



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Marcos Rafael Marinho Pereira

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “A Disfunção Mitocondrial no Desenvolvimento da Aterosclerose”, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação do Dra. Patrícia Teixeira e do Professor Doutor José Barata Antunes Custódio e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Marcos Rafael Marinho Pereira

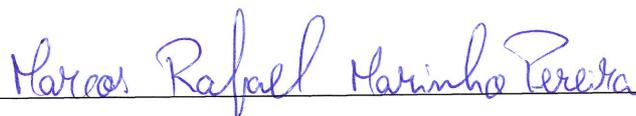
Relatório de Estágio e Monografia intitulada “A Disfunção Mitocondrial no Desenvolvimento da Aterosclerose”, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação do Dra. Patrícia Teixeira e do Professor Doutor José Barata Antunes Custódio e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2020

Eu, Marcos Rafael Marinho Pereira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015228410, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “A Disfunção Mitocondrial no desenvolvimento da Aterosclerose” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográfico legalmente estabelecido, salvaguardando os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 30 de setembro de 2020.



(Marcos Rafael Marinho Pereira)

Agradecimentos

À Faculdade de Farmácia, em especial ao Professor Doutor José Barata Antunes Custódio por toda a disponibilidade e colaboração na realização da monografia.

A todos os meus amigos da Raja, por serem uma família e fazerem de Coimbra a minha segunda casa, por todas as alegrias e aventuras, por tudo o que não seria possível se vocês não estivessem presentes.

Ao Bem-du-ron, o melhor carro da queima das fitas, por toda a amizade, por todos os convívios e grandes momentos que passamos juntos.

Aos meus amigos, pelos bons momentos partilhados, por toda a entreatuda e acima de tudo por serem os melhores amigos que Coimbra me podia dar.

Ao Zé Dias, o amigo de todas as horas, por ser uma pessoa incrível que me acompanhou durante todo o percurso e tornou tudo mais fácil.

À minha família, um agradecimento muito especial, sobretudo aos meus pais e ao meu irmão por me apoiarem incondicionalmente, por me incentivarem nos momentos mais difíceis e assim de tudo por serem a melhor família do mundo.

A Coimbra, a cidade dos estudantes, dos amores e dos doutores. A cidade que me fez crescer e tornou-me adulto. Aqui sorri, aqui chorei, aqui fui feliz e vivi as experiências mais incríveis.

A todos vocês, muito obrigado!

“Tudo vale a pena quando a alma não é pequena”

Fernando Pessoa

Introdução ao Documento Único

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra segue um plano de estudos com a duração de 10 semestres, 9 dos quais de formação teórica, prática e teórico-prática em áreas multidisciplinares de atividade farmacêutica, culminando na realização do Estágio Curricular, que constitui o último semestre do plano de estudos.

A unidade “Estágio Curricular” é assim constituída pela realização de uma monografia sob orientação interna, no meu caso do Professor Doutor José Barata Antunes Custódio, e pela realização de um ou mais estágios, sob orientação externa, em farmácia comunitária e outras áreas de atividade farmacêutica, de forma a completar o número de horas de formação necessárias.

Neste sentido, o seguinte Documento está subdividido em dois capítulos, o primeiro referente ao relatório de estágio curricular em farmácia comunitária, e o segundo referente à monografia intitulada “A Disfunção Mitocondrial no Desenvolvimento da Aterosclerose”. O relatório é constituído por uma Análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) das atividades desenvolvidas e pela apresentação de dois casos práticos. A monografia, por sua vez, representa um trabalho de pesquisa sobre uma doença com alta taxa de mortalidade, a Aterosclerose, relacionando-a a disfunção do organelo central do metabolismo celular, a Mitocôndria.

Índice

Capítulo I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Abreviaturas.....	8
Introdução.....	9
1. Farmácia de Ferverça.....	10
2. O estágio.....	10
3. Análise SWOT.....	11
3.1 Pontos Fortes – <i>Strenghts</i>	11
3.2 Pontos Fracos – <i>Weaknesses</i>	13
3.3 Oportunidades – <i>Opportunities</i>	13
3.4 Ameaças – <i>Threats</i>	14
4. Casos Práticos.....	15
5. Referências Bibliográficas.....	17

Capítulo II – Monografia “A Disfunção Mitocondrial no Desenvolvimento da Aterosclerose”

Resumo.....	19
Abstract.....	20
Abreviaturas.....	21
Introdução.....	23
1. Aterosclerose.....	24
1.1 Oxidação das LDL.....	24
1.2 <i>Stress Oxidativo</i>	25
2. A mitocôndria.....	26
2.1 Cadeia Respiratória.....	27
2.2 Sistema Fosforilativo.....	28
2.3 Produção de ROS nas mitocôndrias.....	28
3. Disfunção mitocondrial.....	31
3.1 Desregulação da proteína UCP2.....	31
3.2 Disfunção autofágica.....	32
3.3 Ativação de macrófagos.....	32
4. Aterosclerose – Uma Doença mitocondrial?.....	33
4.1 Inflamação.....	35
4.1.1 Ativação do Inflamassoma NLRP3.....	36
4.2 O <i>stress oxidativo</i> e o dano sobre o DNA mitocondrial.....	37
4.3 O citocromo-c como regulador apoptótico.....	38
4.4 Disfunção do metabolismo lipídico.....	40

5. Prevenção e Terapêutica.....	41
5.1 Direcionamento de sirtuinas.....	41
5.2 Esculetina.....	42
5.3 MitoQ.....	42
6. Conclusão.....	43
7. Bibliografia.....	44

Capítulo I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



Abreviaturas

COE	Contraceção Oral de Emergência
FF	Farmácia de Fervença
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
PUV	Preparações de uso Veterinário
SWAT	<i>Strenghts, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>

I. Introdução

Ser Farmacêutico na conjuntura atual constitui um desafio e uma responsabilidade acrescida perante a nova realidade provocada pela pandemia COVID-19, que alterou o *modus operandi* da profissão e criou hábitos e rotinas, realçando a capacidade de adaptação da profissão farmacêutica e o papel de primeira linha do farmacêutico junto da população.

A sua atividade remonta ao século XV, época em que estes se denominavam boticários, e as suas funções centravam-se na preparação oficial de medicamentos ou substâncias medicamentosas, razão pela qual as farmácias eram denominadas Farmácias de Oficina, designação mais tarde alterada para Farmácia Comunitária, com a atividade centrada cada vez mais no cidadão e na prestação de serviços de apoio à comunidade (Ordem dos Farmacêuticos, 2020).

Ao longo dos anos o papel do farmacêutico como agente de Saúde Pública tem vindo a revelar-se determinante, tendo este uma posição privilegiada para contribuir em áreas como a gestão da terapêutica, administração de medicamentos, identificação de pessoas em risco, deteção precoce de diversas doenças e promoção de estilos de vida mais saudáveis. Em suma, o farmacêutico é um profissional de saúde que se diferencia pela preparação académica na área do medicamento, realizando serviços de diferentes graus de complexidade, mas todos eles com elevado valor na saúde da população (Ordem dos Farmacêuticos, 2020).

Neste seguimento, o presente relatório representa uma análise retrospectiva e crítica da realização do estágio na Farmácia de Fervença (FF), do ponto de vista de um farmacêutico estagiário, onde serão avaliados os pontos fortes (*Strengths*) e os pontos fracos (*Weaknesses*), bem como as oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) que considere mais expressivas, e que definiram a minha evolução tanto a nível profissional, como a nível pessoal, no decorrer do estágio. Por último, são também apresentados dois casos práticos representativos da importância do farmacêutico junto da comunidade e do seu papel ativo na segurança e bem-estar da saúde do utente.

2. Farmácia de Fervença

A Farmácia de Fervença (FF) está situada na freguesia de fervença, concelho de Celorico de Basto, numa área de confluência de concelhos, próximo de uma extensão do Centro de Saúde de Celorico de Basto, da Escola Básica e Integrada da Mota e outros serviços essenciais responsáveis pela grande afluência de utentes à farmácia.

Apesar de localizada num meio essencialmente rural, a farmácia abrange uma área populacional elevada e dispõem de excelentes instalações, bem como de uma equipa jovem e dinâmica, constituída pela Dra. Técnica Ana Medeiros, pela Dra. Patrícia Teixeira e pelas Técnicas de Farmácia Alexandrina Oliveira, Adriana e Patrícia Marinho.

3. O estágio

No primeiro dia de estágio fui formalmente recebido pela Dra. Patrícia Teixeira, a minha orientadora de estágio, que me apresentou a farmácia e a organização da mesma, traçando uma ordem cronológica de funções que iria desempenhar ao longo do estágio, de forma a facilitar o processo de adaptação e o assimilar dos diferentes conteúdos.

Inicialmente comecei pelas atividades de *back-office*, nomeadamente o aprovisionamento, com a receção de encomendas, a colocação dos medicamentos nas devidas gavetas, verificação de *stocks* e validades, a separação de “produtos pagos” e “produtos reservados”, devoluções aos distribuidores, bem como a arrumação do armazém e dos lineares que era necessário realizar diariamente devido à grande quantidade de medicamentos e produtos de saúde rececionados.

À medida que me ia familiarizado com a dinâmica e o funcionamento da farmácia, comecei a assistir a alguns atendimentos ao balcão, de forma a presenciar diferentes tipos de aconselhamento farmacêutico, a abordagem personalizada ao utente, os diferentes tipos de receitas (eletrónicas, desmaterializadas e manuais), assim como a utilização do Sifarma[®] na modalidade de Atendimento. Participei também em várias ações de formação, tanto *online* como presencialmente, especialmente a nível da cosmética, que complementaram a minha formação, e realizei alguns dos serviços disponibilizados pela farmácia, como a medição da pressão arterial, colesterolémia e glicémia.

Simultaneamente com todas estas tarefas, numa fase já mais avançada do estágio, comecei a realizar atendimento ao utente, que constituiu a fase mais motivante do meu estágio,

não só pela aplicação prática do conhecimento adquirido ao longo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, mas pela comunicação com o utente e o sentido de responsabilidade que advém de cada aconselhamento realizado.

4. Análise SWOT

A análise SWAT, *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*, consiste numa avaliação criteriosa e empírica, assente em pontos positivos e negativos que influenciaram o conhecimento e as capacidades adquiridas durante o decorrer do estágio. Esta análise é feita a dois níveis, interno e externo. Internamente serão abordados os pontos que contribuíram para o bom funcionamento do estágio (Pontos Fortes) e os que de alguma forma dificultaram ou prejudicaram e constituem fragilidades (Pontos Fracos). Externamente serão avaliadas os fatores que impulsionaram o meu crescimento profissional (Oportunidades) e os que se opuseram, e constituíram obstáculos durante a realização do estágio (Ameaças).

4.1 Pontos Fortes – *Strengths*

Localização e Público alvo

Apesar de localizada num meio essencialmente rural, a FF encontra-se numa posição estratégica, que abrange população provenientes de vários concelhos, e é responsável pela grande afluência de utentes à farmácia.

No meu ponto de vista foi um grande vantagem para o estágio a nível de atendimento, não só pela heterogeneidade de utentes e abordagens realizadas, mas também pela diversidade no receituário e no aconselhamento ao utente.

Equipa e ambiente de trabalho

A FF possui uma equipa jovem e dinâmica, muito organizada, responsável e em constante inovação, que está presente em várias redes sociais onde realizam várias campanhas que atraem clientes à farmácia e possui um local de vendas *online*.

O facto de ser uma equipa jovem e empenhada contribuiu para a minha adaptação, não só pela facilidade em me identificar com a equipa, mas também pela disponibilidade e abertura para responder às minhas dúvidas e proporcionar a minha aprendizagem.

Foi extremamente importante a posição que detinham em relação aos estagiários, pois sentia-me parte da equipa e não um estagiário, o que fomentou a minha confiança, autonomia e o sentido de responsabilidade, que sem duvida constituíram pontos positivos.

Prestação de Serviços Farmacêuticos

No decorrer do estágio realizado tive a oportunidade de participar em vários dos serviços prestados pela farmácia, entre eles o apoio domiciliário, com a entrega de medicamentos ao domicílio e a lares de idosos, preparação individualizada de medicamentos, medição de parâmetros físicos e bioquímicos, tais como a medição da pressão arterial, glicémia e colesterolémia, e ainda a preparação de medicamentos manipulados.

Do ponto de vista profissional foram experiências enriquecedoras, uma vez que me permitiram adquirir competências a nível do funcionamento de equipamentos, mas também pelo contacto próximo com o utente, ainda que sobre fortes restrições devido à pandemia, e pela facilidade de comunicação ao utente que ia desenvolvendo, ao intervir em certas situações para dar o melhor aconselhamento possível.

Desenvolvimento de Competências Sociais

O contacto com o público, nomeadamente pelo atendimento ao balcão proporcionou-me o desenvolvimento não só competências comunicativas, mas também de várias aptidões e competências sociais.

A gestão de conflitos e a capacidade de ouvir e interpretar o utente foram sem dúvida dois pilares importantíssimos que desenvolvi ao longo estágio, que juntamente com o trabalho de equipa, a comunicação e o relacionamento interpessoal formam um leque de competências importantes para a profissão farmacêutica e para a sua posição na sociedade enquanto profissional de saúde.

