



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

LORRANE NERE DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO MIRTENOL NO TRATAMENTO PREVENTIVO DA
CARDIOTOXICIDADE AGUDA INDUZIDA POR DOXORRUBICINA**

São Cristóvão-SE

2023

LORRANE NERE DE LIMA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO MIRTENOL NO TRATAMENTO PREVENTIVO DA
CARDIOTOXICIDADE AGUDA INDUZIDA POR DOXORRUBICINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de Sergipe, para obtenção
do título de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dr^a. Sandra Lauton Santos.
Coorientadora: Msc. Marta Maria Soares de
Freitas Almeida.

São Cristóvão-SE

2023

LORRANE NERE DE LIMA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO MIRTENOL NO TRATAMENTO PREVENTIVO DA
CARDIOTOXICIDADE AGUDA INDUZIDA POR DOXORRUBICINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de Sergipe, para obtenção
do título de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dr^a. Sandra Lauton Santos.
Coorientadora: Msc. Marta Maria Soares de
Freitas Almeida.

Aprovado em: 02/05/2023

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a. Grace Kelly Melo De Almeida

Profa. Dr^a. Luciana Nalone Andrade

 Documento assinado digitalmente
SANDRA LAUTON SANTOS
Data: 10/05/2023 12:08:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dr^a. Sandra Lauton Santos

São Cristóvão-SE

2023

À minha mãe, Maria Nere, por todo suporte e incentivo, e a minha falecida avó, Maria de Jesus, uma mulher forte, batalhadora, humilde e ética, sempre será uma inspiração para mim.

AGRADECIMENTOS

Minha fé em Deus e a esperança por dias melhores me trouxeram até aqui, foi um longo caminho, com muitos acontecimentos, bons e ruins, uma fase para amadurecer, mas até que enfim eu me deparo com a conclusão deste ciclo, sou grata por isso. Agradeço à minha família, por todo apoio e assistência, principalmente nos momentos que mais precisei, também reconheço que sem a assistência recebida pela Universidade Federal de Sergipe (UFS), talvez, eu não estaria concretizando este sonho. Devo meus agradecimentos também a todos que fizeram parte deste projeto de pesquisa e contribuíram com a realização deste TCC, especialmente a Doutoranda Marta Almeida, o PhD. Ricardo Amaral e a Profa. Dr^a Sandra Santos, mas também aos meus colegas Salviano Resende, Laíza Ellen e Joycelaine Neres e a todos que contribuíram indiretamente. Gratidão!

RESUMO

Doxorrubicina (DOX) é um antineoplásico amplamente utilizado por sua eficácia em vários tipos de câncer, no entanto, seu uso é ponderado devido a seu alto potencial cardiotoxico, ocasionado principalmente por estresse oxidativo e inflamação. Desse modo, produtos naturais com propriedades antioxidantes e antiinflamatórias podem ser uma alternativa para o tratamento da cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina, neste sentido, o (-) Mirtenol, um álcool monoterpeneo bicíclico, pode ser um candidato promissor, visto que, tem se destacado em diversos estudos por apresentar justamente essas propriedades. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade do mirtenol no pré-tratamento da cardiotoxicidade aguda induzida por doxorrubicina, através do eletrocardiograma e dos parâmetros de estresse oxidativo. Para isso, ratos wistar machos foram utilizados, sendo submetidos a pré-tratamento durante sete dias consecutivos de acordo com o grupo a que foram alocados, sendo eles, Salina, Controle negativo, Teste 1 (mirtenol 25 mg/Kg), Teste 2 (mirtenol 50 mg/Kg) e Teste 3 (mirtenol 100 mg/Kg), e no 7º dia experimental foi realizada a indução da cardiotoxicidade com doxorrubicina, exceto para o grupo salina. Os resultados deste estudo mostram que o Mirtenol não reduziu a perda de massa corpórea, nem o prolongamento do intervalo QT e nem o QTc, apesar de melhorar o quadro de arritmias. Nos parâmetros de estresse oxidativo, o mirtenol causou redução considerável nos níveis de hidroperóxidos lipídicos nas doses de 25 mg/Kg ($p < 0,01$), 50 mg/Kg ($p < 0,001$) e 100 mg/Kg ($p < 0,05$) e aumentou a atividade da glutathione peroxidase, nas doses de 50 mg/Kg ($p < 0,01$) e 100 mg/Kg ($p < 0,05$), mas sem efeito na atividade da SOD. Diante do exposto, concluímos que o mirtenol não previne a perda de massa corpórea e as alterações eletrocardiográficas provocadas pela Doxorrubicina, mas pode melhorar o quadro de arritmias e de aspectos relacionados à atividade antioxidante, entretanto, mais análises são necessárias para confirmação.

Palavras chave: Doxorrubicina; Cardiotoxicidade; Mirtenol; Eletrocardiograma; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Doxorubicin (DOX) is an antineoplastic widely used for its effectiveness in various types of cancer, however, its use is considered due to its high cardiotoxic potential, mainly caused by oxidative stress and inflammation. Thus, natural products with antioxidant and anti-inflammatory properties can be an alternative for the treatment of cardiotoxicity induced by doxorubicin, in this sense, (-) Mirtenol, a bicyclic monoterpene alcohol, can be a promising candidate, since it has been highlighted in several studies for presenting precisely these properties. Thus, the objective of the present study was to evaluate the activity of myrtenol in the pretreatment of acute cardiotoxicity induced by doxorubicin, through the electrocardiogram and oxidative stress parameters. For this, male Wistar rats were used, being submitted to pre-treatment for seven consecutive days according to the group to which they were allocated, namely, Saline, Negative Control, Test 1 (mirtenol 25 mg/Kg), Test 2 (myrtenol 50 mg/Kg) and Test 3 (myrenol 100 mg/Kg), and on the 7th experimental day, cardiotoxicity was induced with doxorubicin, except for the saline group. The results of this study show that Mirtenol did not reduce the loss of body mass, nor the prolongation of the QT interval, nor the QTc, despite improving the arrhythmias. In oxidative stress parameters, myrtenol caused a considerable reduction in lipid hydroperoxide levels at doses of 25 mg/Kg ($p < 0.01$), 50 mg/Kg ($p < 0.001$) and 100 mg/Kg ($p < 0.05$) and increased glutathione peroxidase activity at doses of 50 mg/Kg ($p < 0.01$) and 100 mg/Kg ($p < 0.05$), but without effect on SOD activity. Given the above, we conclude that myrtenol does not prevent the loss of body mass and electrocardiographic changes caused by Doxorubicin, but it can improve arrhythmias and aspects related to antioxidant activity, however, more analyzes are needed for confirmation.

Keywords: Doxorubicin; Cardiotoxicity; Myrtenol; Electrocardiogram; Oxidative stress.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1 Mirtenol.....	10
2.2 Mecanismos Moleculares da Cardiotoxicidade da Doxorubicina.....	13
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Aspectos Éticos.....	19
4.2 Animais.....	19
4.3 Delineamento Experimental.....	19
4.4 Variação da Massa Corpórea.....	21
4.5 Avaliação Eletrocardiográfica in vivo.....	21
4.6 Ocorrência de Arritmia do Tipo Extrassístole Ventricular.....	21
4.7 Determinação dos parâmetros de estresse oxidativo.....	22
4.7.1 Mensuração de Hidroperóxidos Totais.....	22
4.7.2 Determinação dos Grupamentos Sulfidrilas.....	22
4.7.3 Atividade da Superóxido Dismutase.....	22
4.7.4 Atividade da Glutathione Peroxidase.....	23
4.7.5 Determinação da Concentração Total de Proteína.....	23
4.8 Análise Estatística.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6. CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
ANEXO A - Declaração do CEPA (Comitê de Ética em Pesquisa com Animais).....	39

1. INTRODUÇÃO

O aumento crescente nos casos de câncer é um problema de saúde pública mundial, segundo a OMS, 9,6 milhões de pessoas no mundo morreram de câncer em 2018, que representa a segunda causa de mortes em indivíduos de 30 a 69 anos, a primeira são os problemas cardiovasculares (WHO, 2020; WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020). Apesar dos avanços no tratamento do câncer, várias modalidades de tratamento podem provocar danos ao sistema cardiovascular (HAJJAR *et al.*, 2020). Nesse contexto, a Doxorubicina (DOX), um antineoplásico eficaz no tratamento de tumores sólidos e hematológicos, tem seu uso limitado em razão do seu potencial cardiotoxico dose-dependente, que culmina em cardiomiopatias agudas e crônicas e pode levar a insuficiência cardíaca congestiva grave, sendo esta considerada irreversível (KITAKATA *et al.*, 2022; SCHIRONE *et al.*, 2022).

DOX é uma antraciclina que pertence a classe dos antibióticos citotóxicos, sendo derivado do fungo *Streptomyces peucetius*, a atividade antitumoral desse fármaco é decorrente de sua intercalação ao DNA e da inibição da topoisomerase II, mas o estresse oxidativo, causado pela produção excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs), contribuem com seus efeitos citotóxicos (GOODMAN, 2012; OCTAVIA *et al.*, 2012; MEREDITH; DASS, 2016; SHEIBANI *et al.*, 2022).

Os mecanismos envolvidos na Cardiotoxicidade Induzida por Doxorubicina (CID) não são totalmente compreendidos, múltiplos alvos celulares e vias de sinalização foram relacionados, entretanto, o estresse oxidativo ocupa papel central na sua patogênese, além disso, ocorre também distúrbios do ferro, sobrecarga de cálcio, inflamação e morte celular por apoptose, ferroptose e necrose (MEREDITH; DASS, 2016; OCTAVIA *et al.*, 2012; SHEIBANI *et al.*, 2022). Diversos fatores contribuem com a maior suscetibilidade dos cardiomiócitos à toxicidade de DOX, sendo eles: inibição da topoisomerase II β , presente em cardiomiócitos; quantidades elevadas de mitocôndrias nestas células, um dos principais alvos celulares de DOX; menor quantidade de enzimas antioxidantes e baixa capacidade de regeneração do tecido cardíaco (MENG *et al.*, 2019; SHEIBANI *et al.*, 2022; SCHIRONE *et al.*, 2022; KITAKATA *et al.*, 2022).

