



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CARIRI – UFCA
FACULDADE DE MEDICINA DE BARBALHA – FAMED
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

JOANA VARLLA DE LACERDA ALEXANDRE

**QUERCETINA ATENUA A HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA POR ISOPROTERENOL
AO RESTAURAR O PODER ANTIOXIDANTE ENDÓGENO E DIMINUIR OS NÍVEIS DE H₂O₂**

BARBALHA

2020

JOANA VARLLA DE LACERDA ALEXANDRE

QUERCETINA ATENUA A HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA POR ISOPROTERENOL
AO RESTAURAR O PODER ANTIOXIDANTE ENDÓGENO E DIMINUIR OS NÍVEIS DE H₂O₂

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Cariri – UFCA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Heberty Di Tarso Fernandes Facundo
Coorientadora: Prof^a. Dra. Alcía Juliana Kowaltowski

BARBALHA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Cariri
Sistema de Bibliotecas

- A369q Alexandre, Joana Varlla de Lacerda.
Quercetina atenua a hipertrofia cardíaca induzida por *isoproterenol* ao restaurar o poder antioxidante endógeno e diminuir os níveis de H_2O_2 /Joana Varlla de Lacerda Alexandre. – 2020.
67 f.: il.; color.; enc. ; 30 cm.
(Inclui bibliografia p.56-67).
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Cariri, Faculdade de Medicina de Barbalha – FAMED, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Barbalha, 2020.
Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.
- Orientação: Prof. Dr. Heberly DiTarso Fernandes Facundo.
Co-Orientação: Prof^ª. Dra. Alícia Juliana Kowaltowski.
- 1.Mitocôndrias. 2. Hipertrofia cardíaca. 3. Flavonóide. 4. Radicais livres. I. Título.

CDD 612.01421

Bibliotecário: João Bosco Dumont do Nascimento – CRB 3/1355

JOANA VARLLA DE LACERDA ALEXANDRE

QUERCETINA ATENUA A HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA POR ISOPROTERENOL
AO RESTAURAR O PODER ANTIOXIDANTE ENDÓGENO E DIMINUIR OS NÍVEIS DE H₂O₂

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Cariri – UFCA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Heberly Di Tarso Fernandes Facundo (Orientador)

Universidade Federal do Cariri (UFCA)

Prof. Dr. Thiago Mielle Brito Ferreira Oliveira

Universidade Federal do Cariri (UFCA)

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

Universidade Regional do Cariri (URCA)

Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira

Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Dedico aos meus pais, Josefa Soares de Lacerda Alexandre e Raimundo Rinaldo de Moraes Alexandre que sempre incentivaram minha busca pela educação e à todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força, coragem e motivação para enfrentar os obstáculos e superar as adversidades.

Aos meus pais, Josefa Soares de Lacerda Alexandre e Raimundo Rinaldo de Moraes Alexandre por todo incentivo, cuidado e pelo apoio imenso durante essa trajetória.

A minha irmã mais nova, Júlia Válleri de Lacerda Alexandre, por valorizar e admirar a minha pesquisa, mesmo que não seja capaz de compreendê-la bem e também por me enxergar como exemplo, o que me motivou muitas vezes.

Ao meu orientador, professor Dr. Heberty Di Tarso Fernandes Facundo pela oportunidade de me receber em seu laboratório, pela orientação e por todo conhecimento compartilhado comigo sobre esse universo que é estudar mitocôndrias.

A minha coorientadora, professora Dra. Alícia Juliana Kowaltowski por gentilmente ter me recebido em seu laboratório e pela colaboração na execução deste trabalho.

As minhas companheiras de laboratório, Cícera Edna Barbosa David e Aline Maria Brito Lucas pelo suporte técnico, pelo compartilhamento de conhecimentos e pelos momentos de descontração nos dias em que nem tudo dava certo.

Aos meus companheiros de sala de aula, Plínio Bezerra Palácio, André Oliveira Santos, Rafael Barbosa de Moura e Víctor Marcel Gonçalves Oliveira, com os quais eu aprendi tanto durante nossa convivência e que humildemente estiveram sempre dispostos a me ajudar.

Aos alunos de iniciação científica, Yuana Ivia Ponte Viana, Pedro Lourenzo Oliveira Cunha e Amanda Albuquerque Cabral pelo auxílio durante a condução dos experimentos.

A responsável técnica do laboratório, Anna Lídia Nunes Varela, por toda sua disposição e ajuda durante o decorrer do estudo.

A Seu Antônio F. R. Santos, pela sua ajuda essencial com os animais no biotério.

Aos professores do Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular, Juan Carlos Alvarez Pizarro, Kamila Câmara Correa, Francisco Pereira Júnior, Cláudio Gleidiston, Iri Sandro Lima, Roberto Pinheiro Junior, Sally Lacerda, pelos conhecimentos compartilhados.

A FUNCAP, a CAPES e ao CNPq pelo suporte e apoio financeiro.

RESUMO

O estresse oxidativo, caracterizado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), está implicado na patogênese de várias doenças, incluindo a hipertrofia cardíaca. Embora as EROs sejam essenciais para vários processos fisiológicos, quantidades excessivas podem danificar os componentes dos cardiomiócitos, comprometendo a sua função e, assim, desencadeando uma série de alterações adversas, como fibrose cardíaca, contração prejudicada, morte celular por necrose e apoptose. A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (CTE) é uma fonte conhecida de EROs. Como as mitocôndrias são responsáveis por cerca de 25% da massa dos cardiomiócitos, elas são consideradas uma das fontes mais significativas de EROs no coração. Dessa maneira, as mitocôndrias têm sido alvo de vários estudos que utilizam modelos de hipertrofia cardíaca. A quercetina, pertencente à classe dos flavonóides, é uma potente depuradora de EROs, tendo se tornado alvo de atenção por apresentar diversos efeitos benéficos no sistema cardiovascular, incluindo efeitos anti-hipertroficantes. Neste trabalho foi testada a hipótese de que a quercetina é capaz de atenuar a hipertrofia cardíaca ao melhorar o balanço redox e a homeostase mitocondrial. Para tal, tratamos camundongos com injeções intraperitoneais de isoproterenol (30 mg/kg/dia) por 4 dias consecutivos. No quinto dia, alguns desses animais foram eutanasiados e os demais camundongos foram remanejados em dois subgrupos. A partir desse ponto, um grupo recebeu apenas isoproterenol (30 mg/kg/dia) (grupo ISO) e outro grupo recebeu isoproterenol (30 mg/kg/dia) e quercetina (10 mg/kg/dia) (grupo ISO+QUE) por via oral por mais 4 dias. Os animais tratados com ISO durante 4 dias apresentaram aumento da relação peso cardíaco/comprimento da tíbia, aumento do teor de proteínas totais, diminuição do teor de proteínas sulfidrilas, comprometimento da atividade enzimática antioxidante e alta produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A intervenção com o tratamento com quercetina a partir desse ponto foi capaz de atenuar a hipertrofia cardíaca, restabelecer os níveis de proteínas sulfidrilas e a atividade antioxidante, além de bloquear efetivamente a produção de H_2O_2 . Além disso, observamos que o estímulo hipertrofico do isoproterenol diminui a expressão e atividade de superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD), enquanto que a quercetina reverte esse efeito. Observamos também que a quercetina protege as mitocôndrias contra a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP). Em conjunto, esses resultados mostram que o tratamento com quercetina atenua a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol ao restaurar o poder antioxidante endógeno e diminuir os níveis de H_2O_2 .

Palavras-chave: Mitocôndrias. Hipertrofia cardíaca. Flavonóide. Radicais livres.

ABSTRACT

Oxidative stress, characterized by the accumulation of reactive oxygen species (ROS), is implicated in the pathogenesis of several diseases, including cardiac hypertrophy. Although ROS are essentials for several physiological processes, excessive amounts may damage cardiomyocyte components, compromising their function and thus triggering a number of adverse changes such as cardiac fibrosis, impaired contraction, cell death by necrosis and apoptosis. The mitochondrial electron transport chain (ETC) is a known source of ROS. Because mitochondria account for about 25% of the mass of cardiomyocytes, they are considered one of the most significant sources of ROS in the heart. Thus, mitochondria have been the target of several studies using cardiac hypertrophy models. The flavonoid quercetin, is a potent ROS scavenger and having several beneficial effects on the cardiovascular system, including antihypertrophic effects. In this work, we tested whether quercetin could attenuate the cardiac hypertrophy by improving the redox balance and mitochondrial homeostasis. To this hypothesis we treated mice with intraperitoneal injections of isoproterenol (30 mg/kg/day) for 4 consecutive days. On the fifth day, some of these animals were euthanized and the remaining mice were relocated to two subgroups. From that point on, one group received only isoproterenol (ISO group) (30 mg/kg/dia) and another group received isoproterenol and quercetin (ISO+QUE group) orally (10 mg/kg/day) for 4 more days. The animals treated with ISO for 4 days showed increased cardiac weight/tibia length ratio, increased total protein content, decreased sulfhydryl protein content, compromised antioxidant enzyme activity and high H₂O₂ production. Intervention with quercetin treatment from this point on was able to attenuate cardiac hypertrophy, reestablish sulfhydryl protein levels and antioxidant activity, in addition to effectively blocking the H₂O₂ production. In addition, we observed that isoproterenol hypertrophic stimulation decreases mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) expression and activity, while quercetin reverses this effect. Quercetin also protects mitochondria against opening of mitochondrial permeability transition pore (mPTP). Taken together, these results show that treatment with quercetin attenuates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by restoring endogenous antioxidant power and decreasing H₂O₂ levels.

Keywords: Mitochondria. Cardiac hypertrophy. Flavonoid. Free radicals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação e remoção de EROs na matriz mitocondrial.....	19
Figura 2 – Representação estrutural básica de um flavonóide.....	24
Figura 3 – Formas representativas de ocorrência dos flavonóides.	24
Figura 4 – Representação estrutural da quercetina.	26
Figura 5 – Representação estrutural do isoproterenol.	29
Figura 6 – Esquema de tratamento dos animais.	32
Figura 7 – Fotografia dos corações e relação peso cardíaco/comprimento da tíbia.	38
Figura 8 – Teor de proteínas totais e de proteínas sulfidrilas.....	39
Figura 9 – Quantificação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase.	40
Figura 10 – Fotografia dos corações e relação peso cardíaco/comprimento da tíbia.	41
Figura 11 – Teor de proteínas totais e de proteínas sulfidrilas.....	42
Figura 12 – Quantificação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase.....	43
Figura 13 – Quantificação de H ₂ O ₂ produzido pelos ventrículos esquerdos.	44
Figura 14 – Quantificação da atividade da enzima superóxido dismutase mitocondrial.....	45
Figura 15 – Expressão de superóxido dismutase mitocondrial.	46
Figura 16 – Razão do controle respiratório mitocondrial (RCR) e relação ADP/O.	47
Figura 17 – Inchamento mitocondrial induzido por cálcio.....	48
Figura 18 – Inchamento induzido por cálcio em mitocôndrias de corações hipertróficos tratadas com quercetina in vitro.	49
Figura 19 – Esquema representativo dos efeitos do tratamento com quercetina durante a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
Cu/Zn SOD	Superóxido dismutase cobre/zinco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicotetracético
ERK	Proteína quinase regulada extracelularmente
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ETC	Cadeia transportadora de elétrons
FADH ₂	Flavina Adenina Dinucleotídeo
GPX	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
mDNA	DNA mitocondrial
MnSOD	Superóxido dismutase mitocondrial
mPTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NBT	Azul de nitro-tetrazólio
PBS	Salina tamponada com fosfato
pH	Potencial de hidrogênio
Pi	Fosfato inorgânico
PKC	Proteína quinase C
SF	Soro fisiológico
SOD	Superóxido dismutase

HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-ácidopiperazinoetanosulfônico
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Peroxidase de raiz forte)
IP	Intraperitoneal
ISO	Isoproterenol
JNK	Proteína quinase da junção C-N-terminal
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
TF	Fatores de transcrição
TPX	Tioredoxina peroxidase
TR	Tioredoxina redutase
TSH	Tioredoxina reduzida
TSST	Tioredoxina oxidada

LISTA DE SÍMBOLOS

$O_2^{\bullet-}$	Ânion superóxido
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_2O	Água
O_2	Oxigênio molecular
$\Delta\psi$	Potencial elétrico
ΔpH	Taxa de concentração de prótons
Fe^{2+}	Íon ferro
$^{\circ}C$	Grau celsius
μm	Micrometro
$\mu mol/L$	Micromol por litro
U/mL	Unidade por mililitro
U/mg	Unidade por miligrama
nm	Nanômetro
RCF	Força centrífuga
μL	Microlitro
$\mu g/mL$	Micrograma/mililitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
mL	Mililitro
HCl	Ácido clorídrico
ϵ	Coeficiente de extinção molar
$\mu mol/mg$	Micromol/miligrama
μg	Micrograma
KCN	Cianeto de potássio
A.U	Unidade de absorvância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Cadeia de transporte de elétrons na hipertrofia cardíaca	18
1.2 Hipertrofia cardíaca e estresse oxidativo	21
1.3 Flavonóides e estresse oxidativo	23
1.4 Quercetina	26
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Animais	29
3.2 Drogas e reagentes	29
3.2.1 Isoproterenol	29
3.2.2 Quercetina e carboximetilcelulose	30
3.2.3 Rotenona, succinato, oligomicina e carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona ..	30
3.2.4 Reagentes.....	30
3.3 Indução da hipertrofia cardíaca e tratamento com quercetina	31
3.4 Mensuração da hipertrofia cardíaca.....	32
3.5 Quantificação da produção de H ₂ O ₂	32
3.6 Isolamento mitocondrial	33
3.7 Avaliação da respiração/função mitocondrial.....	33
3.8 Avaliação da abertura do mPTP (aumento do volume mitocondrial)	34
3.9 Atividade enzimática da SOD mitocondrial (MnSOD)	35
3.10 Teor de proteínas.....	35

3.11 Teor de proteínas tiol (sulfidrilas).....	35
3.12 Atividade da catalase	36
3.13 Atividade da superóxido dismutase (Cu/ZnSOD).....	36
3.14 Western Blot para SOD mitocondrial (MnSOD)	36
3.15 Análise estatística	37
4. RESULTADOS	38
4.1 Tratamento com quercetina atenua a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol e restaura a atividade antioxidante enzimática.....	38
4.2 Tratamento com quercetina bloqueia a produção de H ₂ O ₂ durante a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol	43
4.3 Quercetina restaura a expressão e atividade de superóxido dismutase mitocondrial.....	44
4.4 Tratamento com quercetina não tem efeito sobre a razão do controle respiratório mitocondrial (RCR) e a relação ADP/O	46
4.5 Quercetina protege as mitocôndrias <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> contra a abertura do mPTP induzida por Ca ²⁺ durante a hipertrofia cardíaca.....	47
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO A: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	69
ANEXO B: PAPER PARA SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA JOURNAL OF CARDIOVASCULAR PHARMACOLOGY.....	71

1. INTRODUÇÃO

A hipertrofia cardíaca patológica é a condição na qual o coração cresce em resposta a vários estímulos intrínsecos ou extrínsecos. Estes estímulos podem ser, por exemplo, hipertensão arterial crônica, sobrecarga de volume ou problemas em válvulas cardíacas. A hipertrofia cardíaca é a princípio uma resposta adaptativa, em que ocorre o crescimento dos cardiomiócitos e mudanças no tecido cardíaco para acomodar a sobrecarga de pressão ou volume. Todavia, apesar de o coração ser um órgão dinâmico, a persistência do estresse hemodinâmico resulta na deterioração progressiva do tecido e é, portanto, um importante fator de risco para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca (FREY; OLSON, 2003; VAKILI; OKIN; DEVEREUX, 2001).

A hipertrofia cardíaca patológica, portanto, é uma das principais causas mundiais de morte súbita. É caracterizada por expressão aumentada de proteínas e perfil genético correspondente ao desenvolvimento embrionário inicial nos cardiomiócitos. Uma série de fatores de transcrição, incluindo os genes c-fos e c-jun, que são componentes do fator de transcrição proteína ativadora-1 (AP-1), e seus genes alvo, incluindo o peptídeo natriurético atrial e peptídeo natriurético tipo B foram implicados no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca (YAN *et al.*, 2013).

A hipertrofia cardíaca geralmente ocorre em resposta a condições patológicas, como hipertensão e infarto do miocárdio decorrente de doença arterial coronariana. No entanto, o miocárdio também pode sofrer uma forma adaptativa de hipertrofia cardíaca denominada hipertrofia fisiológica, fundamentalmente diferente da hipertrofia patológica, porque o coração não desenvolve doença e pode até se beneficiar dela. Um coração submetido a hipertrofia fisiológica mostra perfusão e metabolismo vascular aprimorados, e o processo de crescimento é iniciado por vias moleculares específicas (BERNARDO *et al.*, 2010).

Diferentemente da hipertrofia fisiológica, a hipertrofia patológica está associada a taxas aumentadas de morte de miócitos, remodelação fibrótica e diminuição da função sistólica e diastólica, que geralmente progridem para insuficiência cardíaca. De forma geral, a angiotensina II, a endotelina-1 e as catecolaminas se ligam a receptores transmembranas que são acoplados e ativam proteínas G heterotriméricas. Em particular, a sinalização Gq/11 ativa a fosfolipase C, que catalisa a síntese de inositol 1,4,5-trifosfato (Ins (1,4,5) P3) e DAG3. A

produção de ins (1,4,5) P3 induz a liberação intracelular de Ca^{2+} para ativar a proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina ou calcineurina, que medeia assim o crescimento de cardiomiócitos (HEINEKE; MOLKENTIN, 2006).

Outros exemplos de mediadores da hipertrofia cardíaca patológica são os ramos p38 e c-Jun quinase N-terminal (JNK) da cascata MAPK, que fosforilam e ativam o fator de transcrição GATA4. A ativação sustentada de p38 ou JNK no coração leva a cardiomiopatia e insuficiência cardíaca, enquanto estudos de perda de função demonstram sua função como reguladores negativos da hipertrofia cardíaca (HEINEKE; MOLKENTIN, 2006). As catecolaminas também podem sinalizar para a adenilil ciclase (AC) para induzir a ativação da proteína cinase A (PKA), que então fosforila uma série de alvos intracelulares, levando ao aumento da liberação de cálcio e maior contratilidade; o efeito disso parece ser cardiomiopático, pois resulta em aumento da apoptose e necrose dos miócitos (HEINEKE; MOLKENTIN, 2006).

Aproximadamente 25% de uma célula miocárdica humana é composta de mitocôndrias. As mitocôndrias cardíacas geram cerca de 95% do ATP usado pelo coração, regulam o cálcio intracelular e participam em redes de sinalização além de participarem, em alguns casos, dos processos de morte celular (SANTULLI *et al.*, 2015). Isso pode ser atribuído ao fato de que o coração apresenta alta demanda de energia, já que encontra-se em atividade constante. O ATP necessário é gerado pelas mitocôndrias, na cadeia respiratória, através do processo de fosforilação oxidativa e, como subproduto, a cadeia respiratória gera EROs (Figura 1). Em condições fisiológicas, estas EROs desempenham papel importante na sinalização intracelular, porém em estados patológicos, a produção aumentada de EROs pode tornar-se prejudicial ao cardiomiócito (BUGGER *et al.*, 2014).

