



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

Bolsista: TAMIRES DA SILVA ARANTES

Orientador: SANDRA LAUTON SANTOS

ESTUDO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DA DIOSMINA NA CARDIOTOXICIDADE
AGUDA INDUIDA PELA DOXORRUBICINA EM RATOS

SÃO CRISTOVÃO (SE)

2017

TAMIRES DA SILVA ARANTES

ESTUDO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DA DIOSMINA NA CARDIOTOXICIDADE
AGUDA INDUIDA PELA DOXORRUBICINA EM RATOS

Relatório parcial apresentado ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC da Universidade Federal de Sergipe, desenvolvido no Laboratório de Biologia Cardiovascular e Estresse Oxidativo/DFS/CCBS.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Lauton Santos

SÃO CRISTOVÃO (SE)

2017

RESUMO

A utilidade clínica em longo prazo da doxorubicina (DOX), uma antraciclina com atividade antitumoral potente, é limitada pela cardiotoxicidade. Apesar das pesquisas intensivas sobre a cardiotoxicidade induzida por essa droga, os mecanismos exatos ainda não estão claros. Porém, um sólido corpo de evidências indica que o estresse oxidativo esteja, também, envolvido. A diosmina é um membro da família dos flavonoides que possui atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-apoptótica, entre outras bem conhecidas. Torna-se evidente que a utilização terapêutica de antioxidantes pode compor uma estratégia eficiente no sentido de prevenir os danos causados pela cardiotoxicidade da DOX. Com base nisso, nos propomos a avaliar o possível efeito da diosmina sobre o estresse oxidativo na cardiotoxicidade aguda.

PALAVRAS CHAVES: Doxorubicina; Coração; Diosmina; Cardiotoxicidade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	2
3. OBJETIVOS.....	3
3.1 Geral.....	3
3.2 Específicos.....	3
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
4.1 Estresse Oxidativo na Cardiotoxicidade.....	4
4.2 Diosmina.....	5
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
5.1 Animais.....	6
5.2 Delineamento Experimental.....	6
5.3 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos.....	7
5.4 Análise Estatística.....	8
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
7. CONCLUSÃO.....	14
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15

1. INTRODUÇÃO

O impacto do câncer no mundo tem crescido de forma significativa, sobretudo devido ao envelhecimento populacional e às mudanças de hábitos de vida. Dentre as terapias empregadas para o combate ao câncer, a quimioterapia é a modalidade de tratamento mais utilizada, sendo as antraciclinas um dos agentes antineoplásicos mais importantes (BOMMU et al., 2008). As antraciclinas são antibióticos naturais, originalmente isolados da bactéria *Streptomyces peucetius* (HORENSTEIN et al., 2000). Fazem parte dessa classe a doxorubicina (DOX) e a daunorrubicina, as quais possuem uma diferença estrutural sutil, mas que interfere no espectro de atividade (MINOTTI et al., 2004).

Apesar de sua alta efetividade no tratamento do câncer, o entusiasmo inicial à descoberta desses agentes antitumorais foi abalado quando se tornaram óbvios seus graves efeitos colaterais: as antraciclinas, principalmente a DOX, podem ser tóxicas a outros órgãos pelo seu efeito cumulativo. O principal fator limitante do uso desse agente antineoplásico é a cardiotoxicidade dose-dependente que culmina em cardiomiopatia irreversível degenerativa e insuficiência cardíaca congestiva (SINGAL et al., 2000).

A patogênese da cardiotoxicidade induzida pela DOX não é totalmente clara. Entretanto, evidências sugerem que essa substância induz a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), que resulta em danificação e aumento da permeabilidade das membranas celulares (MINOTTI et al., 2004).