4.2 Pontos Fracos – Weaknesses

Dificuldade em associar princípios ativos aos nomes comerciais

Durante o percurso académico não mencionamos nomes comerciais de medicamentos, mas sim os fármacos que os constituem, o que considero uma dificuldade extra para a realização do estágio em farmácia comunitária. Inúmeras vezes os utentes questionavam em relação ao nome comercial de um medicamento, o que constituía uma dificuldade, principalmente nos primeiros atendimentos ao público, dado ao desconhecimento e fraca familiarização com estes nomes. Contudo, senti que este problema foi minimizando ao longo do estágio pelo contacto recorrente com estes medicamentos, tanto no aprovisionamento, como na dispensa dos mesmos.

Lacunas de conhecimento na formação académica

Inserido num meio essencialmente rural, em que a agropecuária representa o setor de maior atividade, obriga a FF dispor de uma gama alargada de medicamentos e produtos de uso veterinário para responder às necessidades da população.

Apesar de constar no plano de estudos do MICF uma unidade curricular de preparações de uso veterinário (PUV), considero uma lacuna de conhecimento na formação académica, devido à falta de uma componente prática para auxiliar no atendimento ao público. De forma a colmatar esta ameaça recorri várias vezes ao médico veterinário que presta serviço à farmácia, de forma a não prejudicar a qualidade do atendimento prestado e a dar o melhor aconselhamento possível.

4.3 Oportunidades – Opportunities

Formação da equipa

A formação contínua do farmacêutico é uma obrigação contemplada no artigo n.º12 do Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos, onde consta que o farmacêutico deve manter atualizadas as suas capacidades técnicas e científicas no sentido de melhorar e aperfeiçoar constantemente a sua atividade, por forma a que possa desempenhar conscientemente as suas obrigações profissionais perante a sociedade.

Desta forma, a FF preza por manter a sua equipa atualizada e muitas foram as formações que assisti ao longo do estágio, especialmente a nível da cosmética, respondendo à variedade de marcas e produtos que a farmácia possui e ao aconselhamento adequado ao utente. Constituíram assim uma mais-valia na minha formação, complementando o conhecimento adquirido durante o curso e contribuindo para a assertividade e confiança necessária durante um atendimento ao público.

Metodologia Kaizen

A metodologia *Kaizen*, segundo o *Kaizen institute* significa “melhoria contínua” e resulta das palavras “*Kai*”, mudar e “*Zen*”, melhor. Esta metodologia é uma ferramenta para inovação, excelência, crescimento e rentabilidade, constituindo um pilar importante da estratégia competitiva de longo prazo de uma organização (*Kaizen Institute Portugal*, 2020).

Com o intuito de obter a melhor organização e rentabilidade possível, esta metodologia fez parte da realidade do meu estágio, onde foi importante na definição das tarefas a realizar, bem como na organização, maior motivação e gestão da farmácia. Todo o processo de receção de encomendas, com a separação dos “produtos pagos”, “produtos reservados”, ou “produtos para devolução” faziam parte desta organização, assim como a definição de áreas específicas para a colocação destes produtos.

Estes processos constituíam uma estratégia importante no desenrolar das atividades diárias da farmácia, permitindo-me adquirir rotinas e estimular o trabalho de equipa, rentabilizando o tempo necessário para cada tarefa e facilitando a comunicação entre os membros da equipa.

4.4 Ameaças – Threats

Pandemia COVID-19

O facto de estarmos perante uma pandemia mundial prejudicou de forma significativa o meu estágio. O contacto com utente ficou prejudicado, não só pelo uso de máscara que muitas vezes dificultava a comunicação, especialmente em utentes com dificuldade de audição e mais idosos, mas também pelo distanciamento social e a necessidade de adoção de um plano de contingência que impedia a permanência de mais de quatro pessoas no interior da farmácia, desinfeção obrigatória das mãos, delimitação de zonas de circulação e impedimento da

devoluções de produtos, o que muitas vezes não era bem aceite pelos utentes e constituía uma situação difícil de gerir.

Falhas durante implementação do novo sistema informático

A FF utiliza o sistema informático Sifarma[®] concebido pela *Glint* que se encontra atualmente em atualização para originar uma nova versão melhorada e simplificada, em especial na modalidade de atendimento. O facto de a farmácia utilizar a versão antiga em simultâneo com a nova versão constitui uma ameaça dada a morosidade de processamento e o tempo despendido em cada atendimento. Outra dificuldade prendia-se com facto de ser necessário seleccionar a versão a utilizar consoante o atendimento a realizar, isto porque a nova versão não permitia “vendas suspensas” e a “crédito”, obrigando muitas vezes à utilização dos dois sistemas em simultâneo e à indução de erros no atendimento.

5. Casos Práticos

No decorrer do meu estágio deparei-me com situações diferentes, onde pude constatar que o farmacêutico é um profissional de saúde de confiança e extrema importância junto da população. O farmacêutico tem inúmeras responsabilidades para com a saúde e o bem-estar do doente, devendo promover o direito de acesso a um tratamento com qualidade, eficácia e segurança, fomentando o uso racional de medicamentos, com a informação correta sobre a sua utilização e o recurso a medidas não farmacológicas sempre que possível, dispensar ao doente o medicamento em cumprimento da prescrição médica ou que me melhor satisfaça as relações benefício/risco e benefício/custo, bem como assegurar a máxima qualidade dos serviços que presta, em harmonia com as boas práticas de farmácia (Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos). Neste seguimento, apresento dois dos casos em que intervim enquanto farmacêutico estagiário.

Contraceção Oral de Emergência

Enquanto estava no atendimento ao balcão, uma jovem adolescente abordou-me acerca da contraceção oral de emergência (COE), pedindo-me que lhe solicitasse a pílula do dia seguinte. Na tentativa de perceber a razão pela qual a jovem necessitava da COE e se

realmente seria adequado, iniciei uma conversa com a mulher fazendo-lhe algumas questões. Primeiramente perguntei-lhe se houve de facto uma relação sexual desprotegida e há quanto tempo ocorreu para saber se seria adequado a dispensa de *ellaOne*[®] (30mg de acetato de ulipristal), a única COE disponível naquele momento na farmácia, que é eficaz até 120h após a relação sexual desprotegida. Obtendo uma resposta positiva, comecei então por lhe explicar o ciclo menstrual, para entender se a relação teria ocorrido no período fértil, ou seja, entre o décimo e décimo oitavo dia após o início da menstruação. De seguida questionei-a acerca de possíveis problemas de saúde, tal como problemas hepáticos ou de má absorção, no qual me respondeu que não possuía nenhum. Procedi então à dispensa do medicamento, indicando que era aconselhável a utilização de proteção de barreira até ao próximo ciclo menstrual e que este se poderia alterar, e ainda que caso vomitasse nas 3 horas seguintes à toma do medicamento deveria repetir a mesma.

Relação Médico/Farmacêutico

Uma senhora dirige-se à farmácia com uma receita médica, com a prescrição de Terbutalina, um agonista adrenérgico dos recetores beta 2, com indicação terapêutica para asma brônquica, bronquite crónica, enfisema e outras doenças pulmonares. Quando questionei a senhora se era a primeira vez que ia administrar o medicamento e se conhecia o modo de administração, ela respondeu que sim porque a infeção fúngica na unha era recente e a indicação tinha sido dada momentos antes pelo médico. Rapidamente me apercebi que existia algum equívoco quanto à prescrição e decidi contactar o médico prescriptor para confirmar. Após ter explicado a situação, este apercebeu-se que existia um erro na prescrição, sendo que o fármaco pretendido era a Terbinafina 10mg/g, uma solução para pulverização cutânea com indicação para infeções fúngicas da pele causadas por dermatófitos e Pitiríase versicolor.

Esta situação realça a importância da comunicação entre o médico e o farmacêutico, no sentido de evitar potenciais erros e garantir a maior segurança do utente, bem como o papel crítico e ativo do farmacêutico na primeira linha para a promoção do bem-estar e saúde.

6. Referências Bibliográficas

Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos. - Capítulo I. Ordem dos Farmacêuticos. Lisboa.

Kaizen Institute Portugal (2020). - Definição de Kaizen. [Acedido a 21 de setembro de 2020]. Disponível em: https://pt.kaizen.com/o-que-e-kaizen.html#definition_kaizen

Ordem dos Farmacêuticos (2020). - A Farmácia Comunitária. [Acedido a 23 de setembro de 2020]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>

Capítulo II

Monografia

“A Disfunção Mitocondrial no Desenvolvimento da Aterosclerose”

Resumo

A aterosclerose é uma patologia associada às doenças cardiovasculares que se caracteriza pela formação de placas gordurosas nas artérias, altamente instáveis e suscetíveis a rupturas, que conduzem a várias complicações fisiopatológicas. Os lípidos desempenham um papel ativo no desenvolvimento e progressão da doença, que se inicia precocemente com a sua acumulação na íntima arterial, onde sofrem modificações oxidativas que desencadeiam o início da inflamação e dos vários processos ateroscleróticos.

A mitocôndria, por intermédio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) associados ao metabolismo aeróbio, é considerada o motor do stress oxidativo, do qual resulta um extenso dano sobre o material genético deste organelo, contribuindo para a disfunção do metabolismo lipídico que conseqüentemente impede o correto transporte reverso do colesterol, desregula a morte celular programada e possibilita a ativação dos mecanismos da inflamação, com a expressão do complexo multiproteico NLRP3 e a libertação de citocinas pró inflamatórias.

Não obstante, compreender os mecanismos pelos quais a disfunção mitocondrial ocorre e preservar o bom funcionamento da mitocôndria, é imprescindível para reprimir o desenvolvimento de novas placas ateroscleróticas e evitar várias complicações metabólicas que aumentam o risco cardiovascular.

Palavras-chave: Aterosclerose, Mitocôndria, ROS, Disfunção, Metabolismo.

Abstract

Atherosclerosis is a pathology highly associated with cardiovascular diseases characterized by the formation of fatty streaks in the arteries, particularly unstable and susceptible to rupture, leading to several pathophysiological complications. Lipids perform an active role in the development and progression of the disease, starting early with its accumulation in the arterial intima, where it suffers oxidative modifications that trigger several atherosclerotic processes.

Mitochondria, through the production of reactive oxygen species, is considered the engine of oxidative stress, resulting in an extensive damage to the genetic material of this organelle, enabling lipid metabolism dysfunction, preventing the proper cholesterol reverse transport and deregulating programmed cell death that allow inflammatory mechanism activation with the expression of NLRP3 multiproteic complex and release of pro-inflammatory cytokines.

Nevertheless, understanding the mechanism by which dysfunction occurs and preserving the normal mitochondrial function is essential to suppress new atherosclerotic plaques and avoid multiple metabolic complications and cardiovascular risk.

Keywords: Atherosclerosis, Mitochondria, ROS, Dysfunction, Metabolism.

Abreviaturas

ABCA1	Transportador de Cassete Tipo A1 de ligação ao ATP
ABCG1	Transportador de Cassete Tipo G1 de ligação ao ATP
AMP	Adenosina Difosfato
AMPK	Proteína Cinase do AMP
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase
cGAS	Sintetase cíclica GMP-AMP
DAMPs	<i>Damage-associated Molecular Patterns</i>
Drp1	Proteína Relacionada com a Dinâmica Mitocondrial Tipo 1
eNOS	Sintetase do Óxido Nítrico Endotelial
FGF21	Fator de Crescimento de Fibroblastos Tipo 21
GMP	Monofosfato de Guanosina Cíclica
GSH	Glutathiona Reduzida
GSSH	Glutathiona Dissulfeto
IL-1β	Interleucina Beta Tipo 1
mtDNA	DNA Mitocondrial
mtHSP	Proteína de Choque Térmico Mitocondrial
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear kappa-b
NO	Óxido Nítrico
NOX4	NADPH oxidase Tipo 4
OMA1	Metaloendopeptidase Mitocondrial Tipo 1
Opa1	Proteína de Fusão de Atrofia Ótica Tipo 1
PAMPs	<i>Damage-associated Molecular Patterns</i>
PGC1-α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator- 1 α
PON	Paraoxenase recruitment domain
RNS	Espécies Reativas de Nitrogénio
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio

Sirt	Sirtuinas
SOD	Superóxido Dismutase
TLRs	Recetores <i>Toll-like</i>
TPP	Trifenilfosfónio
tRNA	RNA de Transferência
UCP2	Proteína Dissociadora Mitocondrial Tipo 2
$\Delta\psi$	Potencial de Membrana

Introdução

A mitocôndria, como organelo altamente dinâmico, desempenha um papel fundamental na célula, do qual depende a produção de energia e a homeostasia celular, bem como muitos outros processos capazes de manter a célula ativa e funcional. Através da cadeia respiratória, inserida na sua membrana interna, esta tem sido extensivamente associada à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inevitavelmente à regulação da morte celular, metabolismo lipídico e inflamação, todos estes processos envolvidos na fisiopatologia da aterosclerose.