Considerando a relevância clínica da doxorubicina, muitos esforços se concentram em buscar alternativas que atenuem sua cardiotoxicidade, como: modificar o esquema de administração para reduzir a dose cumulativa; utilização da formulação lipossomal; utilização de fármacos com potencial cardioprotetor, como o carvedilol, entre outros (HAJJAR *et al.*, 2020; OCTAVIA *et al.*, 2012; SAIDI; ALHARETHI, 2011). Importante ressaltar que há um fármaco que trata esta condição, o Dexrazoxane, entretanto, foi relatado risco de malignidades secundárias associado a seu uso, especificamente em mulheres adultas com cancro de mama metastático (CRUZ; DUARTE-RODRIGUES; CAMPELO, 2016). Em contraste, a busca por produtos naturais com propriedades anticancerígenas, que potencialize os efeitos da doxorubicina ou antioxidantes com potencial cardioprotetor são desejáveis (ABBAS; KANDIL; ABBAS MA, 2020; ZHANG *et al.*, 2020).

Produtos naturais são fontes ricas de fitoquímicos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, a exemplo dos compostos fenólicos, flavonóides, selênio; vitamina E etc., e seu consumo tem sido estimulado como forma de atenuar o estresse oxidativo, que está envolvido com a patogênese de diversas doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, insuficiência cardíaca, hipertensão arterial e arritmia (SENONER; DICHTL, 2019). Além disso, revisões abrangentes demonstram o potencial protetor desses compostos na CID (KOSS-MIKOŁAJCZYK *et al.*, 2021; SHEIBANI *et al.*, 2022).

Ademais, diversas atividades biológicas foram apreciadas em monoterpenos, que são notavelmente reconhecidos pelas suas atividades anticancerígenas, além de possuírem atividade antioxidante, antiinflamatória, antinociceptiva, antimicrobiana, antiarrítmica e hipotensora (KOZIOŁ *et al.*, 2014; ZIELIŃSKA-BŁAJET *et al.*, 2021). Dentre eles, o (-) Mirtenol, um álcool monoterpeno bicíclico, presente na planta *Myrtus communis* L., apresenta atividade antiinflamatória e antioxidante de interesse (SILVA *et al.*, 2014; VIANA *et al.*, 2016), no entanto, há poucos estudos que avaliam seus efeitos no coração. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade do mirtenol no pré-tratamento da cardiotoxicidade aguda induzida por doxorubicina em ratos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mirtenol

Os terpenos são uma classe de metabólitos secundários bastante diversificada, que são estruturalmente classificados pelo número de unidades isoprênicas (C₅H₈); monoterpenos, por exemplo, apresentam duas unidades isoprênicas em sua estrutura química (C₁₀H₁₆). Esses compostos são os principais constituintes dos óleos essenciais, sendo amplamente empregados na indústria farmacêutica, de alimentos, cosméticos e perfumaria, para tanto, torna-se necessária sua ampla caracterização (MOREIRA *et al.*, 2014; MOREIRA *et al.*, 2015; ZIELIŃSKA-BŁAJET *et al.*, 2021; KOZIOL *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014).

O Mirtenol é um constituinte do óleo essencial de diversas espécies de plantas aromáticas, entre elas a *Myrtus communis* L., conhecida como murta. Essa planta é encontrada na região do mediterrâneo e é utilizada na indústria de cosmético e alimentos, que se beneficiam do seu aroma característico, além disso, possui propriedades analgésicas, anti-hiperglicêmicas, antimicóticas e antibacterianas que são atribuídas aos seus principais ativos, sendo eles, mirtenol, linalol e eucaliptol (SACCHETTI *et al.*, 2007; BEJESHKA *et al.*, 2018), apesar disso, as aplicações do mirtenol são limitadas, sendo utilizado apenas como fragrância em cosméticos, produtos de higiene e limpeza, portanto, são necessários estudos que avaliem suas propriedades terapêuticas para aplicação clínica (BHATIA *et al.*, 2008, MOREIRA *et al.*, 2015).

Além de sua ocorrência natural, que acontece pela auto-oxidação do pineno, o mirtenol pode também ser sintetizado, tanto via enzimática como através da biotransformação, por microrganismo ou planta. Entre os produtos obtidos da oxidação do α -pineno encontram-se o mirtenol, verbenol, α -terpineol e pinocarveol, representados na Figura 1 (JUNIOR, 2006; LINDMARK-HENRIKSSON *et al.*, 2003).

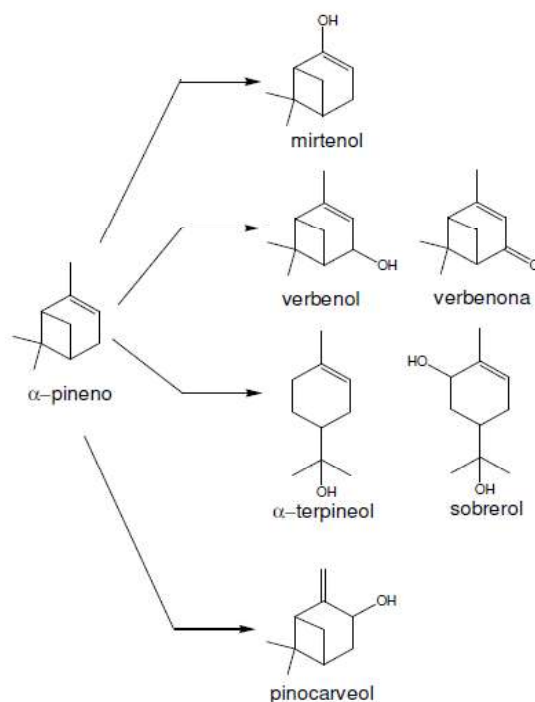


Figura 1. Biotransformação de (1R)-α-pineno por cultura celular de *P. abies*. As estruturas dos compostos obtidos em maiores concentrações estão em destaque (JUNIOR, 2006).

Mirtenol é formado pela oxidação do α-pineno na posição alílica, que dá origem ao grupo hidroxila na molécula (JUNIOR, 2006). É descrito na literatura que a presença de heteroátomo em um composto favorece sua atividade, foi observado que o (+) *cis*-verbenol, que possui a função álcool, apresenta efeitos farmacológicos cardiovasculares mais expressivos do que o próprio α-pineno, o hidrocarboneto correspondente (KOZIOŁ *et al.*, 2014). Em concordância, Andrade *et al.* (2015) demonstraram que o grupamento hidroxila presente no álcool perílico favorece sua citotoxicidade em células tumorais, se comparado ao (-)-perilaldeído, que difere do álcool perílico apenas pelo grupo funcional, sendo este menos citotóxico. Portanto, o desenvolvimento de derivados monoterpênicos com melhorias funcionais na molécula original pode fornecer potenciais agentes terapêuticos (ZIELIŃSKA-BŁAJET *et al.*, 2021).

Estudos *in vivo* avaliaram os efeitos do mirtenol, Gomes *et al.* (2017) demonstraram que o mirtenol reduziu significativamente o edema inflamatório e a incapacitação articular na monoartrite articular induzida por *complete Freud's adjuvant* (CFA). Esse efeito antiedematogênico também foi observado por Silva *et al.* (2014), que investigaram o efeito do mirtenol no edema de pata induzido por carragenina e, subsequentemente, por diferentes agentes flogísticos (induzem

resposta inflamatória local), como o composto 48/80, que ativa a desgranulação de mastócitos; serotonina e histamina; assim como, Prostaglandina E2 (PGE2). O edema induzida por carragenina é caracterizado por duas fases, sendo a primeira mediada pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina; e a segunda, pela produção de prostaglandina e, na sequência, ocorre liberação de citocinas pró-inflamatórias e infiltração celular. Mirtenol reduziu o edema provocado pela carragenina e esse efeito permaneceu por longo prazo, sugerindo que esse monoterpeno age nas duas fases da resposta inflamatória, o que foi confirmado com a redução do edema provocada pelos próprios agentes flogísticos, portanto, pode-se inferir que mirtenol age inibindo a degranulação de mastócitos e dos mediadores inflamatórios como histamina e serotonina, assim como, da PGE2.

Mirtenol confere proteção à mucosa gástrica e esse efeito parece envolver os receptores GABA-A, visto que, flumazenil (um antagonista benzodiazepínico) reverteu parcialmente a diminuição da área de lesão gástrica promovida por mirtenol, em modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol, além disso, tanto a indometacina, um inibidor não seletivo da ciclooxigenase, como L-name, um inibidor da atividade da NO sintase (NOS), eliminaram os efeitos gastroprotetores de mirtenol, mostrando que há participação dessas vias nos seus efeitos (VIANA *et al.*, 2016). Adicionalmente, em ensaios ansiolíticos o mirtenol foi tão eficiente quanto o diazepam, contudo, mirtenol não afetou o desempenho motor dos animais avaliados, diferente do Diazepam (MOREIRA *et al.*, 2014).

Mirtenol mostrou ser capaz de reduzir as alterações patológicas no pulmão de ratos asmáticos, através do aumento das enzimas antioxidantes, redução do estresse oxidativa e inflamação (RAJIZADEH *et al.*, 2019; BEJESHKA *et al.*, 2018). Além disso, preveniu o dano cardíaco após lesão de isquemia-reperfusão miocárdica (BRITTO *et al.*, 2018).

De modo geral, esses efeitos estão associados a atividade antiinflamatória e antioxidante do mirtenol, que atua reduzindo a migração de leucócitos para o foco inflamatório, diminui os níveis de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1 β , e os produtos indiretos da formação de EROs e ERNs, como malondialdeído (MDA) e nitrito, além disso, restaura as enzimas antioxidantes sendo as mais citadas SOD, GPX e catalase (SILVA *et al.*, 2014; VIANA *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2017; BRITTO *et al.*, 2018; MA BEJESHKA *et al.*, 2018; RAJIZADEH *et al.*, 2019).

2.2 Mecanismos Moleculares da Cardiotoxicidade da Doxorubicina

A atividade antitumoral da DOX ocorre através de sua intercalação ao DNA e inibição da topoisomerase II, que é responsável por desfazer a estrutura em espiral do DNA e promover quebras na fita dupla dessa macromolécula, permitindo assim que seja replicada e transcrita, feito isso, a enzima religa as fitas duplas (GOODMAN, 2012; MEREDITH; DASS, 2016). Existem dois subtipos dessa enzima, a topoisomerase II α , superexpressa em células tumorais e a topoisomerase II β , presente em cardiomiócitos, ambas são inibidas, além disso, ocorre a formação do complexo topoisomerase II-DNA-DOX que prejudica o reparo do DNA e impede que a replicação celular aconteça, interrompendo a proliferação celular ou causando a morte celular (SCHIRONE *et al.*, 2022; KITAKATA *et al.*, 2022).

Além disso, DOX medeia a geração de ROS por diversos mecanismos e causa danos a vários componentes celulares, como DNA, mitocôndria, retículo endoplasmático e membrana celular (Figura 2) (SHEIBANI *et al.*, 2022).