Hoje em dia, grande parte da atenção tem sido dada ao uso de fitoquímicos como uma estratégia de proteção contra cardiotoxicidade induzida por DOX (XIAO et al., 2012). Um grupo de substâncias que vêm se destacando é os flavonoides, uma classe de polifenóis que possuem uma série de propriedades farmacológicas, que os fazem atuarem sobre sistemas biológicos de forma benéfica para a saúde humana (NIJVELDT et al., 2001). A diosmina (3',5,7-tri-hidroxi-4'-metoxiflavona-7-ramnoglicosídeo) pertence a essa categoria de moléculas e é encontrada em frutas cítricas. Esse flavonoide possui muitas atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, antioxidante, anti-hipertensiva, entre outras (SRINIVASAN & PARI, 2012; TAHIR et al., 2013; SILAMBARASAN & RAJA, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Devido à maioria dos estudos indicarem algum grau de associação inversa entre a ingestão de flavonoides e doença arterial coronariana (LIN et al., 2007; SUN et. al., 2012; SILAMBARASAN & RAJA, 2012), e a gama de propriedades biológicas da diosmina, principalmente a antioxidante, esse estudo se propõe a estudar o efeito antioxidante da diosmina contra a cardiotoxicidade aguda induzida pela DOX em ratos e elucidar os mecanismos moleculares subjacentes em termos de estresse oxidativo.

3. OBJETIVOS

3.0 Geral

Avaliar os possíveis efeitos protetores da diosmina na cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina em ratos.

3.1 Específicos

Analisar o efeito antioxidante da diosmina sobre o estresse oxidativo na cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina em ratos.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Estresse Oxidativo na Cardiotoxicidade

Os mecanismos envolvidos na gênese da cardiotoxicidade doxido-induzida são parcialmente distintos dos mecanismos relacionados a seu efeito antitumoral e ainda não estão completamente elucidados. Porém, um dos possíveis mecanismos envolvidos é o aumento do estresse oxidativo. Esta condição é ocasionada quando há o desequilíbrio entre os sistemas de defesa antioxidante com predomínio dos oxidantes, culminando no surgimento de danos celulares. O sistema oxidante corresponde a espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) como, por exemplo, radical hidroxila (OH^\bullet), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO^\bullet), respectivamente (PHAM-HUY & PHAM-HUY, 2008). O sistema antioxidante compreende as enzimas antioxidantes (1) superóxido dismutase (SOD), enzima que age dismutando o $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 ; (2) catalase (CAT), enzima que promove a dismutação do H_2O_2 em água H_2O e O_2 , impedindo a formação do radical OH^\bullet ; (3) glutatona peroxidase (GPx), atua em conjunto com a CAT impedindo a formação do radical OH^\bullet (CERQUEIRA et al., 2005).

As ROS e RNS, em cardiomiócitos e outras células, são geradas por diversas fontes, dentre as quais, as mais importantes são: as mitocôndrias, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-hidrogênio oxidase da família Nox (NADPH oxidase), xantina oxidase (XO), as óxido nítrico sintases (NOS) e sistema NADPH citocromo p-450 redutase microssomal (TZIOMALOS & HARE, 2009). As espécies reativas também podem ser geradas sem o auxílio de enzimas como, por exemplo, nas reações de Fenton e Haber Weiss. Na reação de Fenton, ocorre a formação de duas OH^\bullet , um radical livre altamente reativo, pela reação de íons ferroso (Fe^{2+}) ou cobre (Cu^+) com o H_2O_2 . Na reação de Haber Weiss ocorre a interação do H_2O_2 com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e também são formados dois radicais OH^\bullet (ZWEIER & HASSAN TALUKDER, 2006).

A geração de espécies reativas mediada pela DOX ocorre por duas vias: enzimática e não enzimática. Na via enzimática, via citocromo p450, há redução da DOX pela NADPH redutase e formação de radical semiquinona, que em contato com O_2 e H_2O_2 gera o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o OH^\bullet . Já na via não enzimática, moléculas de DOX ligam-se ao ferro formando complexos de ferro-DOX que resulta na formação de ROS (reação de Fenton). O aumento da produção desses radicais livres ocasiona também aumento da

peroxidação lipídica, que tem papel fundamental na lesão da membrana celular, vacuolização mitocondrial e perda de miofibrilas (FERREIRA, 2008).