É indiscutível que o stress oxidativo representa uma ameaça ao material genómico da mitocôndria e que daí resultam consequências graves para o seu funcionamento. No entanto, a extensão da sua ocorrência e os mecanismos pelos quais atuam, ainda não totalmente esclarecidos, são substancialmente importantes para gerar soluções capazes de impedir o desenvolvimento e a progressão desta patologia que afeta milhões de pessoas, e se inicia precocemente de forma silenciosa.

Desta forma, o trabalho foi aqui apresentado de modo a descrever primeiro lugar a aterosclerose e os mecanismos envolvidos no seu desenvolvimento, nomeadamente o stress oxidativo e a relevância da oxidação lipídica, bem como a mitocôndria, nomeadamente o seu papel na produção de ROS e os mecanismos suscetíveis de descontrolar a sua função.

De seguida, é feita uma paralelização entre a fisiopatologia da aterosclerose e o contributo da disfunção mitocondrial, enfatizando-se o papel da inflamação, do dano sobre o DNA mitocondrial, do citocromo-c como regulador apoptótico e da disfunção do metabolismo lipídico. Por último, são referidas algumas abordagens terapêuticas centradas na mitocôndria, com grande potencial para evitar ou mesmo impedir os efeitos nefastos da disfunção mitocondrial no desenvolvimento de aterosclerose.

I. Aterosclerose

A Aterosclerose, condição inerente à doença cardiovascular, é a principal causa de morte a nível mundial, contabilizando cerca de 17,9 milhões de mortes anuais. A patologia apresenta um quadro sintomatológico com aumento da pressão arterial, glicose e lípidos, além de sobrepeso e obesidade. Identificar pacientes de maior risco cardiovascular, garantir o acesso a medicamentos essenciais e a tecnologias básicas de saúde, é um passo primordial para evitar mortes prematuras e garantir o tratamento e aconselhamento necessário (WHO, 2017).

Considerada uma patologia sistémica inflamatória e progressiva, a aterosclerose afeta principalmente a parede das pequenas e grandes artérias, como a aorta, a carótida, e as artérias coronárias, em locais propensos a turbulência ou stress de cisalhamento oscilatório, como ramos, curvaturas ou bifurcações arteriais. Devido ao longo período de latência associado, as lesões clinicamente relevantes evidenciam-se em adultos de meia idade, no entanto, o armazenamento de lípidos inicia-se durante a primeira infância (Marchio *et al.*, 2019).

A oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) é o fator principal no desencadeamento e desenvolvimento da aterosclerose. No entanto, não é o único mecanismo passível de iniciar a inflamação, dado que, o desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes desempenha também um papel de relevância no processo aterosclerótico (Marchio *et al.*, 2019).

I.1 Oxidação das LDL

As lipoproteínas plasmáticas, além da função de transporte dos lípidos na corrente sanguínea, são importantes mediadores na captação celular de lípidos circulantes mediada por recetores, constituindo um elemento básico do metabolismo lipídico (Ahotupa, 2017).

A oxidação das lipoproteínas LDL na etiologia da doença cardiovascular tem sido alvo de vários estudos, e tem sido descritas fortes associações entre a oxidação destas lipoproteínas e a verificação clínica de aterosclerose, função arterial e fatores de risco cardiovascular. As LDL oxidadas, entre múltiplas funções desempenhadas no desenvolvimento da aterosclerose, estão envolvidas na acumulação de macrófagos e regulação da sua atividade, formação de células espumosas na parede vascular, assim como na ativação de genes ateroscleróticos (Ahotupa, 2017).

Kresanov e colaboradores demonstraram que as lipoproteínas HDL oxidadas estão igualmente envolvidas no risco aterosclerótico, mas com efeito preventivo. A razão entre LDL oxidadas e HDL oxidadas é assim indicativo do movimento dos produtos da oxidação lipídica, e como tal, da severidade de propagação da doença.

Os lípidos oxidados são capazes de iniciar diversas respostas celulares, entre as quais, mecanismos mediados por recetores e modificação direta pós-tradução de proteínas. A incubação de células endoteliais com concentrações elevadas de LDL oxidadas induz a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, que parece depender da indução do stress oxidativo (Victor *et al.*, 2009).

1.2 Stress Oxidativo

O stress oxidativo e nitrosativo é caracterizado essencialmente pelo desequilíbrio entre sistemas oxidantes e antioxidantes, resultando num aumento das espécies reativas de oxigénio e nitrogénio (Marchio *et al.*, 2019). A parede vascular possui sistemas oxidantes como as xantinas oxidases, enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, lipoxigenases, sintetase do óxido nítrico endotelial (eNOS) não acoplado, NADPH oxidases, e sistemas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona peroxidases, paraoxenases, sistema tioredoxina e peroxiredoxinas (Mauricio *et al.*, 2018).

A NADPH oxidase é a principal fonte de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio na parede vascular. O aumento da sua atividade promove a dissociação da eNOS, e, conseqüentemente, a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), promovendo a disfunção endotelial. A eNOS dissociada exhibe a atividade da NADPH oxidase e produz o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), responsável por agravar o stress oxidativo (Förstermann *et al.*, 2017).

A SOD possui três isoformas, a SOD1, localizada no citoplasma e na membrana mitocondrial interna, a SOD2, na matriz mitocondrial, e a SOD3, no meio extracelular, capazes de neutralizar o $O_2^{\cdot-}$ para formar O_2 e H_2O_2 . Apesar de neutralizar o $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 estimula o stress oxidativo, pelo que são necessárias enzimas a jusante, tal como a catalase, capazes de o neutralizar, e que o convertem em água e oxigénio (Kattoor *et al.*, 2017).

A glutathiona peroxidase, o maior sistema antioxidante celular, reduz o H_2O_2 e os hidroperóxidos lipídicos em H_2O e nos correspondentes álcoois, tendo a glutathiona reduzida (GSH) como principal dador de eletrões. A GSH é oxidada pela glutathiona peroxidase para

formar glutationa dissulfeto (GSSG), uma reação revertida pela glutationa redutase, uma enzima NADPH dependente, levando à regeneração da GSH. A deficiência de glutationa peroxidase em ratos promoveu o aumento de LDL oxidado e a indução da formação de células espumosas, assim como o aumento das lesões ateroscleróticas (Marchio *et al.*, 2019).

As Paraoxenases (PON) são uma família de proteínas (PONI, PON2 e PON3) implicadas na redução do stress oxidativo, diminuição da peroxidação lipídica e na limitação da aterosclerose em modelos animais. A PON2, responsável por reduzir a formação de superóxidos, é expressa na parede dos vasos e em resposta à peroxidação lipídica migra para a membrana plasmática e participa ativamente na redução do stress oxidativo. Da mesma forma, a PON3, expressa nas células musculares lisas das placas ateroscleróticas, previne a formação de superóxido na mitocôndria (Kattoor *et al.*, 2017).

2. A mitocôndria

A mitocôndria é um organelo intracelular existente na maioria das células eucarióticas, desempenhando um papel multifuncional. Além de ser a central energética da célula, com produção de energia celular, energia redutora e produção de ATP, está envolvida na homeostasia celular, tendo um papel importante na sinalização intracelular, apoptose, metabolismo de aminoácidos, lípidos, colesterol, esteroides e nucleótidos.

Este organelo pode ser dividido em quatro áreas funcionais, sendo estas, a membrana externa mitocondrial, o espaço intermembranar, a matriz mitocondrial e a membrana interna mitocondrial (Peng *et al.*, 2019). Esta última, impermeável a pequenas moléculas e iões, incluindo prótons, é o local que aloja os componentes da cadeia respiratória e do sistema fosforilativo (Nelson and Cox, 2008). Cada Mitocôndria contém uma cadeia dupla de DNA circular, conhecida como DNA mitocondrial (mtDNA). O mtDNA humano contém 16 569 pares de bases e codifica 37 genes, incluindo 2 moléculas de RNA ribossomal (rRNA), 22 moléculas de RNA de transferência (tRNA) e 13 proteínas, que são subunidades dos complexos respiratórios I, III, IV e V, com um papel essencial na fosforilação oxidativa (Peng *et al.*, 2019).

2.1 Cadeia Respiratória

A cadeia respiratória mitocondrial ou cadeia transportadora de elétrons consiste numa seqüenciação de transportadores, representando proteínas integrais com grupos prostéticos localizadas na membrana mitocondrial interna, capazes de catalisar a transferência de elétrons através de uma porção da cadeia, com o intuito de produzir energia sob a forma de ATP (Nelson and Cox, 2008).

É composta por 4 complexos supra-moleculares, compreendendo o complexo I (NADH desidrogenase), o complexo II (sucinato de ubiquinona oxirredutase), o complexo III (citocromo-c oxirredutase) e o complexo IV (citocromo-c oxidase), que completa a sequencia transferindo elétrons do citocromo-c para o O₂, bem como por duas proteínas férricas transportadoras de elétrons, a Coenzima Q e o Citocromo-c (Fig. 1) (Nelson and Cox, 2008).

A fosforilação oxidativa inicia-se com a entrada de elétrons na cadeia respiratória provenientes da ação de desidrogenases que captam os elétrons provenientes das vias catabólicas, cabendo ao NADH e ao FADH₂, a cedência de elétrons ao complexo I e II, respetivamente (Nelson and Cox, 2008).

O complexo I catalisa dois processos simultâneos e obrigatórios, a transferência de um íon hidreto do NADH e um próton da matriz para a ubiquinona, e a transferência de quatro prótons da matriz para o espaço intermembranar, uma reação que direciona prótons da matriz, negativamente carregada pela saída de elétrons, para o espaço intermembranar, positivamente carregado com a chegada de prótons. Uma vez nos complexos I e II, os elétrons são transportados para o complexo III, via coenzima Q ou ubiquinona, que associa a transferência de elétrons do ubiquinol para o citocromo-c. Deste, os elétrons passam para o oxigénio molecular, por intermédio do complexo IV, reduzindo-o a água (Nelson and Cox, 2008).

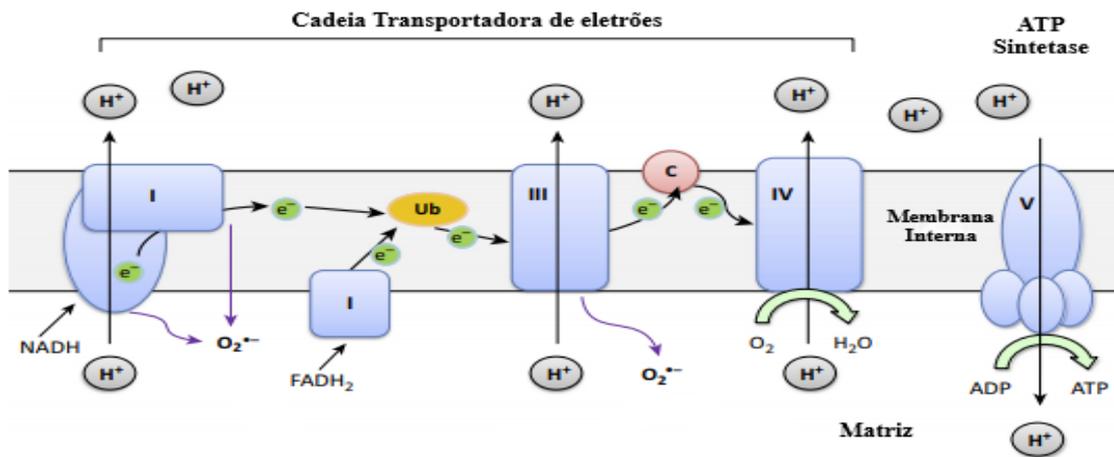


Figura 1 – Cadeia transportadora de elétrons. A cadeia transportadora de elétrons recebe elétrons provenientes do NADH e do FADH₂ que se deslocam, via ubiquinona e citocromo-c, do complexo I até ao complexo IV, onde convertem o oxigénio molecular (O₂) em água. O fluxo de elétrons gera uma força protomotriz ao longo da membrana interna mitocondrial que é utilizada pelo complexo V (ATP sintetase) para converter o ADP em ATP (Adaptado de Yu and Bennett, 2014).

2.2 Sistema Fosforilativo

O sistema fosforilativo compreende o complexo V, ou ATP sintetase, que é uma enzima inserida na membrana mitocondrial interna, responsável pelo último processo na síntese de energia sobre a forma de ATP associado ao transportador e do (Nelson na Cox, 2008).

O fluxo de elétrons ao longo da cadeia respiratória é impulsionado pelo gradiente eletroquímico transmembranar, a força protomotriz, que resulta da diferença de concentração de H⁺ nas duas regiões da membrana, ou $\Delta\mu\text{H}$, e do potencial de membrana ($\Delta\psi$) criado pela diferença de carga dos dois lados da membrana, o primeiro responsável pelo transporte do fosfato inorgânico, e o segundo pelo transporte de ADP/ATP, dois substratos oxidáveis que concedem desta forma a energia necessária ao complexo V para a síntese de ATP (Nelson and Cox, 2008).