Vários achados sugerem um papel central das EROs no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Nessa circunstância, pode-se encontrar marcadores de estresse oxidativo aumentados no miocárdio, além de modificações oxidativas pós-traducionais em múltiplas proteínas-alvo, muitas das quais estão na mitocôndria. Sendo assim, a disfunção mitocondrial é objeto de intensa investigação para entender essa complexa síndrome clínica e descobrir novos alvos terapêuticos moleculares (SCHEUBEL *et al.*, 2002; SVERDLOV *et al.*, 2016). A quercetina, pertencente à classe dos flavonóides, é uma potente depuradora de EROs, tendo se tornado alvo de atenção por apresentar diversos efeitos benéficos no sistema

cardiovascular (DUARTE et al., 2001b). Nesse contexto, a hipótese central desse estudo é que o uso da quercetina é capaz de atenuar a hipertrofia cardíaca por melhorar o balanço redox celular e mitocondrial.

1.1 Cadeia de transporte de elétrons na hipertrofia cardíaca

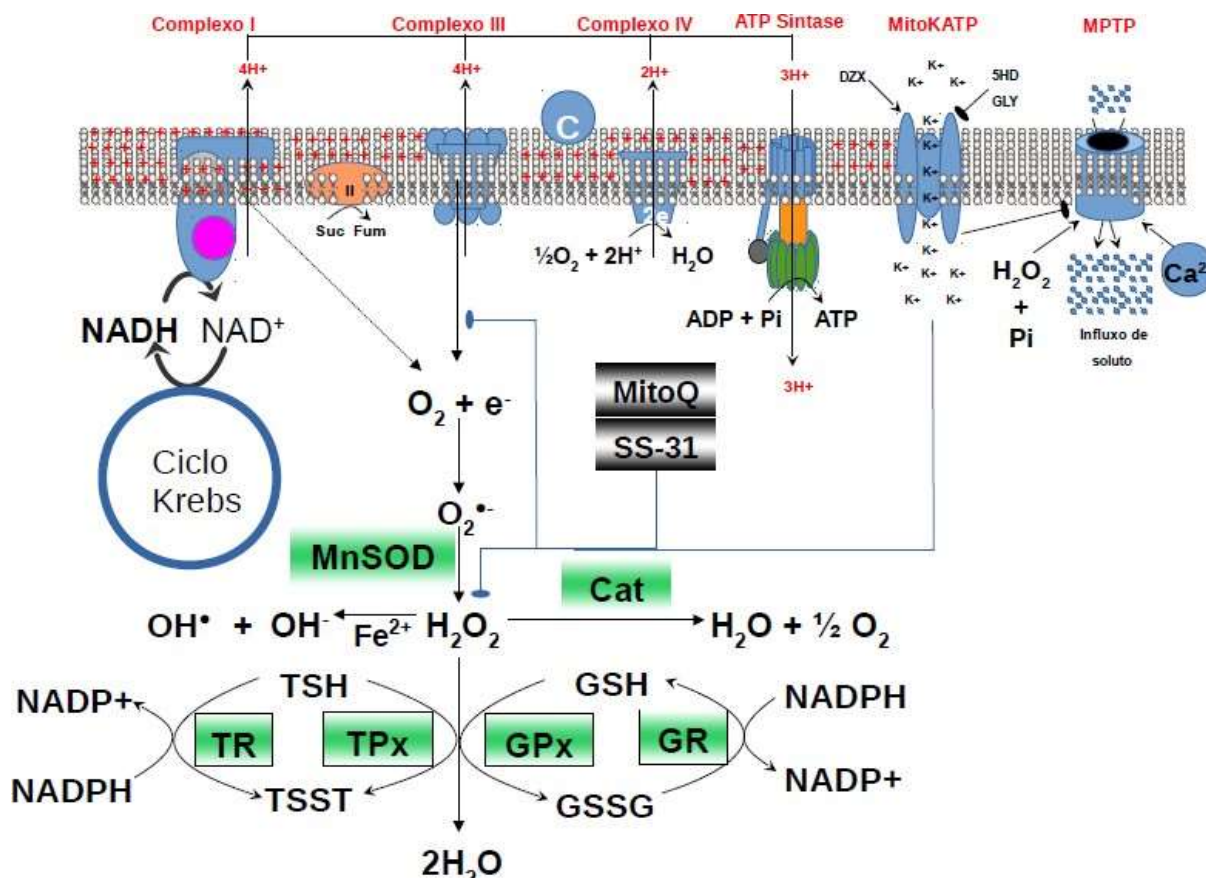
As mitocôndrias geram energia através da fosforilação oxidativa (OXPHOS) que ocorre na membrana mitocondrial interna. A produção de energia mitocondrial é um processo no qual os elétrons passam por quatro complexos mitocondriais (I, II, III e IV), citocromo c e ubiquinona. Ao final, quando os elétrons atingem o complexo IV, são utilizados para a redução de oxigênio à água (SARASTE, 1999). Como resultado da transferência de elétrons, os prótons são bombeados ativamente para o espaço intermembrana pelos complexos I, III e IV, gerando um gradiente eletroquímico (composto de um potencial elétrico - $\Delta\psi$ e uma razão de concentração de prótons - ΔpH). Essa energia é utilizada pelo complexo V (FO/F1-ATP-sintase) que promove diminuição do gradiente de concentração dos prótons ao permitir sua volta para matriz mitocondrial, gerando energia. Essa energia é então utilizada para unir uma molécula de ADP com um P_i , produzindo ATP (HATEFI, 1985).

Este sistema (Figura 1) irá gerar a grande maioria do ATP celular que será usado pela mitocôndria ou exportado para ser usado para alimentar as funções celulares (HATEFI, 1985). A capacidade máxima de fosforilação oxidativa mitocondrial é reduzida pela hipertrofia cardíaca, em parte devido à diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória. Bioquimicamente, esse defeito respiratório atrapalha a produção de ATP, causando declínio no potencial da membrana e diminuindo a atividade da ATP sintase. Adicionalmente, isso reduz as vias de oxidação de substrato, resultando na acumulação de equivalentes redutores (KINDO *et al.*, 2012; LIN; SUN; LIU, 2003).

A cadeia respiratória (complexos I-IV) é a via final para a oxidação de equivalentes redutores (NADH, FADH_2). Os elétrons entram na cadeia de transporte de elétrons no complexo I ou II, que são transportados ao longo dos outros complexos para eventualmente reduzir o O_2 à H_2O (SARASTE, 1999). Uma cadeia respiratória disfuncional, portanto, levará ao comprometimento da fosforilação oxidativa, resultando não apenas na diminuição da produção de ATP mas também em desequilíbrio redox, devido a alterações no NAD^+/NADH . Por fim este quadro

leva a níveis aumentados de Ca^{2+} intracelular e geração aumentada de EROs (TAHARA; NAVARETE; KOWALTOWSKI, 2009).

Figura 1 – Formação e remoção de EROs na matriz mitocondrial.



Fonte: Adaptado de FACUNDO *et al.*, 2017. Os complexos enzimáticos (I, II, III e IV) transportam elétrons para o oxigênio molecular (O_2) e bombeiam prótons para o espaço intermembrana. Nesse processo, o oxigênio pode ser parcialmente reduzido formando o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), este por ação da superóxido dismutase mitocondrial que tem como cofator o manganês (MnSOD) é transformado em H_2O_2 . O H_2O_2 pode difundir pela membrana ou se acumular na mitocôndria, onde pode ser transformado em H_2O e O_2 por ação da catalase (CAT) ou pela ação da glutatona peroxidase/tioredoxina peroxidase (GPX/TPX) que transforma essa molécula em H_2O numa reação acoplada com glutatona/tioredoxina reduzidas (GSH/TSH). Glutatona/tioredoxina oxidadas (GSSG/TSST) podem ser novamente reduzidas a GSH/TSH pela ação da glutatona redutase (GR) ou tioredoxina redutase (TR) respectivamente. Essas enzimas usam o NADPH como doador de elétrons. Caso esse sistema não seja eficaz o H_2O_2 acaba se acumulando e pode ser convertido a radical hidroxila (OH^{\bullet}) pela reação de Fenton envolvendo Fe^{2+} .

Curiosamente, até 2% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias pode ser convertido em EROs como subprodutos da atividade respiratória. O complexo mitocondrial I contém 45 subunidades diferentes e seu papel principal é transferir elétrons do NADH para a cadeia de transporte de elétrons. Além disso, estudos mostram que o complexo I é um local importante de vazamento de elétrons, contribuindo significativamente para a formação de EROs (GRIFFITHS *et al.*, 2010; GRIVENNIKOVA; VINOGRADOV, 2006).

É importante citar que a transição da hipertrofia compensada do ventrículo esquerdo para a insuficiência cardíaca é precedida pela disfunção dos complexos I e II e posteriormente é seguido por aumento nas EROs e nos marcadores pró-apoptóticos (relação Bax/Bcl-2) (ST-PIERRE *et al.*, 2002). Além disso, mesmo na fase da hipertrofia compensada, as atividades dos complexos mitocondrial I e IV encontram-se reduzidas, o que pode estar associado à depleção do DNA mitocondrial (KWONG; SOHAL, 1998).

O defeito mitocondrial pode estar no nível de importação de proteínas para mitocôndrias e/ou sua montagem em complexos na membrana mitocondrial interna. Uma consequência direta seria prejuízo na fosforilação oxidativa cardíaca (SCHMIDT; PFANNER; MEISINGER, 2010). As proteínas mitocondriais são em sua maioria codificadas pelo DNA nuclear e importadas para as mitocôndrias. Mais importante, a função mitocondrial é mantida pela importação de proteínas nas organelas. Para serem direcionadas com precisão às mitocôndrias, as proteínas devem ser reconhecidas pelos receptores (Tom70, Tom20 e Tom22) localizados na membrana mitocondrial externa (ROSCA *et al.*, 2008).

Curiosamente, a expressão de Tom 70 encontra-se diminuída durante a hipertrofia cardíaca patológica induzida por vários estímulos (angiotensina-II, isoproterenol e endotelina-1). Por outro lado, a superexpressão de Tom 70 aboliu o crescimento hipertrófico patológico através da modulação da produção de EROs (LI *et al.*, 2014). Surpreendentemente, essa proteína também é reduzida na hipertrofia cardíaca patológica humana. Portanto, os distúrbios nas atividades da cadeia de transporte de elétrons também podem estar relacionados à fraca importação de proteínas para mitocôndrias desencadeadas pela hipertrofia cardíaca (FACUNDO *et al.*, 2017).

1.2 Hipertrofia cardíaca e estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um distúrbio no equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e as defesas antioxidantes. Um crescente corpo de evidências revela o seu papel causador nos processos subjacentes à hipertrofia cardíaca, que culminam em disfunção miocárdica. Já foi demonstrado que a hipertrofia cardíaca induzida pela angiotensina II, endotelina-1, fator de necrose tumoral (TNF- α) ou estresse mecânico em cardiomiócitos cultivados, envolve a produção de espécies reativas de oxigênio que por sua vez, é inibida por antioxidantes (CAVE *et al.*, 2005; TAKIMOTO; KASS, 2007).

Mudanças no perfil energético mitocondrial são característica dos corações hipertrofiados. O aumento do estresse oxidativo ativa várias quinases sinalizadoras de hipertrofia e fatores de transcrição (EISNER *et al.*, 2017; PAPANICOLAOU *et al.*, 2012). O padrão metabólico da idade fetal, leva ao deslocamento da oxidação dos ácidos graxos para oxidação mais eficiente da glicose, o que resulta no déficit na produção de energia, já que a glicólise produz menos quantidade de ATP que a β -oxidação (SIASOS *et al.*, 2018). No estágio de insuficiência cardíaca, a produção de energia diminui ainda mais e o estresse oxidativo aumenta, facilitando a disfunção celular e induzindo a apoptose (JIANG *et al.*, 2014).

A produção de EROs também estimula a proliferação de fibroblastos cardíacos e a expressão e ativação pós-traducional de metaloproteinases de matriz que desempenham papel fundamental no remodelamento extracelular (GRADMAN; ALFAYOUMI, 2006). As alterações anatômicas durante a hipertrofia ventricular incluem a fibrose perivascular e miocárdica, bem como o espessamento das artérias coronárias intramiocárdicas. A hipertrofia e a fibrose impedem a microcirculação cardíaca, resultando em hipóxia tecidual e conseqüentemente perda de miócitos cardíacos. Portanto, a função cardíaca pode diminuir progressivamente à medida que a hipertrofia passa gradualmente para insuficiência cardíaca (BOER; PINTO; VELDHUISEN, 2003).

Dessa maneira, o estresse oxidativo do miocárdio tem sido implicado na transição da hipertrofia ventricular compensada para insuficiência cardíaca e existem evidências que apoiam o papel das EROs nesse processo (AGO *et al.*, 2010; KURODA *et al.*, 2010; TSUTSUI; KINUGAWA; MATSUSHIMA, 2009). O estresse oxidativo pode prejudicar ainda mais a função mitocondrial, levando a modificações

oxidativas de proteínas mitocondriais, mutações no DNA mitocondrial e ativação do poro de transição de permeabilidade (ABEL; DOENST, 2011).

O aumento da produção de EROs, ao ativar o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), promove uma permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna, tipicamente promovida pelo acúmulo de quantidades excessivas de íons cálcio, resultando na perda de componentes da matriz, comprometimento da funcionalidade mitocondrial e substancial inchaço da organela, com consequente ruptura da membrana externa, liberação do citocromo c e, por fim, apoptose (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001).

Em condições fisiológicas normais, a membrana interna mitocondrial é impermeável a quase todos os íons e moléculas. Entretanto, sob condições de estresse, o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) pode se abrir na membrana interna mitocondrial, permitindo a passagem livre de qualquer molécula (RASOLA; BERNARDI, 2007).

Quando o mPTP abre, a barreira de permeabilidade da membrana interna é interrompida com duas consequências principais. Em primeiro lugar, embora todos os solutos de pequeno peso molecular se movam livremente através da membrana, as proteínas não o fazem e, como resultado, exercem pressão osmótica coloidal que causa o inchaço das mitocôndrias. Embora o desdobramento das cristas permita que a matriz se expanda sem a ruptura da membrana interna, a membrana externa se romperá e levará à liberação de proteínas no espaço intermembranoso, como o citocromo c e outros fatores que desempenham papel crítico na morte celular por apoptose (HALESTRAP; CLARKE; JAVADOV, 2004).

Em segundo lugar, a membrana interna torna-se livremente permeável aos prótons. Isso desfaz a fosforilação oxidativa, fazendo com que a ATPase de translocação de prótons reverta a direção e, assim, hidrolisem ativamente o ATP, em vez de sintetizá-lo (HALESTRAP; CLARKE; JAVADOV, 2004). Sob tais condições, as concentrações de ATP intracelular diminuem rapidamente, levando ao rompimento da homeostase iônica e metabólica e à ativação de enzimas degradativas, como fosfolipases, nucleases e proteases. A menos que ocorra o fechamento dos poros, essas alterações causarão danos irreversíveis à célula, resultando em morte necrótica. Mesmo que ocorra o fechamento, o edema mitocondrial e a ruptura da membrana externa podem ser suficientes para colocar a cascata apoptótica em movimento (HALESTRAP *et al.*, 1998).

Assim, não é de surpreender que o mPTP seja mantido fechado sob condições fisiológicas normais e só seja ativado sob condições patológicas. O principal fator responsável pela abertura do mPTP é a sobrecarga de cálcio mitocondrial, especialmente quando acompanhada por estresse oxidativo, depleção de nucleotídeos de adenina, concentrações elevadas de fosfato e despolarização mitocondrial (HALESTRAP; CLARKE; JAVADOV, 2004; KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001).

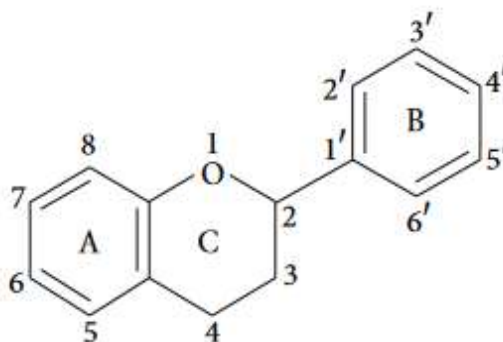
1.3 Flavonóides e estresse oxidativo

Os flavonóides são importantes metabólitos secundários de plantas, de estrutura polifenólica, amplamente encontrados em frutas e vegetais (BURAK; IMEN, 1999). Eles têm diversos efeitos bioquímicos protetores contra várias doenças, como câncer, doença de Alzheimer (DA), aterosclerose e doenças cardiovasculares (OVANDO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2009).

Os flavonóides estão associados a um amplo espectro de efeitos promotores de saúde e são componentes indispensáveis em diversas aplicações nutracêuticas, farmacêuticas, medicinais e cosméticas (WALKER *et al.*, 2000). Isso ocorre devido às suas propriedades anti-oxidativas, anti-inflamatórias, anti-mutagênicas e anti-carcinogênicas, juntamente com sua capacidade de modular as principais funções enzimáticas celulares (METODIEWA; KOCHMAN; KAROLCZAK, 1997). Eles também são conhecidos por serem inibidores potentes de várias enzimas, como xantina oxidase (XO), ciclo-oxigenase (COX), lipoxigenase (LOX) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (HAYASHI *et al.*, 1998;).

De forma geral, os flavonóides pertencem a uma classe de compostos fenólicos de baixo peso molecular e são amplamente distribuídos no reino vegetal (DEWICK, 2001). Quimicamente, são baseados em um esqueleto de quinze carbonos, consistindo em dois anéis de benzeno (A e B) ligados por um anel pirano heterocíclico (C) (Figura 2). Eles podem ser divididos em uma variedade de classes, como flavonas (por exemplo, apigenina e luteolina), flavonóis (por exemplo, quercetina, kaempferol, miricetina e fisetina), flavanonas (por exemplo, hesperidina e naringenina) e outras (MIDDLETON, 1998).

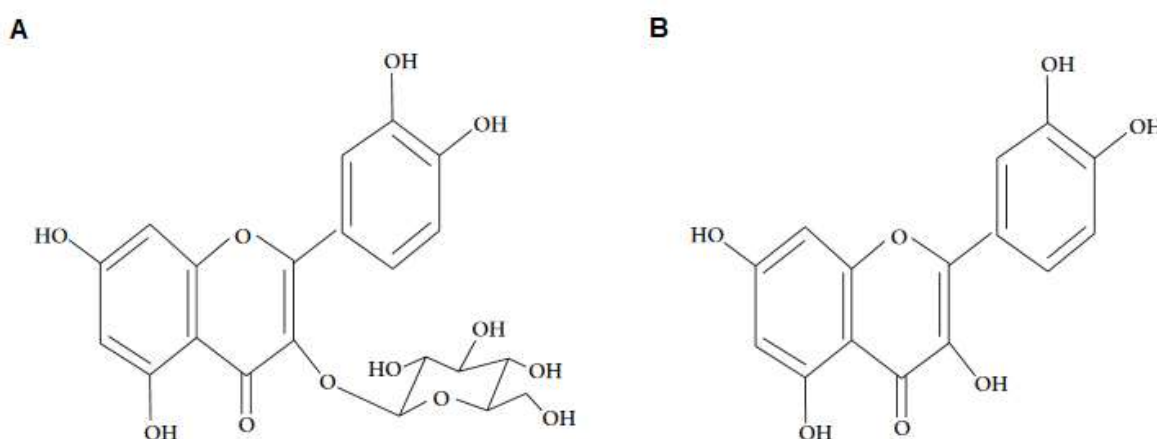
Figura 2 – Representação estrutural básica de um flavonóide.