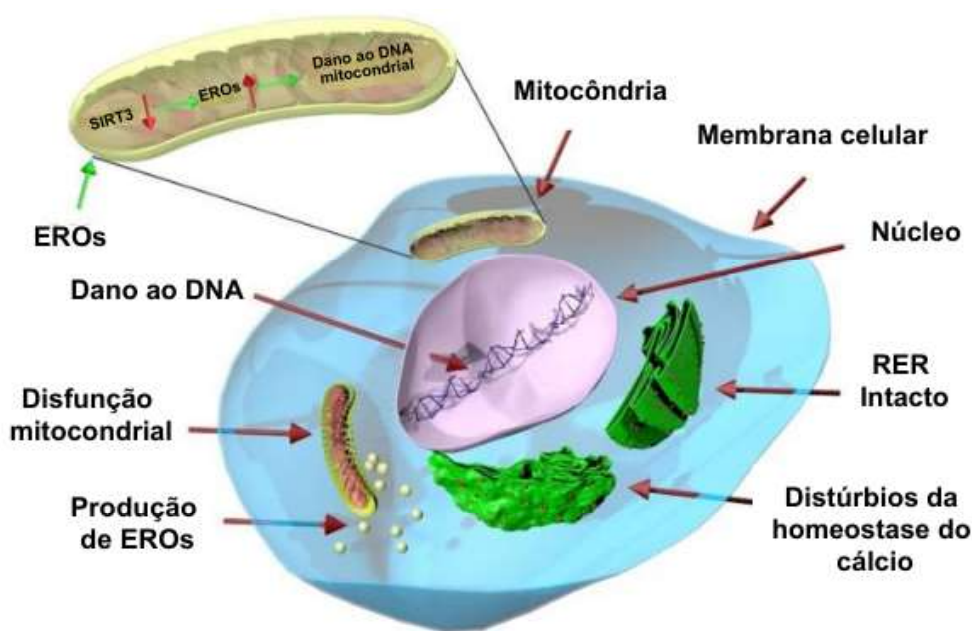


Figura 2. Distúrbios da homeostase do Ca^{2+} e disfunção mitocondrial após administração de DOX. DOX pode induzir defeitos na função mitocondrial; como resultado, pode ocorrer elevação na produção de EROs das mitocôndrias. Por outro lado, devido ao comprometimento da estrutura do retículo endoplasmático, pode ocorrer aumento da liberação de Ca^{2+} . Além disso, a produção de EROs pode aumentar após a elevação da liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático. O dano mitocondrial induzido por DOX pode iniciar a supressão da expressão de SIRT3. A atenuação da concentração de SIRT3 na mitocôndria pode levar à superprodução de EROs, bem como à exacerbação da disfunção mitocondrial, destruição do mtDNA, lesão celular e insuficiência cardíaca. Doxorubicina (DOX); Espécies Reativas de Oxigênio (EROs); Retículo Endoplasmático Rugoso (RER); DNA mitocondrial (mtDNA); Sirtuína 3 (SIRT3) (SHEIBANI *et al.*, 2022)

A redução catalítica de DOX pelas enzimas citocromo P450 redutase, Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e NADPH oxidase são responsáveis formar o radical DOX-semiquinona, que é capaz de desencadear reações redox com o oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil ($\cdot OH$), respectivamente (MEREDITH; DASS, 2016; OCTAVIA *et al.*, 2012; SEGREDO, 2017). Reações de Fenton que são catalisadas por metais, sendo o principal o ferro, também formam esses radicais (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Ademais, DOX pode formar os complexos $DOX-Fe^{3+}$ e sua forma reduzida $DOX-Fe^{2+}$ e participar de reações de Fenton. Considerando que apenas uma pequena parte do ferro encontra-se livre na célula, DOX sequestra o ferro ligado a proteínas, como a ferritina (TADOKORO *et al.*, 2020). Ainda, é descrito que seu metabólito, o Doxorrubicinol, pode interagir com o grupo tiol da aconitase citoplasmática/IRP-1, uma proteína reguladora do ferro, como consequência, aumenta a estabilização do mRNA da transferrina e impede a tradução de proteínas sequestradoras de ferro, isso levaria ao aumento do ferro livre, tornando-o disponível à DOX (OCTAVIA *et al.*, 2012).

DNA, proteínas e lipídios são afetados pela produção de EROs, que causa danos a suas estruturas (ZHANG *et al.*, 2020). A membrana celular é constituída em sua maior parte por lipídios e são suscetíveis a oxidação pelas EROS, principalmente os ácidos graxos poliinsaturados, esse evento é conhecido como peroxidação lipídica, que é bastante lesiva a célula, uma vez que, a membrana desempenha importantes funções para a homeostase celular. A peroxidação lipídica é iniciada pelo ataque das EROs aos lipídios e podem gerar radicais altamente reativos, como alcóxila ($LO\cdot$) e peróxila ($LOO\cdot$), que se perpetuam através de reações redox, oxidando mais lipídios e assim aumentando a produção de radicais livres. As reações de Fenton contribuem com esse processo ao converter os hidroperóxidos lipídicos ($LOOH$), que são produtos primários da peroxidação lipídica, nesses radicais (MIYAMOTO, 2005; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A peroxidação lipídica na membrana mitocondrial, principalmente pelo complexo $DOX-Fe^{2+}$, somado a regulação negativa da glutathione peroxidase (GPX), desencadeia a morte celular por ferroptose dependente de mitocôndria em cardiomiócitos (TADOKORO *et al.*, 2020). A GPX é uma importante enzima antioxidante que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e os

peróxidos orgânicos nos álcoois correspondentes, através da conversão da glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG) e protege a célula contra os danos provocados pela peroxidação lipídica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Um desequilíbrio entre a formação de EROs e a capacidade de neutralizá-los causa danos irreparáveis às células e consequentemente desencadeia apoptose (SHEIBANI *et al.*, 2022). A apoptose na CID é reflexo da ativação das vias intrínseca e extrínseca (OCTAVIA *et al.*, 2012). A via extrínseca é ativada por receptores de morte pró-apoptótica na membrana celular, que tem como ligantes extracelulares o ligante Fas (FasL), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), que levam a ativação da caspase 8 e subsequente ativação das caspases executoras, são elas as caspases 3, 6 e 7. Possivelmente, DOX ativa essa via pela regulação de Fas como também através de TNF- α (MEREDITH; DASS, 2016; OCTAVIA *et al.*, 2012).

Já a via intrínseca, que é dependente de mitocôndria, pode ser ativada em resposta ao estresse oxidativo e o dano ao DNA, entre outros estímulos; nesta via, há o aumento de proteínas da família Bcl-2, que são mediadores de apoptose. O aumento de BAX (pró-apoptótica) e diminuição Bcl-2 (anti-apoptótica) desencadeia a apoptose. Cardomonina, um flavonóide encontrado na *Alpinia katsumadai* e *Ginkgo biloba*, atenua a apoptose e a inflamação na CID ao aumentar as defesas antioxidantes, por meio do aumento da expressão de Fator nuclear eritróide 2 (Nrf2), decorrente da inibição de Keap1, um repressor de Nrf2 (QI *et al.*, 2020).

O Nrf2 é um fator de transcrição que estimula a produção das enzimas antioxidantes Superóxido dismutase (SOD), GPx, Catalase, Heme oxigenase 1 (HO1) etc, tornando-se um alvo promissor para o tratamento da CID (QI *et al.*, 2020). A regulação positiva da sinalização PI3k/Akt surte efeito anti apoptótico ao atuar em Nrf2 (KITAKATA *et al.*, 2022). Foi demonstrado que FNDC5/irisina, uma miocina que tem sua produção estimulada pelo exercício físico, diminui ROS e a apoptose dos cardiomiócitos ao impedir a degradação do Nrf2, via sinalização AKT/GSK3 β /FYN/Nrf2. A AKT reduz o estresse oxidativo ao desativar a glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β), que promove a exportação e degradação de Nrf2 por meio de translocação nuclear FYN, além disso, foi demonstrado que a regulação da via AKT foi dependente da expressão de proteínas de choque térmico como as HSP20, que foi aumentada por FNDC5/irisina (ZHANG *et al.*, 2019).

Outras vias de sinalização estão envolvidas com a CID. Geneposídio, um

glicosídeo iridóide, reduz o dano miocárdico e melhora a função cardíaca ao regular positivamente a via da Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina (AMPK), uma proteína quinase envolvida no metabolismo energético (MENG *et al.*, 2019). As sirtuínas são enzimas que promovem a desacetilação de histonas e são diminuídas na CID, foi demonstrado que a ativação da SIRT1 aumenta a expressão de Nrf2 e provoca a desacetilação de p53, impedindo a apoptose (Hu *et al.*, 2020).

O estresse oxidativo também inicia a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que é responsável por mecanismo de proliferação, diferenciação e morte celular, e possui ramificações como as cascatas p38 que induz aumento de BAX e p53 e reduz BCL-2; além das cascatas JNK e ERK, que induz apoptose e regula a expressão de NF- κ B, responsável pela produção de citocinas pró inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (SENONER; DICHTL, 2019; KITAKATA *et al.*, 2022; SHEIBANI *et al.*, 2022). De certo, foi demonstrado que DOX ativa a via MAPK e as cascatas mencionadas, no entanto, a Dietil Blechnic, um composto isolado da *Salvia miltiorrhiza* Bunge, exerceu efeitos antiapoptóticos através da ativação de JNK, opondo-se ao efeito apoptótico mediado pela ativação da mesma cascata por DOX. Esses achados, indicam que ativação de JNK possui ações duplas (YU *et al.*, 2018).

Na CID, as mitocôndrias não só são afetadas pelas ROS como também intensificam sua produção, tanto pelo acúmulo de ferro intracelular, liberação de citocromo C e cálcio, que consequentemente levam a apoptose ou ferroptose (SCHIRONE *et al.*, 2022; KITAKATA *et al.*, 2022; SHEIBANI *et al.*, 2022). É descrito que algumas proteínas que participam do sistema glicolítico e cadeia transportadora de elétrons são oxidadas na CID tendo seu funcionamento prejudicado, além disso, as mitocôndrias são afetadas pelos efeitos deletérios da formação do complexo TopII β -DOX-DNA, que causam danos a biogênese mitocondrial (SCHIRONE *et al.*, 2022; SHEIBANI *et al.*, 2022).