4.2 Diosmina

A diosmina (3',5,7-tri-hidroxi-4'-metoxiflavona-7-ramnoglicosídeo) é um flavonoide encontrado em frutas cítricas. Foi isolada pela primeira vez em 1925, a partir da *Scrophularia Nodosa*. Em 1969, foi utilizada pela primeira vez como agente terapêutico.

É utilizada, por ser um agente protetor vascular, para o tratamento de insuficiência venosa crônica, linfodema e varizes (JANTET, 2002). A diosmina também exibe propriedades anti-inflamatórias, antioxidante, anti-hipertensiva, cardioprotetora nas lesões de isquêmica-reperusão, entre outras (SRINIVASAN & PARI, 2012; TAHIR et al., 2013; SILAMBARASAN & RAJA, 2012; SENTHAMIZHSELVAN et al., 2014; COVA, 1992; PARI et al., 2010).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério da UFS. Os animais foram alimentados com ração comercial e submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, em temperatura controlada ($23 \pm 3^\circ\text{C}$). Durante a execução dos experimentos, foram obedecidas as normas de manipulação dos animais propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA/MCT). Os procedimentos metodológicos realizados neste trabalho foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da UFS sob o protocolo de número 58/2015.

5.2 Delineamentos Experimentais

Tratamento com Diosmina

Os animais foram pré-tratados com diosmina na dose de 50mg/kg uma vez por dia, durante sete dias consecutivos por via oral. A dose utilizada foi determinada com base no estudo de Senthamizhselvan et al. (2014) que relatam as suas propriedades cardioprotetoras nas lesões de reperfusão cardíaca. Os animais controles receberam igual volume do veículo (Soro fisiológico + DMSO - dimetilsulfóxido) (1:9) durante o mesmo período.

Indução da Cardiotoxicidade por DOX

Os animais receberam uma única injeção intraperitoneal de DOX (15, 20 e 30mg/kg, para escolha da melhor dose a ser utilizada no estudo) no sétimo dia, após uma hora do último tratamento com a diosmina (MANTAWY, E. et al., 2014).

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n= 6) como se segue:

- 1) Grupo Controle: animais que receberam veículo.
- 2) Grupo DOX: animais que receberam veículo + DOX.
- 3) Grupo Diosmina: animais que foram pré-tratados com diosmina 50 mg/Kg.
- 4) Grupo Diosmina + DOX: animais que receberam diosmina 50 mg/Kg + DOX.

5.3 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos

5.3.1 Determinação do Grau de Peroxidação Lipídica (TBARS)

Resumidamente, as amostras foram pesadas e homogeneizadas em 10 vezes o volume de solução de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), contendo butil-hidroxitoluol (BHT; 12,6 mM). Em seguida, 200 µL dos homogenatos foram incubados a 90°C por 45 minutos com solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA 0,37%), em meio ácido (15% de ácido tricloroacético- TCA e 0,25 N de ácido clorídrico). As amostras, em seguida, foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm. Aos sobrenadantes, acrescentará n-butanol e solução saturada de NaCl. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e novamente centrifugada a 14.000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R) por 2 minutos. Alíquotas dos sobrenadantes foram pipetadas em placas de 96 poços para a leitura de absorbância em espectrofotômetro de placa (Biotek, ELx800AbsorbanceMicroplateReader) a 535 nm, corrigindo pelos valores de absorbância a 572 nm. A quantidade de malondialdeído (MDA) produzida foi expressa em nanomoles por gramas de tecido, e foi interpretada como marcador de peroxidação lipídica formado pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) (GRAW et al., 2000).