2.3 Produção de ROS nas mitocôndrias

A cadeia respiratória é também uma predominante fonte de ROS intracelular, produzida como um sub-produto da transferência de elétrons (Fig. 2). Embora não seja conhecido o local exato onde são produzidas, e o mecanismo pelo qual ocorre não esteja totalmente elucidado, o complexo I e o complexo III são reconhecidos como as principais

fontes de ROS na cadeia respiratória, o primeiro através da flavina mononucleótida reduzida e dos clusters de ferro sulfuros, N-Ia e N-Ib, e o segundo pelo local oxidado do ubiquinol (Peoples *et al.*, 2019).

Os complexos inseridos na cadeia transportadora de elétrons apresentam diferentes comportamentos relativamente à produção de ROS. O complexo IV, por exemplo, retém todos os intermediários parcialmente reduzidos até que a redução total do oxigénio seja alcançada, enquanto que outros complexos libertam elétrons para o oxigénio, reduzindo parcialmente a molécula para formar o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Madamanchi and Runge, 2007).

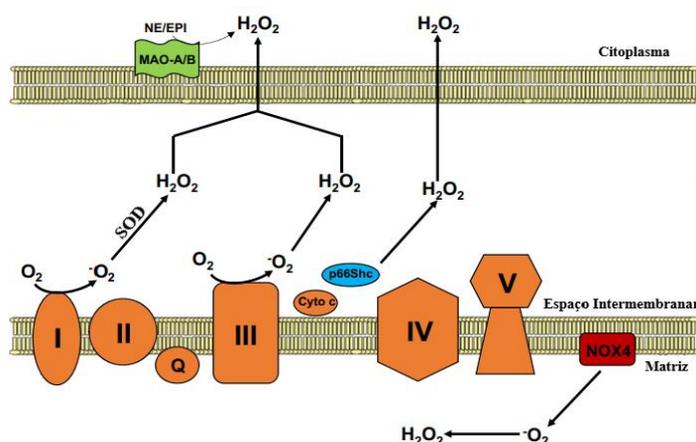


Figura 2 – Formação de ROS mitocondriais. Os complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial formam superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que por ação da SOD forma o peróxido de hidrogénio (H_2O_2). A p66shc, em associação com o citocromo-c participa na sinalização de ROS pela produção de H_2O_2 . A NADPH oxidase 4 (NOX4), na membrana mitocondrial interna, forma $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 na matriz mitocondrial. As isoformas A e B da monoamino oxidases degradam as monoaminas em aldeídos e H_2O_2 na membrana externa mitocondrial (Adaptado de Peoples *et al.*, 2019).

O óxido nítrico (NO) é um potente vasodilatador produzido pela oxidação de um dos átomos terminais de nitrogénio da L-arginina, uma reação catalisada pela óxido nítrico sintetase (NOS). Os níveis de NO biodisponíveis diminuem à medida que reagem com ROS. O NO é convertido noutras espécies reativas de nitrogénio (RNS), no entanto, é devido à predominância de $O_2^{\cdot-}$ que rapidamente reage com o NO para formar o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), um oxidante capaz de nitração irreversível de proteínas, inativação de enzimas, dano no DNA e interrupção da integridade mitocondrial. Outra importante reação entre ROS e NO é a oxidação da tetrahydrobiopterina (BH₄). Na ausência de BH₄, a NOS forma $O_2^{\cdot-}$ em vez de NO, num processo designado por dissociação do NO que é crítico para o stress oxidativo, promovendo a disfunção endotelial (Whaley-Connell *et al.*, 2011).

Para além da cadeia respiratória, várias outras proteínas mitocondriais demonstraram contribuir para a formação de ROS, incluindo a p66shc, representada na figura 1, bem como a monoamino oxidase (MAO), e as NADPH oxidases (Peoples *et al.*, 2019).

A proteína P66shc, é um membro das proteínas adaptadoras citosólicas que se encontra parcialmente localizada no espaço intermembranar (Peoples *et al.*, 2019). Esta proteína forma um complexo molecular com o citocromo-c, o qual subtrai eletrões para catalisar a redução parcial do oxigénio e formar $O_2^{\cdot-}$. A P66shc é um alvo a jusante da p53 e indispensável para o aumento da produção de ROS, libertação do citocromo-c, dissipação do potencial de membrana mitocondrial e apoptose. No entanto, sob condições de estado estacionário, esta proteína não afeta o potencial de membrana transmembranar, indicando a existência de dois estados funcionais distintos: um estado basal inativo e um estado pró-apoptótico ativo. Desta forma, foi demonstrado que a P66shc mitocondrial existe como um complexo de alto peso molecular, o qual inclui a proteína de choque térmico mitocondrial (mtHSP) 70. Após sinais pró-apoptóticos, o complexo P66shc – mtHSP70 é destabilizado e liberta a P66shc monomérica para interagir com o citocromo-c (Madamanchi and Runge, 2007).

As isoformas A e B da MAO, localizadas na membrana externa mitocondrial, são duas importantes fontes de peróxido de hidrogénio nas mitocôndrias, catalisando a degradação oxidativa das monoaminas, epinefrina e norepinefrina, através do cofator FAD, em peróxido de hidrogénio e aldeídos (People *et al.*, 2019).

Por último, as NADPH oxidases, em particular a NOX4, que se localiza na membrana interna mitocondrial, são responsáveis por catalisar a transferência dos eletrões do NADPH para o oxigénio molecular, onde se forma o superóxido e o peróxido de hidrogénio (People *et al.*, 2019).

Cumulativamente, as ROS produzidas pela cadeia respiratória, assim como por fontes enzimáticas, atuam por *feedback* positivo, levando à produção de mais ROS, num processo designado de libertação de ROS induzido por ROS, contribuindo para a falha do sistema mitocondrial (Madamanchi and Runge, 2007).

3. Disfunção mitocondrial

A disfunção mitocondrial desempenha um papel central na patogênese de várias doenças crônicas humanas, da qual se destacam as doenças cardiovasculares. Em condições normais de funcionamento a mitocôndria é responsável pela produção de ATP com as ROS a serem formadas como um subproduto que é rapidamente neutralizado pelos sistemas antioxidantes celulares (Poznyak *et al.*, 2020).

A razão entre a produção de ROS e a eliminação pelo sistema de defesa antioxidante reflete a condição oxidativa da mitocôndria, que é regulada pelo seu estado metabólico, pelo $\Delta\psi$ e pelos complexos da cadeia transportadora de elétrons, enzimas antioxidantes e proteínas dissociadoras, bem como por componentes da fusão, fissão e da autofagia mitocondrial (Wang and Tabas, 2014).

Ao comprometer a função mitocondrial, a respiração celular e a produção de energia são deficitárias e resultam numa extensa produção de ROS que conduzem ao aumento do stress oxidativo e ao desencadear de mecanismos que provocam dano celular e apoptose, componentes importantes na patogênese da aterosclerose associada à doença cardiovascular (Poznyak *et al.*, 2020).

3.1 Desregulação da proteína UCP2

A proteína dissociadora mitocondrial 2 (UCP2), expressa na membrana interna da mitocôndria, é a principal forma de UCP presente na parede vascular responsável pela diminuição da produção de ROS mitocondriais (Wang and Tabas, 2014).

Como consequência do processo aterosclerótico, a sua produção aumenta, em sequência do aumento da produção de ROS, e é regulada positivamente em resposta a uma dieta aterogénica, de forma a manter a normal atividade antioxidante nas mitocôndrias das células vasculares. A UCP2 acumula várias funções, entre elas, a de suprimir a produção de ROS mitocondriais, manutenção da normal função endotelial, promoção de relaxamento vascular, diminuição da ativação do fator de transcrição nuclear kappa-b (NF-kB), regulação do $\Delta\psi$, essencial para a dinâmica mitocondrial, e inibição da expressão de moléculas de adesão pró-inflamatórias nas células endoteliais, fazendo parte da resposta compensatória protetora que mantêm a atividade da SOD2 (Ke *et al.*, 2020; Wang and Tabas, 2014). Desta forma, a sua

disfunção contribui para a falha da capacidade antioxidante e proporciona sobreprodução de ROS mitocondriais numa aterosclerose avançada (Wang and Tabas, 2014).

3.2 Disfunção autofágica

A mitofagia ou autofagia mitocondrial, constitui um sistema de defesa mitocondrial no qual lisossomas sequestram e degradam mitocôndrias disfuncionais, reciclando os seus constituintes para que possam ser novamente utilizados (Wang and Tabas, 2014).

O excesso de ROS promove despolarização mitocondrial e perda do potencial de membrana interna, que desencadeia a ativação da Parkina mediada pela ubiquitina ligase E3. A Parkina, sobre condições de stress oxidativo/nitrosativo excessivo, é passível de modificação e inativação, comprometendo o processo autofágico. Por sua vez, as ROS regulam diretamente a formação de autofagossomas, oxidando e inativando a (ATG4), uma protéase reguladora da autofagia, culminando assim na desregulação mitofágica. Este processo, promotor de disfunção mitocondrial e apoptose celular, é desencadeador da formação de núcleos necróticos e de placas instáveis (Wang and Tabas, 2014).

3.3 Ativação de macrófagos

Os macrófagos são contribuintes fundamentais para o desenvolvimento da placa aterosclerótica, inflamação local e indução de trombose (Fig. 2) (Barret, 2020). Normalmente divididos em macrófagos M1 (classicamente ativados) e M2 (alternativamente ativados), os primeiros aumentam a inflamação, enquanto os segundos diminuem-na e reparam danos nos tecidos. Comparativamente aos macrófagos M1, os M2 apresentam menor captação de colesterol e acumulação de lípidos. Estes macrófagos são alternativamente ativados pelo metabolismo oxidativo mitocondrial, sendo a glicólise a principal fonte de energia dos macrófagos M1 e a fosforilação oxidativa mitocondrial a principal fonte de energia dos macrófagos M2 (Peng *et al.*, 2019).

Durante a progressão da aterosclerose, processo patológico caracterizado por reações inflamatórias crónicas, o número de macrófagos M1 e M2 aumentam e distribuem-se principalmente na região do limbo fibroso (Fig. 2). O macrófago M1 é o principal subtipo de macrófagos em placas humanas instáveis com grande núcleo lipídico, enquanto o M2 é extensivamente encontrado em placas estáveis. A dinâmica de polarização dos macrófagos e

a sua proporção contribuem para a progressão e instabilidade da placa aterosclerótica (Peng *et al.*, 2019).

Os macrófagos contribuem para a manutenção da resposta inflamatória local pela libertação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, e pela produção de ROS e RNS. Além disso, estes interferem com células vasculares do músculo liso, amplificando o ciclo inflamatório com a produção de citocinas pró-inflamatórias adicionais e componentes da matriz extracelular, que promovem a retenção de lipoproteínas. Os macrófagos plaquetários têm uma capacidade migratória diminuída, impedindo a resolução da inflamação e promovendo a progressão de lesões em placas propensas a ruptura. A inflamação persistente leva a apoptose de macrófagos e, na ausência de eferocitose eficiente, leva à acumulação de detritos e células apoptóticas, facilitando a formação do núcleo necrótico na placa aterosclerótica (Barret, 2020).

4. Aterosclerose – Uma doença mitocondrial?

A aterosclerose, principal causa de mortalidade nos países desenvolvidos, é caracterizada pela formação de placas gordurosas nas artérias – os grandes vasos de conduto, que transportam oxigênio e nutrientes vitais para os tecidos. No entanto, pode ocorrer ruptura da placa que obstrui a artéria, resultando em sequelas significativas, como acidentes cardiovasculares e vasculares cerebrais (Yu and Bennett, 2014).

As lesões iniciam-se na túnica íntima e afetam progressivamente toda a artéria, incluindo a túnica média e a adventícia. O passo inicial da lesão precoce ou faixa gordurosa ocorre quando as partículas de LDL saem da circulação sanguínea e entram na íntima arterial, onde se acumulam (Insull, 2009). Uma vez na íntima, os lípidos sofrem modificação oxidativa por enzimas, ROS, e RNS, que promovem disfunção endotelial. Devido à sua reatividade química relativa, o $O_2^{\cdot-}$, ao contrário da sua forma protonada, o radical hidroperoxil (HOO^{\cdot}), é incapaz de oxidar o LDL. No entanto, a pH fisiológico apenas uma porção do $O_2^{\cdot-}$ está presente como $HO_2^{\cdot-}$, sugerindo que o $O_2^{\cdot-}$ atua como precursor de oxidantes mais reativos, tais como o $ONOO^{\cdot-}$, o H_2O_2 e os seus derivados, que atuam assim na modificação oxidativa (Victor *et al.*, 2009).

A expressão de moléculas de adesão endotelial recruta monócitos, onde se formam macrófagos que consomem lípidos para formar células espumosas. Enquanto a eliminação de lípidos oxidados é inicialmente protetora, uma resposta inflamatória é desencadeada, levando

à morte celular e ao desenvolvimento do núcleo necrótico da placa. As células do músculo liso vascular proliferam e/ou migram para a íntima, onde secretam para a matriz extracelular colagénio, fibras elásticas e proteoglicanos, que formam a capa fibrosa protetora (Weber and Noels, 2011).