A cardiolipina é um fosfolípido de membrana interna mitocondrial que exerce função imprescindível ao bom funcionamento da fosforilação oxidativa, pois estabiliza os complexos que participam da cadeia transportadora de elétrons (SHEN; YANG, 2010). A desestruturação da membrana interna mitocondrial devido à ligação irreversível de DOX a cardiolipina prejudica a ancoragem do citocromo C, que por sua vez, desencadeia reações de radical livre, por conseguinte, o acúmulo de DOX também pode causar à abertura do poro de transição de permeabilidade

mitocondrial (mPTP) de alta condutância, liberando Ca^{2+} mitocondrial e citocromo C (SCHIRONE *et al.*, 2022).

Ademais, a sobrecarga de cálcio também ocorre na CID em virtude da desregulação dos mecanismos que controlam o cálcio intracelular. No sarcolema, ocorre ativação dos canais de cálcio tipo L, que promovem a entrada de cálcio do meio extracelular para o meio intracelular, e inibição do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), responsável pela remoção deste íon da célula; já no retículo sarcoplasmático, ocorre ativação dos canais de Rianodina (RyR), responsáveis por liberar o cálcio do retículo sarcoplasmático durante o processo de acoplamento excitação-contração, como também, inibição da bomba de Ca^{2+} ATPase sarcoplasmática, que faz reintrodução do cálcio para o retículo sarcoplasmático (ALMEIDA., 2019; OCTAVIA *et al.*, 2012). Isso ocorre em decorrência da suscetibilidade destes canais e bombas à modificações redox induzidas pelas EROs, principalmente da bomba de Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático e canais de RyR, além disso, este possui vários sítios de ligação para DOX na sua estrutura tetramérica, que pode estimular seu estado aberto e prejudicar sua regulação (ALMEIDA., 2019; SENONER; DICHTL, 2019; OCTAVIA *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a atividade do mirtenol no pré-tratamento da cardiotoxicidade aguda induzida por doxorrubicina em ratos.

3.2 Objetivos Específicos:

Investigar o efeito do mirtenol nos parâmetros eletrocardiográficos em animais com cardiotoxicidade aguda induzida por doxorrubicina.

Investigar a atividade do mirtenol nos parâmetros de estresse oxidativo em animais com cardiotoxicidade aguda induzida por doxorrubicina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Os experimentos foram realizados obedecendo-se às orientações do Conselho Nacional de Controle Experimentação Animal - CONCEA (Resolução Normativa nº 12, 20/09/2013) e aprovados pelo Comitê de Ética para Pesquisa com Animais – CEPA/UFS com protocolo nº 2289220322 (Anexo A).

4.2 Animais

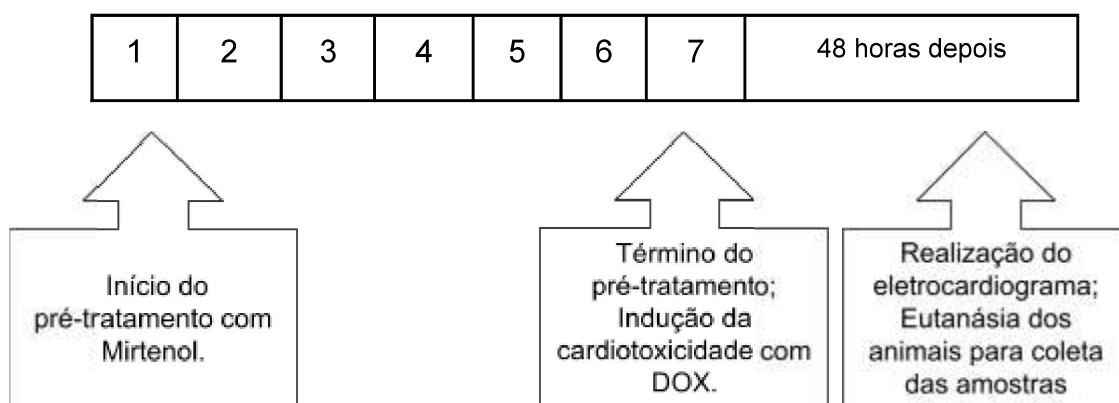
Para avaliação do efeito cardioprotetor do mirtenol foram utilizados 25 ratos Wistar machos saudáveis, pesando entre 350 g e 450 g, adquiridos do Biotério Setorial da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e mantidos no Biotério do Laboratório de Biologia Celular e Estresse Oxidativo da Universidade Federal de Sergipe (LABCEO/UFS). Os animais foram mantidos dentro de caixas de polipropileno (48,7 cm de comprimento, 33,1 de largura e 21,4 cm de altura) com grades metálicas apropriadas, em pequenos grupos de 5 ratos. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água, e foram submetidos a ciclos claro/escuro de 12/12 horas, em temperatura controlada ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$). O número de animais utilizados foi reduzido ao mínimo cientificamente aceitável. A dor e o sofrimento dos animais no decorrer dos ensaios foram minimizados de acordo com os princípios éticos de animal da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Após a realização dos experimentos, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), por via i.p., e eutanasiados por decapitação com o uso de guilhotina, para excisão do coração e coleta do sangue (para obtenção do soro), que foram utilizados nas análises.

4.3 Delineamento Experimental

Os animais foram divididos em cinco grupos de cinco animais ($n=5$), de acordo com o pré-tratamento que foram submetidos: Grupo salina (veículo), Grupo Dox, Grupo teste 1 (mirtenol 25 mg/Kg), Grupo teste 2 (mirtenol 50 mg/Kg) e Grupo teste 3 (mirtenol 100 mg/Kg). A administração do pré-tratamento foi realizada por gavagem via oral (v.o.), uma vez por dia, durante 7 dias consecutivos (Figura 3). A diluição do Mirtenol foi realizada usando soro fisiológico 0,9% e dimetilsulfóxido

(DMSO) 5%. A indução da cardiotoxicidade aguda foi realizada no 7º dia de pré-tratamento através do método descrito por Hadi *et al.* (2012); usando dose única de DOX 20 mg/kg intraperitoneal (i.p.) no grupo controle negativo e grupos teste 1, 2 e 3; o grupo salina recebeu uma única injeção (i.p.) do mesmo veículo (soro fisiológico 0,9%) utilizada para DOX. Quarenta e oito horas após indução da cardiotoxicidade os ratos foram eutanasiados para excisão do coração e coleta do sangue que foram utilizadas nas análises.

Figura 3. Fluxograma do delineamento experimental



Fonte: própria.

Abaixo é mostrada a descrição geral dos grupos experimentais utilizados neste estudo.

Tabela 1. Descrição geral dos grupos experimentais

GRUPO	PRÉ-TRATAMENTO	INDUÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE
Salina	Soro fisiológico 0,9% + DMSO 5% (v.o.)	Não (Soro fisiológico 0,9%, i.p.)
DOX	Soro fisiológico 0,9% + DMSO 5% (v.o.)	Sim (Soro fisiológico 0,9%, i.p.)
Teste 1	Mirtenol 25 mg/Kg (v.o.)	Sim (Soro fisiológico 0,9%, i.p.)
Teste 2	Mirtenol 50 mg/Kg (v.o.)	Sim (Soro fisiológico 0,9%, i.p.)
Teste 3	Mirtenol 100 mg/Kg (v.o.)	Sim (Soro fisiológico 0,9%, i.p.)

Fonte: própria.

4.4 Variação da Massa Corpórea

Os animais foram pesados durante todos os dias do pré-tratamento (1º ao 7º dia experimental) e 48 horas depois da indução da cardiotoxicidade (9º dia experimental). Foi realizada a diferença de massa corpórea do dia 9 subtraído pela massa corpórea do dia 7, para avaliar a perda de massa corpórea depois da indução da cardiotoxicidade. O resultado foi expresso como Δ massa corpórea (g) .

4.5 Avaliação Eletrocardiográfica *in vivo*

Após quarenta e oito horas da administração da DOX 20 mg/Kg, os ratos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p.), para posterior análise eletrocardiográfica. Eletrodos adaptados foram fixados na pele dos quatro membros dos animais e conectados a um eletrocardiógrafo, modelo (*INcardio Duo da Inpulse Animal Health*). Os sinais do ECG foram visualizados e analisados em um tablet equipado com um *software INcardio Duo*.

As seguintes variáveis dos ECGs foram analisadas por computador:

- (a) Duração do intervalo PRi: representa a despolarização atrial;
- (b) Duração do intervalo RR: consiste no intervalo de tempo entre 2 complexos QRS.
- (c) Duração do complexo QRS: compreende a despolarização ventricular;
- (d) Duração do intervalo QTc: corrigido segundo a equação de Bazett [$iQTc = iQT/\sqrt{(iRR)}$]: representa a repolarização ventricular conforme a frequência cardíaca;
- (e) Duração do intervalo QT: representa a repolarização ventricular;
- (f) FC: consiste da velocidade do ciclo cardíaco medida pelo número de contrações do coração por minuto (Wang *et al.*, 2007).

4.6 Ocorrência de Arritmia do Tipo Extrassístole Ventricular

As arritmias cardíacas foram definidas como a presença de Extrassístole Ventricular (ESV) na representação gráfica do eletrocardiograma *in vivo*. Para obter uma medida de intensidade de arritmias a quantidade de ESVs foram contabilizadas arbitrariamente durante 2 minutos, quanto maior a quantidade de ESVs maior a intensidade das arritmias (BERNAUER; ERNENPUTSCH, 1988).

4.7 Determinação dos parâmetros de estresse oxidativo

4.7.1 Mensuração de Hidroperóxidos Totais

Os corações foram homogeneizados em PBS e centrifugados (*Heal Force, Neofuge 15R*) a 14.000 x g por 30 minutos a 4°C. Em eppendorfs foram colocados 100µL do sobrenadante e 900 µL do reagente de FOX, composto por xilenol orange 0,25 mmol/L, sulfato ferroso amoniacal $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)2.6\text{H}_2\text{O}]$ 0,25 mmol/L, hidroxitolueno butilado (BHT) 4,4 mmol/L, metanol (CH_4O) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) 97%. Após 30 minutos, foram centrifugados a 14.000 x g por 5 minutos a 24°C. Em uma microplaca de 96 poços foram pipetados 200 µL dos sobrenadantes para a leitura de absorbância em leitor de placa (ELx800, BIOTEK *Instruments*®) a 570 nm. A quantificação dos hidroperóxidos totais foi expressa em µmol/L, utilizando o coeficiente de extinção molar $4,3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (JIANG, HUNT; WOLFF, 1992).