5.3.2 Avaliação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Em síntese, os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato (PBS 50 mM, pH 7,4), centrifugado a 12000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R) por 30 minutos. A reação foi realizada pipetando em microplaca de 96 poços: os sobrenadantes obtidos, PBS, MTT (1,25 mM) e pirogalol (100 µM). A microplaca foi agitada por 5 minutos e logo após acrescentará DMSO. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa (Biotek, ELx800AbsorbanceMicroplate Reader) a 570 nm. A atividade da SOD foi expressa em unidade de SOD por miligrama de proteína (MADESH & BALASUBRAMANIAN, 1998).

5.3.3 Determinação da Atividade da Enzima Catalase (CAT)

Em suma, as amostras foram homogeneizadas em PBS e em seguida os homogenatos foram centrifugados (Heal Force, Neofuge 15R) a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C. Em cubeta de quartzo foi pipetado tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) e os

homogeneizados. A reação foi iniciada com a adição de H₂O₂ (0,3 M). As medidas foram realizadas em espectrofotômetro (Hitachi, Japão), em intervalos de 15 segundos, a 25° C, no comprimento de onda de 240 nm. A atividade da enzima foi expressa pela diferença da variação das absorbâncias (ΔE) /minuto/miligrama de proteínas (NELSON & KIESOW, 1972).

5.3.4 Avaliação da Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

Resumidamente, as amostras foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (50 mM), acrescido de KCl (140 mM), pH 7,4 (1:10, p/v). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (Heal Force, Neofuge 15R) a 12.000 rpm por 30 minutos a 4 C° e os sobrenadantes separados para o ensaio. Na microplaca foi colocado tampão fosfato (100 mM, pH 7,0), NADPH (8,4 μ M), GR (10 U/mg de proteína/mL), azida sódica (NaN₃, 1,125 M), GSH (0,15 mM), H₂O₂ (2,2 mM) e as amostras. O monitoramento foi feito a 340 nm, 25°C, por 8 minutos. A atividade da Gpx foi avaliada pela oxidação do NADPH. Os resultados foram expressos em nanomol/NADPH/minuto/miligrama de proteínas (WENDEL, 1981).

5.4 Análise Estatística

Para a sistematização e observação, os resultados foram tabulados e confeccionados em gráficos utilizando-se o *software* GRAPHPAD PRISMA v. 5.0 (*GraphPad Software, Inc.*, EUA). Para a decisão entre diferenças de médias foi empregado o teste ANOVA 'one-way', seguido do teste de Tukey, com nível de significância para $p < 0,05$ para rejeitar a hipótese de nulidade.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi realizado um experimento piloto para a determinação da dose da doxorrubicina capaz de ocasionar cardiotoxicidade aguda com a geração de espécies reativas e consequentemente, estresse oxidativo na célula. Como critério de escolha foi mensurado a peroxidação lipídica no tecido cardíaco através da concentração de malondialdeído (MDA).

Na análise da concentração de MDA, os grupos DOX 15 mg, DOX 20 mg e DOX 30 mg tiveram um aumento em relação ao grupo DOX (5,9 η mols de MDA/g de tecido \pm 0,2, ** $p < 0,05$; 7,7 η mols de MDA/g de tecido \pm 0,6, *** $p < 0,05$; 8,0 η mols de MDA/g de tecido \pm 0,5, *** $p < 0,05$; 3,4 η mols de MDA/g de tecido \pm 0,1;). Porém, foi observado que o grupo DOX 20 mg e DOX 30 mg tiveram um aumento em relação ao grupo DOX 15 mg (7,7 η mols de MDA/g de tecido \pm 0,6, # $p < 0,05$; 8,0 η mols de MDA/g de tecido \pm 0,5; # $p < 0,05$; 5,9 \pm 0,2 η mols de MDA/g de tecido). Entretanto, não houve diferença da concentração de MDA entre os grupos DOX 20mg e DOX 30mg (7,7 η mols de MDA/g de tecido \pm 0,6; 8,0 η mols de MDA/g de tecido \pm 0,5). Diante dos presentes resultados, foi escolhida para dar continuidade ao estudo a dose de DOX 20 mg/Kg (**Fig.1**).