Fonte: Adaptado de KUMAR; PANDEY, 2013. Representação estrutural básica de um flavonóide – esqueleto de quinze carbonos, com dois anéis de benzeno (A e B) ligados por um anel pirano heterocíclico (C).

As várias classes de flavonóides diferem no nível de oxidação e no padrão de substituição do anel C, enquanto os compostos individuais de uma classe diferem no padrão de substituição dos anéis A e B. Os flavonóides ocorrem como agliconas, glicosídeos e derivados metilados (Figura 3). A estrutura flavonóide básica é a aglicona. A posição do substituinte benzenoide (anel B) divide a classe flavonóide em flavonóides e isoflavonóides (MIDDLETON, 1998).

Figura 3 – Formas representativas de ocorrência dos flavonóides.



Fonte: Adaptado de KUMAR; PANDEY, 2013. **A.** Forma representativa de um flavonóide glicosídeo. **B.** Forma representativa de um flavonóide aglicona.

Os flavonóis diferem das flavanonas pelo grupo hidroxila na posição 3 e na

ligação dupla C2-C3. Os flavonóides são frequentemente hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 2, 3', 4' e 5' (NARAYANA *et al.*, 2001). Quando os glicosídeos são formados, a ligação glicosídica normalmente está localizada nas posições 3 ou 7 e os carboidratos podem ser L-ramnose, D-glicose, glucoranose, galactose ou orarabinose (MIDDLETON, 1984).

Os flavonóides são abundantemente encontrados em alimentos e bebidas de origem vegetal, como frutas, verduras, chá, cacau e vinho, por isso são denominados flavonóides na dieta (YAO *et al.*, 2004). Sendo fitoquímicos, os flavonóides não podem ser sintetizados por seres humanos e animais. Assim, os flavonóides encontrados nos animais são de origem vegetal, em vez de serem biossintetizados. Os flavonóides nos alimentos são geralmente responsáveis pela cor, sabor, prevenção da oxidação da gordura e proteção de vitaminas e enzimas (KOES; VERWEIJ; QUATTROCCHIO, 2005).

Os benefícios para a saúde dos flavonoides, atribuídos aos polifenóis, geralmente estão ligados a duas propriedades: (I) inibição de certas enzimas, como xantina oxidase e (II) atividade antioxidante (KORKINA; AFANASEV, 1997). Os flavonóides podem prevenir lesões causadas pelos radicais livres de várias maneiras e uma delas é a eliminação direta de radicais livres. Os flavonóides são oxidados pelos radicais, resultando num radical mais estável e menos reativo. Em outras palavras, os flavonóides estabilizam as espécies reativas de oxigênio reagindo com o composto reativo do radical. Assim, devido à alta reatividade do grupo hidroxila dos flavonóides, os radicais são desativados (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994).

Estudos observaram que os flavonóides podem eliminar diretamente os ânions superóxidos além de também poderem eliminar o radical altamente reativo derivado do oxigênio, chamado peroxinitrito. Esses estudos mostraram que os flavonóides, como a epicatequina e a rutina, são poderosos eliminadores de radicais e a capacidade de eliminação da rutina é devida à sua atividade inibitória sobre a enzima xantina oxidase (HANASAKI *et al.*, 1997). Além disso, outros estudos relataram que, ao eliminar radicais, os flavonóides podem inibir a oxidação do LDL e dessa maneira, podem prevenir a aterosclerose (KERRY; ABBEY, 1997).

Vários estudos epidemiológicos sugeriram que beber chá verde ou preto pode diminuir as concentrações de colesterol no sangue e a pressão sanguínea, fornecendo assim alguma proteção contra doença cardiovascular. Foi observado um efeito anti-hipertensivo na fração total de flavonóides do *Astragalus complanatus* em

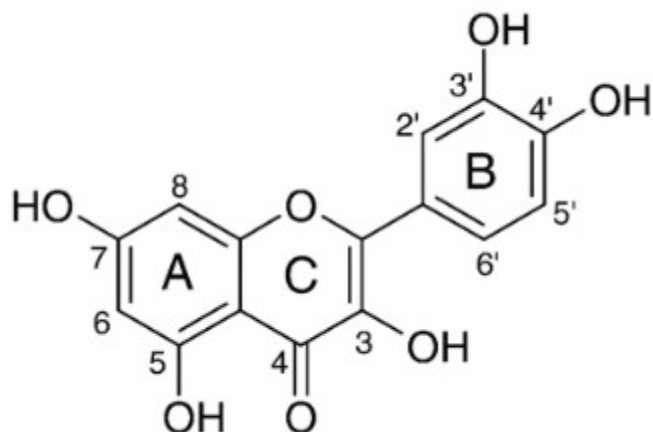
ratos hipertensos. Dentre outras atividades, os flavonoides podem ter um efeito positivo contra a doença de Parkinson e também podem ajudar a melhorar a memória em idosos. A ingestão de flavonóides antioxidantes tem sido também inversamente relacionada ao risco de incidência de demência (COMMENGES et al., 2000; LI et al., 2005).

1.4 Quercetina

Segundo estudos epidemiológicos, o aumento da ingestão de flavonóides é acompanhado por um risco reduzido de doenças coronarianas. Nesse contexto, a quercetina tornou-se alvo de atenção, principalmente devido ao seu amplo espectro de efeitos benéficos no sistema cardiovascular (DUARTE *et al.*, 2001a).

Dentro da família dos flavonóides, a quercetina é a mais potente depuradora de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo o radical superóxido e espécies reativas de nitrogênio, como o radical óxido nítrico e o peroxinitrito. Estas capacidades antioxidantes da quercetina são atribuídas à presença de dois farmacóforos antioxidantes dentro da molécula (grupo catecol no anel B e grupo OH na posição 3 do anel AC) que possuem a configuração ótima para eliminação de radicais livres (Figura 4). Além disso, sugere-se que a quercetina possa fortalecer significativamente a proteção antioxidante endógena devido à sua contribuição para a capacidade antioxidante total do plasma que é 6,24 vezes maior do que o antioxidante referência trolox, enquanto por exemplo a contribuição da vitamina C e do ácido úrico virtualmente é igual à do trolox (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008).

Figura 4 – Representação estrutural da quercetina.



Fonte: Adaptado de BOOTS; HAENEN; BAST, 2008. As capacidades antioxidantes da quercetina são atribuídas à presença de um grupo catecol no anel B e um grupo OH na posição 3 do anel AC.

A quercetina é um importante polifenol na dieta, presente em vários alimentos e consumido quase diariamente. Pesquisas sobre a bioatividade da quercetina identificaram inúmeras vias pelas quais ela pode impedir ou retardar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (JOSEPH; MURALIDHARA, 2015; MAGALINGAM *et al.*, 2015; PISONERO-VAQUERO *et al.*, 2015a, 2015b, SABOGAL-GUAQUETA *et al.*, 2015).

Apesar de sua capacidade direta de eliminação de radicais livres, os polifenóis também podem exercer um efeito antioxidante intracelular por meio de vários mecanismos. Esses mecanismos incluem modulação da expressão e/ou atividade de enzimas antioxidantes endógenas, reduzindo assim a produção de espécies reativas de oxigênio (ALÍA *et al.*, 2006; GRAZIANI *et al.*, 2005; PATEL; MARU, 2008; SPANIER *et al.*, 2009).

As proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e outras vias de sinalização que desempenham papéis importantes na hipertrofia cardíaca, são fortemente ativadas pelas EROs. As EROs atuam como moléculas sinalizadoras intracelulares na resposta ao estresse, levando à apoptose, proliferação e transformação. Nos cardiomiócitos, as EROs mediam a hipertrofia cardíaca induzida por diversos estímulos, como o estiramento mecânico, angiotensina II e o fator de necrose tumoral. Nesse sentido, a quercetina, enquanto antioxidante, apresenta um papel significativo na prevenção da hipertrofia cardíaca (CHEN *et al.*, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto do tratamento com quercetina sobre a hipertrofia cardíaca.

2.2 Objetivos específicos

Determinar os efeitos do tratamento com quercetina sobre os níveis de proteínas totais e proteínas sulfidrilas em corações hipertróficos;

Avaliar os efeitos do tratamento com quercetina sobre a atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase (SOD);

Determinar a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em corações hipertróficos que foram tratados com quercetina;

Avaliar os efeitos da quercetina sobre a expressão e atividade da superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD);

Avaliar os efeitos da quercetina sobre a respiração/função mitocondrial através da medida da razão do controle respiratório (RCR) e relação ADP/O;

Analisar o impacto do tratamento *in vivo* com quercetina sobre a indução da abertura do mPTP em corações hipertróficos;

Analisar o impacto do tratamento *in vitro* com quercetina sobre a indução da abertura do mPTP em corações hipertróficos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os animais foram utilizados em conformidade com o guia para cuidado e uso de animais de laboratório publicado pelo National Institute of Health. O protocolo foi aprovado pelo comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Cariri com número de protocolo 01/2019 (ANEXO A). Camundongos Swiss de 60 dias de idade, machos, pesando entre 25 e 30 g foram mantidos a 23 ± 2 °C com ciclo de 12 hrs claro/escuro e com acesso a uma dieta padrão (Purina do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e água filtrada.

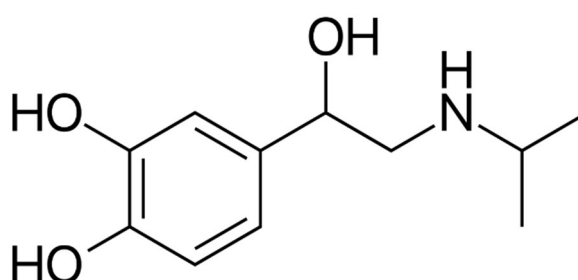
3.2 Drogas e reagentes

3.2.1 Isoproterenol

O isoproterenol (Figura 5) é um agonista beta-adrenérgico não seletivo utilizado em pesquisas cardiovasculares. Possui um efeito inotrópico e cronotrópico positivo sobre o coração, ocasionando hipertrofia. Para o estudo, foi utilizada a mistura racêmica (\pm) isoproterenol obtida através da Sigma-Aldrich® (código I5627).

O (\pm) isoproterenol apresenta-se como um pó branco, que foi utilizado na dose de 30 mg/kg/dia e aplicado via intraperitoneal com um intervalo de 24 hrs entre as aplicações. Sua diluição foi feita em solução salina a 0,9%, na concentração de 3 mg/mL e, para cada animal, foram administrados 300 μ L.

Figura 5 – Representação estrutural do isoproterenol.



3.2.2 Quercetina e carboximetilcelulose

A quercetina foi obtida através da Sigma-Aldrich® (código Q4951), apresenta-se como um pó amarelo e, *in vivo*, foi administrada na forma de suspensão em carboximetilcelulose a 1% (Labsynth®). Para tal, a quercetina foi misturada lentamente à carboximetilcelulose sob agitação constante em vórtex. A preparação foi feita na concentração de 1:1 (m/v) e a dosagem de quercetina utilizada foi 10 mg/kg/dia. Sua administração foi feita através de gavagem (via oral) e para cada animal foram administrados 300 μ L. A carboximetilcelulose, por sua vez, apresenta-se como um pó branco e foi diluída na concentração de 1% (m/v) em solução salina a 0,9%.

Para teste *in vitro*, a quercetina foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 2,5, 5 e 10 nM e administrada sobre mitocôndrias isoladas de corações hipertróficos.

3.2.3 Rotenona, succinato, oligomicina e carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona

O succinato é um substrato do complexo II mitocondrial (succinato desidrogenase), que fornece elétrons para a cadeia de transporte de elétrons, enquanto a rotenona é um inibidor do complexo I (NADH desidrogenase). Os dois são utilizados em conjunto para estimular a respiração *in vitro* em mitocôndrias isoladas. A oligomicina e o carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), por sua vez, são moduladores da função mitocondrial. A oligomicina é uma droga inibidora da ATP-sintase e o CCCP é um ionóforo que ocasiona desacoplamento da respiração e síntese de ATP (PANOV, 2015).

Todas as drogas são provenientes da Sigma-Aldrich® e foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) nas seguintes concentrações: rotenona 5 μ M, succinato 3 mM, oligomicina 1 μ g/mL e carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) 100 nM.

3.2.4 Reagentes

Azul de nitrotetrazólio (NBT) 100 mg/ml – Obtido através da Sigma-Aldrich®. Apresenta-se na forma de um pó branco e é um potente indicador redox que forma um diformazano insolúvel após redução, sendo utilizado no estudo para detecção de SOD citosólica e mitocondrial. Sua diluição foi feita em água miliQ na concentração

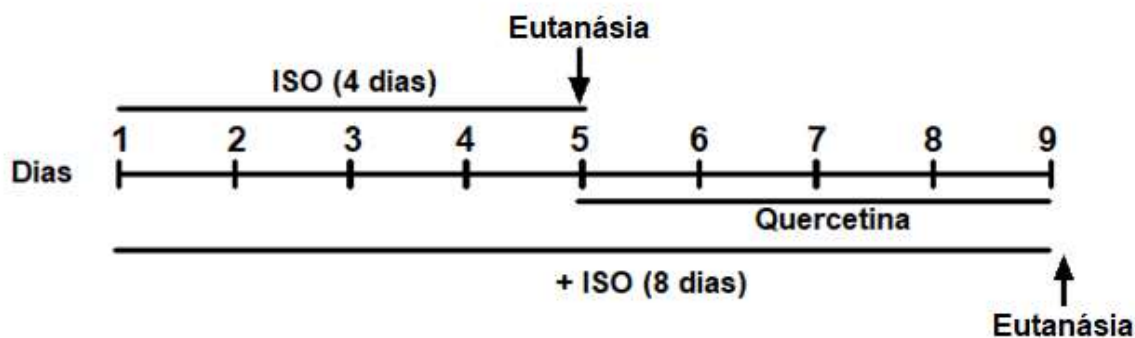
de 75 mM.

Ácido 2,2'-dinitro-5-5'-ditio-dibenzóico (DTNB) 10mg/ml – Obtido através da Sigma-Aldrich®. Também chamado de reagente de Ellman, é um reagente que interage com os grupos tiol das proteínas, sendo utilizado no estudo para determinar seus níveis. Sua diluição foi feita em uma solução de tampão fosfato-salino (PBS) contendo (em mM) 137 NaCl, 10 Na₂HPO₄, 2 KH₂PO₄, pH 7,4 mais EDTA, na concentração de 0,2 mM.

3.3 Indução da hipertrofia cardíaca e tratamento com quercetina

Para estudar os efeitos da quercetina na hipertrofia cardíaca induzida por (\pm) isoproterenol (ISO), camundongos *Mus musculus* linhagem Swiss com 60 dias de idade (25-30 g) foram tratados por oito dias consecutivos, num intervalo de 24 horas. Nos primeiros quatro dias, os animais foram divididos em dois grupos – um grupo ISO que recebeu 300 μ L de (\pm) isoproterenol (na dose de 30 mg/kg/dia) por via intraperitoneal e um grupo controle que recebeu 300 μ L de solução salina (0,9%) também por via intraperitoneal. A partir desse ponto, para avaliação dos efeitos do (\pm) isoproterenol, uma parte de camundongos do grupo ISO e do grupo controle foi submetida à eutanásia, o tecido cardíaco foi coletado e os parâmetros de estresse oxidativo analisados. Os camundongos restantes do grupo ISO foram então subdivididos arbitrariamente em dois grupos e tratados por mais quatro dias (Figura 6) – Um grupo recebeu 300 μ L de (\pm) isoproterenol (na dose de 30 mg/kg/dia), mais 300 μ L de quercetina (na dose de 10 mg/kg/dia em suspensão em carboximetilcelulose 1%) via oral (grupo ISO+QUE) e outro grupo que recebeu 300 μ L de (\pm) isoproterenol e também 300 μ L de carboximetilcelulose 1% via oral (grupo ISO). O grupo controle recebeu injeções de solução salina à 0,9% por via intraperitoneal e também carboximetilcelulose 1% via oral nos últimos quatro dias de tratamento. As aplicações intraperitoneais foram feitas alternando-se os lados de aplicação durante o decorrer do tratamento, a fim de evitar a ocorrência de peritonite. A dose de quercetina utilizada foi escolhida com base nos estudos que demonstraram sua atividade antioxidante já presentes na literatura.

Figura 6 – Esquema de tratamento dos animais.



Fonte: Elaboração própria. Representação esquemática dos tratamentos dos camundongos com (\pm) isoproterenol (4 dias), (\pm) isoproterenol (8 dias) e (\pm) isoproterenol mais quercetina. As setas indicam os dias das eutanásias dos camundongos.

3.4 Mensuração da hipertrofia cardíaca

Antes da eutanásia, os camundongos foram injetados com ketamina sódica (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), pesados e eutanasiados por decapitação. Os corações foram removidos, lavados com tampão fosfato-salino (PBS) gelado para remover o excesso de sangue e pesados. As tíbias foram removidas, dissecadas e seus comprimentos foram medidos. A hipertrofia cardíaca foi expressa pela relação entre peso cardíaco (mg) e comprimento da tíbia (mm). Os ventrículos esquerdos foram seccionados e imediatamente utilizados para a quantificação de H_2O_2 .

3.5 Quantificação da produção de H_2O_2

A produção de H_2O_2 foi medida usando Amplex Red (Molecular Probes[®]) de acordo com as instruções do fabricante. De forma rápida, os ventrículos esquerdos foram cortados em blocos (20 mg) e incubados (protegidos da luz) com Amplex Red (50 μ mol/mL) e peroxidase de raiz forte (HRP) (1 U/mL) durante 30 min a 37°C em tampão Krebs-Hepes contendo (em mM) 118 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 1,2 KH_2PO_4 , 4,7 KCl, 1,2 $MgSO_4$, 1,25 $CaCl_2$, 10 glicose e 10 Hepes, pH 7,4. Os tubos foram centrifugados a 5000 RCF durante 2 min e a absorbância medida a 560 nm. A absorbância do branco foi determinada incubando Amplex Red e HRP sem a amostra. A liberação de H_2O_2 foi calculada utilizando padrões de H_2O_2 para criar uma curva de calibração e expressa em μ mol/20 mg de tecido.

