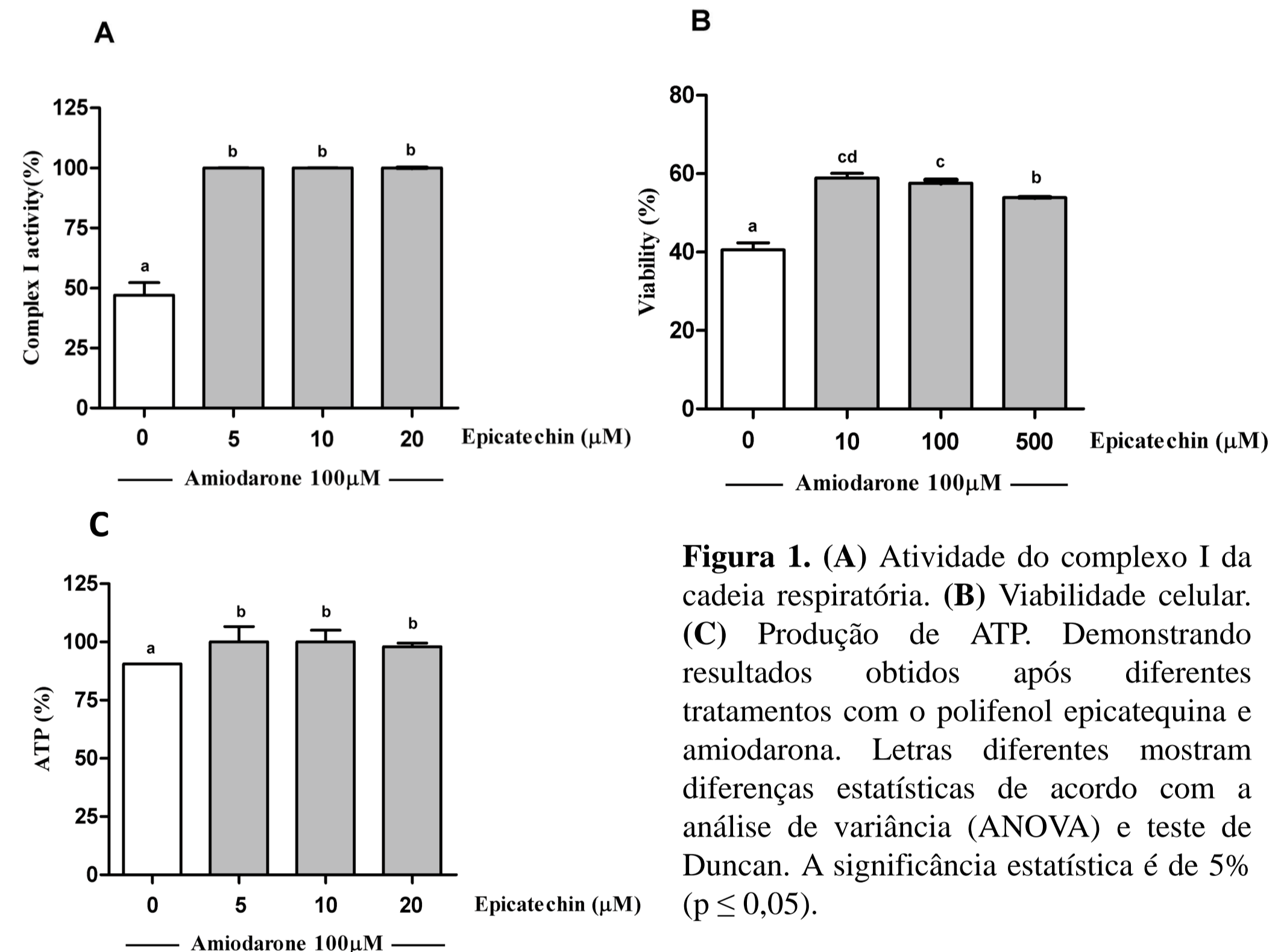


Figura 1. (A) Atividade do complexo I da cadeia respiratória. (B) Viabilidade celular. (C) Produção de ATP. Demonstrando resultados obtidos após diferentes tratamentos com o polifenol epicatequina e amiodarona. Letras diferentes mostram diferenças estatísticas de acordo com a análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan. A significância estatística é de 5% (p ≤ 0,05).

CONCLUSÃO

Este trabalho mostra que o mecanismo de toxicidade da amiodarona pode estar associado a disfunção mitocondrial, principal causa de geração de dano oxidativo celular. Verificou-se, ainda, que o polifenol epicatequina, é capaz de evitar o dano mitocondrial induzido pelo fármaco, diminuindo, significativamente, o efeito citotóxico induzido pela amiodarona em células pulmonares. Estes dados abrem novas perspectivas para estudos visando o desenvolvimento de medicamentos que minimizem os efeitos tóxicos da amiodarona.

Referências

- 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.
- Brardwaj, P.; Khanna, D. (2013). Green tea catechins: defensive role in cardiovascular disorders. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 11(4):345-353.
- 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-β₁ gene expression but not prevention of mitochondrial dysfunction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 304:277-283.
- Serviddio, G.; Bellanti, F.; Giudetti, A.M.; Gnoni, G.V.; Capitanio, 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. (2008). Amiodarone as paradigm for developing new drugs for atrial fibrillation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 52:300-305.

Agradecimentos