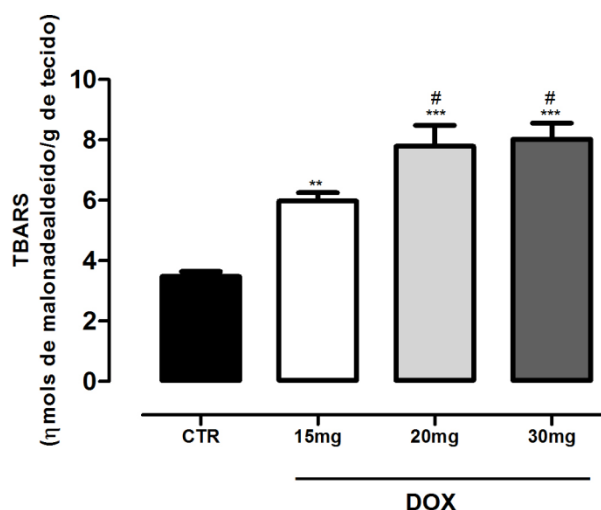


Figura 1. Efeito agudo da doxorrubicina (DOXO) nas doses de 15, 20 e 30 mg/Kg em corações de ratos sobre a peroxidação lipídica.

Após a determinação da dose da DOX, foi avaliado o possível efeito do pré-tratamento da diosmina sobre o estresse oxidativo.

Não houve diferença na concentração de MDA entre os grupos CTR e DIOS (7,8 η mols de MDA/g de tecido \pm 0,3; 7,0 η mols de MDA/g de tecido \pm 0,3). Porém, foi observado aumento na concentração de MDA no grupo DOX em relação aos grupos CTR e DIOS (10,2 de MDA/g de tecido \pm 0,3; 7,8 η mols de MDA/g de tecido \pm 0,3, **p < 0,05; 7,0 η mols de MDA/g de tecido \pm 0,3, ###p < 0,05). Porém, houve redução na concentração de MDA no grupo DIOS + DOX em comparação ao grupo DOX (7,6 de MDA/g de tecido \pm 0,7; 10,2 de MDA/g de tecido \pm 0,3, ++p < 0,05). Não houve diferença na concentração de MDA nos grupos CTR e DIOS em relação ao grupo DIOS + DOX (7,8 η mols de MDA/g de tecido \pm 0,3; 7,0 η mols de MDA/g de tecido \pm 0,3; 7,6 de MDA/g de tecido \pm 0,7)(Fig.2).

A peroxidação lipídica é definida como a deterioração oxidativa do lipídio poli-insaturado. Uma vez que os principais componentes das membranas biológicas são lipídios, a sua peroxidação pode resultar em dano celular e morte. O MDA é um produto final da quebra de lipídios causada pelo estresse oxidativo e seu conteúdo em tecidos é considerado bom indicador de peroxidação lipídica induzida por radicais(El-Agamy, et al., 2016). Nossos resultados exibiram um aumento significativo do conteúdo de MDA cardíaco em ratos tratados com DOX, sugerindo o papel primário do estresse oxidativo na cardiotoxicidade por esse quimioterápico. Contudo, a diosmina foi capaz de reduzir a concentração de MDA dos tecidos, promovendo um efeito cardioprotetor contra a DOX, possivelmente devido ao sua atividade antioxidante, já observada em outros estudos (SRINIVASAN & PARI, 2012; SILAMBARASAN & RAJA).