A capa fibrosa protetora é uma barreira importante que separa o núcleo necrótico altamente trombogénico do sangue circulante. No entanto, a inflamação, enzimas degradantes e a morte celular podem comprometer a capa, levando à rutura da placa. Uma vez exposto o núcleo, forma-se um trombo que pode obstruir o vaso ou embolizar, promovendo complicações isquémicas. O *stress* oxidativo, a apoptose e a inflamação contribuem, dessa forma, significativamente para a aterogénese e podem ser causados por danos e disfunções no mtDNA (Yu and Bennett, 2016).

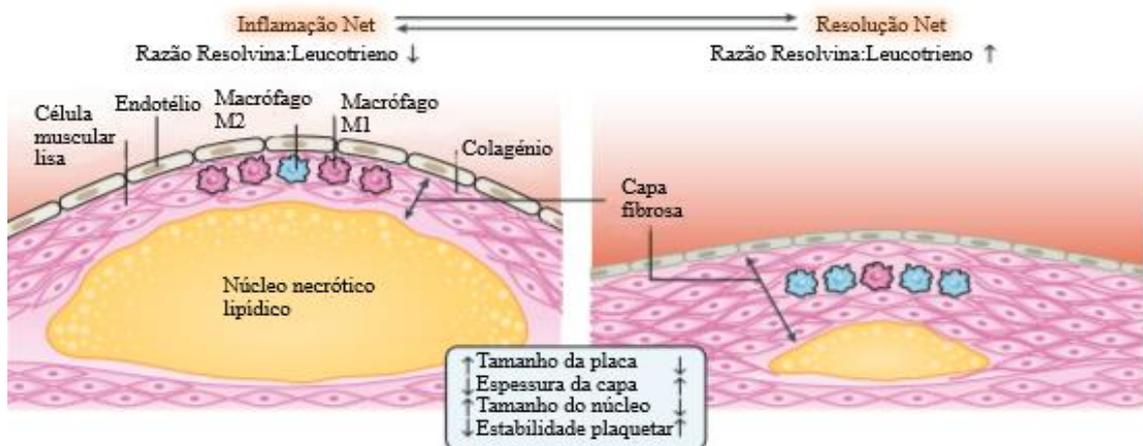


Figura 3 – Placas ateroscleróticas com “Inflamação Net” (esquerda) e a sua resolução (direita). Ambas as placas são caracterizadas por inflamação contínua, em que ambos os processos pró-inflamação e pró-resolução estão ativados, embora em níveis diferentes nas duas placas. A placa com “Inflamação Net”, instável e suscetível a rutura, é grande e possui uma fina capa fibrosa (constituída essencialmente por Macrófagos pró inflamatórios M1, algumas células musculares lisas e colagénio clivado), e um grande núcleo necrótico lipídico. Por outro lado, a placa com “Resolução Net”, estável e não suscetível a rutura, é menor e possui uma capa fibrosa mais espessa (constituída maioritariamente com macrófagos anti-inflamatórios M2, muitas células musculares lisas e colagénio intacto), e um pequeno núcleo necrótico lipídico. Durante o desenvolvimento da placa os processos de inflamação e resolução podem variar, sendo que durante a inflamação o tamanho da placa tende a aumentar e durante a resolução a diminuir (Adaptado de Bäck *et al.*, 2019).

4.1 Inflamação

A inflamação conduz à aterosclerose através de células inflamatórias presentes tanto na placa, como no trombo que se forma após a sua rutura. Cada vez mais reconhecemos que a mitocôndria não só produz ATP e ROS, mas também tem um papel fundamental na resposta imune (Yu and Bennet, 2016).

A resposta imune inata fornece deteção e proteção rápida contra os sinais de perigo. Os recetores de reconhecimento de padrões, incluindo os recetores *Toll-like* (TLRs), detetam uma ampla gama de padrões moleculares associados a patogénicos PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) ou ao dano DAMPs (*damage-associated molecular patterns*). O mtDNA mantém os DAMPs na forma não metilada, para estimular a TLR9, que por sua vez, promove a ativação do NF- κ B e a transcrição de citocinas inflamatórias. A autofagia normalmente degrada os danos da mitocôndria, no entanto, o mtDNA pode evitar este processo e provocar uma resposta inflamatória sistémica, com a sua libertação na circulação (Zhang *et al.*, 2010).

Na ausência do fator de transcrição mitocondrial A, o mtDNA é libertado no citosol, onde se liga ao sensor cíclico de DNA – sintetase cíclica (GMP)-(AMP) (cGAS). O estimulador a jusante da sinalização dos genes interferon é promovido, aumentando a expressão do interferon tipo I e outros genes estimuladores de interferon. A ativação da caspase apoptótica pode atenuar a via de sinalização, demonstrando que a mitocôndria regula as vias que cruzam a morte e a inflamação (West *et al.*, 2015).

A sinalização de interferões não está apenas implicada na resposta protetora antiviral, mas também na aterogénese e na vulnerabilidade da placa. Os interferões tipo I, INF α e INF β , afetam as células musculares lisas vasculares e os macrófagos. O INF α aumenta o TNF relacionado à apoptose induzido por ligando em células T, promovendo a morte das células musculares lisas vasculares. O INF β promove a adesão endotelial de macrófagos e o recrutamento de leucócitos para os locais propensos à aterosclerose. Além disso, o tratamento com INF β demonstrou efeitos *in vivo*, ao aumentar a formação de placa num modelo de murganho de aterosclerose, e, de facto, o aumento da sinalização com IFN tipo I foi confirmado na rutura humana de placas (Goossens *et al.*, 2010).

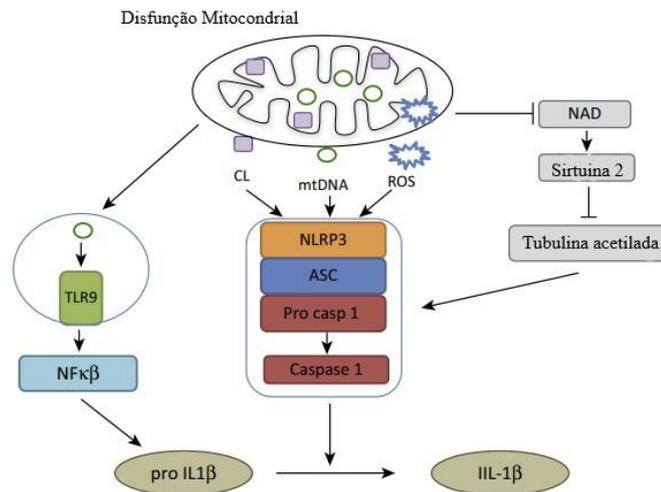


Figura 4 – Mecanismos associados à disfunção mitocondrial e aterosclerose. O inflamassoma NLRP3 é um complexo multiproteico que compreende o NLRP3, a proteína adaptadora (ASC), e a pró-caspase I (pro casp I). Uma vez ativado, a caspase I cliva a pró-interleucina I beta (IL-1β) na sua forma madura. A mitocôndria disfuncional produz ROS, externaliza cardiopilina (CL), e liberta mtDNA, todos estes capazes de ativar O NLRP3. Os níveis diminuídos de NAD/NADH, levam à diminuição da atividade da sirtuina 2 e à acumulação de α -tubulina acetilada, promovendo a co-localização do NLRP3 e da ASC. O mtDNA contém quantidades significativas de DNA não metilado, que ativa a sinalização pelo NF- κ B e aumenta a expressão de citocinas através do recetor *Toll-like* 9 (TLR9) (Adaptado de Yu and Bennett, 2014).

4.1.1 Ativação do Inflamassoma NLRP3

As mitocôndrias regulam citocinas inflamatórias através da alteração da sua expressão, mas também pelo desencadeamento de modificações e ativações pós-tradução. O mtDNA oxidado liga-se e ativa o inflamassoma NLRP3, um complexo multiproteico composto por um sensor (NLRP3), um adaptador (ASC), do inglês *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*, e um efector (caspase I) (Fig. 4). O NLRP3 responde a vários estímulos de perigo, como vírus, toxinas bacterianas e colesterol cristalizado. Uma vez ativado, o NLRP3 e o ASC colocam-se em aglomerados do retículo endoplasmático mitocondrial, no espaço perinuclear. O ASC recruta a caspase I e induz a sua clivagem e ativação. Uma vez ativada, a caspase I cliva a pro-IL1β na sua forma ativa (Swanson *et al.*, 2019) (Yu and Bennett, 2014).

A regulação funcional de um inflamassoma ativo é considerado um processo de dois passos, no qual o sinal 1 inicia a transcrição do inflamassoma e o sinal 2 ativa-o, induzindo a secreção das citocinas inflamatórias IL-1β e IL-18 (Bäck *et al.*, 2019). O primeiro sinal é induzido pelo reconhecimento de vários PAMPs e DAMPs que ativam os recetores de reconhecimento de padrões, os TLR. A ativação do NLRP3 inclui vários sinais, a maioria dos quais não se excluem mutuamente, como o efluxo de iões de potássio ou cloreto, o fluxo de

ções de cálcio, a rutura dos lisossomas, a disfunção mitocondrial ou alterações metabólicas (Swanson *et al.*, 2019).

As mitocôndrias disfuncionais ativam o NLRP3 não só através do mtDNA, mas também pela formação de ROS e cardiopilina. Embora, a cardiopilina seja um lípido da membrana interna mitocondrial, ela localiza-se na membrana externa em mitocôndrias disfuncionais e pode recrutar e ativar o NLRP3. Os níveis de NAD/NADH indicam o estado da energia e dos nutrientes da célula. Na disfunção mitocondrial, os níveis diminuídos de NAD/NADH são detetados por enzimas dependentes de NAD⁺, tal como as desacetilases de sirtuina. A atividade da sirtuina 2 diminui paralelamente ao NAD⁺ e a α -tubulina acumula-se, promovendo a co-localização do NLRP3 com o ASC e, portanto, a ativação do inflamassoma (Misawa *et al.*, 2013).

O NLRP3 é ativado através do dano sobre o mtDNA, ROS, cardiopilina e alterações nos níveis de NAD/NADH. É importante ressaltar que a ativação do inflamassoma NLRP3 e o aumento da IL1 β são promotores da aterosclerose. As mitocôndrias são então reconhecidas como reguladoras da sinalização inflamatória pro-aterogénica, através da modulação da expressão génica e da modificação pós-tradução. Na aterogénese, os agentes promotores de stress metabólico, como ácidos gordos e cristais de colesterol, podem convergir na mitocôndria e combinar-se com o dano no mtDNA para estimular a inflamação e promover o desenvolvimento da placa aterosclerótica (Yu and Bennett, 2016).

4.2 O stress oxidativo e o dano sobre o DNA mitocondrial

O stress oxidativo, em especial as ROS, são uma constante ao longo das diferentes fases da aterosclerose, potenciando modificações proteicas, lipídicas e genéticas, que precedem e se correlacionam com o desenvolvimento da placa, constituindo um importante evento no desenvolvimento da aterosclerose.

Através de modelos *in vivo*, verificou-se que uma diminuição nas enzimas antioxidantes, superóxido dismutase ou glutatona peroxidase, desencadeia o processo aterosclerótico, e, no sentido oposto, a expressão de catalase nos macrófagos tem um efeito protetor, diminuindo a formação de placas. Estas evidências sugerem que as ROS estão presentes e desempenham um papel desencadeante na aterosclerose, sem, no entanto, se conhecer se é necessário um aumento de ROS para mediar os efeitos dos danos no mtDNA (Wang *et al.*, 2014).

Utilizando um modelo de murgancho mutado verificou-se que, na existência de dano no mtDNA, a vulnerabilidade da placa e a aterosclerose estavam presentes, no entanto, não se verificava mudanças nas ROS. Por outro lado, com a utilização de uma sonda de ROS, MitoB, um catião lipofílico especificamente direcionado para o local de ligação do peróxido de hidrogênio à mitocôndria, observou-se que é necessário um dano crônico e extenso sobre o mtDNA para que ocorra aumento das ROS, isto porque ao contrário dos murganchos idosos, os jovens não apresentaram aumento nas ROS (Salin *et al.*, 2017).

Indiscutivelmente, as ROS provocam modificações oxidativas prejudiciais, no entanto, também estão envolvidas em vias de sinalização importantes, como desencadear um padrão de expressão gênica que promove a sobrevivência, pelo que, o seu aumento ocorre na aterosclerose e muito provavelmente contribui para a doença, contudo, pode não ser necessário para que o dano no mtDNA promova aterosclerose (Yu and Bennett, 2016).

4.3 O citocromo-c como regulador apoptótico

As mitocôndrias, como único organelo celular a dispor de citocromo-c sobre condições fisiológicas normais, desempenham um papel de referência na regulação da morte celular programada. O citocromo-c, para além de inserido na cadeia de transporte de elétrons, também é um sinal crítico para a apoptose. Estes sinais internos convergem nos membros pró-apoptóticos da família das BCL-2, as proteínas Bak e Bax, e oligomerizam, possibilitando a permeabilização da membrana externa mitocondrial. Estas proteínas pró-apoptóticas ativam a metaloendopeptidase mitocondrial I (OMA1), uma protéase da membrana interna mitocondrial, que, em conjunto com a permeabilização da membrana externa mitocondrial, permite a libertação do citocromo-c, que por sua vez liga-se ao Apaf-1, levando à ativação da caspase e à execução da apoptose (Iyer *et al.*, 2019) (Fig. 5).