4.7.2 Determinação dos Grupamentos Sulfidrilas

Os corações foram homogeneizados em PBS e centrifugados (*Heal Force, Neofuge 15R*) a 14.000 x g por 30 minutos a 4°C. Em microplaca de 96 poços foram colocados 200 µL de solução PBS-EDTA pH 7,5 (EDTA 1 mM) e 10 µL dos sobrenadantes foi realizada a primeira leitura a 412 nm em leitor de placa (ELx800, BIOTEK *Instruments*®), em seguida, foi adicionado 0,4µL de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB 3 mmol/L). Após 30 minutos, foi realizada a segunda leitura da absorbância a 412 nm. A concentração total de grupamentos sulfidrilas foi expressa em nmol por miligramas de proteína (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

4.7.3 Atividade da Superóxido Dismutase

Os corações foram homogeneizados em PBS e centrifugados (*Heal Force, Neofuge 15R*) a 14.000 x g por 30 minutos a 4°C. A reação foi realizada pipetando em microplaca de 96 poços: 30 µL dos sobrenadantes, 100 µL de PBS, 6 µL de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT 1,25 mmol/L) e 15 µL de pirogallol (100 µmol/L). A microplaca foi agitada por 5 minutos, e logo após foi acrescentado 150 µL de sulfóxido de dimetilo (DMSO). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa (ELx800, BIOTEK *Instruments*®) a 570 nm. A atividade

da SOD foi expressa como unidade de SOD por microgramas de proteína (MADESH; BALASUBRAMANIAN, 1998).

4.7.4 Atividade da Glutathione Peroxidase

Os corações foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio (50 mmol/L, pH 7,4), acrescido de cloreto de potássio (KCl, 140 mmol/L). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados (*Heal Force, Neofuge 15R*) a 14.000 x g por 30 minutos a 4°C. Em microplaca de 96 poços foram pipetados: 8,4 µL dos sobrenadantes, 580 µL de tampão fosfato de sódio (100 mmol/L, pH 7,0), 10 µL de NADPH (8,4 µmol/L), 10 µL de GR (10 U/mg de proteína/mL), 10 µL de azida sódica (NaN₃, 1,125 mol/L), 10 µL de GSH (0,15 mmol/L) e 250 µL de H₂O₂ (2,2 mmol/L). O monitoramento foi realizado a 340 nm, 25°C, por 8 minutos em espectrofotômetro de placa (ELx800, BIOTEK *Instruments*®). A atividade da GPx foi avaliada pela oxidação do NADPH, e os resultados expressos em nanomol/NADPH/minuto/microgramas de proteínas (PAGLIA; VALENTINE, 1967).

4.7.5 Determinação da Concentração Total de Proteína

O tecido cardíaco foi homogeneizado em PBS e centrifugado (*Heal Force, Neofuge 15R*) a 14.000 x g por 30 minutos a 4°C. Preparou-se a solução de albumina: diluição de 10 mg de albumina em 1 mL de H₂O miliq, em seguida foram preparados padrões (P1 a P8), adicionou-se 150 µL água miliq em cada tubo e em seguida executou-se diluição seriada. Distribuiu-se as soluções em placa. Ao sobrenadante foi pipetado hidróxido de sódio (NaOH, 0,5 mol/L) e depois de 15 minutos foi adicionado carbonato de sódio (Na₂CO₃, 2%), sulfato de cobre (CuSO₄, 1%) e tartarato de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆.4H₂O, 2%) (100:1:1). Posteriormente, pipetou-se 20 µL de solução de Folin, sendo realizada a leitura em espectrofotômetro de placa (EI x 800, BIOTEK *Instruments*®), a 630 nm, depois de 30 minutos da reação, cuja curva padrão de albumina bovina foi construída para comparação (LOWRY *et al.*, 1951).

4.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*, através do programa *GraphPad Prism* versão 8.0. Os dados são apresentados como

média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), considerando cinco animais em quatro dos grupos e quatro animais em um dos grupos (n=4-5). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A falta de especificidade dos antineoplásicos às células tumorais consistem na maior barreira do tratamento quimioterápico, pois o mesmo é responsável pela toxicidade de vários órgãos (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012). Apesar do coração ser o órgão mais afetado pela toxicidade da DOX, este antineoplásico afeta também os rins, fígado e cérebro, além de provocar vômitos, náuseas, diarreia e perda de massa corporal (ZHANG *et al.*, 2020; MEREDITH; DASS, 2016; MELO; OLIVEIRA, 2012).

Para tanto, o efeito do Mirtenol na massa corporal de ratos que receberam DOX foram avaliados (Figura 4). Perda de massa corporal estatisticamente significativa ocorreu no grupo DOX ($p < 0,01$) e grupos tratados Mirtenol 25 mg/Kg ($p < 0,01$) e Mirtenol de 50 e 100 mg/Kg ($p < 0,05$).

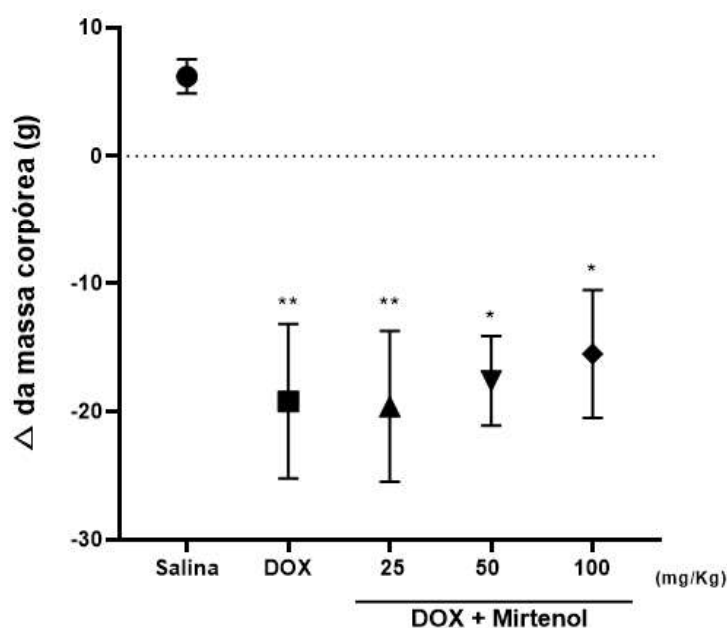


Figura 4. Variação da massa corpórea (g) de ratos wistar machos 48 horas após a indução da cardiotoxicidade com Doxorrubicina. Os animais foram pré-tratados com veículo ou Mirtenol 25, 50 e 100mg/Kg, por gavagem via oral (v.o.), uma vez por dia, durante 7 dias consecutivos. Durante esse período o peso dos animais foi registrado. No sétimo dia (7º) experimental foi realizada a indução da cardiotoxicidade com dose única de DOX 20 mg/kg intraperitoneal (i.p.), exceto para o grupo Salina que recebeu uma injeção única de soro fisiológico 0,9% (i.p.), 48 horas depois os ratos foram pesados e sacrificados. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 4-5$) e os resultados foram avaliados por análise de variância de duas vias (ANOVA) com pós-teste de Tukey'. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação com o grupo salina. Fonte: Própria.

A perda de massa corporal nos animais do grupo DOX também foi descrita por outros estudos (OLIVEIRA; MELO, 2012; XIN ZHANG *et al.*, 2020; SHEKARI *et*

al., 2022). Ademais, o Mirtenol não foi capaz de impedir ou atenuar essa complicação.

A cardiotoxicidade induzida por DOX possui patogênese multifatorial e complexa que culmina no desenvolvimento de cardiomiopatia aguda, subaguda e crônica (OCTAVIA *et al.*, 2012; SCHIRONE *et al.*, 2022). A cardiomiopatia aguda pode aparecer com 2 a 3 dias após o tratamento com DOX e é caracterizada por taquicardia, anormalidades eletrocardiográficas, batimentos prematuros, miopericardite e ocasionalmente insuficiência ventricular esquerda (CHATTERJEE *et al.* 2010).

As alterações eletrocardiográficas mais predominantes na cardiotoxicidade induzida por DOX são: alargamento do QRS, prolongamento do intervalo QT, bradicardia, prolongamento do intervalo RR, achatamento da onda T e diminuição significativa na voltagem da onda R (KHALILZADEH *et al.*, 2018; SHEKARI *et al.*, 2022).

Desse modo, o efeito do pré-tratamento com mirtenol na CID foi avaliado quanto aos parâmetros eletrocardiográficos (Figura 5). O grupo DOX teve um aumento significativo nos intervalos QT e QTc em relação ao grupo Salina ($p < 0,001$), no entanto, os grupos Mirtenol 25 e 50 mg/Kg, e Mirtenol 100 mg/Kg também apresentaram um aumento significativo no intervalo QT e QTc comparado ao grupo Salina ($p < 0,01$) e ($p < 0,05$), respectivamente (Figura 5E e Figura 5F). Esses resultados mostram que o pré-tratamento com Mirtenol não foi capaz de reverter o atraso na repolarização dos ventrículos, refletido no prolongamento do intervalo QT e QTc, que foram provocados por DOX. Nos demais parâmetros (frequência cardíaca, complexo QRS, intervalo PR e intervalo RR), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