Ao analisar a atividade da enzima SOD no grupo CTR foi observado que não houve diferença em relação ao grupo DIOS (0,3 U de SOD/ μ g de proteína \pm 0,03; 0,28 U de SOD/ μ g de proteína \pm 0,02). Porém, foi verificada redução da atividade dessa enzima no grupo DOX em relação aos grupos CTR e DIOS (0,1 U de SOD/ μ g de proteína \pm 0,009; 0,38 U de SOD/ μ g de proteína \pm 0,03, ***p < 0,05; 0,2 U de SOD/ μ g de proteína \pm 0,02, ##p < 0,05). Contudo, houve aumento da atividade dessa enzima no grupo DIOS + DOX em relação ao grupo DOX (0,2 U de SOD/ μ g de proteína \pm 0,03; 0,13 U de SOD/ μ g de proteína \pm 0,009, ++p < 0,05). Não houve diferença nos grupos CTR e DIOS em relação ao grupo DIOS + DOX (0,3 U de SOD/ μ g de proteína \pm 0,03; 0,2 U de SOD/ μ g de proteína \pm 0,02; 0,2 U de SOD/ μ g de proteína \pm 0,03)(Fig.3).

A atividade da enzima CAT no grupo CTR não apresentou diferença em relação ao grupo DIOS (0,03 $\Delta/\text{min}/\mu$ de proteína \pm 0,002; 0,03 $\Delta/\text{min}/\mu$ de proteína \pm 0,001). Contudo, houve diminuição da atividade dessa enzima no grupo DOX em comparação ao grupo CTR e DIOS (0,02 $\Delta/\text{min}/\mu$ de proteína \pm 0,0006; 0,03 $\Delta/\text{min}/\mu$ de proteína \pm 0,002, *** $p < 0,05$; 0,03 $\Delta/\text{min}/\mu$ de proteína \pm 0,001, ## $p < 0,05$). Todavia, foi observado aumento da atividade da CAT no grupo DIOS + DOX em relação ao grupo DOX (0,03 $\Delta/\text{min}/\mu$ de proteína \pm 0,001; 0,02 $\Delta/\text{min}/\mu$ de proteína \pm 0,0006, +++ $p < 0,05$). Não houve diferença nos grupos CTR e DIOS em relação ao grupo DIOS + DOX (0,03 $\Delta/\text{min}/\mu$ de proteína \pm 0,002; 0,03 $\Delta/\text{min}/\mu$ de proteína \pm 0,001; 0,03 $\Delta/\text{min}/\mu$ de proteína \pm 0,001)(**Fig.4**).

Ao analisar atividade da enzima GPx foi observado que não houve diferença entre os grupos CTR e DIOS (0,8 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1} \pm 0,09$; 0,7 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1} \pm 0,05$). Porém, foi observada redução da atividade dessa enzima no grupo DOX em comparação ao grupo CTR e DIOS (0,3 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1} \pm 0,02$; 0,8 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1} \pm 0,09$, *** $p < 0,05$; 0,7 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1} \pm 0,05$, #### $p < 0,05$). Todavia, houve aumento da atividade da GPx no grupo DIOS + DOX em relação ao grupo DOX (0,6 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1} \pm 0,04$; 0,3 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1} \pm 0,02$, ++ $p < 0,05$). Não houve diferença nos grupos CTR e DIOS em relação ao grupo DIOS + DOX (0,8 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1} \pm 0,09$; 0,7 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1} \pm 0,05$; 0,6 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1} \pm 0,04$)(**Fig.5**).

As ROS e RNS leva à depleção do sistema antioxidante endógeno e lesão oxidativa. As enzimas SOD, CAT e GPxconstituem a primeira linha de defesa celular contra ROS, porque podem decompor os ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio antes de sua interação para formar o radical hidroxila, bastante reativo (ELBERRY, A. et al., 2010). Neste estudo, as atividades reduzidas da SOD, CAT e GPx observadas no grupo DOX pode ser atribuída ao aumento da sua utilização para eliminação de ROS. No entanto, o pré-tratamento com a diosmina aumentou significativamente as atividades destas enzimas, podendo ser um dos mecanismos que essa substância utiliza para promover a cardioproteção contra a DOX.

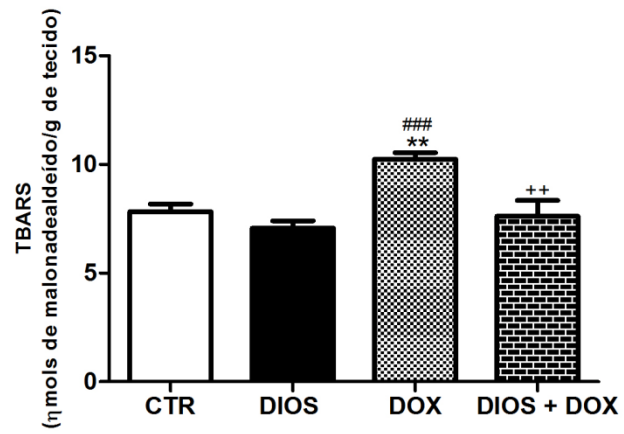


Figura 2. Efeito da diosminasobre a peroxidação lipídica na cardiotoxicidade aguda.

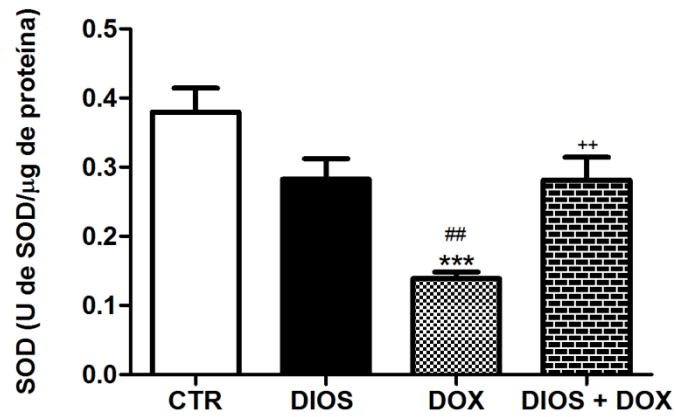


Figura 3. Efeito da diosmina na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na cardiotoxicidade aguda.

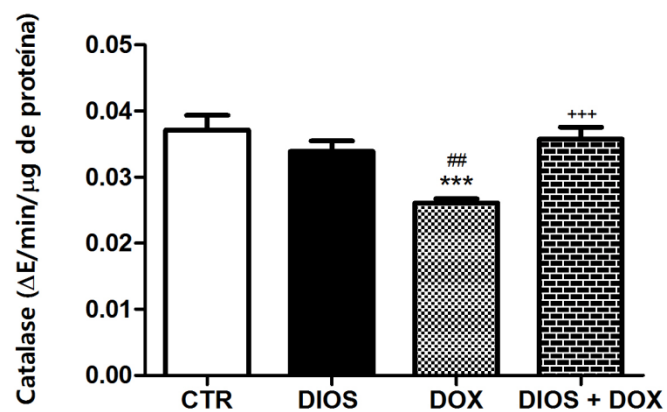


Figura 4. Efeito da diosmina na atividade da enzima catalase (CAT) na cardiotoxicidade aguda.

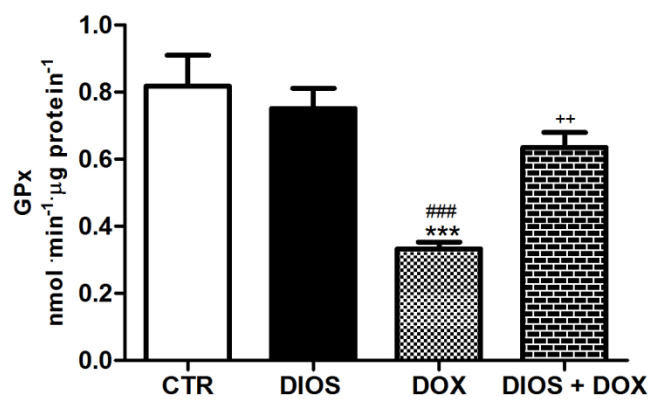


Figura 5. Efeito da diosmina na atividade da enzima glutationaperoxidase (GPx) na cardiotoxicidade aguda.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a diosmina exerce efeitos protetores significativos contra a cardiotoxicidade induzida por DOX em ratos e os mecanismos subjacentes podem estar associados a sua capacidade de sequestrar espécies reativas e/ou sobre sua atuação no sistema de defesa antioxidante.

8 REFERÊNCIAS

BOMMU, P. et al. Phyllanthusmaderaspatensis, a dietary supplement for the amelioration of adriamycin-induced toxicity and oxidative stress in mice. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, n. 2, p. 149-154, 2008.

CERQUEIRA, N. F. et al. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20, p. 336-343, 2005.

ELBERRY, A. et al. Cranberry (Vacciniummacrocarpon) protectsagainstdoxorubicin-inducedcardiotoxicity in rats. **FoodandChemicalToxicology**, v.48, p. 1178-1184, 2010.

EL-AGAMY, D. et al. Cardioprotectiveeffects ofsitagliptinagainstdoxorubicin-inducedcardiotoxicity in rats. **ExpBiolMed (Maywood) OnlineFirst**, v. 0, p. 1-11, 2016.

FERREIRA, A. L. et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity. **CardiovascHematol Agents Med Chem**, v. 6, p. 278-81, 2008.

GRAW, A. et al. Measurement of thiobarbituric acid values in dark chicken meat thorough derivative spectrophotometry: influence of various parameters. **J Agric. Foor. Chem.** 2000; 48 (4): 1155-9.

HORENSTEIN, M.S. et al. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. **Mol Genet Metab**, v. 71, p. 436-444, 2000.

LIN, J. et al. Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. **Am. J. Epidemiol.**, v. 165, p. 1305–1313, 2007.

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.

MANTAWY, E. et al. Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. **European journal of pharmacology**, v. 728, p. 107-118, 2014.

MINOTTI, G. et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, p. 185–229, 2004.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Anal Biochem**, v. 49, p. 474–478, 1972.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**, v. 74, p. 418-425, 2001

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International journal of biomedical science**, v. 4, n. 2, p. 89, 2008.

SILAMBARASAN, T.; RAJA, B. Diosmin, a bioflavonoid reverses alterations in blood pressure, nitric oxide, lipid peroxides and antioxidant status in DOCA-salt induced hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 679, p. 81–89, 2012.

SINGAL, P. K. et al. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. **Mol Cell Biochem**, v.207, p. 77-85, 2000.

SRINIVASAN, S.; PARI, L. Ameliorative effect of diosmin, a citrus flavonoid against streptozotocin- nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats. **Chemico - Biological Interactions**, v. 195, p. 43–51, 2012.

SUN, D. et al. Luteolin limits infarct size and improves cardiac function after myocardium ischemia/reperfusion injury in diabetic rats. **PLoS One**, v. 7, p. 334-91, 2012.

TAHIR, M. et al. Diosmin abrogates chemically induced hepatocarcinogenesis via alleviation of oxidative stress, hyperproliferative and inflammatory markers in murine model. **Toxicology letters**, v. 220, n. 3, p. 205-218, 2013.

TZIOMALOS, K.; HARE, J. M. Role of xanthine oxidoreductase in cardiac nitroso redox imbalance. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 237–262, 2009.

WENDEL, A. Glutathione Peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325-332, 1981.

XIAO, J. et al. Kaempferol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and in vitro. **Toxicology**, v. 292, n. 1, p. 53-62, 2012.

ZWEIER, J. L. et al. O papel dos oxidantes e radicais livres na lesão de reperfusão. **Pesquisa Cardiovascular**, v. 70, p. 181-190, 2006.