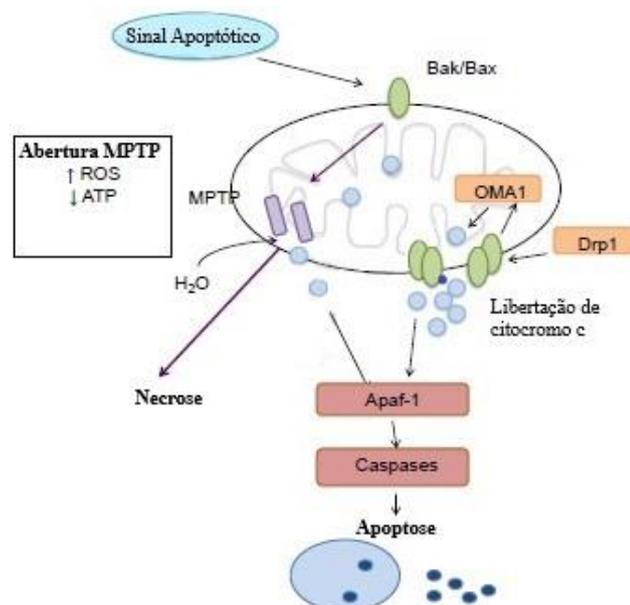


Figura 5 – A regulação mitocondrial da morte celular. Os sinais apoptóticos convergem em bak e bax, e oligomerizam por estimulação da proteína 1 relacionada com a dinâmica mitocondrial (Drp1), permitindo a permeabilização da membrana externa mitocondrial, que, juntamente com a OMA1, promove a liberação de citocromo-c. Este, quando libertado, liga-se ao Apaf-1, ativando as caspases e a execução apoptótica. A abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) amplifica a apoptose, ao permitir a entrada de água e solutos, cuja intumescência é responsável pela rutura e liberação de citocromo-c, podendo ocorrer necrose devido ao colapso da fosforilação oxidativa, sobre condições de depleção de ATP e aumento de ROS, que são responsáveis pela abertura prolongada do MPTP (Adaptado de Yu and Bennett, 2014).

A rede dinâmica mitocondrial, também envolvida na regulação apoptótica, sofre fissão e fusão constante de forma a moldar o número e a massa mitocondrial. A fissão mitocondrial acompanha a permeabilização da membrana externa mitocondrial e a proteína de fissão, proteína 1 relacionada com a dinâmica mitocondrial (Drp1), estimulando a oligomerização do Bax. A sobre-expressão da forma mutada de Drp1 atrasa a oligomerização e, consequentemente, a morte celular. Outro regulador da apoptose é a proteína de fusão de atrofia ótica 1 (Opa1) localizada na membrana interna mitocondrial. Esta proteína regula a forma da crista mitocondrial, e, ao manter junções estreitas, limita a liberação do citocromo-c (Guan *et al.*, 2019).

Por último, a disfunção mitocondrial, responsável pelo aumento das ROS e pela diminuição do potencial de membrana mitocondrial, promove a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP), possibilitando a morte celular apoptótica. Quando o MPTP abre, os iões equilibram-se livremente entre o citoplasma e a matriz mitocondrial, cuja intumescência leva à rutura da sua membrana externa e à liberação de citocromo-c. A duração da sua abertura pode determinar a morte celular, se for breve, pode resultar em

apoptose, a função da cadeia respiratória não é mantida e ocorre necrose (Kwong *et al.*, 2015) (Fig. 5).

Desta forma, as mitocôndrias, por meio do citocromo-c, regulam estreitamente a morte celular e, a interrupção da sua estrutura ou função pode promover a apoptose, levando o mtDNA a impulsionar a formação de placas (Yu and Bennett, 2016).

4.4 Disfunção do metabolismo lipídico

Para além da inflamação e da morte celular programada, a disfunção metabólica mitocondrial, celular e sistêmica, particularmente a disfunção do metabolismo lipídico, são importantes fatores de risco aterosclerótico. Proteínas, hidratos de carbono e lípidos alimentam o ciclo de Krebs, que fornece à cadeia respiratória os substratos necessários para a formação de ATP, tendo as mitocôndrias um papel crítico na coordenação da produção de energia e no metabolismo (Yu and Bennett, 2016).

As mudanças lipídicas que ocorrem na sequência da disfunção mitocondrial, especificamente o dano sobre o mtDNA, são responsáveis pelo aumento da razão AMP/ATP e da respetiva ativação da via de sinalização da proteína Cinase do AMP (AMPK). A ativação da AMPK estimula as vias catabólicas e inibe processos anabólicos, como a síntese de colesterol, ácidos gordos e triglicerídeos, responsáveis por diminuir a adiposidade. Alternativamente, a disfunção mitocondrial promove a libertação do fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21), um fator de crescimento de proteínas que simula a lipólise e após a qual, os lípidos são mobilizados do tecido adiposo para a corrente sanguínea, resultando numa redução da massa gorda e altos níveis de ácidos gordos livres (Kim *et al.*, 2013).

Cumulativamente, a função mitocondrial influencia o transporte celular de colesterol. O efluxo de colesterol dos macrófagos é uma etapa do transporte reverso, em que o colesterol intracelular é devolvido ao fígado para clearance hepática. Os transportadores de cassete de ligação ao ATP, ABCA1 e ABCG1, medeiam o efluxo de colesterol, mas a dependência de ATP submete-os à regulação mitocondrial. De facto, a inibição da ATP sintetase leva à diminuição da capacidade do efluxo de colesterol, enquanto o aumento da respiração mitocondrial potencia-o e reduz a formação de placas ateroscleróticas (Karunakaran *et al.*, 2015). Desta forma, as lesões e disfunções no mtDNA tem múltiplos efeitos no metabolismo lipídico, incluindo a redução do efluxo de colesterol, que potencia o desenvolvimento da aterosclerose (Yu and Bennett, 2016).

5. Prevenção e Terapêutica

As mitocôndrias, tal como temos vindo a analisar, são alvos terapêuticos bastante promissores na aterosclerose e as quais tem sido objeto de vários estudos, com o objetivo de providenciar novas estratégias no combate e na prevenção desta patologia de origem cardiovascular, que cada vez mais se associa com a função e metabolismo mitocondrial.

O bom funcionamento mitocondrial está intrinsecamente relacionado com a capacidade antioxidante da mitocôndria para proteger o seu genoma contra os efeitos nefastos das ROS. Desta forma, diversos antioxidantes estão assim naturalmente presentes na mitocôndria, tal como a superóxido dismutase, na matriz e no espaço intermembranar, que catalisa a conversão do superóxido em peróxido de hidrogénio, e a catalase ou a peróxido desidrogenase, responsáveis pela redução do peróxido de hidrogénio em água (Yu and Bennett, 2016).

Ao nível da replicação do mtDNA, a mitocôndria dispõem de um sistema de correção que atua ao nível da excisão de bases, incompatibilidades, ou da recombinação homóloga, do qual faz parte a helicase *Twinkle*, a DNA polimerase, e a proteína de ligação ao DNA mitocondrial de cadeia simples (Yu *et al.*, 2017).

A *Twinkle*, atua por ligação ao DNA de cadeia dupla promovendo a sua abertura na direção 5`-3`, e é um importante regulador do número de cópias de mtDNA. Recentemente, estudos realizados em murganhos deficientes em apolipoproteína E, com sobre-expressão de *Twinkle*, conclui-se que esta promove a integridade e o número de cópias de mtDNA, bem como melhoria da respiração mitocondrial, aumento da capa fibrosa e diminuição do núcleo necrótico, constituindo assim uma importante estratégia terapêutica para a manutenção e reparação do genoma mitocondrial, assim como da sua própria funcionalidade (Yu *et al.*, 2017).

5.1 Direcionamento de sirtuinas

As sirtuinas (Sirt) são uma família/classe de proteínas com atividade desacetilase dependentes de NAD⁺, constituídas por 7 membros, 3 dos quais (Sirt3, Sirt4 e Sirt5) localizados na mitocôndria. Utilizadas como sensores metabólicos, estas combinam a função metabólica com o suprimento de nutrientes e regulam a biogénese mitocondrial através da desacetilação da Sirt1 e da regulação do PGCI- α (*Peroxisome Proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1 α*) (Miller Jr, 2020).

A Sirt3 regula o metabolismo celular e promove a fosforilação oxidativa pela desacetilação e ativação do complexo I e III (Yu and Bennett, 2016). Ao interagir fisicamente com a superóxido dismutase 2 (SOD2) estimula a atividade desta enzima pela desacetilação de dois resíduos críticos de lisina, funcionando assim como um importante antioxidante, capaz de impulsionar a desintegração de ROS e dessa forma contribuir para a diminuição da vulnerabilidade e desenvolvimento da placa aterosclerótica (Miller Jr, 2020).

5.2 Esculetina

A esculetina é um composto fenólico pertencente à família das Cumarinas utilizado como inibidor da lipoxigenase e recentemente como inibidor do stress oxidativo (Karnewar et al., 2016).

Os compostos alvos da mitocôndria emergem como uma nova classe de fármacos para fisiopatologias onde a disfunção mitocondrial desempenha um papel crítico. Karnewar e colaboradores sintetizaram uma esculetina (6,7-dihidroxicumarina) direcionada para a mitocôndria (Mito-Esc), com o intuito de investigar o efeito do stress oxidativo na morte celular endotelial e da aterosclerose induzida por angiotensina II em murganhos deficientes em apolipoproteína E, concluindo que a Mito-Esc, exceto o tratamento com esculetina natural, inibiu o H₂O₂-, a formação de placas ateroscleróticas pela Angiotensina II, a infiltração de monócitos, e ainda os níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro. O mecanismo envolvido passa pelo aumento da produção de NO via AMPK, mediado pela fosforilação da eNOS e o aumento da biogênese mitocondrial resultante da expressão de Sirt3 através ativação de AMPK (Karnewar et al., 2016).

5.3 MitoQ

Uma ampla gama de antioxidantes podem ser direcionados para a mitocôndria por conjugação com o ião trifenilfosfônio (TPP), como é o caso dos derivados da ubiquinona e do tocoferol. Neste sentido foi desenvolvido o MitoQ, que consiste no catião lipofílico TPP ligado covalentemente à ubiquinona, o qual atravessa rapidamente e extensivamente a membrana interna da mitocôndria, onde é reduzido pelo complexo II da cadeia respiratória no seu componente antioxidante ativo, o ubiquinol (Mercer et al., 2012).

Mercer e colaboradores demonstraram assim que inoculando o MitoQ em murganhos, este é eficaz na diminuição dos níveis de ROS mitocondriais, na reversão dos efeitos deletérios do metabolismo lipídico, assim como na prevenção da síndrome metabólica, tal como a adiposidade, estenose hepática e níveis elevados de colesterol e triglicérides.

Conclusão

Os efeitos nefastos da disfunção mitocondrial, que ocorrem na sequência da produção excessiva de ROS derivadas da cadeia transportadora de eletrões, são preponderantes na fisiopatologia da aterosclerose.

A aterosclerose é uma patologia do foro cardiovascular que se caracteriza genericamente pela obstrução dos vasos sanguíneos que promovem complicações isquémicas. A alta taxa de incidência e a elevada mortalidade desta patologia impulsionam várias investigações no sentido de compreender os mecanismos pelos quais a doença se desenvolve, propaga e qual o papel da disfunção mitocondrial na sequência destes eventos.

Desta forma, o presente trabalho demonstra alguns mecanismos pelos quais a disfunção mitocondrial se correlaciona com o desenvolvimento da aterosclerose, nomeadamente o dano sobre o mtDNA decorrente do stress oxidativo e o seu papel no controlo da inflamação, apoptose e desregulação do metabolismo lipídico que precedem a formação de placas ateroscleróticas e o desenvolvimento de complicações cardiovasculares.

Por último, foram realizadas algumas abordagens preventivas e terapêuticas centradas na mitocôndria, que demonstram ser bastante promissoras, com o intuito de minimizar o impacto da disfunção mitocondrial na aterosclerose e desta forma constituírem uma nova classe de fármacos no combate desta patologia, que aliada a uma contínua investigação por parte da comunidade científica possam contribuir para a descoberta de novos mecanismos subjacentes à doença e desta forma melhorar a qualidade de vida de milhões de pessoas anualmente.

Bibliografia

Ahotupa, M., 2017. Oxidized lipoproteins lipids and atherosclerosis. *Free Radical Research*. 51:4, 439-447.

Bäck, M., Yurdagul, A., Tabas, I., Öörn, K., and Kovanen, P.T., 2019. Inflammation and resolutions in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cardiology*. 16, 389-406.

Barret, T.J., 2020. Macrophages in Atherosclerosis Regression. *American Heart Association*. 40, 20-33.

Förstermann, U., Xia, N., and Li, h., 2017. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation Research*. 120, 713-73.