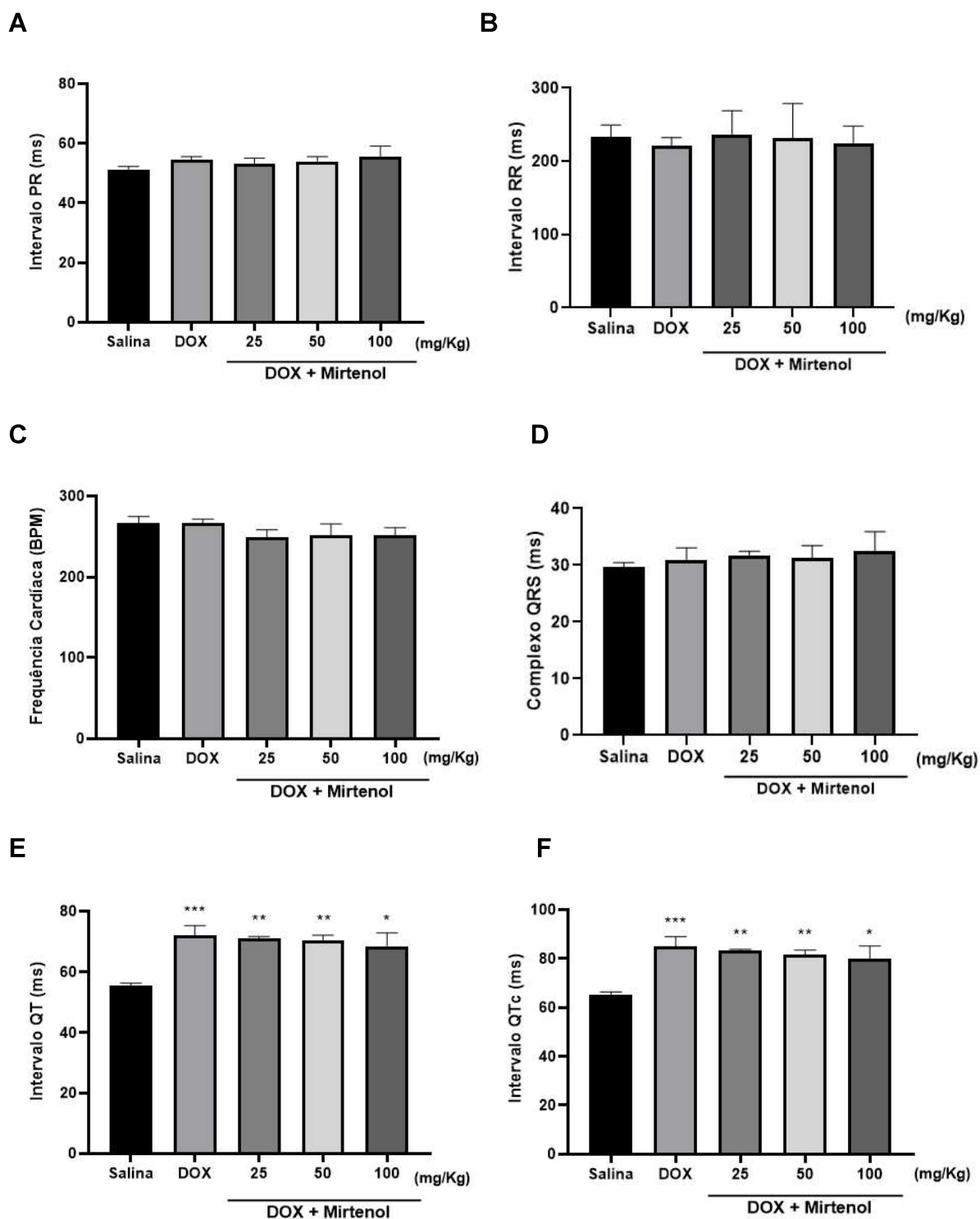


Figura 5. Efeito do Mirtenol 25, 50 e 100 mg/Kg nos parâmetros eletrocardiográficos. (A) Intervalo PR, (B) Intervalo RR, (C) Frequência Cardíaca (FC), (D) Complexo QRS, (E) Intervalo QT, (F) Intervalo QTc. Os dados foram representados como média $\pm$ E.P.M. ($n = 4-5$). ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo Salina. Fonte: Própria.

Diferente do Mirtenol, outros compostos podem reverter as alterações eletrocardiográficas desencadeadas por DOX. O tiosulfato de sódio, um agente quelante, reduziu o aumento do complexo QRS e intervalo QT promovido por esse

antineoplásico, além disso, esse efeito foi acompanhado da redução do estresse oxidativo, com aumento de SOD, GSH e redução do MDA (SHEKARI *et al.*, 2022). Sulfato de magnésio pode normalizar o intervalo QT aumentado por DOX, mas não o complexo QRS; como a sobrecarga de cálcio está associada a disfunção contrátil na CID, o Mg^{2+} surte efeito cardioprotetor ao atuar por mecanismos antagônicos ao cálcio e alivia a sua concentração intracelular (KHALILZADEH *et al.*, 2018).

Curiosamente Fang; Wei; Jiang (2023), relataram redução significativa no intervalo QT e QTc no ECG de camundongos alocados no grupo DOX, no entanto, Monotropeína reverteu essa redução. A Monotropeína é um glicosídeo iridóide, foi demonstrado que esse composto pode suprimir a disfunção cardíaca, reduzir o dano miocárdico, estresse oxidativo e inflamação induzido por DOX. Ainda, foi comprovado que esses efeitos são dependentes da regulação positiva da sinalização AKT.

Nos traçados eletrocardiográficos observa-se presença de arritmia do tipo extrassístole ventricular (ESV) no grupo DOX (Figura 6A). A quantidade de ESVs nos animais foi contabilizada e os resultados estão apresentados na Figura 6B. Um aumento significativo na quantidade de ESVs ocorreu no grupo DOX comparado a Salina ($p < 0,05$), já nos grupos pré-tratados com Mirtenol 25, 50 e 100 mg/Kg houve diminuição significativa na quantidade de ESV comparado ao grupo DOX. Indicando um possível efeito antiarritmogênico do mirtenol na CID.

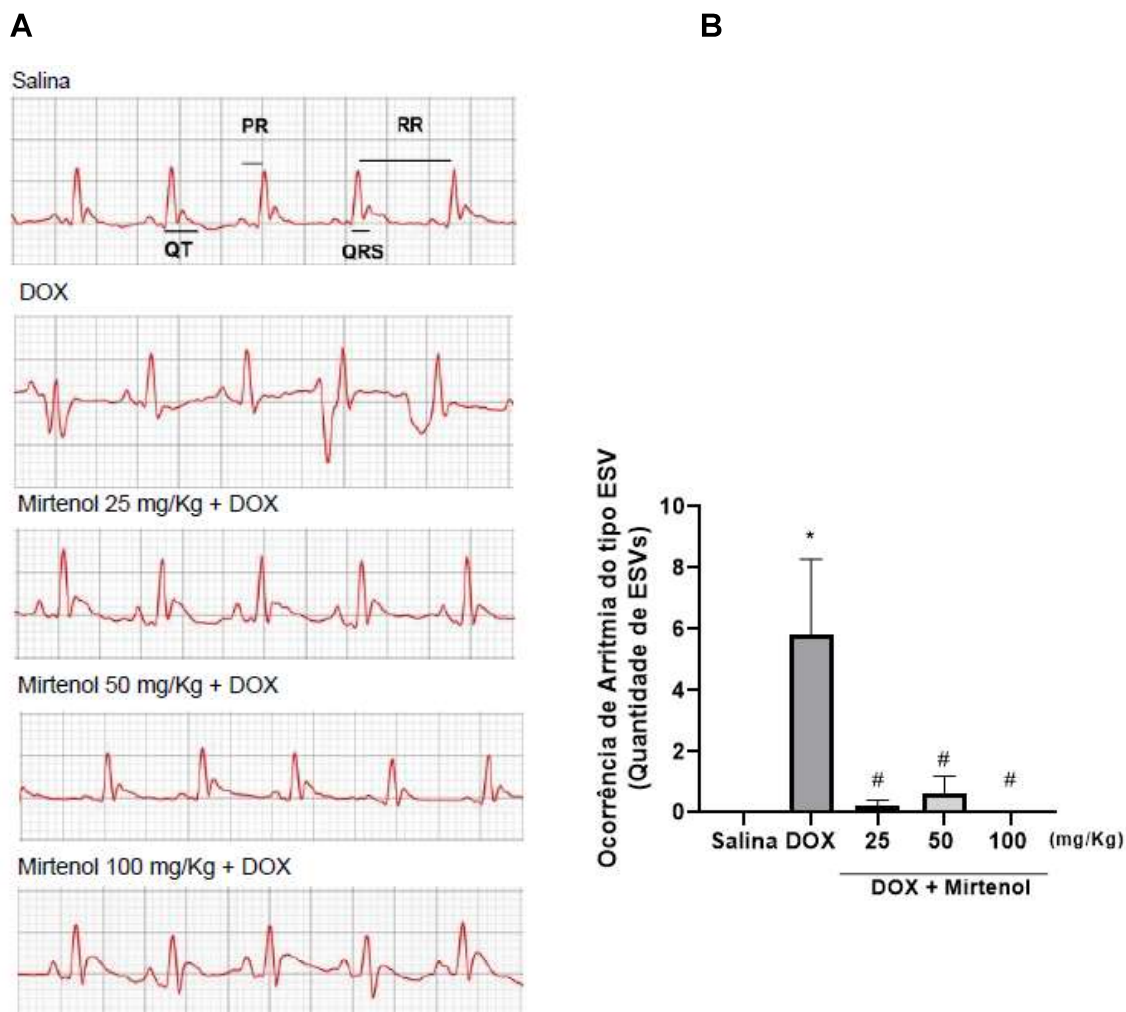


Figura 6. Efeito do Mirtenol 25, 50 e 100 mg/Kg na cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina no eletrocardiograma. (A) Representação gráfica do eletrocardiograma (B) Ocorrência de arritmia do tipo ESV. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 4-5$) e os resultados foram avaliados por análise de variância de duas vias (ANOVA) com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina; # $p < 0,05$ em relação ao grupo DOX. Fonte: Própria.

Britto *et al.* (2018), avaliou os efeitos do pré-tratamento com mirtenol na lesão isquemia/ reperfusão (IR) miocárdica, onde foi demonstrado que esse monoterpene diminuiu a duração das arritmias, bem como, previne a ocorrência de arritmias graves, esses resultados são consistentes com o presente estudo, em que foi observado melhora no quadro de arritmias nos animais pré-tratados com mirtenol.

Sabe-se que DOX induz a formação de EROs e que estes desencadeiam a peroxidação lipídica, formando assim os hidroperóxidos lipídicos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MIYAMOTO, 2005). Além disso, as EROs podem oxidar grupos sulfidrilas presentes em proteínas (BRITTO *et al.*, 2018). Portanto, avaliamos o efeito do mirtenol no ensaio de Hidroperóxidos Totais e nos níveis de Grupamentos Sulfidrilas na CID.

No teste de Hidroperóxidos Lipídicos (Figura 7A) houve aumento significativo dos hidroperóxidos no grupo DOX em relação à Salina ($p < 0,01$) e Mirtenol nas três doses avaliadas preveniu esse aumento. A dose de 50 mg/Kg foi mais eficaz na redução dos hidroperóxidos lipídicos comparado a DOX ($p < 0,001$), seguida da dose de 25 mg/Kg ($p < 0,01$) e 100 mg/Kg ($p < 0,05$). Portanto, Mirtenol é capaz de reduzir os hidroperóxidos totais que são elevados por DOX, sendo a dose mais eficaz a de 50 mg/Kg.

No teste de grupamentos sulfidrila (Figura 7B) não houve diferença significativa entre os grupos.