3.6 Isolamento mitocondrial

Rapidamente, o tecido cardíaco foi picado em pedaços pequenos usando uma tesoura, lavado duas vezes com PBS gelado. Após isso os corações foram expostos a protease de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich®) por 10 min em tampão contendo sacarose 300 mM, tampão K⁺ Hepes 10 mM, pH 7,2 e K⁺ EGTA 1 mM. O excesso de protease foi removida por lavagem com tampão contendo sacarose 300 mM, tampão K⁺ Hepes 10 mM, pH 7,2, K⁺ EGTA 1 mM e albumina de soro bovino (BSA) 1 mg/mL e logo em seguida homogeneizado com um potter de vidro pré-resfriado no mesmo tampão gelado. Núcleos e resíduos celulares foram sedimentados por centrifugação a 1200 g por 5 min. Para obter o sedimento mitocondrial, o sobrenadante foi centrifugado a 9000 RCF por 10 min. O sedimento mitocondrial foi ressuspenso em uma quantidade mínima de tampão (100 µL) e usado imediatamente para avaliação da atividade respiratória, para avaliação da abertura do mPTP e posteriormente para determinação da atividade de superóxido dismutase dependente de manganês (SOD mitocondrial). O sobrenadante resultante (fração citosólica) foi armazenado a -80 °C e utilizado para os outros ensaios bioquímicos (proteínas tiol, catalase e superóxido dismutase Cu/Zn).

3.7 Avaliação da respiração/função mitocondrial

A adição de ADP às mitocôndrias isoladas na presença de substrato (succinato) estimula a fosforilação oxidativa, que é convencionalmente denominada de "estado 3" da respiração. Como resultado, o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) cai e o consumo de oxigênio aumenta. Sendo assim, o grau de declínio do $\Delta\Psi$ depende da capacidade da mitocôndria de estimular a respiração. Já o "estado 4" é caracterizado pelo esgotamento do ADP e conseqüentemente o $\Delta\Psi$ torna-se máximo, fazendo com que o consumo de oxigênio diminua. Por fim, a adição de um protonóforo (CCCP) resulta no consumo máximo de oxigênio (respiração máxima) devido à dissipação do $\Delta\Psi$. Esse estado metabólico é designado como "estado desacoplado" (PANOV, 2015).

A razão numérica estado 3/ estado 4 é denominada razão do controle respiratório mitocondrial (RCR), na qual uma alta relação reflete uma boa função mitocondrial, enquanto que uma baixa relação é interpretada como sinal de

desacoplamento mitocondrial e comprometimento da função da organela (PANOVA, 2015).

Outro parâmetro utilizado para avaliar função mitocondrial é a relação ADP/O, que nada mais é que a relação entre o consumo de oxigênio e a síntese de ATP. Em outras palavras, refere-se à quantidade de moléculas de ADP fosforiladas por átomos de oxigênio reduzidos. Essa razão reflete a eficiência da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, sendo que quanto maior essa relação, maior a eficiência (PANOVA, 2015).

A respiração mitocondrial foi medida utilizando-se um oxígrafo (*Oxygraph Plus*) com eletrodo tipo Clark, que permite a verificação do oxigênio consumido no meio reacional pelas mitocôndrias em cada condição testada. Para tal, as mitocôndrias isoladas foram suspensas em meio experimental contendo D-manitol 75 mM, sacarose 25 mM, KH_2PO_3 20 mM, Tris-HCl 5 mM, KCl 100 mM, BSA à 0,1%, EGTA 1 mM e EDTA 0,5 mM, pH 7,4 (K^+). Todos os experimentos foram realizados no mesmo meio, a 37°C e utilizando-se como substrato mitocondrial succinato 3 mM na presença de rotenona 5 μM (que proporciona melhores taxas respiratórias). A respiração do “estado 3” foi medida pela adição de 1 mM de ADP, a do “estado 4” pela adição de 1 $\mu\text{g/ml}$ de oligomicina e a respiração máxima foi promovida pela adição de 100 nM de CCCP. A razão do controle respiratório mitocondrial (RCR) foi determinada pela razão estado 3/estado 4, obtidos através do coeficiente angular das retas, em uma análise de regressão linear. Já a relação ADP/O foi determinada pela razão entre a concentração de ADP utilizada (200 μmol) e a variação da concentração de oxigênio no meio no “estado 3” (ΔO_2). Todos os valores foram normalizados pela concentração de proteínas presentes na amostra.

3.8 Avaliação da abertura do mPTP (aumento do volume mitocondrial)

As mitocôndrias dos corações de camundongos (0,2 mg de proteína/mL) foram incubadas em tampão contendo KCl 100 mM, HEPES 10 mM, succinato 2 mM, MgCl_2 2 mM, KH_2PO_4 2 mM, oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$, pH 7,2 (KOH). Para induzir a abertura do mPTP, adicionou-se 2 μM de CaCl_2 . As alterações na dispersão da luz devido à absorção de Ca^{2+} e conseqüentemente, ao aumento do volume mitocondrial, foram medidas como uma diminuição ao longo do tempo na densidade óptica a 540 nm.

3.9 Atividade enzimática da SOD mitocondrial (MnSOD)

A atividade de MnSOD foi medida segundo o procedimento de Weisiger e Fridovich (1973). As mitocôndrias foram submetidas a três ciclos de congelamento-descongelamento rápido em tampão hipotônico (KH_2PO_4 25 mM, pH 7,2, MgCl_2 5 mM), pH 7,2 antes do ensaio. As mitocôndrias foram então adicionadas a um meio de reação contendo EDTA 0,1 mM, L-metionina 13 mM e azul de nitro-tetrazólio 75 mM (NBT) em tampão PBS pH 7,8. A reação foi iniciada pela adição de 2 μM de riboflavina e exposta uniformemente a uma luz branca não filtrada durante 10 minutos. A cor azul desenvolvida devido à redução de NBT foi medida a 560 nm. As amostras foram pré-incubadas durante 20 min com cianeto de sódio (5 mM) para inibir a Cu/ZnSOD residual e, assim, medir apenas a atividade de MnSOD. A atividade de SOD foi expressa como U/mg de proteína. Uma unidade é a quantidade de enzima necessária para inibir a redução de NBT em 50%.

3.10 Teor de proteínas

O teor total de proteínas em cada amostra foi estimado usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) que é baseado no deslocamento do equilíbrio do corante para sua forma aniônica, quando ocorre interação entre a proteína e o “coomassie brilhante blue” BG 250 (LI et al., 1995). Para calcular o teor de proteínas totais foi criada uma curva de calibração usando padrões de albumina de soro bovino (BSA) e a leitura foi realizada em 595 nm.

3.11 Teor de proteínas tiol (sulfidrilas)

O dano oxidativo às proteínas está inversamente correlacionado com o teor de tiol de proteínas. Os tióis nas proteínas foram medidos através da redução do DTNB, gerando um produto amarelo (TNB) medido a 412 nm. Os sobrenadantes do homogenato foram incubados no escuro por 30 min à 37°C com DTNB 0,2 mM (preparado em PBS mais EDTA 1 mM). O teor de proteína tiol foi calculado com base no coeficiente de extinção molar de TNB ($14.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e relatado como moles de TNB por miligrama de proteína. A reação com DTNB sem proteína e submetida à mesma incubação serviu como branco.

3.12 Atividade da catalase

Os sobrenadantes das amostras homogeneizadas foram adicionados ao meio de reação contendo 50 mM de H₂O₂ e 100 mM de tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,4). O decaimento na absorbância, a 240 nm, foi registrado por 10 min. A atividade da catalase foi calculada como miliunidades de catalase por miligrama de proteína.

3.13 Atividade da superóxido dismutase (Cu/ZnSOD)

O homogenato foi adicionado a um meio de reação contendo 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 75 mM de nitro azul tetrazólio (NBT) em tampão fosfato de potássio (pH 7,8). A reação foi iniciada pela adição de 2 µM de riboflavina e exposta uniformemente a uma luz branca não filtrada por 10 min. A absorbância da cor azul desenvolvida devido à redução de NBT foi medida em 560 nm. A atividade da SOD foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade é a quantidade de enzima necessária para inibir a redução de NBT em 50%.

3.14 Western Blot para SOD mitocondrial (MnSOD)

As proteínas de amostras cardíacas foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE (4-10%) e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi corada com o corante Ponceau para detectar o nível de proteínas em cada amostra. Após isso a membrana foi descorada e bloqueada à 37°C utilizando solução salina tamponada com Tris pH 7,5 (TBS) contendo 5% de leite livre de ácidos graxos. A MnSOD foi detectada inicialmente após incubação *overnight* a 4°C com anticorpo primário – Anti-SOD2/MnSOD de coelho da Abcam® (código ab68155) 1:1000. Em seguida, a membrana foi então lavada em TBS-Tween-20 a 0,1% (TBS-T) e foi novamente bloqueada em TBS-T em 1% de leite livre de ácidos graxos e incubado com anticorpo secundário de cabra anti IgG de coelho da Li-cor® (código 926-32211) marcado com IRDye 680RD (emite fluorescência na região do verde) conjugado com a imunoglobina, durante 1h. Após a lavagem com TBS-T, o blot foi detectado por um sistema de detecção fluorescente na região do verde. A análise densitométrica das bandas foi feita utilizando o software Image J. Os níveis de proteínas foram expressos como relativos ao controle.

3.15 Análise estatística

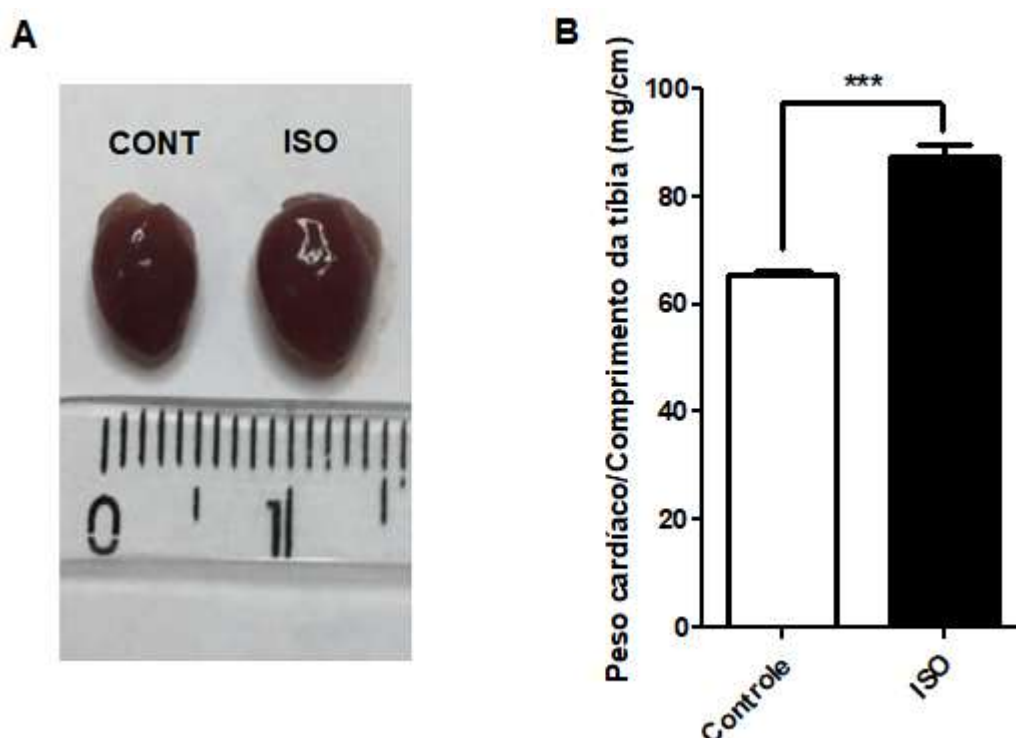
Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism[®] versão 5.0 (Microsoft Windows[®]). A diferença entre os grupos foram analisadas usando análise de variância teste “t” de student’s ou one-way (Anova) seguida de tukey test para análise de post hoc. Os dados são apresentados como média e erro padrão médio. Para todas as análises $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Tratamento com quercetina atenua a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol e restaura a atividade antioxidante enzimática

Após os primeiros 4 dias de tratamento com (\pm) isoproterenol, os camundongos tiveram corações hipertrofiados, como indicado pelo aumento do tamanho dos corações e pelo aumento da relação peso cardíaco/comprimento da tibia (Figura 7A, 7B). A diferença nessa relação foi associada a teor de proteínas maior (Figura 8A), sugestivo de hipertrofia cardíaca, e a menor teor de proteínas sulfidrilas, sugestivo de estresse oxidativo (Figura 8B). Além disso, foi observado que o tratamento com (\pm) isoproterenol leva ao comprometimento da atividade enzimática antioxidante, diminuindo a atividade de catalase e causando um leve efeito de diminuição mas não significativo de superóxido dismutase (Figura 9A, 9B).

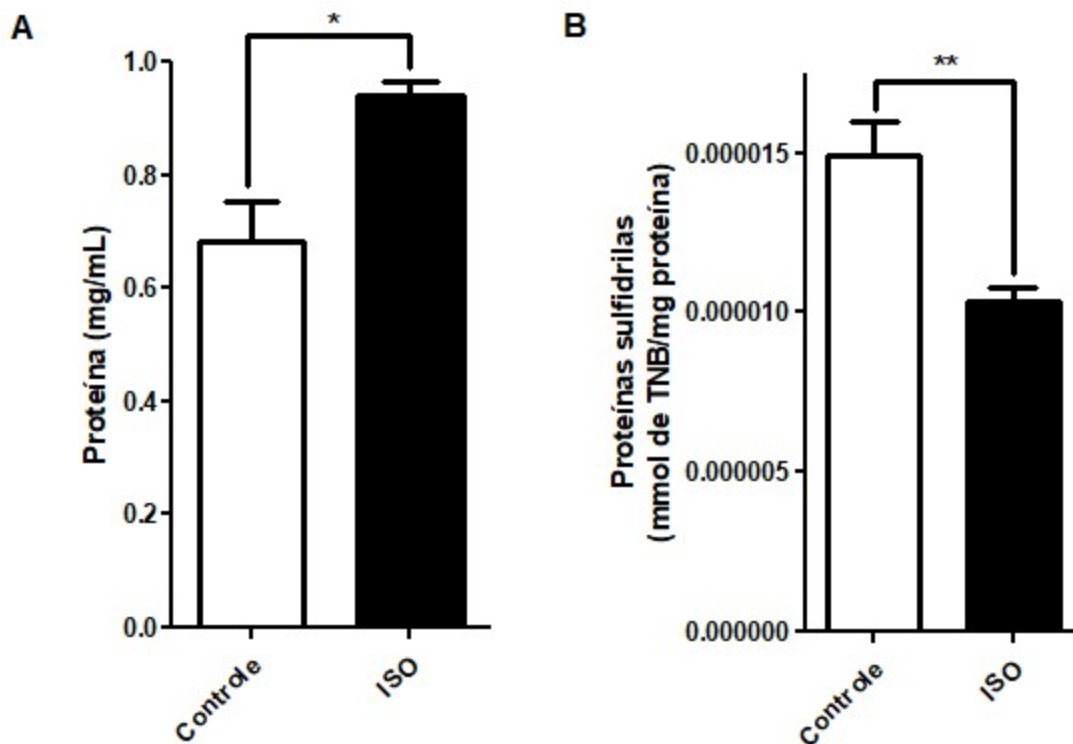
Figura 7 – Fotografia dos corações e relação peso cardíaco/comprimento da tibia.



Fonte: Dados da pesquisa. A. Fotografia dos corações de camundongos não tratados (controle) e tratados com (\pm) isoproterenol por 4 dias (ISO). B. Relação entre o peso cardíaco e o comprimento da tibia de camundongos não tratados (controle) e ao final do tratamento com (\pm) isoproterenol por 4 dias (ISO). *** $P < 0.001$. Os valores são apresentados

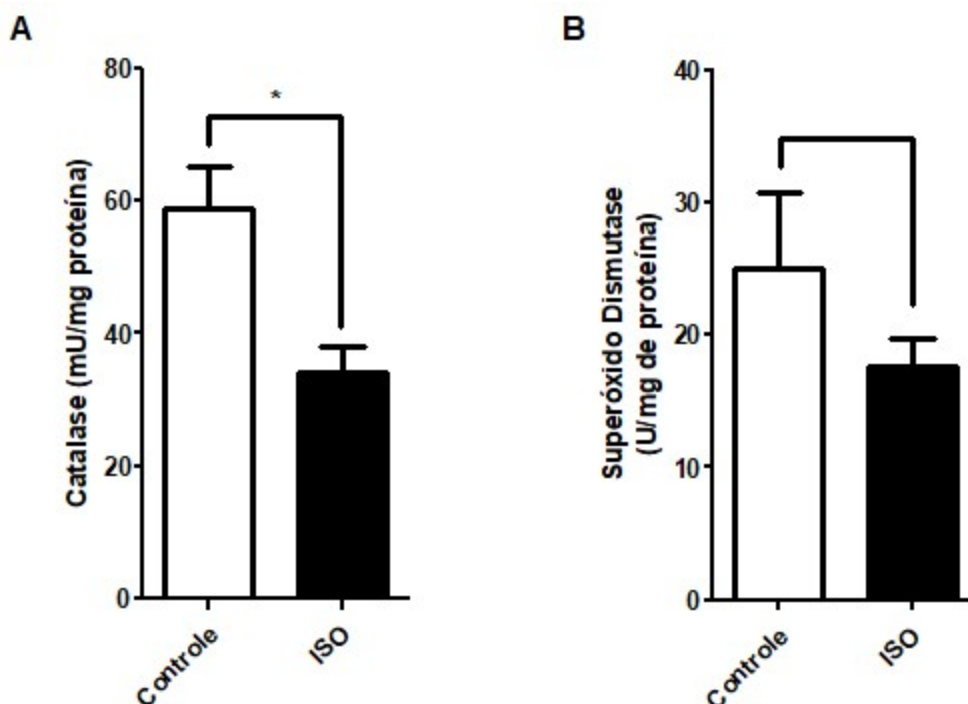
como \pm erro padrão da média, n=3-4 por grupo.

Figura 8 – Teor de proteínas totais e de proteínas sulfidrilas.



Fonte: Dados da pesquisa. A. Teor de proteínas totais em corações de camundongos não tratados (controle) e submetidos ao tratamento com (\pm) isoproterenol por 4 dias (ISO). B. Teor de proteínas sulfidrilas em corações de camundongos não tratados (controle) e submetidos ao tratamento com (\pm) isoproterenol por 4 dias (ISO). *P<0.05, **P<0.01. Os valores são apresentados como \pm erro padrão da média, n=3-4 por grupo.