Goossens, P., Gijbels, M.J., Zemecke, A., Eijgelaar, W., Vergoure, M.N., van der Made, I., Vanderlocht, J., Beckers, L., Buurman, W.A., Daemen, M.J.A.P., Kalinke, U., Weber, C., Lutgens, E., de Winther, M.P.J., 2010. Myeloid Type I Interferon Signaling Promotes Atherosclerosis by Stimulating Macrophage Recruitment to Lesions. *Cell Metabolism*. 12(2), 142-153.

Guan, L., Che, Z., Meng, X., Yu, Y., Li, M., Yu, Z., Shi, H., Yang, D., Yu, M., 2019. MCU Up-regulation contributes to myocardial ischemia-reperfusion injury through calpain/OPA-1-mediated mitochondrial fusion/mitophagy inhibition. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 23(11), 7830-7843.

Insull, W.Jr., 2009. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Response to Medical Treatment. *The American Journal of Medicine*. 122, 3-14.

Iyer, S., Uren, R.T., Kluck, R.M., 2019. Probing BAK and Bax Activation and Pore Assembly with cytochrome c release, Limited Proteolysis, and Oxidant- Induced Linkage. In: Gavathiosis E. (eds) BCL-2 family proteins. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, USA, New York. pp. 201-216.

Karnewar, S., Vasamsetti, S., Gopaju, R., et al., 2016. Mitochondria-targeted esculetin alleviates mitochondrial dysfunction by AMPK-mediated nitric oxide and SIRT3 regulation in endothelial cells: potential implications in atherosclerosis. *Scientific Reports*. DOI: 10.1038/srep24108.

Kattoor, A.J., Pothineni, N.V.K., Palagiri, D., Mehta, J.L., 2017. Oxidative stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*. 19, 42.

- Karunakaran, D., Thrush, A.B. Nguyen, M.A., Richards, L., Geoffrion, M., Singaravelu, R., Ramphos, E., Shangari, P., Ouimet, M., Pezacki, J.P., Moore, K.J., Perisic, L., Maegdefessel, L., Hedin, U., Harper, M.E., Rayner, K.J., 2015. Macrophage Mitochondrial Energy Status Regulates Cholesterol Efflux and is Enhanced by Anti-miR33 in Atherosclerosis. *Circulation Research*. 117, 266-278.
- Ke, Q., Yuan, Q., Qin, N., Shi, C., Luo, J., Fang, Y., Xu, L., Sun, Q., Zen, K., Jiang, L., Zhou, Y., and Yang, J., 2020. UCP2- induced hypoxia promotes lipid accumulation and tubulointerstitial fibrosis during ischemia kidney injury. *Cell Death and Disease*. 11,26.
- Kim, K.H., Jeong, Y.T., Oh, H., S.H., Cho, J.M., Kim, Y.N., Kim, S.S., Kim do, H., Hur, K.Y., Kim, H.K., Ko, T., Han, J., Kim, H.L., Kim, J., Back, S.H., Komatsu, M., Chen, H., Chan, D.C., Konishi, M., Itoh, N., Choi, C.S., Lee, M.S., 2013. Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine. *Nature Medicine*. 19, 83-92.
- Kresanov, P., Ahotupa, M., Vasankari, T., et al., 2013. The associations of oxidized high-density lipoproteins lipids with risk factors for atherosclerosis. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Free Radical Biology and Medicine*. 65, 1284-1290.
- Kwong, J.Q., Molkenin, J.K., 2015. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metabolism*. 21, 206-214.
- Madamanchi, N.R., Runge, M.S., 2007. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation Research*. 100, 460-473.
- Marchio, P., Guerra-Ojeda, S., Vila, J.M., Aldasoro, M., Victor, V.M., and Mauricio, M.D., 2019. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. DOI: 10.1155/2019/8563845.
- Mauricio, M.D., Guerra-Ojeda, S., Marchio, P., Valles, S.L., Aldasoro, M., Escribano-Lopez, I., Herance, J.R., Rocha, M., 2018. Nanoparticles in Medicine: A Focus on Vascular Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. DOI: 10.1155/2018/6231482.
- Mercer, J.R., Yu, E., Figg, N., Cheng, K.K., Prime, T.A., Griffin, J.L., Masoodi, M., Vidal-Puig, A., Murphy, M.P., Bennett, M.R., 2012. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ decreases features of the metabolic syndrome in ATM+/+ / ApoE-/- mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 59, 841-849.
- Miller Jr, F.J., 2020. Hypertension and Mitochondrial Oxidative Stress Revisited: Sirtuin 3, the Improved “Antioxidant”. *Circulation Research*. 126, 453-455.

- Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Lee, H., Zou, J., Saitoh, T., Akira, S., 2013. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nature Immunology*. 14, 544-460.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2008. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. In: Lehninger: Principles of Biochemistry. W.H. Freeman and Company, New York, pp. 707-735.
- Peng, W., Cai, G., Xia, Y., Chen, J., Wu, P., Wang, Z., Li, G., and Wei, D., 2019. Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis. *DNA and Cell Biology*, 597-606.
- Peoples, J.N., Saraf, A., Ghazal, N., Pham, T.T., and Kwong, J.Q., 2019. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Experimental and Molecular Medicine*. 51, 1-13.
- Poznyak, A.V., Ivanova, E.A., Sobenin, I.A., Yet, S.F., and Orekhov, A.N., 2020. The Role of Mitochondria in Cardiovascular Disease. *Biology*. DOI: 10.3390/biology9060137.
- Salin, K., Auer, S.K., Villasevil, E.M., Anderson, G.J., Cairns, A.G., Mullen, W., Hartley, R.C., Metcalfe, N.B., 2017. Using MitoB method to assess levels of reactive oxygen species in ecological studies of oxidative stress. *Scientific Reports*. DOI: 10.1038/srep41228.
- Swanson, K.V., Deng, M., and Ting, J.P., 2019. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology*. 19, 447-489.
- Victor, V.M., Apostolova, N., Herance, R., Hernandez-Mijares, A., and Rocha, M., 2009. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in atherosclerosis: mitochondria – targeted antioxidants as potencial therapy. *Current Medicinal Chemistry*. 16, 4654-4667.
- Whaley-Connell, A., McCullough, P.A., and Sowers, J.R., 2011. The Role of Oxidative Stress in the Metabolic Syndrome. *Reviews in cardiovascular medicine*. 12, 21-29.
- Wang, Y., Wang, G.Z., Rabinovitch, P.S., Tabas, I., 2014. Macrophage mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and nuclear factor-kappaB-mediated inflammation in macrophages. *Circulation Research*. 114, 421-433.
- Weber, C., Noels, H., 2011. Atherosclerosis: Current Pathogenesis and Therapeutic Options. *Nature Medicine*. 17(11), 1410-1422.
- West, A.P., Khoury-Hanold, W., Staron, M., Tal, M.C., Pineda, C.M., Lang, S.M., Bestwick, M., Duguay, B.A., Raimundo, N., MacDuff, D.A., Kaech, S.M., Smiley, J.R., Means, R.E., Iwasaki, A.,

Shadel, G.S., 2015. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature*. 520, 535-557.

World Health Organization – WHO, 2017. Cardiovascular Diseases [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

Yu, E.P.K., and Bennet, M.R., 2014. Mitochondrial DNA damage and atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metabolism*. 25(9), 481-487.

Yu, E.P.K., and Bennett, M.R., 2016. The role of mitochondrial DNA damage in the development of atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 100, 223-230.

Yu, E.P.K., Reinhold, J., Yu, H., Starks, L., Uryga, A.K., Foote, K., Finigan, A., Figg, N., Pung, Y., Logan, A., Murphy, M.P., and Bennett, M., 2017. Mitochondrial respiration is reduced in atherosclerosis, promoting necrotic core formation and reducing relative fibrous cap thickness. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 12, 2322-2332.

Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Surgal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C.J., 2010. Circulating mitochondrial DAMPS cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 464(7285): 104-107.

Curricular Internship Report



Azienda Hospitaliero – Universitario Policlinico Umberto I

January to March of 2020

Name: Marcos Rafael Marinho Pereira

Advisor: Dr. Pietro Matricardi

Acknowledgments

After an amazing experience I have lived in Rome, I want to thank all the people who made this Erasmus + programme unique and unforgettable.

First of all, I want to thank Dr. Ricardo Castro and Dr. Isabel Vitória for all the calls asking me if I was fine and for the support they gave me, and for Dr. Pietro Matricardi and *Sapienza Università di Roma* for accepting me and make this possible.

Second of all I want to thank to all the team of *Farmacia Centrale* for being amazing persons and for all the advises they gave me that helped my adaptation, specially to Mauro and Max for all the wine advices, coffees and the always present laughs.

A special acknowledgment to Elena, an amazing friend that I met who helped me through all the internship and for all the coffees and conversations he had that introduced me to Italian lifestyle.

To my roomies, Alice, Camila, Cesare, Cyntia, Fiorenza, Jacob, Mathilde, Umberto, and Sergio for all the nice dinners, for being like a family and making my time in Rome easier and incredible.

To my Erasmus friends for making this experience unbelievable, for all the trips, dinners, afternoon walks, parties and for all the support they gave me, specially to Zé, Pedro, Carlitos, João, Daniela, Margarida, Sofia, and Bea. A very specially acknowledgment to Tixa for being my partner of all time and for being an amazing friend.

Last but not least, a special acknowledgment for my parents and for my brother, the persons who made all of this possible, for encouraging me to face new adventures and for being a great family.

Abbreviations

SSN	<i>Servizio Sanitario Nazionale</i>
WHO	World Health Organization
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PSN	<i>Piano Sanitario Nazionale</i>
ASL	<i>Azienda Sanitarie Locale</i>
AO	<i>Azienda Ospedaliera</i>
SSRL	<i>Servizio sanitario della Regione Lazio</i>

I. Introduction

Being a pharmaceutical science student allowed me to acquire a variety of skills, knowledge, and abilities that a healthcare professional must have to ensure the safety and health of the population. However, in order to complement my studies and challenge myself, I decided to embrace the opportunity to realise an experience abroad, doing an international hospital internship through Erasmus + Programme. *Sapienza Università di Roma* is one the biggest and most advanced universities in the world as well as Rome, a city full of history and culture that combined made me progress and improved myself, facing difficulties that I could not imagine it would happen like the pandemic we are living now.

This internship report describes my functions as an intern pharmacist at Policlinico Umberto I, the biggest Hospital in Rome. It is divided in two different parts. First, it describes the *Farmacia Centrale* and its several tasks, including the preparation of hospital departments orders and delivery of medicines under medical prescriptions. Second, it describes the *Laboratorio Galenico*, that under responsibility of Dr. Massimiano Moli, is responsible for the production of medicines used in the hospital.

1.1 Hospital Policlinico Umberto I

Located in the center of Rome, region of Lazio, Policlinico Umberto I is the second largest public hospital in Italy and the largest in the city, counting about 1650 beds. The hospital provides a differentiated service in articulation with the Faculty of Pharmacy and Medicine of Sapienza Università di Roma, in which the students can put in practise the knowledge received, doing internships and specializations (Umberto I – Policlinico di Roma). As an important and advanced institution for the Italian healthcare system, its construction started in 1888 in the presence of Re d'Italia Umberto I and the consortium Regina Margherita by two important physicians and politicians, Guido Baccelli and Francesco Durante respectively, and designed by the architect Giulio Podesti. The institution was finished in 1902 and received the first patients in August 1904. After opening, all the professors associated with the university moved to the new university hospital, allowing for free communication, robust exchange of ideas, and

ultimately, a homogeneous curriculum of medical education, transforming the teaching and practise of medicine in Italy (Serarcangeli C., 2006).

1.2 Servizio Sanitario Nazionale

On 23 December 1978 was established the Italian National Health Service, named *Servizio Sanitario Nazionale* (SSN) based on three guiding principles, universality, equity, and solidarity, that makes the right to health accessible to all citizens, without discrimination based on income, gender or age. The SSN have been acknowledge over the years by major international bodies such as World Health Organization (WHO) and the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (Healthcare in European Union).

Concerning its organization, SSN is structured at a national, regional, and local level, allowing a uniform distribution of resources to all regions and serve the purpose of universal coverage. The Ministry of Health in coordination with the government is responsible for defining, according to the strategic lines drawn by the correspondent European and international plans and taking account the proposals from the different Italian regions, the National Health Plan or *Piano Sanitario Nazionale* (PSN), with a duration of three years. This agency ensures the quality of services and controls the distribution of the financial revenue generated by tax revenue for the public healthcare, offering statutory benefits to all national residents. In the regional context, the structures have the autonomy to organize and deliver their own health services with their additional revenue, and to create their own health strategy documents known as regional health plan or *Piano Sanitario Regional*. Lastly, in the local context, there are two types of public health providers: local health units or *Azienda Sanitarie Locali* (ASL) and hospital units or *Azienda Ospedaliere* (AO).

1.3 Servizio sanitario della Regione Lazio (SSRL):

Under the presidency of Nicola Zingaretti since 2013, the SSRL is formed by ten ASL, six of which are in Rome (Roma 1, 2, 3, 4, 5, 6) and one for each other province of Lazio: Latina, Frosinone, Viterbo e Rieti. Regarding to the AO, there are six, all of them headquartered in Rome:

- Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Tor Vergata;
- Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Umberto I;
- Azienda Ospedaliero-Universitaria Sant`Andrea;
- Azienda Ospedaliero San Camillo Forlanini;
- Azienda Ospedaliero San Filippo Neri;
- Azienda Ospedaliero San Giovanni Addolorata.

These entities are autonomous on the organizational, administrative, and technical level, being coordinated by the correspondent ASL which harmonizes the processes in the Lazio region (Regione Lazio).

2. Farmacia Centrale

During the first three weeks of my internship I was at the central pharmacy or *Farmacia Centrale*. It is located inside a yellow building near to the main entrance of the hospital, with the indication “Farmacia”. This unit is responsible for managing orders and delivering medicines under medical prescriptions that could be accomplished inside the hospital by the several departments or outside by other institutions. Regarding the “post recovery”, medicines could be requested by patients themselves or the healthcare person and by nurses or health assistants working in the department that the patient was hospitalized. The therapeutic record or *Prontuario terapeutico* is the book used to figure out if a medicine is class A (reimbursed or *mutuabili*), or class C (not reimbursed). If it is class A the patient does not have to pay, however, if it is class C, it cannot be provided at the hospital pharmacy, and the patient has to go a community pharmacy to buy it.

As a first task, during the first week, I was verifying all the medicines in order to memorize their disposition to streamline the delivering of medicines. On the right side of the pharmacy were the antibiotics (e.g. Enoxaparina 4000 UI), on the left side were the oral anticoagulants (e.g. Apixaban 5 mg), and on the back were the infusion solutions (e.g. sodium chloride). The main area, located in front of the door, had a balcony where the pharmacists and pharmacy technicians attend, and under it was the albumin, one of the medicines more requested. On the shelves in the center of the pharmacy were the other medicines distributed by several corridors, in alphabetic order. Other medicines like expensive medicines and the ones who needs high level of

attention or *Farmaci ad alto livello attenzione*, due to the toxicity, low therapeutic index, and high possibility of interactions (e.g. concentrated solutions of potassium) are kept in a specific shelf, with appropriated conditions that allow their conservation, and locked to avoid potential mistakes.

Outside this area, but in the same building, there are specific rooms for psychotropic drugs, which dispensation needs to be authorized by a pharmacist and be properly registered in a book, divided into three sections, one for the department that need the medicine, one for the pharmacy and the other to administrative use. In the case of medicines that requires special conditions of temperature they are kept in refrigerators whose temperature is highly controlled to ensure there are no variations.

The pharmacy use the informatic system of the hospital, where the different departments can send the request and the pharmacist in charge validates the prescription, checking all the data about the patient and the medicines, such as the active substances, the dosage and the posology, and then the operatives prepare the request that is properly identified with the department code. When it comes to urgent requests, after prepared they are placed in front of the warehouse, near the entrance door. The other requests, also called as expeditions, due to higher quantity of medicines have a specific room to be placed after prepared.

Regarding the medicines acquisition process, each region has a list of medicines for each pathology that appears on the hospital therapeutic record. It is organized from the company that have the best price to the worst, and every hospital from that region must buy the medicines according to the list. When the medicine who is first on the list is sold out, the hospital must buy the second one and the company responsible for producing the first medicine of the list pays the price difference.

3. Laboratorio Galenico

The second department I have been was the galenic laboratory or *laboratorio galenico*. This laboratory, located in *Torre di Ricerva*, is responsible for produce medicines for the several departments of the hospital. Dr. Massimo Poli, the pharmacy technician responsible for the laboratory, who work there for more than twenty years,

is an excellent professional that made a big effort to explain me all the procedures and gave me all the autonomy and sense of responsibility to carry out the preparations.

As a recognise galenic laboratory, it is design to complies the quality standards for good preparation imposed by the Italian and forcibly European pharmacopeias. The laboratory is equipped with four work benches, one of them specifically used for the ointments, two for the other preparations, such as emulsions, solutions, capsules, and another to place the preparations ready to deliver. The substances and excipients are placed under these benches in cabinets, following an alphabetic order. It is necessary to verify all the substances to always ensure a safety stock that guarantees the laboratory productions. When it reaches the safety stock, it is necessary to make a requirement with the products that we need and send it to the central pharmacy that will analyse the request and send us the products.

Regarding the requests for preparation, the several departments that need galenic preparations must elaborate a request and deliver it to the laboratory during the first days of the week. The request, in duplicate, must contain the department code, the date it was created, the signature of the responsible person and what the laboratory has to prepare. We analyse it and prepare it during the week so that on Friday everything is prepared to deliver. A responsible for each department verifies if the preparation is according to the request and sign it.

3.1 Galenic preparations

Zinc oxide ointment, 10% - This ointment was a frequent request that is prepared every week in the laboratory. To a total amount of 100g of preparation it contains 80g of solid Vaseline, 10g of Vaseline oil and 10g of zinc oxide. This preparation, normally with white colour, homogeneous and pasty consistence, is used as protective agent for external use and must be conserved in well closed containers away from sources of hot. It has an expiration date of 6 months after production and requires medical prescription. The preparation method consists in sifting the zinc oxide and, using two spatulas mixing it first with the vaseline oil and then successively incorporate step by step the solid vaseline on it until all the vaseline is incorporated. After production it is

normally divided into 48 containers with approximately 50g each and stored in the laboratory.

Methylene blue, 1% - This solution is a colorant and is very easy to prepare. In 100 ml of solution we use 1g of Methylene blue and enough deionized water to have 100g of solution. The procedure consists only in dissolving the methylene blue in the water. After preparation, the solution must be limpid with an intense blue colour and conserved in a dark glass container away from light or hot sources. It has an expiration date of 1 month after production and requires medical prescription.

Chlorhexidine mouthwash – This solution is an antiseptic for the oral cavity. In 1L we use 5ml of chlorhexidine gluconate 20% (Active principle), 1 ml of menthol 2% (Flavoring), 50g of Sucrose (Sweetener), 10ml of Ethyl alcohol 96° (Alcoholic base), 2 drops of Methylene blue 1% (Colorant) and enough deionized water to have 1000ml of solution. This preparation, that requires medical prescription, must be conserved in a suitable container away from light or hot sources and has an expiration date of 1 month after prepared. The preparation method consists of dissolving sucrose in deionized water, add chlorhexidine and mix it. After mixing, menthol, Methylene blue and the ethanol are added, and then the final volume is completed with deionized water. In the end we control if everything is solubilized and label with “external use” and “do not ingest”.

Salicylic Vaseline 2% - This ointment is used as a keratolytic. One preparation of 100g has 2g of salicylic acid and enough to complete the weight of white vaseline. This preparation, that requires medical prescriptions, has an expiration date of 6 months after prepared and must be conserved in a well close recipient away from hot sources. The preparation method consists of smooth the salicylic acid with a small amount of vaseline oil and mix everything with white solid vaseline to fill 100g. The label should indicate external use and local application.

Aqueous solution of acetic acid 5% - This solution is prepared with 5ml of glacial acetic acid and enough deionized water to complete 100 ml. To prepare it, first we measure the glacial acetic acid under the mobile fume hood and then complete the final volume with deionized water. Used for colposcopy purposes under medical

prescription, this solution has an expiration date of 30 days and must be conserved in a dark glass container away from light and hot sources. As a final control we must verify if the solution is limpid and colourless and label with the indication “external use” and “inflammable liquid and vapor”.

solution of Lugol– This aqueous solution, that request medical prescription, is prepared with 1g of metallic iodine, 2g of potassium iodide and deionized water as needed to fill up to 100 ml. The preparation method is risky, therefore I never did it myself, but I helped in some steps. First, we dissolve the potassium iodide in the minimum amount of water and add the metallic iodine successively with agitation. Lastly, we add the deionized water until we have 100ml. To conserve it we must use a dark glass container and kept away from light and hot sources. As a final step, we must verify if the solution is completely solubilized and if the final volume is correct as well as label the container with the indications “external use”, “poison” and “dangerous for health”. This solution is used for a diagnostic method, the colposcopy, to detect precancerous cervical lesions.

Aqueous solution for Glycerol test – This solution is used, under medical prescription, for diagnosis of Menière`s syndrome. To prepare a total amount of 250g of solution we used 140.5g of glycerine, 0.282g of chloride sodium and 108.96g of deionized water. The preparation method consists of dissolve the chloride sodium previously weighed in deionized water and add, step by step, the glycerine. This solution has an expiration date of 30 days and must be conserved in a dark glass container and kept away from light and hot sources. Finally, we must verify if the solution is completely solubilized and label with the indications “known use” and “for observation”.

Emulsion of zinc oxide in almond oil – To prepare 100g of this emulsion we use 5g of zinc oxide, 10g of solid vaseline, 1g of cetylstearyl alcohol, 5g of deionized water and as much as need of almond oil. Normally we prepared 800g of emulsion, so we must multiply the amount of substances by eight. This emulsion, that request medical prescription, is used as a protective and emollient agent, and has an expiration date of 6 months. The preparation method consists of sift the zinc oxide and dissolve it in a small amount of almond oil. The vaseline is mixed apart with cetylstearyl alcohol and, the rest of the almond oil is heated in mild heat with the deionized water. Lastly,

we mix everything in a capsule until cool down. As a final step we must use a well closed container to conserve it and kept away from hot sources, verifying if the emulsion is white, with homogeneous and semi-solid appearance. The label must have the indication “External use to local application, 2-3 times a day” and “shake before using”.

Sucrose syrup, 24% - This preparation, that request medical prescription, is prepared using 24g of sucrose and as much as need of deionized water to complete 100g of syrup. The preparation method consists of dissolve the sucrose in a sufficient amount of deionized water, using a bath water heath. After mixing, we do a hot filtration and add water to complete the 100g. To conserve it we must use dark glass container well closed, away from light sources and at a temperature not exceeding 15°C. The syrup, used as a sedative, has an expiration date of 1 month and must be labelled with the indication “to hospital”.

Calcium carbonate capsules, 400mg - These capsules are used, under medical prescription, as mineral supplement. The preparation method consists in weight 48g of calcium carbonate needed to prepare 120 capsules N°0, 400mg each, and fill it through an encapsulator. After prepared it has expiration date and normally, we use a paper bag well closed to conserve it with a label indicating “do not use in case of constipation” and kept away from hot sources. As a final control we must verify the mass uniformity to ensure that dose variation is not higher than 10%.

Aqueous solution of pure alcohol 50° - To prepare a total amount of 100ml of this solution we use 42g of pure alcohol 96° and as much as needed to 93.2g of deionized water. To conserve it we used a well closed recipient kept away from flames and sparks. This preparation is used as an antiseptic and requires medical prescription. As final control we must verify the alcohol grade and label the recipient with the indication “easily inflammable”.

3.2 Colposcopy

Colposcopy is as diagnosis test that consists in viewing the female genitalia using a special microscope: the colposcope. The exam lasts for 10 to 15 minutes and use

galenic preparations such as acetic acid 3-5% and the solution of lugol that in contact with the genital mucosa better highlight any lesions (Mitchell *et al.*, 1998).

The glacial acetic acid, in a 3% to 5% dilution, has the aim of highlight areas in which there are a bigger activity of cell division. The conglutination of these cells results in a white colour with variable thickness, in which is possible to identify codified geometric figures that outline a colposcopic lesion. The effect of this dye is obtained within about 15 seconds and it is fleeting, so the evaluation must be quick (Mitchell *et al.*, 1998).

The solution of lugol, in case of trophic mucous membranes, dyes the cervix in a brown colour. The abnormal areas do not capture iodine therefore are classified as iodine negative. This happens because the healthy epithelium, unlike the abnormal one, is rich in glycogen that promote the iodine uptake. The reaction to the dye, as described, concerns only the squamous epithelium or the mucosa that normally covers the outer surface of the cervix (Mitchell *et al.*, 1998).

3.3 Ménière`s syndrome

This syndrome, named in honour of the French doctor Prosper Ménière, is an anomaly of the inner ear that is characterized by vertigo, severe dizziness, tinnitus, fluctuations in hearing and feeling of pressure or pain in the affected ear.

The diagnosis of this syndrome is realized by the glycerol test that involves a baseline audiometric examination and three successive controls, one per hour, three hours after oral glycerol.

Glycerol is in fact an osmotic diuretic, or a substance capable of achieving the elimination of liquids.

4. References:

Mitchell, M.F., Schottenfeld, D., Tortolero-Luna, G., Cantor, S.B., Richards-Kortum, R., 1998. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology*. 91, 626-631.

Umberto I – Policlinico di Roma. Available at: <http://www.policlinicoumberto1.it>. [accessed on 14 April 2020].

Serarcangeli C, (2006). *Il Policlinico Umberto I. Un Secolo di Storia*. 3rd ed. Università La Sapienza, Rome. pp.18-19.

Healthcare in European Union: Strengths of the Italian National Health Service. Available at: <http://www.salute.gove.it>. [accessed on 17 April 2020]

Regione Lazio: Organizzazione e servizi della ASL. Available at: <http://www.regione.lazio.it>. [accessed on 19 April 2020].