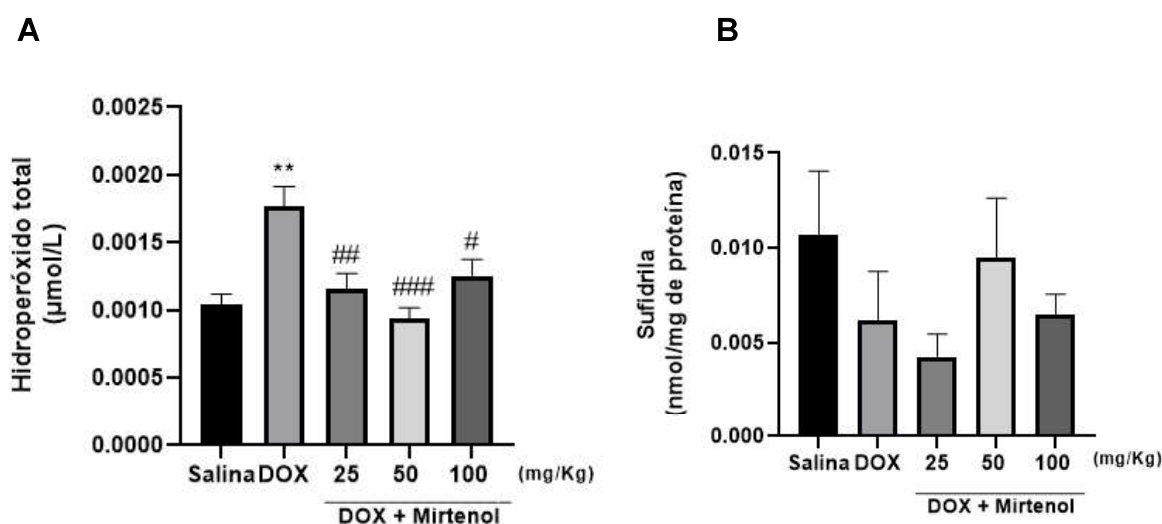


Figura 7. Efeito do Mirtenol 25, 50 e 100 mg/Kg no estresse oxidativo induzido por doxorubicina (DOX). (A) Concentração de Hidroperóxidos Totais; (B) Concentração de grupos sulfidrila. Os dados foram apresentados como média $\pm$ E.P.M. ($n = 4-5$). ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo Salina; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ em relação ao grupo doxorubicina (DOX). Fonte: Própria.

As enzimas antioxidantes endógenas exercem papel essencial na manutenção da homeostase celular, visto que neutralizam as EROs. A SOD, por exemplo, atua na dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ formando H_2O_2 e O_2 , enquanto isso, a GPX promove a redução H_2O_2 formando água, e os peróxidos orgânicos, como os hidroperóxidos lipídicos, nos alcoóis correspondentes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Na Figura 8A, é demonstrado o efeito do Mirtenol na atividade da SOD. Houve diminuição significativa na atividade da SOD no grupo DOX comparado a Salina ($p < 0,05$), bem como, entre Mirtenol de 25 mg/Kg e Salina ($p < 0,05$), no entanto, não houve diferença significativa entre DOX e os grupos pré-tratados com mirtenol, indicando ausência de efeito do mirtenol na atividade da SOD na CID.

A atividade da GPX também foi avaliada (Figura 8B), diminuição significativa na atividade da GPX foi observada no grupo DOX em relação à salina ($p < 0,05$), o mesmo aconteceu com Mirtenol 25 mg/Kg comparado a salina ($p < 0,0001$); A redução na atividade da GPX no pré-tratamento com Mirtenol 25 mg/Kg foi ainda maior do que no grupo DOX ($p < 0,0001$), contudo, foi observado aumento significativo da atividade dessa enzima com Mirtenol 50 mg/Kg ($p < 0,01$) e Mirtenol 100 mg/Kg ($p < 0,05$), em relação a DOX. Para tanto, também foi observado diferentes efeitos entre as doses de mirtenol, tanto Mirtenol 50 mg/Kg quanto Mirtenol 100 mg/Kg apresentaram aumento significativo da atividade da GPX em relação ao tratamento com Mirtenol 25 mg/Kg (ambos com $p < 0,0001$).

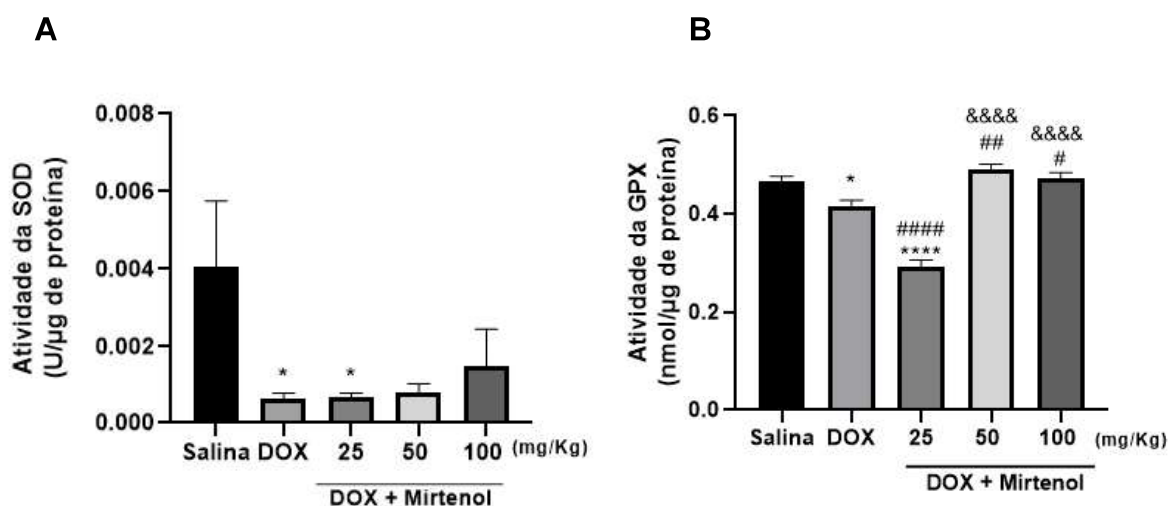


Figura 8. Efeito do Mirtenol 25, 50 e 100 mg/Kg na atividade das enzimas antioxidantes endógenas na cardiotoxicidade aguda induzida por doxorubicina (DOX). (A) Atividade da superóxido dismutase (SOD); (B) Atividade da glutathione peroxidase (GPx). Os dados foram apresentados como média $\pm$ E.P.M. ($n = 4-5$). ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo Salina, # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; #### $p < 0,0001$ em relação ao grupo doxorubicina (DOX) e &&&& $p < 0,0001$ em relação a MIR 25 (mg/Kg) + DOX. Fonte: Própria.

Na literatura, apesar de predominantemente serem relatados efeitos antioxidantes do mirtenol, na redução dos produtos indiretos da formação de EROs e ERNs e aumento das enzimas antioxidantes endógenas (GOMES *et al.*, 2017; VIANA *et al.*, 2016), alguns estudos mostram ausência de efeito na atividade da SOD (RAJIZADEH *et al.*, 2019) e da GPX (BEJESHK *et al.*, 2019). Neste estudo, também foi observado ausência de efeito na atividade da SOD em tecido cardíaco no modelo de CID.

Além disso, no tecido cardíaco, em modelo de lesão de IR miocárdica, foi demonstrado que Mirtenol na dose de 50 mg/Kg reduz os hidroperóxidos totais,

aumenta os grupamentos sulfidrilas e a atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase, glutathione peroxidase e redutase (BRITO *et al.*, 2018). No presente estudo, o Mirtenol em todas as doses testadas reduziu os hidroperóxidos lipídicos, mas aumentou a atividade da GPX apenas nas doses de 50 e 100 m/Kg, no entanto, não aumentou a atividade da SOD em nenhuma das doses avaliadas. Ademais, não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de grupamentos sulfidrilas.

Vários estudos relatam o papel cardioprotetor dos monoterpenos na CID. Paeoniflorina inibe a apoptose de cardiomiócitos, esse efeito está associado à redução de EROs, que regula positivamente a expressão de miR-1 e, por sua vez, reprime a expressão de Bcl-2 (LI *et al.*, 2016). R-(-)-carvona aumenta a atividade da catalase na CID, *in vivo*, bem como, em linhagem celular de cardiomiócitos, *in vitro*, além disso, melhorou a citotoxicidade da DOX em linhagem celular de câncer de mama (ABBAS; KANDIL; ABBAS, 2020). Tanto o pré tratamento como o tratamento da CID com Linalol, atenua o dano miocárdio provocado por esse antineoplásico, além de aumentar a atividade de SOD e catalase, assim como, leva o aumento de GSH e redução do MDA (ONER *et al.*, 2019).

Timol e carvacrol isolados ou em combinação atenuam o dano miocárdico na CID ao reduzir os níveis séricos de LDH, AST, CPK, CK-MB, TNF- γ e cTn-I; diminui os níveis de caspase-3, a formação de MDA e aumenta GSH, bem como, as enzimas catalase e SOD no tecido cardíaco. Timol teve efeito cardioprotetor mais expressivo do que carvacrol, mas em combinação o efeito é potencializado, sendo perceptível na análise histopatológica, em que, nenhuma alteração no tecido cardíaco de ratos que receberam DOX e foram tratados com esses dois monoterpenos foi observada (EL-SAYED; MANSOUR; ABDUL-HAMEED, 2015).

Os benefícios da utilização de antioxidantes na CID ainda é controverso, visto que, o estresse oxidativo contribui substancialmente com a atividade citotóxica de DOX, logo, os antioxidantes podem não só reduzir a EROs em cardiomiócitos como também em células cancerígenas, isso poderia comprometer a eficácia do tratamento antineoplásico (FATIMA, 2018). No entanto, alguns estudos apontam que compostos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórios e anti-apoptóticas podem atenuar a CID sem interferir no tratamento quimioterápico ou até mesmo potencializar os efeitos antitumorais de fármacos antineoplásicos (HU *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019; ABBAS; KANDIL; ABBAS MA, 2020).

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados foi possível inferir que o pré-tratamento com o Mirtenol não foi capaz de prevenir a perda de massa corpórea ou de melhorar os aspectos eletrocardiográficos, especificamente os intervalos QT e QTc de animais com cardiotoxicidade aguda induzida por DOX. Entretanto, foi observado melhora no quadro de arritmias e de aspectos relacionados à atividade antioxidante, como redução dos níveis de hidroperóxidos lipídicos e aumento da atividade da GPX.