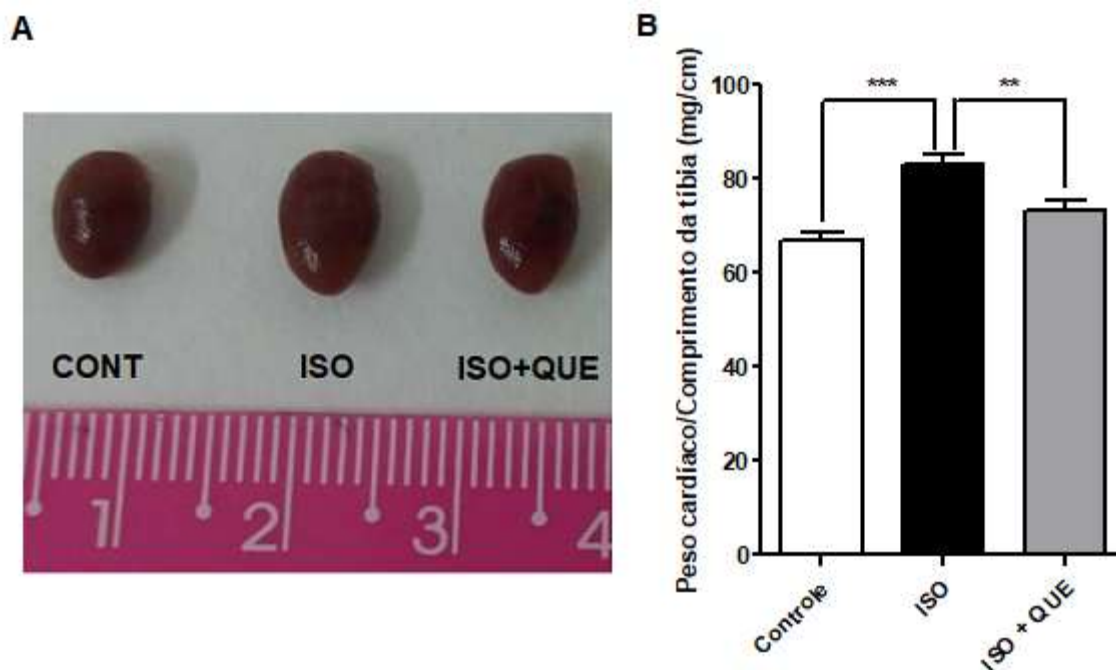
Figura 9 – Quantificação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase.



Fonte: Dados da pesquisa. **A.** Atividade de catalase (CAT). **B.** Atividade de superóxido dismutase (SOD). * $P < 0.05$. Os valores são apresentados como \pm erro padrão da média, $n=3-4$ por grupo.

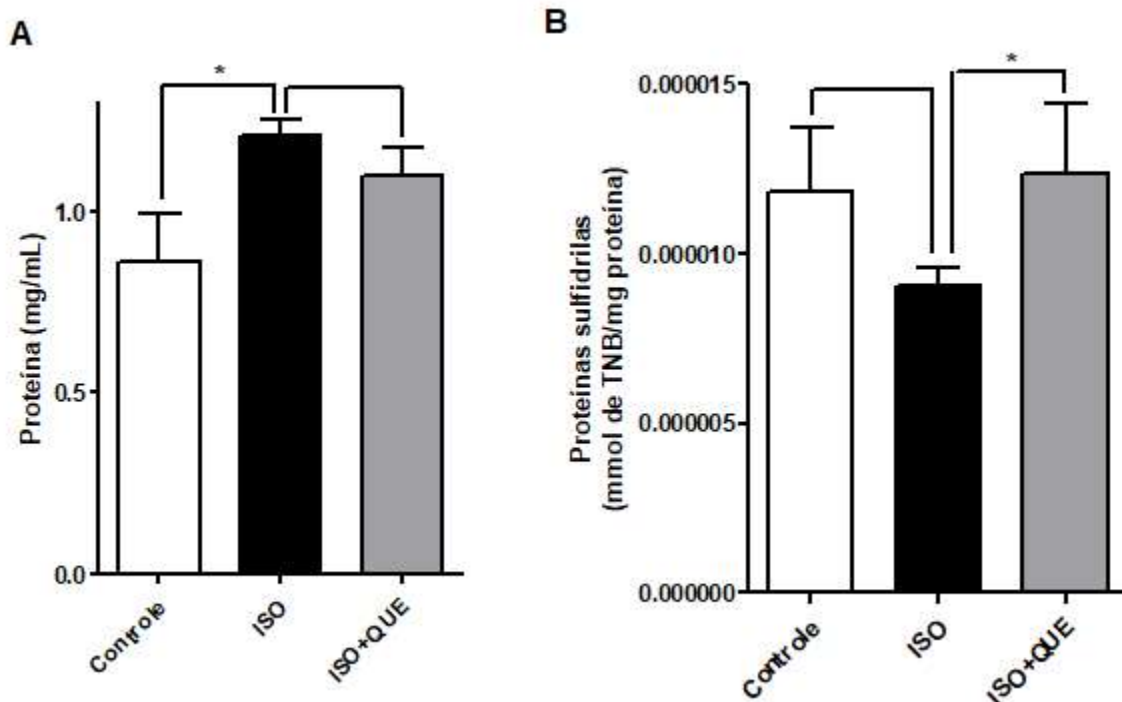
Sabendo que o tratamento com (\pm) isoproterenol leva à hipertrofia cardíaca e comprometimento da atividade antioxidante, investigou-se o efeito do tratamento com quercetina nessa condição subdividindo-se o grupo de camundongos que receberam (\pm) isoproterenol em um grupo que recebeu (\pm) isoproterenol mais quercetina (grupo ISO+QUE) e outro que continuou a receber apenas (\pm) isoproterenol (grupo ISO) por mais quatro dias. Observou-se que, ao final de oito dias, os corações do grupo ISO+QUE apresentaram menor tamanho (Figura 10A) e menor relação peso cardíaco/comprimento da tíbia (Figura 10B). Esses resultados demonstram que a quercetina atenuou a hipertrofia cardíaca induzida pelo (\pm) isoproterenol. Além disso, foi observado que o tratamento com quercetina foi capaz de restabelecer o teor de proteínas sulfidrilas (Figura 11B) e de melhorar significativamente a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase comprometidas nos corações hipertróficos (Figura 12A, 12B).

Figura 10 – Fotografia dos corações e relação peso cardíaco/comprimento da tíbia.



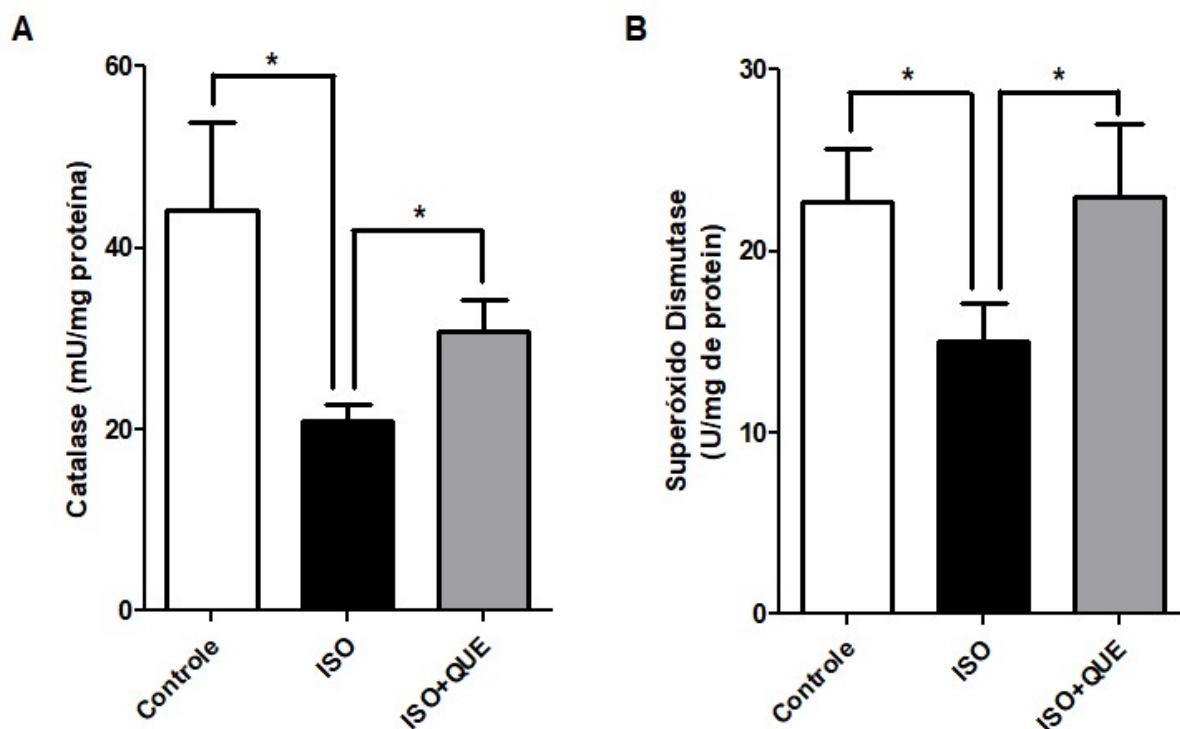
Fonte: Dados da pesquisa. A. Fotografia dos corações de camundongos não tratados (controle), ao final do tratamento (8 dias) com (\pm) isoproterenol (ISO) e (\pm) isoproterenol mais quercetina (ISO+QUE). B. Relação entre o peso cardíaco e o comprimento da tíbia de camundongos não tratados (controle), ao final do tratamento com (\pm) isoproterenol (ISO) e (\pm) isoproterenol mais quercetina (ISO+QUE). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Os valores são apresentados como \pm erro padrão da média, $n=4-6$ por grupo.

Figura 11 – Teor de proteínas totais e de proteínas sulfidrilas.



Fonte: Dados da pesquisa. A. Teor de proteínas totais em corações de camundongos não tratados (controle), submetidos ao tratamento (8 dias) com (\pm) isoproterenol (ISO) e (\pm) isoproterenol mais quercetina (ISO+QUE). B. Teor de proteínas sulfidrilas em corações de camundongos não tratados (controle), submetidos ao tratamento com (\pm) isoproterenol (ISO) e isoproterenol mais quercetina (ISO+QUE). * $P < 0.05$. Os valores são apresentados como \pm erro padrão da média, $n=4-6$ por grupo.

Figura 12 – Quantificação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase.

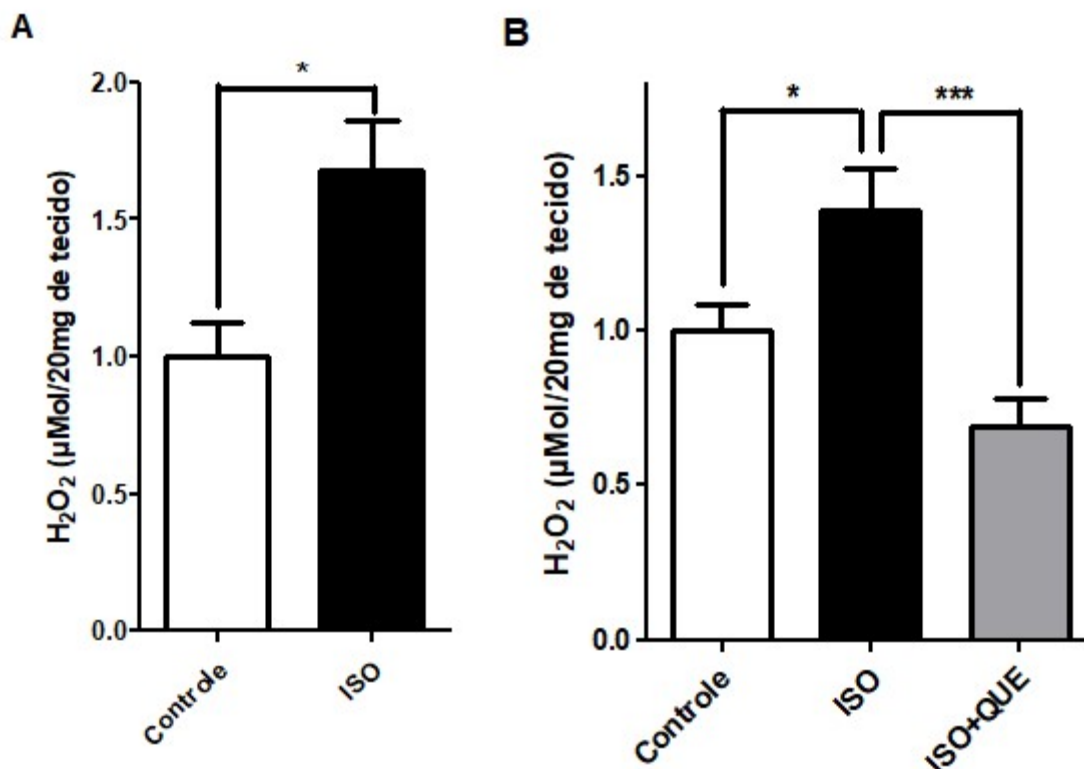


Fonte: Dados da pesquisa. **A.** Atividade de catalase (CAT). **B.** Atividade de superóxido dismutase (SOD). * $P < 0.05$. Os valores são apresentados como \pm erro padrão da média, $n=4-6$ por grupo.

4.2 Tratamento com quercetina bloqueia a produção de H_2O_2 durante a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol

Sabendo que a quercetina restaura a atividade antioxidante enzimática, foi levantada a hipótese de que o tratamento com quercetina também pode evitar a hipertrofia cardíaca atuando diretamente sobre as espécies reativas de oxigênio. De acordo com essa hipótese, observou-se que a concentração de H_2O_2 (medida usando o ensaio Amplex Red, conforme descrito em Materiais e métodos) encontra-se significativamente aumentada após 4 dias de tratamento com (\pm) isoproterenol (Figura. 13A) e que a intervenção com a quercetina a partir desse ponto, foi capaz de diminuí-la (Figura. 12B).

Figura 13 – Quantificação de H_2O_2 produzido pelos ventrículos esquerdos.



Fonte: Dados da pesquisa. A. Quantificação de H_2O_2 em camundongos não tratados (controle) e ao final de 4 dias de tratamento com (\pm) isoproterenol. B. Quantificação de H_2O_2 em camundongos não tratados (controle), ao final do tratamento de 8 dias com (\pm) isoproterenol (ISO) e (\pm) isoproterenol mais quercetina (ISO+QUE). As análises foram conduzidas como descrita em materiais e métodos. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Os valores são apresentados como \pm erro padrão da média, $n=4-6$ por grupo.

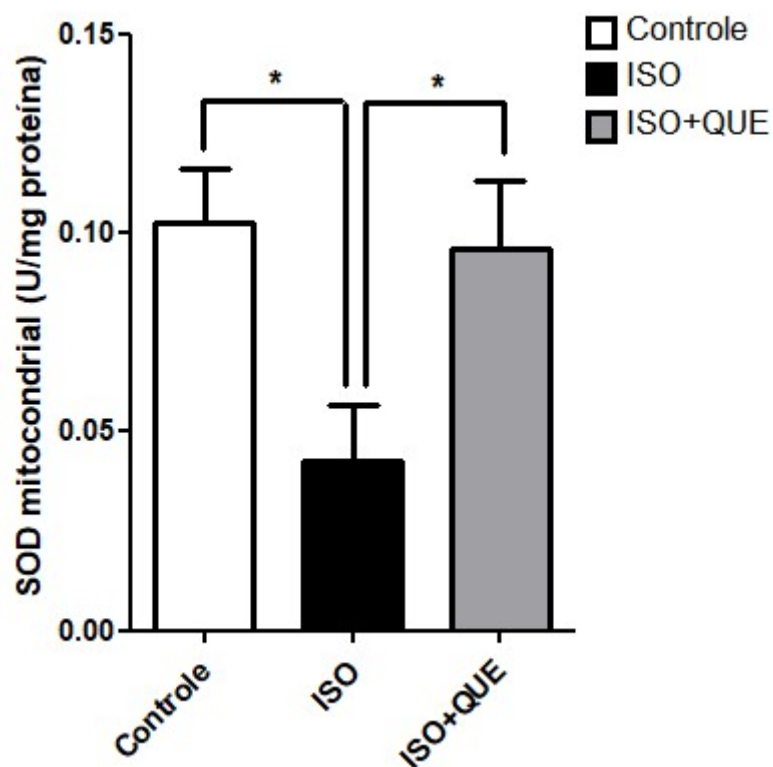
4.3 Quercetina restaura a expressão e atividade de superóxido dismutase mitocondrial

Sabendo que a quercetina é capaz de restaurar a atividade antioxidante de superóxido dismutase citosólica (Cu/Zn SOD), foi testada a atividade de MnSOD durante a hipertrofia cardíaca, sem e com tratamento com quercetina, com o objetivo de identificar se as mitocôndrias cardíacas de camundongos tratados com quercetina apresentam menor dano oxidativo. Evidenciou-se que as mitocôndrias cardíacas isoladas de camundongos tratados apenas com (\pm) isoproterenol apresentaram atividade diminuída de MnSOD, enquanto que as mitocôndrias cardíacas isoladas de camundongos tratados inicialmente com (\pm) isoproterenol e

depois com (\pm) isoproterenol mais quercetina, tiveram a atividade MnSOD restaurada (Figura. 14).

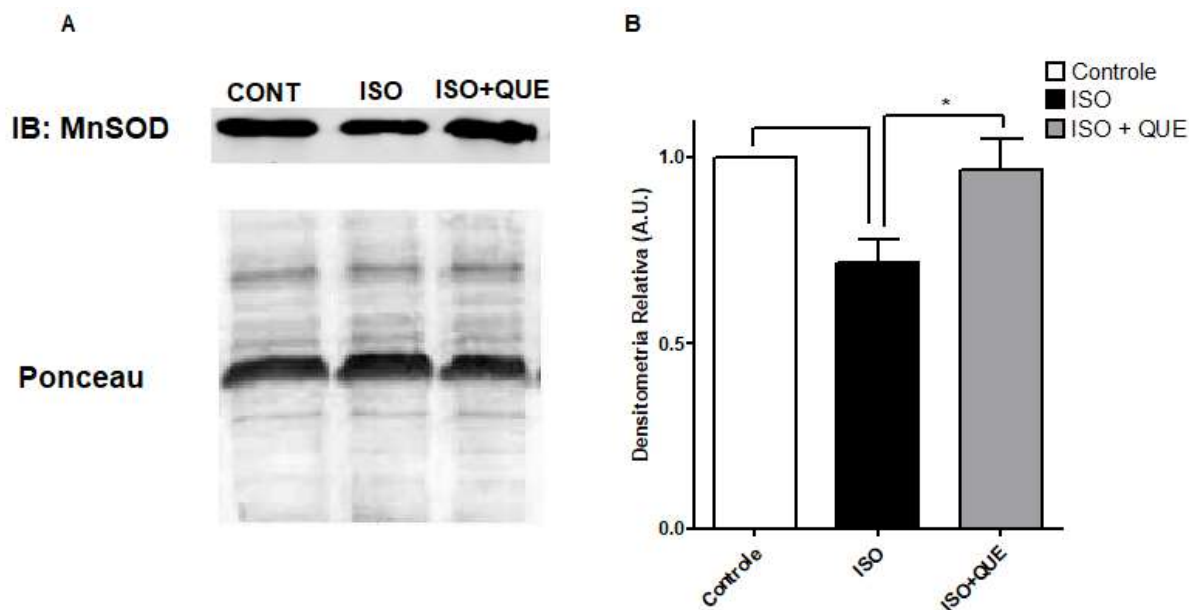
Além disso, também foi quantificado os níveis dessa proteína através da técnica de *Western Blot* e observou-se que o estímulo hipertrófico diminuiu a expressão de MnSOD, enquanto que o tratamento com quercetina durante a hipertrofia cardíaca reestabeleceu os níveis dessa proteína (Figura. 15A, 15B). Estes resultados sugerem que a quercetina possa atuar à nível mitocondrial, diminuindo o estresse oxidativo ao exercer efeito sobre a expressão de uma importante enzima antioxidante.

Figura 14 – Quantificação da atividade da enzima superóxido dismutase mitocondrial.



Fonte: Dados da pesquisa. Tratamento com quercetina restaura a atividade de superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD). * $P < 0.05$. Os valores são apresentados como \pm erro padrão da média, $n=4-6$ por grupo.

Figura 15 – Expressão de superóxido dismutase mitocondrial.



Fonte: Dados da pesquisa. **A.** Quantificação de MnSOD por *Western Blot* normalizada pelo Ponceau. **B.** Densitometria relativa ao controle. * $P < 0.05$. Os valores são apresentados como \pm erro padrão da média, $n=4-6$ por grupo.

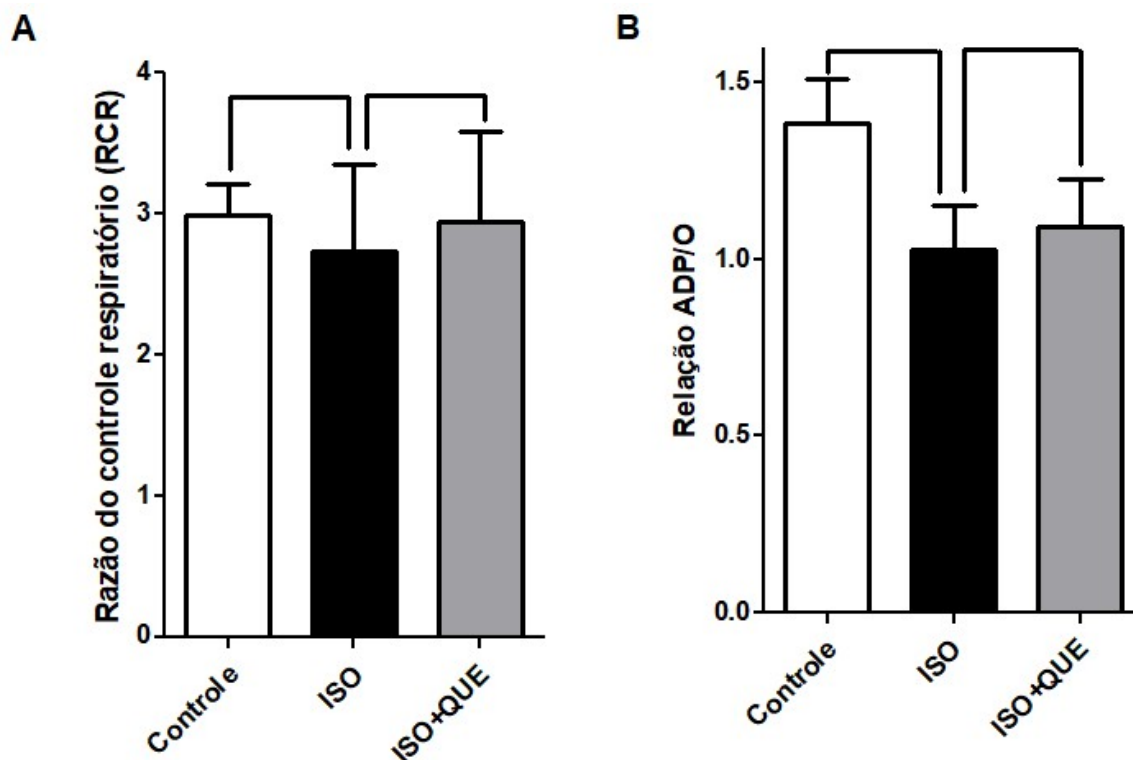
4.4 Tratamento com quercetina não tem efeito sobre a razão do controle respiratório mitocondrial (RCR) e a relação ADP/O

Sabendo que a quercetina é capaz de diminuir o estresse oxidativo ao atuar sobre a atividade e expressão de enzimas antioxidantes e também sobre as espécies reativas de oxigênio, foi levantada a hipótese de que a quercetina possa atuar sobre a mitocôndria, melhorando a função mitocondrial e conseqüentemente, o equilíbrio redox. Para testar tal hipótese, monitorou-se a razão do controle respiratório mitocondrial (RCR) de mitocôndrias isoladas de corações hipertróficos e também de corações hipertróficos submetidos ao tratamento com antioxidante quercetina.

Observou-se que as mitocôndrias oriundas de corações hipertróficos apresentaram uma leve diminuição dessa relação em comparação às mitocôndrias do grupo controle, mas não significativa. Da mesma forma, as mitocôndrias de corações hipertróficos tratados com quercetina apresentaram um leve aumento dessa relação em relação ao grupo ISO, mas também não significativo (Figura. 16A). Além disso, foi evidenciado que o (\pm) isoproterenol (grupo ISO) e a quercetina (grupo

ISO+QUE) também não exerceram efeitos significantes sobre a relação ADP/O (Figura. 15B).

Figura 16 – Razão do controle respiratório mitocondrial (RCR) e relação ADP/O.



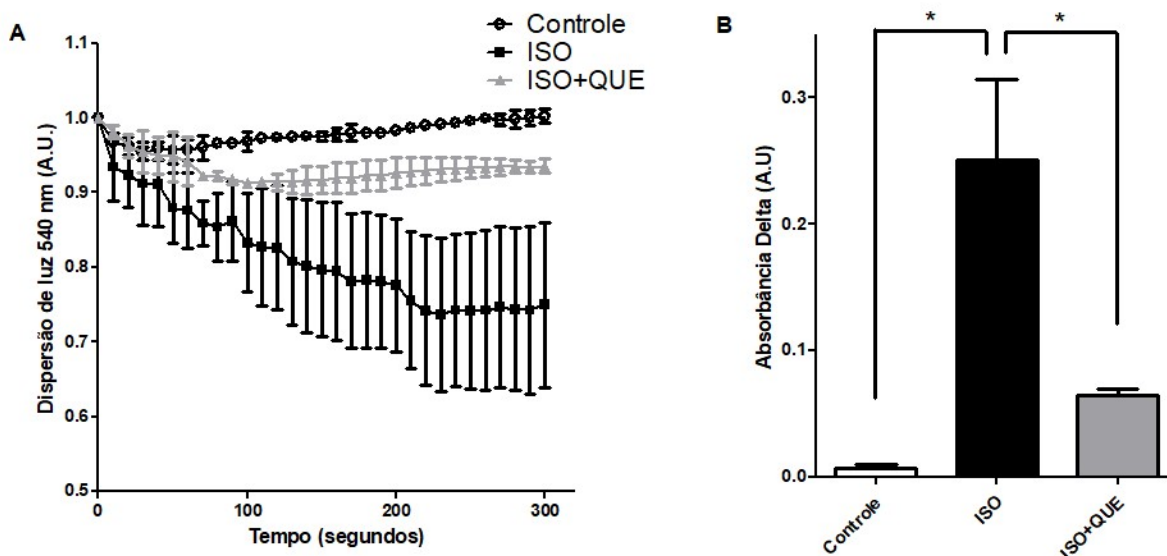
Fonte: Dados da pesquisa. **A.** Razão do controle respiratório mitocondrial (RCR) – estado 3/ estado 4 – deduzidos a partir do coeficiente angular das retas. **B.** Relação ADP/O (concentração de ADP em mmol/ ΔO_2 no estado 3). Os valores são apresentados como \pm erro padrão da média, n=3 por grupo.

4.5 Quercetina protege as mitocôndrias *in vivo* e *in vitro* contra a abertura do mPTP induzida por Ca^{2+} durante a hipertrofia cardíaca

A fim de examinar se as mitocôndrias cardíacas isoladas dos camundongos tinham maior susceptibilidade ao aumento de volume induzido por Ca^{2+} , foi utilizada a técnica de acompanhamento da dispersão de luz como descrita em materiais e métodos. Observou-se que as mitocôndrias oriundas de corações hipertróficos apresentaram um aumento significativo do volume em relação ao grupo controle (indicado pela diminuição no espalhamento de luz). Em contraste, o tratamento com quercetina durante a hipertrofia cardíaca foi capaz de reverter esse efeito (Figura. 17A, 17B). Isso sugere que a quercetina protege as mitocôndrias contra a abertura

do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) durante o estímulo hipertrófico.

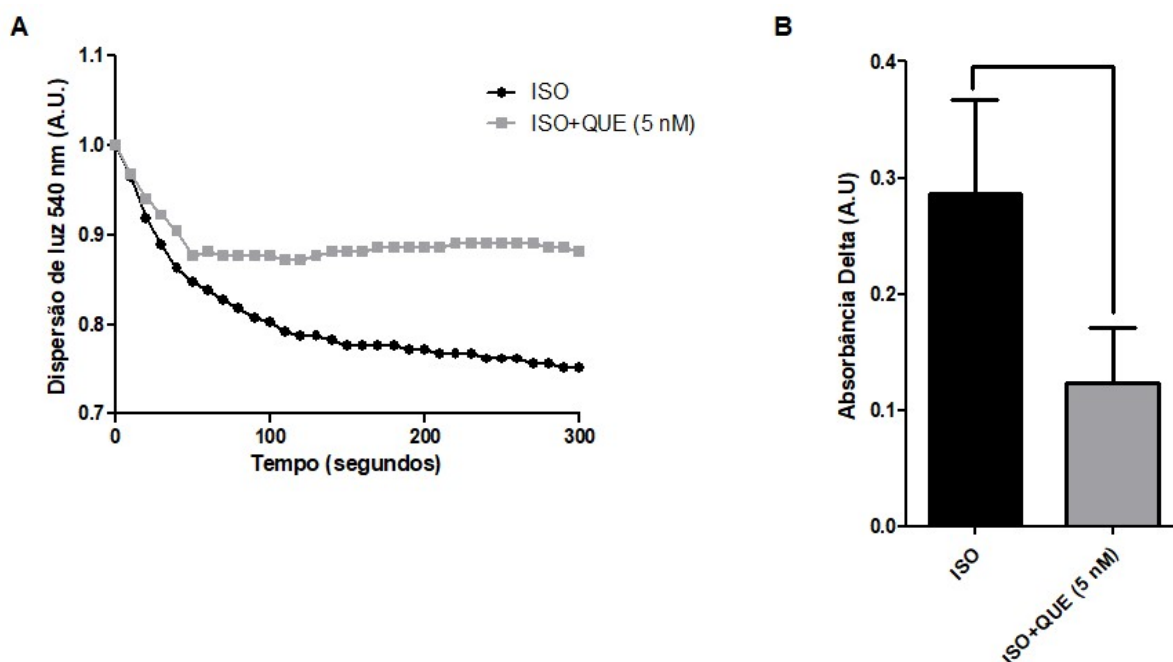
Figura 17 – Inchamento mitocondrial induzido por cálcio.



Fonte: Dados da pesquisa. A. Acompanhamento da dispersão de luz após a adição de CaCl_2 em mitocôndrias isoladas de corações de camundongos não tratados (controle), tratados com (\pm) isoproterenol (ISO) e (\pm) isoproterenol mais quercetina (ISO+QUE) B. Delta das absorbâncias. Os valores são apresentados como \pm erro padrão da média, $n=3$ por grupo.

Por fim, também foi testado se esse efeito é reproduzido quando a quercetina é administrada *in vitro*. Para tal, a quercetina foi diluída em DMSO e administrada nas concentrações de 2,5, 5 e 10 nM sobre as mitocôndrias isoladas de corações hipertróficos juntamente com o tampão utilizado no experimento (KCl 100 mM, HEPES 10 mM, succinato 2 mM, MgCl_2 2 mM, KH_2PO_4 2 mM, oligomicina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 7,2 (KOH). Observou-se que na concentração de 5 nM, a quercetina parece exercer algum efeito protetor contra a abertura do mPTP (Figura. 18A, 18B), dando suporte à hipótese de que o efeito protetor observado anteriormente pode ser devido à sua atividade.

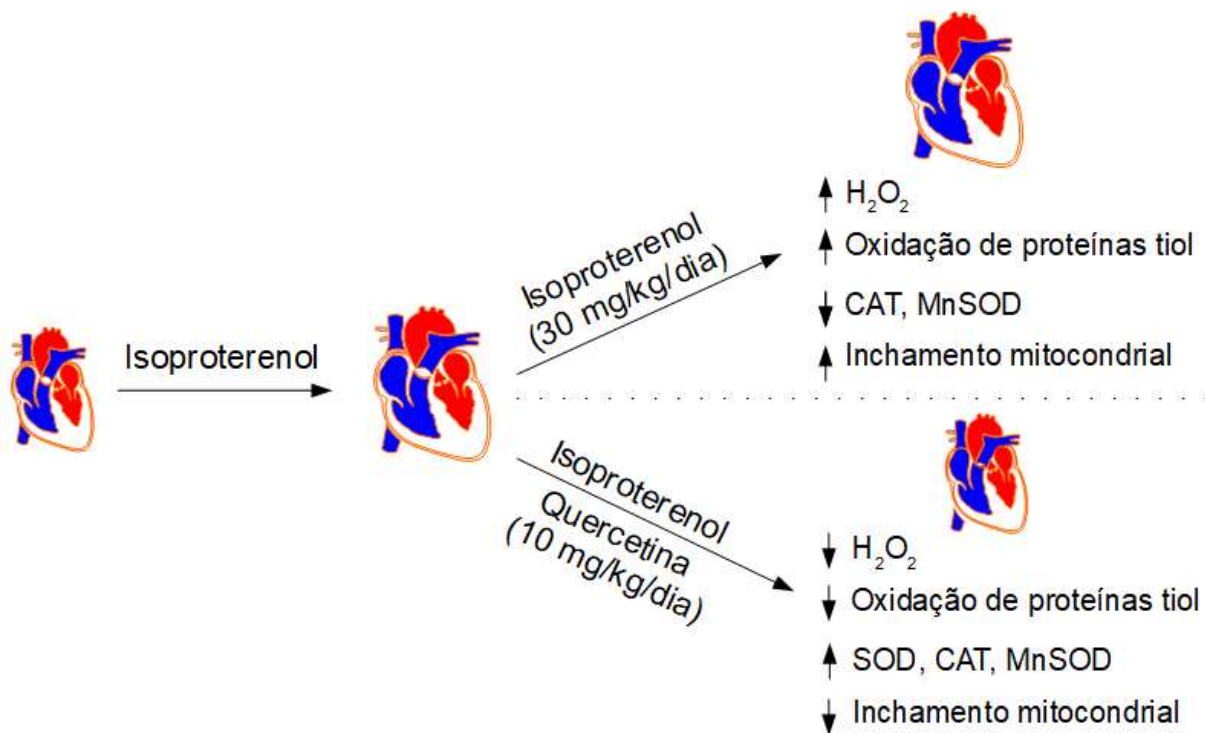
Figura 18 – Inchamento induzido por cálcio em mitocôndrias de corações hipertróficos tratadas com quercetina *in vitro*.



Fonte: Dados da pesquisa. A. Acompanhamento da dispersão de luz após a adição de quercetina (5nM) e CaCl_2 em mitocôndrias isoladas de corações hipertróficos. Figura representativa de 3 experimentos. B. Delta das absorbâncias. Os valores são apresentados como \pm erro padrão da média, $n=3$ por grupo.

Em suma, a administração de (\pm) isoproterenol (30 mg/kg/dia) por quatro dias, ocasiona hipertrofia cardíaca, estimula a geração de H_2O_2 , promove a oxidação dos grupos tiol das proteínas pelos radicais livres, compromete a atividade antioxidante e estimula a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), que gera inchamento da organela, com conseqüente ruptura e morte celular por necrose e apoptose. A intervenção com quercetina (10 mg/kg/dia) a partir desse ponto, foi capaz de atenuar a hipertrofia cardíaca, bloquear a produção de H_2O_2 , diminuir o teor de proteínas tiol oxidadas, melhorar a atividade antioxidante (SOD, CAT, MnSOD) e proteger as mitocôndrias contra a abertura do mPTP (Figura. 19)

Figura 19 – Esquema representativo dos efeitos do tratamento com quercetina durante a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.



Fonte: Elaboração própria.

5. DISCUSSÃO

Está bem estabelecido que a oxidação de macromoléculas importantes, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, em resposta ao estresse oxidativo, está associada ao desenvolvimento e progressão de doenças crônicas não transmissíveis, como a hipertrofia cardíaca (KANEDA *et al.*, 2002; KULOGLU *et al.*, 2002 ; LOVELL *et al.*, 1999; RAHMAN *et al.*, 2002, ZHANG *et al.*, 1999). Vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que as moléculas antioxidantes que eliminam os radicais livres podem atenuar o aumento dos marcadores do estresse oxidativo e atenuar os danos celulares, restaurando assim a homeostase celular normal e a função fisiológica (GUTIERREZ *et al.*, 2015 ; HANNEKEN *et al.*, 2006; HOLT *et al.*, 2009; PAVLICA; GEBHARDT, 2010; PIGNATELLI *et al.*, 2006; RAHMAN *et al.*, 2002; YOUNDIM *et al.*, 2000). Da mesma forma, alguns estudos identificaram uma correlação inversa entre o risco relativo de desenvolver doenças degenerativas e cardiovasculares com uma alta ingestão alimentar rica em antioxidantes naturais (BARBERGER-GATEAU *et al.*, 2007; CHO *et al.*, 2004; GEY; PUSKA, 1989; CORLEY *et al.*, 2015).

A quercetina é um flavonóide seguro, de ocorrência natural e amplamente disponível, capaz de estimular a expressão de genes anti-oxidativos e reduzir processos inflamatórios associados a muitas doenças (BALLMANN *et al.*, 2015). Um número crescente de relatos demonstrou que a quercetina na dieta exerce efeitos cardiovasculares protetores, vários estudos farmacológicos confirmaram que ela reduz a pressão arterial elevada e melhora a disfunção endotelial, bem como a lesão de órgãos-alvo em ratos espontaneamente hipertensos (BALLMANN *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2018; ULASOVA *et al.*, 2013)

Além disso, demonstraram que a quercetina atenuou o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga de pressão, prevenindo o remodelamento cardíaco patológico e estimulando a biogênese mitocondrial. Em ratos espontaneamente hipertensos, uma dose de 10 mg/kg de quercetina reduziu a pressão sanguínea e a hipertrofia ventricular e renal esquerda, induzindo uma redução significativa na pressão arterial sistólica, diastólica, média e na frequência cardíaca (DUARTE *et al.*, 2001a). A quercetina, ainda, é capaz de reduzir ou impedir o crescimento de placas ateroscleróticas, inibir a agregação plaquetária e diminuir os níveis de colesterol (CHEN *et al.*, 2018; ULASOVA *et al.*, 2013).

A hipertensão arterial crônica aumenta a pós-carga, o que, por sua vez, estimula o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. A quercetina é um agente eficaz para reduzir a pressão arterial e prevenir a hipertrofia cardíaca. Ratos espontaneamente hipertensos com hipertensão arterial estabelecida, tratados diariamente com quercetina oral, apresentam queda da pressão arterial, redução da hipertrofia cardíaca e melhora da função vascular (DUARTE *et al.*, 2001b). Outros estudos em camundongos e cobaias com sobrecarga de pressão induzida cirurgicamente (constricção aórtica) relataram que o tratamento com quercetina pode realmente prevenir a hipertrofia cardíaca (CHEN *et al.*, 2018; JALILI *et al.*, 2006; ULASOVA *et al.*, 2013).

No presente estudo, demonstrou-se que a quercetina atenua a hipertrofia cardíaca induzida por (\pm) isoproterenol ao diminuir o estresse oxidativo cardíaco. Pôde-se observar uma modulação positiva das atividades de catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e uma diminuição na produção de H_2O_2 . Além disso, a quercetina também foi capaz de estimular a expressão e atividade de SOD mitocondrial, que encontram-se comprometidas durante a hipertrofia cardíaca. Hung *et al.* (2015) demonstraram que o tratamento com quercetina é capaz de levar à ativação da Sirtuína 1 (SIRT1), uma histona desacetilase que tem, dentre algumas funções, a transcrição das enzimas antioxidantes SOD e CAT, o que poderia explicar tal achado.

Apesar de alguns estudos associarem o bloqueio da hipertrofia como uma resposta secundária à redução da pressão arterial e não por efeitos cardíacos diretos, em um estudo conduzido por Hao *et al.* (2007), observou-se que a quercetina inibiu completamente a hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga de pressão (constricção aórtica), porém sem efeitos significativos na pressão sanguínea, sugerindo que o principal órgão-alvo da quercetina é o coração e não os vasos sanguíneos e que seus efeitos sobre o peso ventricular podem ser atribuídos à atenuação das vias de transdução de sinal que regulam a hipertrofia cardíaca.

In vitro, estudos mostraram que a quercetina suprimiu a hipertrofia de células H9C2 induzida por angiotensina II, em que a ativação do fator de transcrição PPAR- γ (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama) pode ter desempenhado um papel fundamental na cardioproteção fornecida pela quercetina (HAO *et al.*, 2007). Um grande número de efeitos do PPAR- γ foi relatado na regulação de células endoteliais de células miocárdicas, células musculares lisas

vasculares e macrófagos do tecido miocárdico (BENSON *et al.*, 2000; MATSUMURA *et al.*, 2011; MEHRABI *et al.*, 2002; YAMAMOTO *et al.*, 2009).

Estudos anteriores mostraram que ele desempenha um papel fundamental em todas as fases do processo de hipertrofia cardíaca de várias doenças cardíacas (KLEEMANN *et al.*, 2011; TAKANO *et al.*, 2000). Os resultados mostraram que os níveis de PPAR- γ estavam marcadamente aumentados nos grupos tratados com quercetina, por outro lado, a ativação do fator de transcrição AP-1 (c-fos, s-jun) foi suprimida nestes grupos e, conseqüentemente, foram observadas diminuições na transcrição de genes hipertróficos (ANP e BNP) (HAO *et al.*, 2007).

Além disso, foi demonstrado que *in vitro* a quercetina inibe a atividade da hipoxantina-xantina oxidase e elimina os radicais superóxido e hidroxila, pois após a administração oral, os metabólitos da quercetina conservam as propriedades antioxidantes do composto original. Ainda nesse estudo, viu-se que os níveis de malondialdeído (MDA) estavam marcadamente aumentados no grupo de constrição da aorta abdominal e que o tratamento com quercetina resultou na eliminação do aumento de MDA de maneira dose-dependente (HAN *et al.*, 2009).

Os mecanismos pelos quais a quercetina exerce sua ação ainda não foram totalmente elucidados. Segundo Kukongviriyapan *et al.* (2012), os efeitos protetores da quercetina sobre o sistema cardiovascular estão relacionados à regulação positiva da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), à proporção redox de glutathiona sanguínea (GSH) e à redução do estresse oxidativo. Duarte *et al.* (2001a) evidenciaram um aumento do estresse oxidativo no coração de ratos hipertensos (DOCA-Sal) através da concentração significativamente maior de TBARS e diminuição do conteúdo total de GSH, em comparação com ratos controle normotensos. O tratamento com quercetina, em contraste, previniu o aumento de TBARS e o conteúdo total de GSH no coração dos animais.

Para a ocorrência destes efeitos da quercetina, uma ampla rede de sinalização pode ser ativada. Li *et al.* (2012) demonstraram que a proteína quinase A (PKA), proteína quinase B (Akt) e as quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK 1/2) foram todas rapidamente fosforiladas em resposta à quercetina. Além disso, a quercetina fosforila rapidamente a eNOS na serina 1179 através de uma via mediada por cAMP-PKA independente de Akt para aumentar a produção de óxido nítrico (NO) e promover a vasodilatação.

Várias vias de sinalização intracelular incluindo proteína quinase ativada por

mitógeno (MAPK), Janus quinase/transdutores de sinal, ativadores de transcrição (JAK/STAT), calcineurina, serina/treonina quinase, proteína quinase B (Akt) e seu alvo a jusante, a glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) já foram implicados na hipertrofia cardíaca induzida por estresse mecânico. O mesmo estudo anterior demonstrou que as atividades das quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), p38, Akt e GSK-3 foram significativamente aumentadas após a contração aórtica antes das alterações morfológicas e foram atenuadas pelo tratamento com quercetina, de maneira dose-dependente (HAO *et al.*, 2007).

Embora os mecanismos antioxidantes dos compostos polifenólicos possam ocorrer em diferentes compartimentos subcelulares, o efeito dos polifenóis no nível mitocondrial é de grande significado clínico (FIORANI *et al.*, 2010; HALDER *et al.*, 2008; ZHENG; RAMIREZ, 2000). As mitocôndrias foram identificadas como o principal local de produção de radicais superóxido e são uma das principais fontes do estresse oxidativo além de serem alvos também (DU *et al.*, 1998, HAN *et al.*, 2001; PITKANEN; ROBINSON, 1996). Também foi demonstrado que os polifenóis interagem com uma infinidade de processos celulares associados à manutenção da integridade estrutural celular e da função metabólica das mitocôndrias (HALDER *et al.*, 2008; LIEBERMAN; BIALE, 1956; SHAMRAJ *et al.*, 1978; TISSUT *et al.* 1980).

Sendo assim, além de suas propriedades antioxidantes, alguns estudos demonstraram que a quercetina modula a função mitocondrial, alterando a biogênese mitocondrial, influenciando no potencial de membrana, exercendo efeitos sobre a cadeia de transporte de elétrons e consequentemente, sobre produção de ATP (LAKROUN *et al.*, 2015; PSOTOVA *et al.*, 2002; VIDYA PRIYADARSINI *et al.*, 2010; YOSHINO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2005). No presente estudo, não foram observados efeitos do \pm isoproterenol e da quercetina sobre parâmetros de função mitocondrial (RCR e relação ADP/O). Esses dados sugerem que as mitocôndrias dos corações hipertróficos tratados com \pm isoproterenol ainda não estavam completamente sem função.

O PGC-1 α é um dos mais importantes reguladores da biogênese mitocondrial. O PGC-1 α coativa NRF-1 e NRF-2 e aumenta a transcrição de vários genes mitocondriais que participam da cadeia respiratória (LEBLEU *et al.*, 2014). Na hipertrofia cardíaca fisiológica, a expressão de PGC-1 α é aumentada e, como resultado, a duplicação de DNA mitocondrial é estimulada, assim como a oxidação de ácidos graxos (LEBLEU *et al.*, 2014; O'NEILL *et al.*, 2007). No entanto, a

expressão de PGC-1 α é reduzida em corações hipertrofiados patologicamente e ocorre logo nos estágios iniciais da doença. Em um modelo de camundongos *knockout* para PGC-1 α , foi demonstrado que a expressão de enzimas antioxidantes como Cu/Zn-SOD1, SOD-2 e catalase peroxissômica mitocondrial estavam notavelmente diminuídas (ST-PIERRE *et al.*, 2006).

Tanto o aumento da EROs quanto a sobrecarga mitocondrial de Ca²⁺ desencadeiam o fenômeno da abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP), levando a danos às células e a uma perda permanente da produção de ATP (BERNARDI *et al.*, 1992). Nessas circunstâncias, a prevenção do aumento da EROs nas células pode, portanto, impedir tal efeito. No presente estudo, foi evidenciado que a quercetina foi capaz de proteger as mitocôndrias de corações hipertróficos contra a abertura do mPTP, sugerindo que o tratamento com quercetina resulte em mitocôndrias mais resistentes à sobrecarga de Ca²⁺.

Em conjunto, esses resultados mostram que a hipertrofia cardíaca induzida pelo *beta*-agonista (\pm) isoproterenol leva a um desequilíbrio oxidativo, com diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (CAT, SOD, MnSOD), aumento da produção de EROs e torna as mitocôndrias mais suscetíveis à sobrecarga de Ca²⁺, enquanto que a quercetina foi capaz de minimizar esses efeitos e, conseqüentemente atenuar a hipertrofia cardíaca nos camundongos tratados. Todos esses resultados serão submetidos para publicação na revista *Journal of Cardiovascular Pharmacology* (ANEXO B).

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o tratamento com quercetina é capaz de diminuir o desequilíbrio oxidativo e, dessa maneira, é capaz de atenuar a hipertrofia cardíaca induzida por (\pm) isoproterenol. Um dos mecanismos envolvidos nessa proteção está relacionado ao restabelecimento da atividade e expressão de enzimas antioxidantes endógenas importantes que encontram-se comprometidas durante a hipertrofia cardíaca. Como consequência a produção/liberação de espécies reativas de oxigênio diminui, restaurando a homeostase mitocondrial e protegendo contra o aumento de volume desencadeado pela abertura do mPTP induzido por acúmulo de Ca^{2+} .

REFERÊNCIAS

- ABEL E. D.; DOENST T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. **Cardiovascular Research**, v. 90, n. 2, p. 234–242, 2011.
- AGO, T.; KURODA, J.; PAIN, J.; FU, C.; LI, H.; SADOSHIMA, J. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. **Circulation Research**, v. 106, n. 7, p. 1253-1264, 2010.
- ALÍA, M.; MATEOS, R.; RAMOS, S.; LECUMBERRI, E.; BRAVO, L.; GOYA, L.; Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cellline (HepG2). **European Journal of Nutrition**, v. 45, p. 19–28, 2006.
- BALLMANN, C.; HOLLINGER, K.; SELSBY, J. T.; AMIN, R.; QUINDRY, J. C. Histological and biochemical outcomes of cardiac pathology in mdx mice with dietary quercetin enrichment. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 1, p. 12-22, 2015.
- BARBERGER-GATEAU, P., RAFFAITIN, C., LETENNEUR, L., BERR, C., TZOURIO, C., DARTIGUES, J.F. Dietary patterns and risk of dementia: the three-city cohort study. **Neurology**, v. 69, p. 1921–1930, 2007.
- BENSON, S.; WU, J.; PADMANABHAN, S.; KURTZ, T. W.; PERSHADSINGH, H. A. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma expression in human vascular smooth muscle cells: inhibition of growth, migration, and c-fos expression by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma activator troglitazone. **American Journal of Hypertension**, p. 74-82, 2000.
- BERNARDI, S. VASSANELLI, P. VERONESE, R. COLONNA, I. SZABÓ, M. ZORATTI. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 5, p. 2934–2939, 1992.
- BERNARDO, B. C.; WEEKS, K. L.; PRETORIUS, L.; MCMULLEN, J. R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 128, p. 191-227, 2010.
- BOOTS, A. W.; HAENEN G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 325-337, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, 248-254, 1976.
- BUGGER, H.; SCHWARZER, M.; CHEN, D.; SCHREPPER, A.; AMORIM, P. A.; SCHOEPE, M.; NGUYEN, T. D.; MOHR, F. W.; KHALIMONCHUK, O.; WEIMER, B. C.; DOENST, T. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. **Cardiovascular Research**, v. 82, n. 2, p.

376-3844, 2014

BURAK, M; IMEN, Y. Flavonoids and their antioxidant properties. **Turkiye Klin Tip Bil Derg**, v. 19, p. 296-304, 1999.

CANDAS, D.; LI, J. J. MnSOD in Oxidative Stress Response-Potential Regulation via Mitochondrial Protein Influx. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 10, 1599–1617.

CAVE, A.; GRIEVE, D.; JOHAR, S.; ZHANG, M.; SHAH, A. M. NADPH oxidase derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, p. 2327-2334, 2005.

CHEN B; WU Q; XIONG Z; MA Y; YU S; CHEN D. Adenosine monophosphate-activated protein kinase attenuates cardiomyocyte hypertrophy through regulation of FOXO3a/MAFbx signaling pathway. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 48, n. 9, p. 827-832, 2016.

CHEN, J. X.; MEYRICK, B. Hypoxia increases Hsp90 binding to eNOS via PI3K-Akt in porcine coronary artery endothelium. **Laboratory Investigation**, v. 84, n. 2, p. 182–190, 2004.

CHEN, K.; REKEP, M.; WEI, W.; WU, Q.; XUE, Q.; LI, S. Quercetin Prevents In Vivo and In Vitro Myocardial Hypertrophy Through the Proteasome-GSK-3 Pathway. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 32, n. 1, p. 5-21, 2018.

CHO, E., SEDDON, J.M., ROSNER, B., WILLETT, W.C., HANKINSON, S.E. Prospective study of intake of fruits, vegetables, vitamins, and carotenoids and risk of age-related maculopathy. **JAMA Ophthalmology**, v. 122, p. 883–892. 2004.

COMMENGES, D.; SCOTET, V.; RENAUD, S.; JACQMIN-GADDA, H.; BARBERGER-GATEAU, P.; DARTIGUES, J. F. Intake of flavonoids and risk of dementia. **The European Journal of Epidemiology**, v. 16, n. 4, p. 357-363, 2000.

CORLEY, J., KYLE, J.A., STARR, J.M., MCNEILL, G., DEARY, I. J. Dietary factors and biomarkers of systemic inflammation in older people: the Lothian birth cohort. **British Journal of Nutrition**, v. 114, p. 1088–1098, 2015.

DAI D. F., SANTANA LF, VERMULST M, TOMAZELA DM, EMOND MJ, MACCOSS MJ. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. **Circulation**, v. 119, p. 2789–2797, 2009.

DAI, D. F.; HSIEH, E. J.; LIU, Y.; CHEN, T.; BEYER, R. P.; CHIN, M. T.; MACCOSS, M. J.; RABINOVITCH, P. S. Mitochondrial proteome remodelling in pressure overload-induced heart failure: the role of mitochondrial oxidative stress. **Cardiovascular Research**, n. 93, v. 1, p. 79-88, 2012.

DATE M, MORITA T, YAMASHITA N, NISHIDA K, YAMAGUCHI O, HIGUCHI Y. The antioxidant N-2-mercaptopropionyl glycine attenuates left ventricular hypertrophy in

vivo murine pressure-overload model. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 39, p. 907–912, 2002.

DE BOER, R. A.; PINTO, Y. M.; VAN VELDHUISEN, D. J. The imbalance between oxygen demand and supply as a potential mechanism in the pathophysiology of heart failure: The role of microvascular growth and abnormalities. **Microcirculation**, v. 10, p. 113-26, 2003.

DEWICK, P. M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2ª edição, p. 137-186, 2001.

DHALLA AK; HILL MF; SINGAL PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 28, p. 506–514, 1996.

DORN, G. W. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. **Hypertension**, v. 49, p. 962-970, 2007.

DU, G., MOUITHYS-MICKALAD, A., SLUSE, F.E. Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, p. 1066–1074, 1998.

DUARTE, J.; PÉREZ-PALENCIA, R.; VARGAS, F.; ANGELES OCETE, M.; PÉREZ-VIZCAINO, F.; ZARZUELO, A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, n. 1, 117-124, 2001a.

DUARTE, J.; GALISTEO, M.; OCETE, M. A.; PEREZ-VIZCAINO, F.; ZARZUELO, A.; TAMARGO, J. Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 221, p. 155-160, 2001b.

EISNER, V.; CUPO, R. R.; GAO, E.; CSORDÁS, G.; SLOVINSKY, W. S.; PAILLARD, M. Mitochondrial fusion dynamics is robust in the heart and depends on calcium oscillations and contractile activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 5, p. 859-868, 2017.

FACUNDO, H. D. T. F.; BRAINARD, R. E.; CALDAS, F. R. L.; LUCAS, A. M. B. Mitochondria and cardiac Hypertrophy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 982, p. 203-226, 2017.

FIORANI, M., GUIDARELLI, A., BLASA, M., AZZOLINI, C., CANDIRACCI, M., PIATTI, E. Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: prevention of mitochondrial damage and release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 397–404, 2010.

FREY, N.; OLSON, E. N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. **Annual Review of Physiology**, v. 65, p. 45-79, 2003.

GEY, K.F., PUSKA, P. Plasma vitamins E and A inversely correlated to mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 570, p. 268–282, 1989.

GRADMAN, A. H.; ALFAYOUMI, F. From Left Ventricular Hypertrophy to Congestive Heart Failure: Management of Hypertensive Heart Disease. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 48, p. 326–341, 2006.

GRAZIANI, G., D'ARGENIO, G., TUCCILLO, C., LOGUERCIO, C., RITIENI, A., MORISCO, F. Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa in vivo. **Gut**, v. 54, p. 193–200, 2005.

GRIFFITHS, E. R.; FRIEHS I.; SCHERR, E.; POUTIAS, D.; MCGOWAN, F. X.; DEL NIDO, P. J. Electron transport chain dysfunction in neonatal pressure-overload hypertrophy precedes cardiomyocyte apoptosis independent of oxidative stress. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 139, n. 6, p. 1609-1617, 2010.

GRIVENNIKOVA, V. G.; VINOGRADOV, A. D. Generation of superoxide by the mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1757, p. 553–561, 2006.

GUTIERREZ, L., GARCIA, J.R., RINCON MDE, J., CEBALLOS, G.M., OLIVARES, I.M. Effect of a hypocaloric diet in the oxidative stress in obese subjects without prescription of exercise and antioxidants. **Clinical Medicine**, v. 145, p. 1–6, 2015.

HALESTRAP, A. P.; CLARKE, S. J.; JAVADOV, S. A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - A target for cardioprotection. **Cardiovascular Research**, v. 61, p. 372-385, 2004.

HALESTRAP, A. P.; KERR, P. M.; JAVADOV, S.; WOODFIELD, K. Y. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**, v. 1366, p. 79–94. 1998.

HALDER, B., BHATTACHARYA, U., MUKHOPADHYAY, S., GIRI, A.K. Molecular mechanism of black tea polyphenols induced apoptosis in human skin cancer cells: involvement of Bax translocation and mitochondria mediated death cascade. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 129–138, 2008.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 16, p. 845–850, 1994.

HANASAKI K; YOKOTA Y; ISHIZAKI J; ITOH T; ARITA H. Resistance to endotoxic shock in phospholipase A2 receptor-deficient mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 52, p. 32792-32797, 1997.

HAN, D., WILLIAMS, E., CADENAS, E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. **Biochemical Journal**, v. 353, p. 411–416, 2001.

HAN, J. J.; HAO, J.; KIM, C. H.; HONG, J. S.; AHN, H. Y.; LEE, Y. S. Quercetin prevents cardiac hypertrophy induced by pressure overload in rats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 6, p.737-743, 2009.

HANNEKEN, A., LIN, F.F., JOHNSON, J., MAHER, P. Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, p. 3164–3177, 2006.

HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, p. 1015-1069, 1985.

HAO, J.; KIM, C. H.; HA, T. S.; AHN, H. Y. Epigallocatechin-3 gallate prevents cardiac hypertrophy induced by pressure overload in rats. **Journal of Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 121-129, 2007.

HAYASHI, T.; SAWA, K.; KAWASAKI, M.; ARISAWA, M.; SHIMIZU, M.; MORITA, N. Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. **Journal of Natural Products**, v. 51, p. 345–348, 1988.

HEINEKE J.; MOLKENTIN, J. D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 589-600, 2006.

HOLT, E.M., STEFFEN, L.M., MORAN, A., BASU, S., STEINBERGER, J., ROSS, J.A. Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, p. 414–421, 2009.

HUNG C. H.; CHAN S. H.; CHU P. M.; TSAI K. L. Quercetin is a potent anti-atherosclerotic compound by activation of SIRT1 signaling under oxLDL stimulation, **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 10, p. 1905–1917, 2015.

JALILI, T.; CARLSTROM, J.; KIM, S.; FREEMAN, D.; JIN, H.; WU, T. C. Quercetin-Supplemented Diets Lower Blood Pressure and Attenuate Cardiac Hypertrophy in Rats With Aortic Constriction. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 47, n. 4, p. 531-541, 2006.

JIANG, X.; JIANG, H.; SHEN, Z.; WANG, X. Activation of mitochondrial protease OMA1 by Bax and Bak promotes cytochrome c release during apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 41, p. 14782–14787, 2014.

JOSEPH, K.M.D., MURALIDHARA. Combined oral supplementation of fish oil and quercetin enhances neuroprotection in a chronic rotenone rat model: relevance to Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, v. 40, p. 894–905, 2015.

KANEDA, H., TAGUCHI, J., OGASAWARA, K., AIZAWA, T., OHNO, M. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 162, p. 221–225, 2002.

KERRY N. L.; ABBEY M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. **Atherosclerosis**, v. 135, n. 1, p. 93-102, 1997.

KHOO, N. K. H.; WHITE, C. R.; POZZO-MILLER, L.; ZHOU, F.; CONSTANCE, C.; INOUE, T. Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 3, p. 339-347, 2010.

KINDO, M.; GERELLI, S.; BOUITBIR, J.; CHARLES, A.; ZOLL, J.; MINH, T. H.; MONASSIER, L.; FAVRET, F.; PIQUARD, F.; GENY, B. Pressure overload-induced mild cardiac hypertrophy reduces left ventricular transmural differences in mitochondrial respiratory chain activity and increases oxidative stress. **Frontiers in Physiology**, n. 3, v. 332, 2012.

KLEEMANN, R.; VERSCHUREN, L.; MORRISON, M.; ZADELAR, S.; VAN, M. J.; WIELINGA, P. Y. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. **Atherosclerosis**, v. 218, n. 1, p. 44-52, 2011.

KOES, R.; VERWEIJ, W.; QUATTROCCHIO, F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. **Trends in Plant Sciences**, v. 10, n. 5, p. 236-242, 2005.

KOHLER, J. J.; CUCORANU I.; FIELDS, E.; GREEN, E.; HE, S.; HOYING, A.; RUSS, R.; ABUIN, A.; JOHNSON, D.; HOSSEINI, S. H.; RAPER, C. M.; LEWIS, W. Transgenic mitochondrial superoxide dismutase and mitochondrially targeted catalase prevent antiretroviral-induced oxidative stress and cardiomyopathy. **Laboratory Investigation**, v. 89, 782-790, 2009.

KORKINA, L.; AFANASEV, I. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. **Advances in Pharmacology**, v. 38, p. 151-163, 1997.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, v. 495, p. 12-5, 2001.

KUKONGVIRIYAPAN, U.; SOMPAMIT, K.; PANNANGPETCH, P.; KUKONGVIRIYAPAN, V.; DONPUNHA, W. Preventive and therapeutic effects of quercetin on lipopolysaccharide-induced oxidative stress and vascular dysfunction in mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1345-1353, 2012.

KULOGLU, M., USTUNDAG, B., ATMACA, M., CANATAN, H., TEZCAN, A.E., CINKILINC, N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. **Cell Biochemistry & Function**, v. 20, p. 171-175, 2002.

KURODA, J.; AGO, T.; MATSUSHIMA, S.; ZHAI, P.; SCHNEIDER, M. D.; SADOSHIMA, J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 35, p. 15565-15570, 2010.

KWONG, L. K.; SOHAL, R. S. Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 350, n. 1, p. 118–126, 1998.

LAKROUN, Z., KEBIECHE, M., LAHOUEL, A., ZAMA, D., DESOR, F., SOULIMANI, R. Oxidative stress and brain mitochondria swelling induced by endosulfan and protective role of quercetin in rat. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 10, p. 7776-7781, 2015.

LEBLEU V. S.; O'CONNELL J. T.; GONZALEZ HERRERA, K. N.; WIKMAN, H.; PANTEL, K.; HAIGIS, M. C. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 10, p. 992–1003, 2014.

LEE, Y. K.; YUK, D. Y., LEE, J. W.; LEE, S. Y.; HÁ, T. Y.; OH, K. W.; YUN, Y. P.; HONG, J. T. **Brain Research**, v. 23, n. 1250, p. 164-174, 2009.

LIEBERMAN, M., BIALE, J.B. Oxidative phosphorylation by sweet potato mitochondria and its inhibition by polyphenols. **Plant Physiology**, v. 31, p. 420–424, 1956.

LI, J.; QI, M.; LI, C.; SHI, D.; ZHANG, D.; XIE, D.; YUAN, T.; FENG, J.; LIU, Y.; LIANG, D.; XU, X.; CHEN, J.; XU, L.; ZHANG, H.; YE, J.; LV, F.; HUANG, J.; PENG, L.; CHEN, Y. H. Tom70 serves as a molecular switch to determine pathological cardiac hypertrophy. **Cell Research**, v. 24, n. 8, p. 977–993, 2014.

LI, J. X.; XUE, B.; CHAI, Q.; LIU, Z. X.; ZHAO, A. P.; CHEN, L.B. Antihypertensive effect of total flavonoid fraction of *Astragalus complanatus* in hypertensive rats. **The Chinese Journal of Physiology**, v. 48, n. 2, p. 101–106, 2005.

LIN, C. S.; SUN, Y. L.; LIU, C. Y. Structural and biochemical evidence of mitochondrial depletion in pigs with hypertrophic cardiomyopathy. **Research in Veterinary Science**, n. 74, v. 3, p. 219-226, 2003

LI N; WANG H-X; HAN Q-Y; LI W-J; ZHANG Y-L; DU J. Activation of the cardiac proteasome promotes angiotension II-induced hypertrophy by down-regulation of ATRAP. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 79, p. 303-314, 2015.

LI, P. G.; SUN, L.; HAN, X.; LING, S.; GAN, W. T.; XU, J. W. Quercetin induces rapid eNOS phosphorylation and vasodilation by an akt-independent and PKA-dependent mechanism. **Pharmacology**, v. 89, p. 220–228, 2012.

LOVELL, M.A., GABBITA, S.P., MARKESBERY, W.R., Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, p. 771–776, 1999.

MAILLET M; VAN BERLO JH; MOLKENTIN JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players, **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, p.38-48, 2013.

MATSUMURA, T.; KINOSHITA, H.; ISHII, N.; FUKUDA K.; MOTOSHIMA H.; SENOKUCHI, T. Telmisartan Exerts Antiatherosclerotic Effects by Activating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-in Macrophages. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 6, p. 1268–1275, 2011.

MEHRABI, M. R.; THALHAMMER, T.; HASLMAYER, P.; GLOGAR, H. D.; Wieselthaler, G.; Humpeler, S. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is highly expressed in human heart ventricles. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 407-410, 2002.

MEINERS S; DREGER H; FECHNER M; BIELER S; ROTHER W; GUNTHER C. Suppression of Cardiomyocyte Hypertrophy by Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 302-308, 2008.

METODIEWA, D.; KOCHMAN, A.; KAROLCZAK, S. Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N-diethylaminoethyl ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 41, p. 1067–1075, 1997.

MIDDLETON, E. J. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 439, p. 175-182, 1998.

MIDDLETON, E. J. The flavonoids. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 5, p. 335–338, 1984.

MIRIYALA S, HOLLEY AK, ST CLAIR DK. Mitochondrial superoxide dismutase-signals of distinction. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 181-190, 2011.

NARAYANA, K. R.; REDDY, M. S.; CHALUVADI, M. R.; KRISHNA, D. R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 2-16, 2001.

O'NEILL, B. T.; KIM, J.; WENDE, A. R.; THEOBALD, H. A.; TUINEI J; BUCHANAN, J. A conserved role for phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt signaling in mitochondrial adaptations that accompany physiological cardiac hypertrophy. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 4, p. 294–306, 2007.

OVANDO, A. C; HERNÁNDEZ, M. L. P; HERNÁNDEZ, M. E. P; RODRÍGUEZ, J. A.; VIDAL, C. A. G. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859–871, 2009.

PAPANICOLAOU, K. N.; NGOH G. A.; DABKOWSKI, E. R.; O'CONNELL, K. A; RIBEIRO R. F.; STANLEY, W. C. Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 302, n. 1, p. 167-179, 2012.

PANOV, A. V. PRACTICAL MITOCHONDRIOLOGY Pitfalls and Problems in Studies

of mitochondria with a Description of Mitochondrial Functions. **Institute of Molecular Biology and Biophysics**, Russian Academy of Medical Sciences, 2015.

PATEL, R., MARU, G. Polymeric black tea polyphenols induce phase II enzymes via Nrf2 in mouse liver and lungs. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, p. 1897–1911, 2008.

PAVLICA, S., GEBHARDT, R. Protective effects of flavonoids and two metabolites against oxidative stress in neuronal PC12 cells. **Life Sciences**, v. 86, p. 79–86, 2010.

PIGNATELLI, P., GHISELLI, A., BUCHETTI, B., CARNEVALE, R., NATELLA, F., GERMANO, G. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. **Atherosclerosis**, v. 188, p. 77–83, 2006.

PISONERO-VAQUERO, S., GARCIA-MEDIAVILLA, M.V., MARTINEZ-FERRERAS, A., ESTEBAN-BLANCO, M., CULEBRAS, J.M., GARCIA-PALOMO, A. Effect of quercetin treatment on lipid metabolism deregulation associated with non-alcoholic fatty liver disease (Nafld). **British Journal of Surgery**, v. 102, n. 16, 2015a.

PISONERO-VAQUERO, S., MARTINEZ-FERRERAS, A., GARCIA-MEDIAVILLA, M.V., MARTINEZ-FLOREZ, S., FERNANDEZ, A., BENET, M. Quercetin ameliorates dysregulation of lipid metabolism genes via the PI3K/AKT pathway in a diet-induced mouse model of nonalcoholic fatty liver disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, p. 879–893, 2015b.

PITKANEN, S., ROBINSON, B.H. Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, 345–351, 1996.

PSOTOVA, J., CHLOPCIKOVA, S., GRAMBAL, F., SIMANEK, V., ULRICHOVA, J. Influence of silymarin and its flavonolignans on doxorubicin-iron induced lipid peroxidation in rat heart microsomes and mitochondria in comparison with quercetin. **Phytotherapy Research**, v. 16, 63–67, 2002.

RAHMAN, I., VAN SCHADEWIJK, A.A., CROWTHER, A.J., HIEMSTRA, P.S., STOLK, J., MACNEE, W. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, p. 490–495, 2002.

RASOLA, A.; BERNARDI, P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. **Apoptosis**, v. 12, p. 815–832, 2007.

ROSCA, M. G.; VAZQUEZ, E. J.; KERNER, J.; PARLAND, W.; CHANDLER, M. P.; SABOGAL-GUAQUETA, A.M., MUNOZ-MANCO, J.I., RAMIREZ-PINEDA, J.R., LAMPREA-RODRIGUEZ, M., OSORIO, E., CARDONA-GOMEZ, G.P., The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice.

Neuropharmacology, v. 93, p. 134–145, 2015.

SANTULLI, G.; XIE, W.; REIKEN, S. R.; MARKS, A. R. Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, p. 11389–11394, 2015.

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. **Science**, v. 283, p. 1488-1493.

SCHEUBEL, R. J.; TOSTLEBE, M.; SIMM, A.; ROHRBACH, S.; PRONDZINSKY, R.; GELLERICH, F. N.; SILBER, R. E.; HOLTZ, J. Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. **Journal of the American College of Cardiology**, n. 40, v. 12, p. 2174-2181, 2002.

SCHWARZ, K.; SIDDIQI, N.; SINGH, S.; NEIL, C. J.; DAWSON, D. K.; FRENNEAUX, M. P. The breathing heart - Mitochondrial respiratory chain dysfunction in cardiac disease. **International Journal of Cardiology**, v. 171, p. 134–143, 2018.

SCHMIDT, O.; PFANNER, N.; MEISINGER, C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 11, n. 9, p. 655–667, 2010.

SHEN Y.; CROFT K. D.; HODGSON J. M.; KYLE R.; LEE I. L. E.; WANG, Y. Quercetin and its metabolites improve vessel function by inducing eNOS activity via phosphorylation of AMPK. **Biochemical Pharmacology**, v. 11, n. 84, p. 1036-1044, 2012.

SIWIK, D. A.; COLUCCI, W. S. Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. **Heart Failure Reviews**, v. 9, p. 43-51, 2004.

SIASOS, G.; TSIGKOU, V.; KOSMOPOULOS, M.; THEODOSIADIS, D.; TAGKOU, N. M.; TSIMPIKTSIOGLOU, A. Mitochondria and cardiovascular diseases - from pathophysiology to treatment. **Annals of Translational Medicine**, v. 6, n. 2, p. 1-22, 2018.

SPANIER, G., XU, H., XIA, N., TOBIAS, S., DENG, S., WOJNOWSKI, L. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, p. 111–116, 2009.

STANLEY, W.; SABBAH, H. N.; HOPPEL, C. L. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. **Cardiovascular Research**, v. 80, n. 1, p. 30-39, 2008.

ST-PIERRE, J.; DRORI, S.; ULDRY, M.; SILVAGGI, J. M.; RHEE, J.; JÄGER, S. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1

Transcriptional Coactivators. **Cell**, v. 127, n. 2, p. 397–408, 2006.

ST-PIERRE, J.; BUCKINGHAM, J. A.; ROEBUCK, S. J.; BRAND, M. D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 47, p. 44784–44790, 2002.

SVERDLOV, A. L.; ELEZABY, A.; QIN, F.; BEHRING, J. B.; LUPTAK, I.; CALAMARAS, T. D.; SIWIK, D. A.; MILLER, E. J.; LIESA, M.; SHIRIHAI, O. S.; PIMENTEL, D. R.; COHEN, R. A.; BACHSCHMID, M. M.; COLUCCI, W. S. Mitochondrial reactive oxygen species mediate cardiac structural, functional, and mitochondrial consequences of diet-induced metabolic heart disease. **Journal of the American Heart Association**, n. 11, v. 5, 2016.

TAKANO H; NAGAI T; ASAKAWA M; TOYOZAKI T; OKA T; KOMURO I. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiac myocytes. **Circulation Research**, v. 87, n. 7, p. 596–602, 2000.

TAKIMOTO, E.; KASS, D. A. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. **Hypertension**, v. 49, p. 241-248, 2007.

TAKIMOTO, E.; CHAMPION, H. C.; LI, M.; REN, S.; RODRIGUEZ, E. R; TAVAZZI, B.; LAZZARINO, G.; PAOLOCCI, N.; GABRIELSON, K. L.; WANG, Y.; KASS, D. A. Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 1221-1231, 2005.

TISSUT, M., CHEVALLIER, D., DOUCE, R. Effect of different polyphenols on isolated-mitochondria and chloroplasts. **Phytochemistry**, v. 19, p. 495–500, 1980.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. **Cardiovascular Research**, v. 81, 2009, p. 449–56, 2009.

ULASOVA, E.; PEREZ, J.; HILL, B. G.; BRADLEY, W. E.; GARBER, D. W.; LANDAR, A. Quercetin prevents left ventricular hypertrophy in the Apo E knockout mouse. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p.381-386, 2013.

VAKILI, B. A.; OKIN, P. M.; DEVEREUX, R. B. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. **American Heart Journal**, v. 141, n. 3, p. 334-341, 2001.

VIDYA PRIYADARSINI, R., SENTHIL MURUGAN, R., MAITREYI, S., RAMALINGAM, K., KARUNAGARAN, D., NAGINI, S. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-kappaB inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 649, p. 84–91, 2010.

WALKER, E. H.; PACOLD, M. E.; PERISIC, O.; STEPHENS, L.; HAWKINS, P. T.; WYMAN, M. P.; WILLIAMS, R. L. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine.

Molecular Cell, v. 6, p. 909–919.

WEISIGER, R. A.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. Organelle specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n.10, p. 3582-3592, 1973.

YAMAMOTO, K.; OHISHI, M.; HO, C.; KURTZ, T. W.; RAKUGI, H. Telmisartan-Induced Inhibition of Vascular Cell Proliferation Beyond Angiotensin Receptor Blockade and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Activation. **Hypertension**, v. 54, n. 6,1353-1359, 2009.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 113–122, 2004.

YAN, L.; ZHANG, J. D.; WANG, B.; LV, Y. J.; JIANG, H; LIU, G. L.; QIAO, Y.; REN, M.; GUO, X. F. Quercetin inhibits left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats and inhibits angiotensin II-induced H9C2 cells hypertrophy by enhancing PPAR- γ expression and suppressing AP-1 activity. **PLoS One**, v. 8, n. 9, 2013.

YOSHINO, S., HARA, A., SAKAKIBARA, H., KAWABATA, K., TOKUMURA, A., ISHISAKA, A. Effect of quercetin and glucuronide metabolites on the monoamine oxidase-A reactionin mouse brain mitochondria. **Nutrition**, p. 847–852, 2011.

YOU DIM, K.A., SHUKITT-HALE, B., MACKINNON, S., KALT, W., JOSEPH, J.A., Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1523, p. 117–122, 2000.

ZHANG, J., PERRY, G., SMITH, M.A., ROBERTSON, D., OLSON, S.J., GRAHAM, D.G. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. **The American Journal of Pathology**, v. 154, p. 1423–1429, 1999.

ZHENG, J., RAMIREZ, V.D. Inhibition of mitochondrial proton F₀F₁-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, p. 1115–1123, 2000.

ANEXO A: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO CARIRI COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

ANÁLISE DO PROJETO			
Nº de protocolo	001/2019		
Nome do projeto	Impacto do Antioxidante Quercetina sobre a Hipertrofia Cardíaca.		
Coordenador	Prof. Dr. Heberty di Tarso Fernandes Facundo		
Situação	Aprovado (X)	Reprovado ()	Pendente ()
Data da entrega: 03/10/2018		Data do parecer final: 21/02/2019	

Na qualidade de Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA comunico que o projeto acima especificado, após avaliação técnica dos relatores, foi classificado como APROVADO.

Observação: O coordenador do projeto deve apresentar um relatório final da pesquisa à CEUA até 90 dias após a conclusão das atividades.

Atenciosamente,

Maria do Socorro Vieira Gadelha

Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro
Vieira Gadelha SIAPE 1550021 /
Médica Veterinária CRMV/CE 01143
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de
Animais – CEUA

Rua: Divino Salvador, 284 – Rosário –
Barbalha/CE – CEP 63.180.000 Fone: (88)
3221-9606

**ANEXO B: PAPER PARA SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA
JOURNAL OF CARDIOVASCULAR PHARMACOLOGY**