Esses fatos indicam uma suspeita de uma possível atividade antioxidante do Mirtenol na cardiotoxicidade aguda induzida por doxorrubicina, entretanto, mais análises são necessárias para confirmação.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. M.; KANDIL, Y. I.; ABBAS, M. A. R-(-)-carvone Attenuated Doxorubicin Induced Cardiotoxicity In Vivo and Potentiated Its Anticancer Toxicity In Vitro. **Balkan Medical Journal**, v. 37, n. 2, p. 98–103, fev. 2020.
- ALMEIDA, G.K.M. **Diosmina Reduz a Cardiotoxicidade Aguda Induzida por Doxorubicina Via Atenuação do Estresse Oxidativo, da Inflamação e da Apoptose em Ratos**. 2019. Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Sergipe, 2019.
- ANDRADE, L. N. *et al.* Evaluation of the Cytotoxicity of Structurally Correlated p-Menthane Derivatives. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13264–13280, jul. 2015.
- AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, v. 302, p.141-5, 2001.
- BEJESHK, M. A. *et al.* Anti-inflammatory and anti-remodeling effects of myrtenol in the lungs of asthmatic rats: Histopathological and biochemical findings. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 47, n. 2, p. 185–193, mar. 2019.
- BERNAUER, W.; ERNENPUTSCH, I. Antagonistic effects of alpha-adrenoceptor blocking agents on arrhythmias, enzyme release, and myocardial necrosis in isolated rat hearts with coronary occlusion and reperfusion. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 338, n. 1, p. 88-95, Jul. 1988.
- BHATIA, S. P. *et al.* Fragrance material review on myrtenol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. S237–S240, nov. 2008.
- BRITTO, R. M. DE *et al.* Myrtenol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through antioxidant and anti-apoptotic dependent mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 557–566, jan. 2018.
- CHATTERJEE, K. *et al.* Doxorubicin Cardiomyopathy. **Cardiology**, v. 115, n. 2, p. 155–162, 2010.
- CRUZ, M.; DUARTE-RODRIGUES, J.; CAMPELO, M. Cardiotoxicidade na terapêutica com antraciclinas: estratégias de prevenção. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 35, n. 6, p. 359–371, jun. 2016.
- EL-SAYED, E.-S. M.; MANSOUR, A. M.; ABDUL-HAMEED, M. S. Thymol and Carvacrol Prevent Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Abrogation of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 37–44, set. 2015.
- FANG, Z.; WEI, W.; JIANG, X. Monotropein attenuates doxorubicin-induced oxidative stress, inflammation, and arrhythmia via the AKT signal pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 638, p. 14–22, jan. 2023.

FATIMA, S. Cancer Treatment with Pro and Antioxidant Agents. **CPQ Cancer**, v. 1, n. 4, 2018.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, mar. 1997.

GOMES, B. S. *et al.* Anti-inflammatory effect of the monoterpene myrtenol is dependent on the direct modulation of neutrophil migration and oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v. 273, p. 73–81, ago. 2017.

GOODMAN, L. S. *et al.* **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. Porto Alegre, Brazil: Mcgraw-Hill Education, 2012.

HADI, N. *et al.* Vitamin E and telmisartan attenuates doxorubicin induced cardiac injury in rat through down regulation of inflammatory response. **BMC cardiovascular disorders**, v. 12, p. 63, ago. 2012.

HAJJAR, L. A. *et al.* Diretriz Brasileira de Cardio-oncologia – 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, n. 5, p. 1006–1043, nov. 2020.

HU, C. *et al.* Meteorin-like protein attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating cAMP/PKA/SIRT1 pathway. **Redox Biology**, v. 37, p. 101747, out. 2020.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384-389, 1992.

JUNIOR, M. R. M. **Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais**. 2006. Tese (Doutorado) - Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

KHALILZADEH, M. *et al.* Protective effects of magnesium sulfate against doxorubicin induced cardiotoxicity in rats. **Life Sciences**, v. 207, p. 436–441, ago. 2018.

KITAKATA, H. *et al.* Therapeutic Targets for DOX-Induced Cardiomyopathy: Role of Apoptosis vs. Ferroptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1414, Jan. 2022.

KOSS-MIKOŁAJCZYK, I. *et al.* Natural Products Counteracting Cardiotoxicity during Cancer Chemotherapy: The Special Case of Doxorubicin, a Comprehensive Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 10037, set. 2021.

KOZIOL, A. *et al.* An Overview of the Pharmacological Properties and Potential Applications of Natural Monoterpenes. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 14, p. 1156–1168, 2014.

LI, J.-Z. *et al.* Paeoniflorin inhibits doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis by downregulating microRNA-1 expression. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 11, n. 6, p. 2407–2412, jun. 2016.

LINDMARK-HENRIKSSON, M. *et al.* Transformation of α -Pinene Using *Picea abies* Suspension Culture. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 3, p. 337–343, fev. 2003.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.

MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. **Indian J. Biochem. Biophys**, v. 35, p. 184-188, 1998.

MELO, I. M.; OLIVEIRA, M. S. DE; MELO, M. M. Avaliação das alterações cardiotoxícas decorrentes do uso da doxorubicina: estudo experimental em ratos. **rmmg.org**, v. 22, n. 0, p. 9–13, 2012.

MENG, Y.-Y. *et al.* Protection against Doxorubicin-Induced Cytotoxicity by Geniposide Involves AMPK α Signaling Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. e7901735, jun. 2019.

MEREDITH, A.-M.; DASS, C. R. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 729–741, mar. 2016.

MIYAMOTO, S. **Hidroperóxidos de lipídios como fonte biológica de oxigênio singlete**. 2005. estudos com marcação isotópica, espectrometria de massa e luminescência. 2005. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MOREIRA, M. R. C. *et al.* Anxiolytic-like effects and mechanism of (–)-myrtenol: A monoterpene alcohol. **Neuroscience Letters**, v. 579, p. 119–124, set. 2014.

MOREIRA, M. R. C. *et al.* MAPEAMENTO CIENTÍFICO E PATENTÁRIO DO MIRTENOL: UM MONOTERPENO COM ATIVIDADE PSICOFARMACOLÓGICA. **Cadernos de Prospecção**, v. 8, n. 3, p. 478–478, set. 2015.

OCTAVIA, Y. *et al.* Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 6, p. 1213–1225, jun. 2012.

ONER, Z.; ALTINOZ, E.; ELBE, E.; EKINCI, N. The protective and therapeutic effects of linalool against doxorubicin-induced cardiotoxicity in Wistar albino rats. **Human and Experimental Toxicology**, Vol. 38, n. 7, p. 803–813, 2019.

PAGLIA, D.E. AND VALENTINE, W.N. Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, p. 158-169, 1967.

QI, W. *et al.* Cardamonin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice by restraining oxidative stress and inflammation associated with Nrf2 signaling. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 122, p. 109547, fev. 2020.

RAJIZADEH, M. A. *et al.* Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Effects of Myrtenol in the Rats with Allergic Asthma. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR**, v. 18, n. 3, p. 1488–1498, 2019.

SACCHETTI, G. *et al.* Intra-specific biodiversity of Italian myrtle (*Myrtus communis*) through chemical markers profile and biological activities of leaf methanolic extracts. **Natural Product Research**, v. 21, n. 2, p. 167–179, fev. 2007.

SAIDI, A.; ALHARETHI, R. Management of Chemotherapy Induced Cardiomyopathy. **Current Cardiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 245–249, nov. 2011.

SCHIRONE, L. *et al.* Mitochondria and Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: A Complex Interplay. **Cells**, v. 11, n. 13, p. 2000, 22 jun. 2022.

SEGREDO, M. P. F. **Papel do estresse oxidativo na cardiotoxicidade aguda e crônica induzida por doxorubicina**. 2017. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2017.

SENONER, T.; DICHTL, W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2090, set. 2019.

SHEIBANI, M. *et al.* Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Overview on Pre-clinical Therapeutic Approaches. **Cardiovascular Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 292–310, abr. 2022.

SHEN, X. *et al.* A cardiolipina é o alvo da cardiotoxicidade dos anestésicos locais? **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 60, n. 4, p. 44–454, ago. 2010.

SHEKARI, M. *et al.* Cardioprotective effects of sodium thiosulfate against doxorubicin-induced cardiotoxicity in male rats. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 23, n. 1, 2022.

SILVA, R. O. *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plant-derived monoterpene alcohol, in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 3, p. 184–192, fev. 2014.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 157–170, ago. 2012.

TADOKORO, T. *et al.* Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity. **JCI Insight**, v. 5, n. 9, maio 2020.

VIANA, A. F. S. C. *et al.* Gastroprotective effect of (-)-myrtenol against ethanol-induced acute gastric lesions: possible mechanisms. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 8, p. 1085–1092, jun. 2016.

WILD C.P.; WEIDERPASS E.; STEWART B.W. **World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO REPORT ON CANCER: Setting Priorities, Investing Wisely And Providing Care For All**, 2020. Geneva: WHO, 2020.

YU, J. *et al.* Diethyl Blechnic, a Novel Natural Product Isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge, Inhibits Doxorubicin-Induced Apoptosis by Inhibiting ROS and Activating JNK1/2. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1809, jun. 2018.

ZHANG, X. *et al.* FNDC5 alleviates oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating AKT. **Cell Death & Differentiation**, v. 27, n. 2, p. 540–555, jun. 2019.

ZIELIŃSKA-BŁAJET, M.; PIETRUSIAK, P.; FEDER-KUBIS, J. Selected Monocyclic Monoterpenes and Their Derivatives as Effective Anticancer Therapeutic Agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4763, abr. 2021.

ANEXO A - Declaração do CEPA (Comitê de Ética em Pesquisa com Animais)



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO MIRTENOL NO TRATAMENTO PREVENTIVO DA CARDIOTOXICIDADE AGUDA INDUZIDA POR DOXORRUBICINA", protocolada sob o CEUA nº 2289220322 (ID 000608), sob a responsabilidade de **Prof. Dra. Sandra Lauton Santos e equipe; Marta Maria Soares de Freitas Almeida; Marta Maria Soares de Freitas Almeida** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 06/12/2022.

We certify that the proposal "EVALUATION OF MIRTHENOL ACTIVITY IN THE PREVENTIVE TREATMENT OF DOXORUBICIN-INDUCED ACUTE CARDIOTOXICITY.", utilizing 100 Heterogenics rats (100 males), protocol number CEUA 2289220322 (ID 000608), under the responsibility of **Prof. Dra. Sandra Lauton Santos and team; Marta Maria Soares de Freitas Almeida; Marta Maria Soares de Freitas Almeida** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 12/06/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **06/2022 a 12/2023** Área: **Fisiologia**

Origem: **Biotério da Universidade Federal de Sergipe**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade: **8 a 10 semanas**

N: **100**

Linhagem: **wistar**

Peso: **250 a 300 g**

Local do experimento: **Laboratório de biologia cardiovascular e estresse oxidativo**

São Cristóvão, 24 de abril de 2023

Prof. Dr. Josemar Sena Batista
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe