



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Ana Paula Dantas Ribeiro

**Influência do suco da laranja Pera (*Citrus sinensis*) e da
laranja Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) na
cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título
de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato
Coorientador: Prof. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva

Botucatu

2019

Ana Paula Dantas Ribeiro

Influência do suco da laranja Pera (*Citrus sinensis*) e da laranja Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) na cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorrubicina em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato
Coorientador: Prof. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva

Botucatu

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ribeiro, Ana Paula Dantas.

Influência do suco da laranja pera (*Citrus sinensis*) e da laranja Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) na cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorrubicina em ratos / Ana Paula Dantas Ribeiro. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Bertha Furlan Polegato
Coorientador: Sergio A. Rupp de Paiva
Capes: 20702027

1. Cardiotoxicidade. 2. Doxorrubicina. 3. Estresse oxidativo. 4. Laranja. 5. Suco de laranja.

Palavras-chave: Cardiotoxicidade; Doxorrubicina; Estresse oxidativo; Laranja moro; Laranja pera.

DEDICATÓRIA

À Deus, por ser meu guia e por ter me dado forças para os obstáculos dia após dia.

Aos meus queridos pais Marina e Adalto, por toda base de amor, apoio, educação e que fizeram o possível para me ver feliz e realizar minhas conquistas. Espero um dia retribuir pelo menos metade do que fazem e fizeram por mim ao longo de todos esses anos. Eu nada seria sem vocês!

À minha irmã Michelle, por ser minha conselheira, pelo amor, carinho, por ser meu porto seguro e ser minha maior inspiração.

Aos meus familiares vó Rosa, tia Miriam, meu cunhado Rafael e minhas sobrinhas Rafaela e Manuela pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu namorado Gustavo por cada palavra de amor, incentivo e conforto.

À minha melhor amiga Yasmim, pela amizade sincera e por me dar apoio ao longo desses anos.

À minha família de Botucatu, minha república SóFadinhas, por todo o companheirismo, acolhimento, amor e que me deram força em todos os momentos.

Às minhas amigas Gabriela, Mariana, Fernanda e Ana Flávia que me acompanham desde a época de faculdade pela amizade e solidariedade.

Amo vocês!

AGRADECIMIENTO

ESPECIAL

À minha orientadora Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato, por todas as horas de orientação, dedicação, pela imensa paciência, por acreditar na minha capacidade, por todos os ensinamentos, por ser meu exemplo de caráter e profissionalismo e por fazer parte dessa minha formação profissional e tornar possível a realização desse trabalho.

Muito obrigada é pouco!

AGRADECIMENTOS

A todos os docentes do departamento de clínica médica pelas realizações dos procedimentos e pelas contribuições durante todo o projeto, em especial à Dra. Silméia Garcia Zanati Bazan, Dr. Sérgio A.R. de Paiva, Dr. Marcos F. Minicucci, Dr. Leonardo A.M. Zornoff e Dra. Paula S.A. Gaiola.

À Dra. Priscila P. dos Santos, por toda a amizade, apoio, paciência, sabedoria e disponibilidade em todos os momentos em que precisei e pela contribuição e participação na banca de qualificação e de defesa de dissertação de mestrado.

À Dra. Marina Politi Okoshi pela contribuição e participação na banca de qualificação de mestrado.

À professora Dra. Ana Angélica H. Fernandes do Instituto de Biociências - UNESP, pela realização das análises bioquímicas.

À equipe de laboratório, Amanda, Danielle, Amanda Gomes, Renan, Bruna Camargo, Pamela, Tatiana, Bruna Pereira, Renata por toda a colaboração e em especial ao Seiji por toda a amizade, aprendizado, pelas risadas, companhia e ajuda nos procedimentos dessa pesquisa.

À Dra. Neuza M. A. Hassimotto pela contribuição e participação na banca de defesa de dissertação de mestrado.

A todos os funcionários da UNIPEX que contribuíram para a realização deste trabalho e em especial ao Leandro da histologia.

A todos os funcionários da pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB).

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) de Araraquara pelo fornecimento dos sucos de laranja.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) de Botucatu e a Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) pela minha formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	10
OBJETIVO	16
MATERIAL E MÉTODOS	18
RESULTADOS	27
DISCUSSÃO	38
CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	47

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Peso corporal e dos órgãos.....	28
TABELA 2. Pressão intraventricular esquerda.....	30
TABELA 3. Frequência cardíaca e variáveis estruturais ao Ecocardiograma.....	31
TABELA 4. Variáveis funcionais ao Ecocardiograma.....	31
TABELA 5. Expressão proteica analisada por Western blot.....	33
TABELA 6. Estresse oxidativo miocárdico.....	34
TABELA 7. Metabolismo Energético miocárdico.....	36
TABELA 8. Atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Delineamento experimental	20
FIGURA 2. Ingestão de líquidos e ração antes e após a injeção de doxorubicina	29
FIGURA 3. Resultados ecocardiográficos.....	32
FIGURA 4. Cortes histológicos.....	33
FIGURA 5. Marcador do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes	35
FIGURA 6. Metabolismo energético miocárdico.....	37

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 1. Composição dos sucos de laranja.....	15
---	----

RESUMO

Introdução: A doxorrubicina é um quimioterápico amplamente utilizado e muito eficaz no tratamento de neoplasias, porém pode levar à cardiotoxicidade, o que pode limitar seu uso. Os mecanismos envolvidos no surgimento da cardiotoxicidade são múltiplos, mas o aumento do estresse oxidativo tem papel fundamental. O suco de laranja contém muitos compostos com potencial antioxidante, como os flavonóides. A composição do suco de laranja pode diferir entre as variedades de laranja e isso pode levar a efeitos biológicos diferentes, como maior atividade antioxidante.

Objetivo: Avaliar a influência do suco de laranja Pera (*Citrus sinensis*) e da Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) na cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em ratos.

Material e Métodos: Foram utilizados 120 ratos Wistar machos adultos, que foram alocados em 6 grupos: C, LP, LM, D, DLP, DLM. Os grupos C e D receberam água com maltodextrina para igualar a quantidade de carboidratos dos sucos de laranja. Os grupos LP e DLP receberam suco de laranja Pera e os grupos LM e DLM receberam suco de laranja Moro por 4 semanas. Após, os animais dos grupos D, DLP e DLM receberam injeção de doxorrubicina (20mg/kg, IP) e os animais dos grupos C, LP e LM receberam injeção de salina. Quarenta e oito horas após a injeção de doxorrubicina, os animais foram submetidos ao ecocardiograma, medida da pressão intraventricular esquerda e eutanásia para coleta de material biológico.

Resultados: Os ratos tratados com doxorrubicina ganharam menos peso que os ratos não tratados, provavelmente decorrente da diminuição da ingestão de líquido e ração por esses animais. Também observamos piora da função diastólica e sistólica do ventrículo esquerdo ao ecocardiograma, piora da $+dP/dt$, da $-dP/dt$ e da pressão sistólica máxima durante medida da pressão intraventricular nos animais tratados com a droga. Não observamos presença de infiltrado inflamatório ou alteração da arquitetura tecidual na histologia, bem como na expressão proteica de Bax e Nrf2. A administração de doxorrubicina também aumentou o estresse oxidativo miocárdico e alterou a atividade das enzimas fosfofrutoquinase, β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase, citrato sintase e dos complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. A administração conjunta de suco de laranja e doxorrubicina atenuou a disfunção sistólica e diastólica ao ecocardiograma, o estresse oxidativo e melhorou a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo miocárdico. O suco de laranja Moro se mostrou mais efetivo em melhorar a atividade da citrato sintase, β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase e da glutatona peroxidase.

Conclusão: A suplementação de ambos os tipos de suco de laranja atenuou a disfunção ventricular esquerda, sistólica e diastólica, induzida pela doxorubicina, melhorou o metabolismo energético miocárdico e atenuou o estresse oxidativo. No entanto, o suco de laranja Moro foi mais efetivo que o suco de laranja Pera em modificar a atividade da citrato sintase, β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase e da glutathiona peroxidase.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; metabolismo energético; apoptose; remodelação cardíaca; disfunção cardíaca.

ABSTRACT

Introduction: Doxorubicin is a chemotherapy widely used and very effective in the treatment of neoplasias, but can lead to cardiotoxicity, which may limit its use. The mechanisms involved in the onset of cardiotoxicity are multiple, but the increase of oxidative stress plays a fundamental role. Orange juice contains many compounds with antioxidant potential, such as flavonoids. The composition of orange juice may differ between orange varieties and this may lead to different biological effects such as greater antioxidant activity.

Objective: To evaluate the influence of orange juice Pera (*Citrus sinensis*) and Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) on cardiotoxicity induced by doxorubicin in rats.

Material and Methods: A total of 120 male adult Wistar rats were allocated to 6 groups: C, LP, LM, D, DLP, DLM. Groups C and D received water with maltodextrin to match the amount of carbohydrate in orange juice. The LP and DLP groups received orange Pera juice and the LM and DLM groups received Moro orange juice for 4 weeks. After the animals of groups D, DLP and DLM received injection of doxorubicin (20mg / kg, IP) and the animals of groups C, LP and LM received saline injection. Forty-eight hours after injection of doxorubicin, animals were submitted to echocardiogram, left intraventricular pressure measurement and euthanasia for collection of biological material.

Results: Doxorubicin-treated rats gained less weight than untreated rats, probably due to decreased fluid and feed intake by these animals. We also observed worsening of left ventricle diastolic and systolic function on echocardiography, worsening of $+dP/dt$, $-dP/dt$, and maximal systolic pressure during intraventricular pressure measurement in animals treated with the drug. We did not observe presence of inflammatory infiltrate or alteration of the tissue architecture in the histology, as well as in the protein expression of Bax and Nrf2. The administration of doxorubicin also increased myocardial oxidative stress and altered the activity of the phosphofructokinase, β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, citrate synthase and enzyme complexes of the mitochondrial electron transport chain. Joint administration of orange juice and doxorubicin attenuated systolic and diastolic dysfunction on echocardiogram, oxidative stress and improved the activity of the enzymes involved in myocardial metabolism. Moro orange juice proved to be more effective in improving the activity of citrate synthase, β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and glutathione peroxidase.

Conclusion: Supplementation of both types of orange juice attenuated left ventricular systolic and diastolic dysfunction induced by doxorubicin, improved myocardial energy metabolism and attenuated oxidative stress. However, Moro orange juice was more effective than Pera orange juice in modifying the activity of citrate synthase, β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and glutathione peroxidase.

Keywords: Oxidative stress; energy metabolism; apoptosis; cardiac remodeling; cardiac dysfunction.

INTRODUÇÃO

A incidência de neoplasias vem aumentando em todo o mundo e estima-se que aproximadamente 14,5 milhões de pessoas vivam com o diagnóstico de câncer nos Estados Unidos da América, sendo a segunda causa de morte nesse país após as doenças cardiovasculares (1). Apesar da alta incidência e do elevado potencial de letalidade, a sobrevivência desses pacientes com câncer também tem aumentado de maneira importante, principalmente devido aos avanços nas terapêuticas antitumorais. Em torno de 65% dos adultos diagnosticados com câncer estarão vivos 5 anos após o diagnóstico e 75% das crianças estarão vivas após 10 anos do diagnóstico (2). O aumento da sobrevivência está relacionado ao aumento das chances de surgimento de complicações desses tratamentos. A complicação mais grave do uso dos quimioterápicos é a cardiotoxicidade, relacionada principalmente ao uso das antraciclinas (2).

A Doxorubicina (Doxo) é um dos principais fármacos dessa classe de quimioterápicos e é utilizada no tratamento de diferentes neoplasias malignas, incluindo câncer de mama, leucemias e linfomas (3). Os mecanismos de ação da doxorubicina contra células tumorais envolvem interação com o DNA celular, mitocôndria e membranas biológicas. A ação direta da doxorubicina junto ao DNA ocorre por múltiplos mecanismos, mas podemos destacar sua ligação com a topoisomerase II, impedindo a divisão celular. Além disso, ocorre aumento da taxa de apoptose mediada e não mediada pelo aumento do estresse oxidativo, via ativação da proteína p53 (3).

Apesar de altamente eficaz, a administração da doxorubicina pode levar a diversos efeitos colaterais, como alopecia, neutropenia, neuropatia, náuseas e vômitos. Entretanto o uso da doxorubicina tem sido relacionado também à cardiotoxicidade, seu efeito colateral mais grave. A cardiotoxicidade se manifesta, mais classicamente, como miocardiopatia dilatada e insuficiência cardíaca em semanas a meses após a administração da droga (4). Essa complicação pode ocorrer em 5 a 26% dos pacientes tratados com a medicação, a depender da dose total utilizada, sendo que, atualmente, o limite de dose para uso clínico da doxorubicina é de 450 mg/m² de superfície corporal em adultos e de 300 mg/m² em crianças (2,5). A presença de insuficiência cardíaca piora, por si só, o prognóstico desses pacientes, além de interferir diretamente na qualidade de vida dos mesmos.

Os mecanismos que levam à cardiotoxicidade são múltiplos e incluem alterações nas proteínas de regulação do ferro, liberação de óxido nítrico, alterações na estrutura

e na função mitocondrial, diminuição na síntese de ATP, desregulação do fluxo de cálcio, disfunção endotelial, inflamação, ativação do sistema de ubiquitinação de proteínas, autofagia e apoptose (5). Classicamente, é atribuído ao aumento do estresse oxidativo um papel central na fisiopatologia da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina (4). Mais recentemente, Zhang et al. evidenciaram que uma das bases fisiopatológicas mais importantes da cardiotoxicidade envolve a ligação da doxorubicina com a topoisomerase II β (4). Segundo Zhang et al., a inibição da topoisomerase II β precederia a lesão mitocondrial e o aumento do estresse oxidativo (6).

O estresse oxidativo é caracterizado por desequilíbrio entre a geração de espécies reativas e a capacidade dos sistemas antioxidantes eliminarem essas espécies. Uma das principais fontes geradoras de espécies reativas de oxigênio é o metabolismo mitocondrial (7). A doxorubicina apresenta alta afinidade pela cardiolipina, presente na membrana da mitocôndria (8). A cardiolipina é essencial para a ativação de alguns complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e com a ligação da doxorubicina, esta ativação fica prejudicada, fazendo com que ocorra acúmulo de elétrons desemparelhados e diminuição da geração de ATP. Aproximadamente, 90% do ATP utilizado pelo coração são provenientes da mitocôndria e os cardiomiócitos apresentam em torno de 40% mais mitocôndrias que outros tipos celulares (5). Além disso, o coração apresenta, proporcionalmente, menor concentração de enzimas antioxidantes que outros órgãos (8). Essas características fazem com que o coração esteja mais sujeito ao dano oxidativo induzido pela doxorubicina.

Além das alterações mitocondriais, que podem levar a um déficit energético no miocárdio devido à diminuição da produção de ATP por essa organela, a doxorubicina também interfere em outras vias metabólicas. Estudo prévio utilizando o modelo agudo de cardiotoxicidade evidenciou que a administração de doxorubicina aumentou a atividade da fosfofrutoquinase e da lactato desidrogenase, enzimas envolvidas no metabolismo da glicose, e aumentou a atividade da enzima β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase, envolvida no metabolismo de ácidos graxos (9). Adicionalmente, a administração de doxorubicina diminuiu a atividade da citrato sintase, primeira enzima do ciclo de Krebs (9). Em conjunto, essas modificações metabólicas sugerem que o

déficit energético miocárdico possa ser um grande contribuinte para a disfunção cardíaca que acompanha a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina.

A geração de espécies reativas de oxigênio induzida pela doxorrubicina ocorre também por outras duas vias, além da produção de espécies reativas pela mitocôndria: a enzimática e a mediada pela ligação da droga ao ferro. A via enzimática é caracterizada pela redução da doxorrubicina, dando origem ao radical semiquinona, que é convertido em superóxido e peróxido de hidrogênio (10). Ao se ligar ao Fe^{3+} , a doxorrubicina promove a conversão do Fe^{3+} em Fe^{2+} , que reage com O_2 e também dá origem ao radical superóxido (10). Outra fonte importante de espécies reativas é a partir da reação do óxido nítrico com superóxido, dando origem ao radical peroxinitrito (11).

O sistema enzimático é considerado o principal mecanismo de defesa antioxidante do organismo. Um dos principais fatores de regulação da expressão gênica e proteica dessas enzimas é o Nrf-2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2), que tem sua ação modulada pela sua ligação com a proteína Keap1 (12). Em situações de dano oxidativo, ocorre dissociação da Keap1 e da Nrf-2, que migra para o núcleo e vai estimular a transcrição das enzimas antioxidantes. Já se sabe que a administração aguda de doxorrubicina cursa com diminuição da expressão de Nrf-2 (13).

Além do Nrf-2, a sirtuína 1 (SIRT-1), histona desacetilase dependente de NAD, atua como um regulador crítico em resposta ao estresse oxidativo. A SIRT-1 bloqueia a lesão do sistema cardiovascular através do antagonismo da lesão celular induzida pelo estresse oxidativo e da manutenção da homeostase metabólica no organismo (14).

Há uma forte relação entre aumento do estresse oxidativo e apoptose, porém a doxorrubicina é capaz de induzir apoptose também por ação direta nas proteínas reguladoras da sobrevivência/morte celular. A via intrínseca de ativação de apoptose é mediada pelo citocromo c, que é liberado pela mitocôndria e culmina com a ativação da via das caspases, que são as efetoras finais da apoptose. Por sua vez, a liberação do citocromo c é regulado, basicamente, por duas proteínas: Bcl-2 e Bax. A Bcl-2 é considerada proteína anti-apoptótica, uma vez que previne a abertura de poros mitocondriais, e a Bax é considerada pró-apoptótica, uma vez que estimula a abertura desses poro. Uma das alterações provocadas pela doxorrubicina é a diminuição da expressão de Bcl-2 e aumento da expressão de Bax (15).

Apesar dos sintomas clínicos de insuficiência cardíaca aparecerem, mais frequentemente, semanas a meses após a infusão da doxorubicina, há evidências científicas que o dano ao coração já se inicia imediatamente após a infusão da droga (16–18). Mesmo com todos os avanços já obtidos em relação ao reconhecimento da fisiopatologia da cardiotoxicidade, ainda não há um método sensível para a detecção precoce dessa complicação e nem um tratamento altamente efetivo para a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina (2,19). Assim, a investigação de estratégias que possam atenuar de maneira contundente o curso clínico da cardiotoxicidade ou até mesmo prevenir seu aparecimento tem importância fundamental. Dentre essas estratégias, podemos destacar o consumo de produtos naturais, como o suco de laranja, largamente consumido no mundo todo.

A composição do suco de laranja é determinada pelo tipo de laranja utilizada na sua produção. Assim sendo, os efeitos biológicos do suco de laranja podem ser diferentes a depender da laranja utilizada no seu preparo. A laranja mais comumente utilizada no país para extração de suco é a laranja Pera (*Citrus sinensis*). A composição do suco de laranja Pera encontra-se no quadro 1.

A administração de hesperidina (20) e do suco de laranja (21) provocaram diminuição do estresse oxidativo por funcionarem como “scavenger” de radicais livres. O suco de laranja também mostrou-se capaz de quelar o ferro (22), efeito bastante interessante, pois, como visto anteriormente, um dos principais mecanismos de geração de espécies reativas de oxigênio pela doxorubicina é por meio de reações envolvendo o ferro. Além disso, a administração de hesperidina esteve associada a aumento da expressão gênica de Nrf-2 (23), aumento da expressão proteica de Akt (24), diminuição de caspase-3 e modificações na Bcl-2 e Bax (20), mostrando-se como alternativa efetiva para atenuação da apoptose.

Recentemente, variedades de laranjas sanguíneas, assim denominadas por conta de sua cor avermelhada, vêm ganhando destaque. Os compostos responsáveis pela cor vermelho-violácea dessas laranjas são as antocianinas, que possuem altíssima capacidade antioxidante (25). Uma dessas variedades é a laranja Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), que possui em sua composição quantidades maiores de hesperidina (26) que a laranja Pera e, adicionalmente, possui em torno de 30 mg/L de antocianinas, que não estão presentes na laranja Pera (27), conforme pode ser visto no

quadro 1. Essas diferenças na composição conferem ao suco da laranja Moro maior capacidade antioxidante que o suco das variedades claras, como a Pera.

Quadro 1. Composição dos sucos de laranja

	Citrus sinensis (Laranja Pera)	Citrus sinensis L. Osbeck (Laranja Moro)
Calorias (kcal)	33	144
Carboidratos (g)	7,6	7,8
Vitamina C (mg)	73,3	50
Hesperidina (mg)	110	43,6
Naringina (mg)	0,025	4,8
Antocianinas (mg/L)	0	3,22
β-criptoxantina (g)	1,48	2,68
β-caroteno (mg)	28	42

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, 2011. European Institute of Oncology (EIO) database at <http://www.ieo.it/bda2008/homepage.aspx>. Desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação de flavanonas e psoraleno por claudação em sucos de laranjas de diferentes procedências, 2009. Valores expressos em quantidade por 100ml.

A influência da hesperidina (28) e a naringinina (29), compostos flavanóides presentes no suco de laranja, já se mostraram eficazes para diminuir a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina, no entanto não identificamos estudos que avaliaram o efeito do suco neste modelo. Adicionalmente, outro ponto a ser destacado é que o efeito da combinação dos compostos bioquímicos presentes nos produtos naturais pode ser mais importante do que o efeito de um composto isolado. Isso ocorre devido ao efeito sinérgico ou inibitório entre esses compostos, o que modificaria a ação de um deles isoladamente.

Diante do exposto, elaboramos a hipótese de que o suco da laranja Pera é capaz de atenuar a cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorrubicina em ratos e o suco da laranja Moro tem um efeito mais pronunciado em atenuar essa cardiotoxicidade que o suco da laranja Pera.

OBJETIVO

Avaliar a influência do suco da laranja Pera e do suco de laranja Moro na remodelação cardíaca induzida pela administração aguda de doxorubicina em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

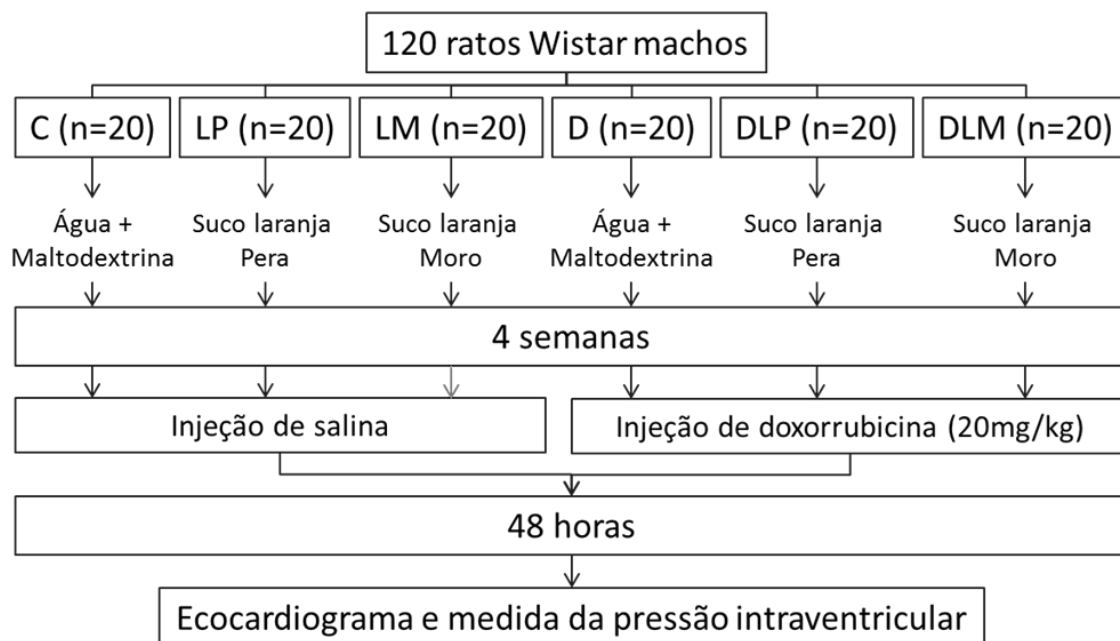
Delineamento experimental

O projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (Processo nº 1211/2017). O número de animais necessários foi determinado por cálculo do tamanho amostral levando-se em consideração a fração de ejeção do ventrículo esquerdo obtido em estudos anteriores. Foram utilizados 120 ratos Wistar machos adultos, com peso corporal de 150 a 300 g, mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com umidade e temperatura controladas, ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso à ração. Foram alocados em 6 grupos, com 20 animais cada: Grupo Controle (C); Grupo suco de Laranja Pera (LP); Grupo suco de Laranja Moro (LM); Grupo Doxorrubicina (D); Grupo Doxorrubicina + suco de Laranja Pera (DLP); Grupo Doxorrubicina + suco de Laranja Moro (DLM).

Com relação à oferta de líquidos, foi feita da seguinte forma: os animais dos grupos C e D receberam água com 100 g de maltodextrina por litro para igualar os carboidratos do suco, à vontade, durante todo o período experimental. Os grupos LP e DLP receberam suco de laranja pasteurizado extraído de laranja Pera, por 4 semanas, à vontade. Os grupos LM e DLM receberam suco de laranja Moro pasteurizado, por 4 semanas, à vontade. Os sucos foram fornecidos pela Fundecitrus, Araraquara-SP, e foram armazenados em freezer a -80°C até o momento de sua utilização. Os líquidos foram trocados a cada 24 horas e a ingestão foi mensurada durante todo o experimento. Após o período de 4 semanas de oferta dos sucos, os animais dos grupos D, DLP e DLM receberam injeção intraperitoneal (IP) de doxorrubicina 20mg/kg, dose única. Os animais dos grupos C, LP e LM receberam injeção IP de salina estéril em volume equivalente. Essa dose de doxorrubicina se mostrou efetiva para provocar lesão cardíaca em estudos anteriores (15–17).

Quarenta e oito horas após a injeção de doxorrubicina ou salina, todos os animais foram submetidos ao ecocardiograma sob anestesia leve (descrita a seguir). Após o ecocardiograma, os animais de cada grupo, foram anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg, IP) e foi realizada a medida da pressão intraventricular esquerda. Em seguida, o tórax foi aberto, o coração retirado, dissecado e armazenado a -80°C para posteriores análises. Além disso, foi coletado sangue de todos os animais, que foi centrifugado para obtenção de soro que também foi armazenado a -80°C. O delineamento experimental encontra-se resumido na figura 1.

Figura 1: Delineamento experimental



C: grupo controle (ingestão de água com maltodextrina); LP: grupo com ingestão de suco de laranja Pera; LM: grupo com ingestão de suco de laranja Moro; D: grupo tratado com doxorubicina; DLP: grupo tratado com doxorubicina + suco de laranja Pera; DLM: grupo tratado com doxorubicina + suco de laranja Moro.

Ecocardiograma

Após o período de observação, os ratos receberam anestesia leve com quetamina (50 mg/kg) e xilazina (1 mg/kg) IP e os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. O exame foi realizado utilizando-se equipamento Vivid S6 (General Electric Medical Systems) com transdutor multifrequencial de 5,0 a 11,5 MHz. Todos os exames foram realizados pelo mesmo examinador que desconhecia o grupo aos quais os animais pertenciam.

As variáveis estruturais foram obtidas por análise bidimensional e foram mensurados: espessuras da parede posterior e do septo interventricular, área do átrio esquerdo e diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole e diástole. Além disso, foi obtido pelo doppler transmitral o pico de velocidade do enchimento diastólico inicial (onda E), pico de velocidade do enchimento diastólico tardio (onda A) e tempo de relaxamento isovolumétrico. O exame foi complementado pela avaliação por doppler tissular dos deslocamentos sistólico (S'), diastólico inicial (E') e tardio (A') do anel mitral na parede lateral e septal.

Com os dados obtidos, foram realizados cálculos da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, relação E/A e relação E/E'.

Medida da pressão intraventricular esquerda

A medida da pressão intraventricular do ventrículo esquerdo foi realizada sob anestesia com tiopental sódico (80 mg/kg, IP). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e foi introduzida agulha 21G abaixo da borda inferior do gradeado costal esquerdo, na linha hemi-clavicular, com a ponta da agulha direcionada para a fúrcula com 15° de inclinação em relação ao plano horizontal. A agulha estava ligada a transdutor de pressão ligado a polígrafo, que registrou a velocidade máxima de decréscimo da pressão ventricular esquerda (-dP/dt; derivada pressão-tempo negativa) e a velocidade máxima de acréscimo da pressão ventricular esquerda (+dP/dt; derivada pressão-tempo positiva). A +dP/dt correlaciona-se com a função sistólica e a -dP/dt correlaciona-se com a função diastólica do ventrículo esquerdo.

Histologia

Após a eutanásia, o ventrículo esquerdo foi seccionado transversalmente 5 mm a partir do ápice e foi obtido anel com 2 mm de espessura. O anel foi colocado em solução de formol tamponado a 10% e permaneceu por 24 a 48 horas. Após esse período, o material foi transferido para solução de etanol a 70% e permaneceu até o momento em que foi processado. As secções foram incluídas em bloco de parafina e posteriormente, cortadas em micrótomo com espessura de 5 µm para confecção das lâminas histológicas, que foram coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram utilizadas para avaliação da estrutura do miocárdio e avaliação de presença de infiltrado inflamatório, segundo método descrito previamente (30).

Western blot

A técnica de Western blot foi utilizada para determinar a expressão proteica de Bax e Nrf-2 no tecido cardíaco.

1) Extração e fracionamento subcelular

Amostras do VE foram homogeneizadas com tampão A contendo 20 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 10 mM de KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 10 mM de benzamidina, 1 mM de ditioneitol, 250 mM de sacarose, além de protease e inibidores de fosfatase, em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington USA) e posteriormente fracionadas por centrifugação diferencial. Resumidamente, o homogenato foi centrifugado duas vezes a 500 g durante 5 min a 4°C, e o pellet (considerada a fração nuclear) foi ressuscitado em tampão A, sonificado 2 vezes de 10s, e armazenado a -80°C. O sobrenadante foi novamente centrifugado, a 10.000 g por 30 min a 4°C. O pellet (considerado a fração mitocondrial) foi ressuscitado em tampão A, sonificado, e armazenada a -80°C. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 100.000 g durante 1 h a 4°C. O sobrenadante resultante foi considerado a fração citoplasmática e armazenada a -80°C. A concentração de proteína total será analisada pelo método de Bradford utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão (31).

2) Eletroforese em gel

Após a quantificação da concentração de proteína, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli (Tris - HCL240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul debromofenol 0,02% e β-mercaptoetanol 200mM) e aquecidas a 100°C por 5 min. Posteriormente, as amostras (contendo 50 µg de proteína total) foram separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris - HCl 240mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris - HCl 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed) a 4°C. A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 5% e a concentração do gel de resolução variou de 10 a 15%, de acordo com o peso molecular da proteína determinada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, Kaleidoscope Prestained Standards (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) e nos poços seguintes os grupos foram pipetados de maneira alternada. A corrida eletroforética foi efetuada a 30 min a 50 V e 2 horas a 120 V (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA) com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

3) Transferência e Bloqueio

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - Trans Blot (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) utilizando - se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 120 min à temperatura ambiente sob constante agitação.

4) Incubação com os Anticorpos primário e secundário

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para cada proteína analisada, diluídos em solução basal. As membranas permaneceram incubadas durante a noite à temperatura de 4°C, sob constante agitação. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas em solução basal pH 8,0 e incubadas com os anticorpos secundários específicos, diluídos também em solução basal. As membranas permaneceram incubadas por 1,5 horas, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Posteriormente a membrana foi lavada em solução 16 basal pH 8,0 e a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência utilizando o Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA. As imagens foram fotografadas no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA). A expressão das proteínas analisadas foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) e beta-actina. A análise das imagens foi realizada no programa de análise de imagens Gel-Pro Analyzer 3.1.

Análise do estresse oxidativo

A análise das defesas antioxidantes foi realizada por meio da determinação das atividades das enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase no tecido cardíaco. A oxidação foi medida por meio da determinação da concentração de hidroperóxido de lipídeo no tecido cardíaco. Amostras de 100 mg de tecido cardíaco foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio (0,01 M) pH 7,4 e a seguir centrifugado a 12000 rpm, por 30 minutos a -4°C, segundo descrito por Pereira et al.

(32). O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas totais na amostra (g/100g de tecido).

- Atividade da Glutathione Peroxidase (GSH-Px) (E.C.1.11.1.9.): foi determinada por meio da técnica descrita por Nakamura et al. (33), em presença de peróxido de hidrogênio. A mistura da reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, azida sódica, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), glutathione reduzida e glutathione redutase. Por meio da oxidação do metileno-tetraidrofolato redutase (NADPH₂) a 340 nm na presença de glutathione redutase, a qual catalisa a redução da glutathione oxidada, foi determinada a atividade da GSH-Px.
- Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) (E.C.1.15.1.1.): foi determinada pela técnica de Crouch et al. (34), tendo como base a capacidade da enzima em inibir a redução de nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais superóxidos gerados pela mistura hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de O²⁻ do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando a amostra for adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra (34).
- Atividade da Catalase (CAT) (EC.1.11.1.6.): foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 0,5mL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). A leitura espectrofotométrica foi realizada a 240 nm (32).
- Concentração de hidroperóxido de lipídeo: foi medido por meio da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe²⁺) medida por hidroperóxido, com 100 µL da amostra e 900 µL de mistura reagente de sulfato ferroso (FeSO₄), 250 µM, ácido sulfúrico (H₂SO₄) 25 mM, xilenol orange 100 µM e butil-hidroxitolueno 4 mM em 90% (v/v) metanol (35).

Análise do metabolismo energético

Aproximadamente 100mg de amostras do VE foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1M pH 7,0) e centrifugadas. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas e a atividade das enzimas do

metabolismo energético. A atividade dos complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons foi determinada após ressuspensão e centrifugação do pellet com tampão fosfato de sódio (0,1M) contendo 250mM de sacarose e 2mM de EDTA (36). As leituras foram realizadas em leitor de microplaca com controle por software. Todos os reagentes foram obtidos do laboratório Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

- Atividade da fosfofrutoquinase (PFK): foi determinada em meio contendo tampão Tris-HCl (50mM pH 8,0), $MgCl_2$, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose-6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH₂ (37).
- Atividade da piruvato desidrogenase (PDH): na presença de tampão fosfato de potássio (50mM pH 7,4) foi determinada a atividade da PDH em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima A, ditioneitol, $MgCl_2$, nitro blue tetrazolium, piruvato de sódio e fenasina metassulfato, onde mediu-se a conversão do piruvato em acetil coenzima A através da velocidade de redução do NAD (37).
- Atividade da beta-hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -OH-acil CoA-DH): determinada na presença de tampão Tris-HCl (0,1M pH 7,0), EDTA, acetoacetil-CoA e NADH (37).
- Atividade da citrato sintase (CS): avaliada pela reação de condensação entre o grupamento acetil da molécula de acetil-CoA e oxaloacetato, reação catalisada pela CS, cuja atividade foi determinada na presença dos substratos acetil-CoA, oxaloacetato e dithiobis-2-nitrobenzoato em tampão fosfato Tris-HCl (50mM pH 8,0) (38).
- Atividade do complexo I: foi determinada em um sistema de reação composto por tampão fosfato de sódio (80mM pH 7,4), EDTA e NADH, onde se monitorou a velocidade de oxidação do NADH (39).
- Atividade do complexo II: foi medida em meio com tampão fosfato de potássio (50mM pH 7,4), contendo succinato de sódio, fenasina metassulfato e 2,6-diclorofenolindofenol, o qual teve absorbância a 600nm (40).

- Atividade da ATP sintase: foi determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50mM pH 8,0), na presença de MgCl₂, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, lactato desidrogenase e piruvato quinase (31).

Análise estatística

Os dados com distribuição normal foram apresentados em média \pm desvio-padrão. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram submetidas à transformação matemática para normalização e também apresentadas em média \pm desvio-padrão. As comparações foram feitas por ANOVA de duas vias. Para todas as análises foi considerada significância estatística de 5%. Quando houve interação entre os fatores suco de laranja e doxorrubicina ($p < 0,05$), foram comparados os grupos de interesse (Cx_D, Cx_{LP}, Cx_{LM}, LPx_{LM}, Dx_{DLP}, Dx_{DLM}, LPx_{DLP}, LMx_{DLM} e DLPx_{DLM}). Quando não houve interação entre os fatores foram apresentados os dados marginais (efeito do suco de laranja isoladamente e efeito da doxorrubicina isoladamente).

RESULTADOS

Peso corporal, peso dos órgãos, ingestão de líquidos e ração

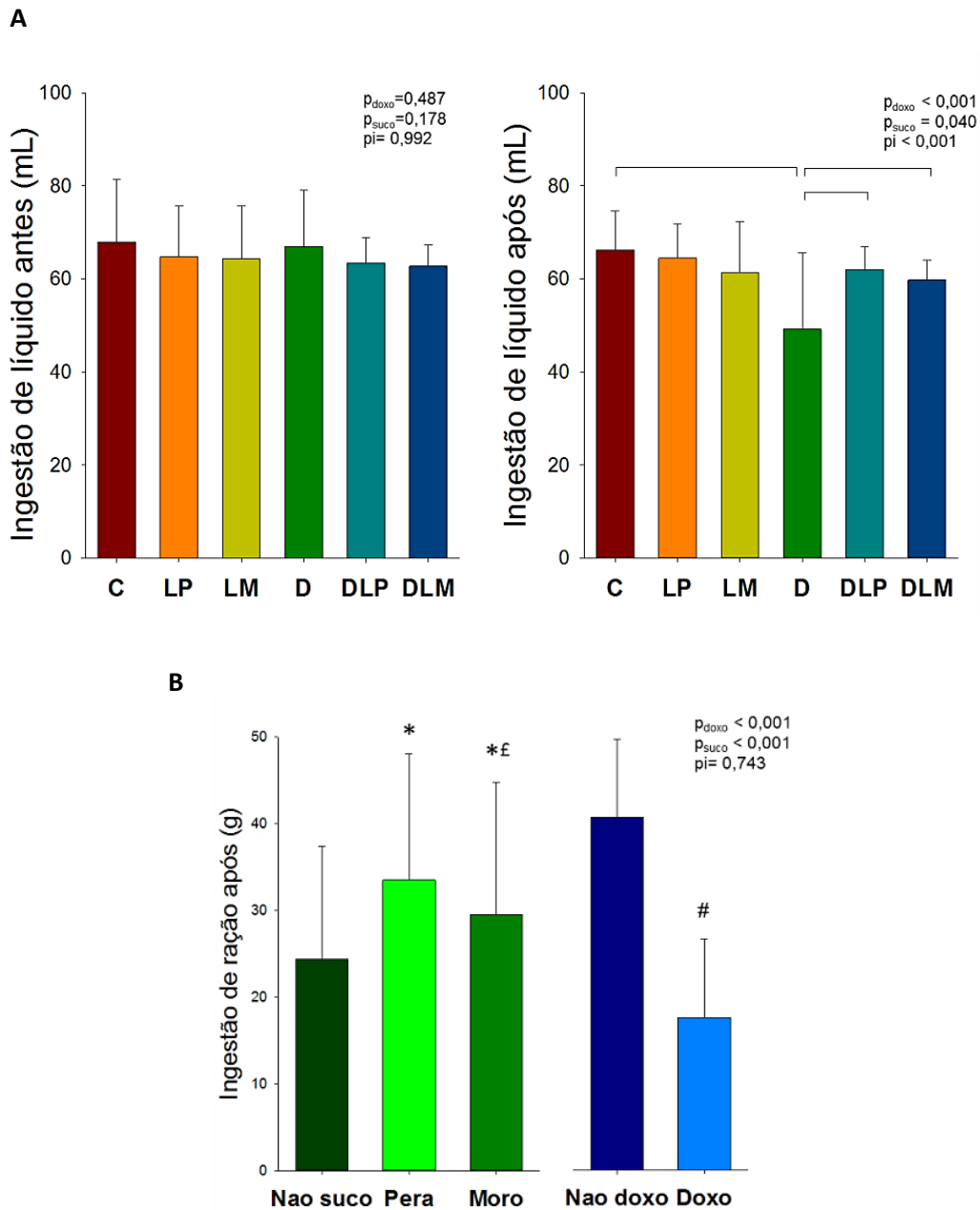
Após a administração da doxorubicina, os animais tratados com a droga apresentaram menor ganho de peso que os animais que não receberam o quimioterápico (tabela 1). Isso ocorreu devido à diminuição da ingestão de ração e também de líquidos pelos animais que receberam a doxorubicina. A ingestão dos dois tipos de suco de laranja e de água com maltodextrina foram semelhantes durante a fase inicial de suplementação dos sucos. Interessantemente, os grupos DLP e DLM apresentaram ingestão líquida maior que o grupo D, evidenciando que a administração de suco preservou o apetite dos animais (figura 2). A doxorubicina levou à diminuição do peso do ventrículo esquerdo, mesmo quando corrigido pelo peso corporal, e aumento do peso do fígado, porém o suco de laranja não modificou esses resultados (tabela 1).

Tabela 1: Peso corporal e dos órgãos

	C (n=20)	LP (n=20)	LM (n=20)	D (n=20)	DLP (n=20)	DLM (n=20)	Pi	Pdoxo	Psuco
Δ peso (g)	-0,13 ± 20,2	10,5 ± 10,2	4,92 ± 23,8	-4,77 ± 19,7	-1,16 ± 11,1	-7,13 ± 23,5	0,617	0,007	0,206
Fígado (g)	11,4 ± 2,0	11,0 ± 1,8	11,0 ± 1,6	13,2 ± 2,4	11,7 ± 1,6	12,5 ± 1,5	0,406	<0,001	0,086
VD (g)	0,20 ± 0,03	0,22 ± 0,06	0,18 ± 0,03	0,23 ± 0,1	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,03	0,056	0,706	0,012
Átrios (g)	0,08 ± 0,14	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,356	0,279	0,313
VE (g)	0,77 ± 0,07	0,73 ± 0,08	0,76 ± 0,23	0,70 ± 0,11	0,65 ± 0,08	0,64 ± 0,07	0,577	<0,001	0,249
VE/peso (mg/g)	2,12±0,35	1,95±0,47	2,19±0,76	1,95±0,21	1,86±0,47	1,90±0,15	0,595	0,026	0,293

C: controle; P: suco de laranja Pera; M: suco de laranja Moro; D: doxorubicina; DP: doxorubicina + suco de laranja Pera; DM: doxorubicina + suco de laranja Moro. Δ peso: Variação do peso corporal imediatamente antes da administração da doxorubicina e 48 horas após a administração da mesma. VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo. Valores apresentados em média ± desvio-padrão. Valor de p: ANOVA de 2 vias. pi: valor de p da interação doxo vs suco; P_{doxo}: valor de p para o fator doxorubicina; P_{suco}: valor de p para o fator suco.

Figura 2: Ingestão de líquidos e ração antes e após a injeção de doxorrubicina



Painel A: O período antes da injeção da doxorrubicina corresponde a média da ingestão nas 4 semanas de suplementação de suco de laranja. O período após compreende as 48 horas após a injeção de doxorrubicina e até o momento da eutanásia. C: grupo controle (ingestão de água com maltodextrina); LP: grupo com ingestão de suco de laranja Pera; LM: grupo com ingestão de suco de laranja Moro; D: grupo tratado com doxorrubicina; DLP: grupo tratado com doxorrubicina + suco de laranja Pera; DLM: grupo tratado com doxorrubicina + suco de laranja Moro. Valor de p: ANOVA de 2 vias. pi: valor de p da interação doxo vs suco; p_{doxo} : valor de p para o fator doxorrubicina; p_{suco} : valor de p para o fator suco. Os colchetes ligam grupos estatisticamente significantes quando houve interação entre os fatores doxorrubicina e suco de laranja.

Painel B: mostra a ingestão de ração no período de 48 horas compreendido entre a injeção da doxorrubicina e a eutanásia. Valor de p: ANOVA de 2 vias. Como não foi observado interação entre os fatores, são apresentados os marginais: *diferente dos animais que não beberam suco; £diferente dos animais que beberam suco de laranja Pera; #diferente dos animais que não receberam doxorrubicina.

Medida da pressão intraventricular do ventrículo esquerdo

A administração da doxorubicina provocou diminuição das derivadas temporais de pressão positivas e negativas (+dP/dt e -dP/dt, respectivamente) e da pressão sistólica máxima, ou seja, disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo (tabela 2). A ingestão de suco de laranja não resultou em melhora dessas variáveis.

Tabela 2: Pressão intraventricular esquerda

	C	LP	LM	D	DLP	DLM	pi	p _{doxo}	p _{suco}
PS max (mmHg)	119 ± 25	103 ± 36	113 ± 25	85 ± 24	86 ± 25	85 ± 26	0,415	<0,001	0,447
+dP/dt (mmHg/s)	6099 ± 1378	4905 ± 1800	5895 ± 1322	3675 ± 1399	4060 ± 1452	3762 ± 1492	0,057	<0,001	0,452
-dP/dt (mmHg/s)	3748 ± 957	2891 ± 1260	3211 ± 943	2687 ± 1039	2503 ± 897	2682 ± 1008	0,340	0,001	0,101

C: controle; P: suco de laranja Pera; M: suco de laranja Moro; D: doxorubicina; DP: doxorubicina + suco de laranja Pera; DM: doxorubicina + suco de laranja Moro. PS max: pressão sistólica máxima; +dP/dt: derivada temporal positiva da pressão, que representa a velocidade máxima de acréscimo da pressão ventricular esquerda e se relaciona com a função sistólica; -dP/dt: derivada temporal negativa da pressão, que representa a velocidade máxima de decréscimo da pressão ventricular esquerda e se relaciona com a função diastólica. Valores expressos em média ± desvio-padrão. Valor de p: ANOVA de 2 vias; pi: valor de p da interação doxo vs suco; p_{doxo}: valor de p para o fator doxorubicina; p_{suco}: valor de p para o fator suco.

Ecocardiograma

Os resultados do ecocardiograma podem ser vistos na figura 3 e tabelas 3 e 4. A frequência cardíaca medida pelo ecocardiograma foi semelhante entre os grupos. Com relação às variáveis estruturais, o uso da doxorubicina levou a aumento do diâmetro e da área do átrio esquerdo e do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, mostrando que o quimioterápico foi capaz de induzir alterações morfológicas no coração. Os grupos DLP e DLM exibiram valores de área do átrio esquerdo e diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo menores que o grupo D, com valores próximos aos dos grupos controles, evidenciando que a suplementação de ambos os tipos de sucos de laranja foi capaz de atenuar as alterações estruturais cardíacas induzidas pela doxorubicina.

Com relação às variáveis funcionais, a doxorubicina levou a aumento da relação E/E' e do tempo de relaxamento isovolumétrico, caracterizando disfunção diastólica. Também foi observado diminuição da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e da onda S' ao doppler tissular nesses mesmos animais, caracterizando a disfunção sistólica. A administração de suco de laranja conjuntamente à administração de doxorubicina melhorou a fração de encurtamento e a relação E/E', sugerindo melhora

da função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo. O efeito dos dois tipos de suco de laranja foi similar.

Tabela 3: Frequência cardíaca e variáveis estruturais ao Ecocardiograma

	C (n=20)	LP (n=20)	LM (n=20)	D (n=20)	DLP (n=20)	DLM (n=20)	pi	p _{doxo}	p _{suco}
PP (mm)	1,50±0,09	1,53±0,08	1,49±0,08	1,47±0,07	1,52±0,08	1,53±0,10	0,260	0,958	0,130
SIV (mm)	1,56±0,09	1,55±0,085	1,57±0,09	1,54±0,11	1,57±0,09	1,60±0,11	0,551	0,547	0,195
AE (mm)	4,34±0,31	4,51±0,32	4,47±0,24	4,85±0,26 [#]	4,54±0,23	4,38±0,95 [§]	0,012	0,077	0,258
DDVE (mm)	6,68±0,59	6,78±0,64	6,71±0,55	6,81±0,55	6,24±0,43 ^{§&}	6,40±0,60	0,030	0,023	0,152
DSVE (mm)	2,60±0,37	2,80±0,55	2,70±0,56	3,54±0,53 [#]	2,72±0,49 [§]	2,83±0,52 [§]	<0,001	<0,001	0,010
AE/Ao	1,22±0,08	1,23±0,09	1,24±0,07	1,33±0,07	1,25±0,08	1,21±0,27	0,120	0,189	0,244
Área AE (cm ²)	17,9±3,03	19,0±3,96	18,3±2,53	22,5±2,69 [#]	18,3±2,67 [§]	19,5±2,54 [§]	<0,001	0,002	0,059
Área AD (cm ²)	14,5±2,42	15,1±2,63	14,1±1,90	15,0±2,26	13,2±2,07 ^{§&}	13,8±1,80	0,046	0,156	0,278
FC (bpm)	323±78	334±67	350±60	310±70	337±58	301±60	0,199	0,103	0,430

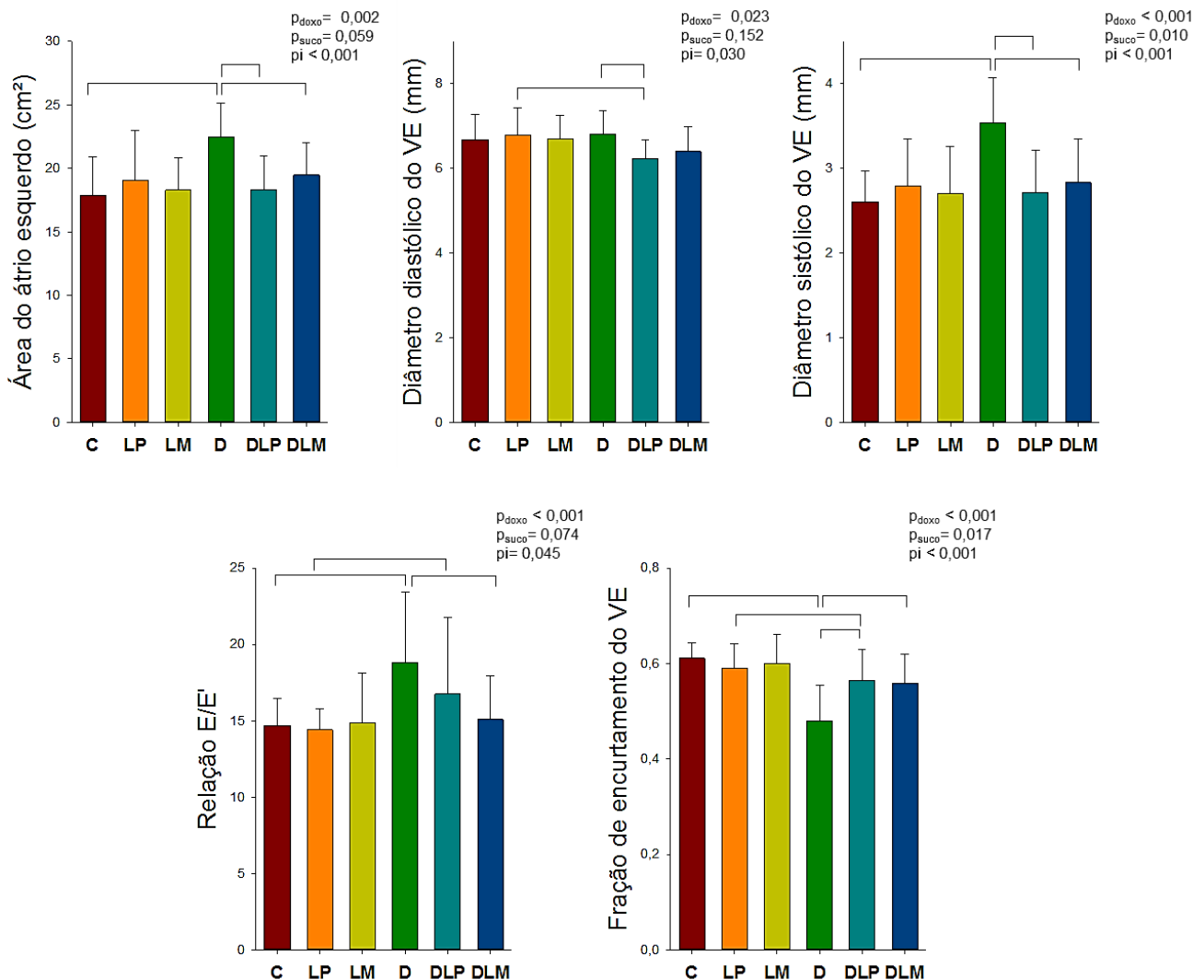
C: controle; P: suco de laranja Pera; M: suco de laranja Moro; D: doxorubicina; DP: doxorubicina + suco de laranja Pera; DM: doxorubicina + suco de laranja Moro. PP: espessura da parede posterior; SIV: espessura do septo interventricular; AE: diâmetro do átrio esquerdo; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DSVE: diâmetro sistólico do VE; Ao: diâmetro da aorta; AD: átrio direito; FC: frequência cardíaca. Valores expressos em média ± desvio-padrão. Valor de p: ANOVA de 2 vias; pi: valor de p da interação doxo vs suco; p_{doxo}: valor de p para o fator doxorubicina; p_{suco}: valor de p para o fator suco; [#]diferente do grupo C; [§]diferente do grupo D; [&]diferente do grupo LP.

Tabela 4: Variáveis funcionais ao Ecocardiograma

	C (n=20)	LP (n=20)	LM (n=20)	D (n=20)	DLP (n=20)	DLM (n=20)	pi	p _{doxo}	p _{suco}
E/A	1,52±0,35	1,58±0,47	1,43±0,19	1,77±0,83	1,39±0,28	1,32±0,363	0,077	0,809	0,039*
TRIV (ms)	23,3±2,22	23,2±2,48	24,1±4,17	26,0±6,78	26,8±4,60	28,1±5,03	0,807	<0,001	0,319
E/E'	14,7±1,76	14,4±1,38	14,9±3,25	18,8±4,66 [#]	16,8±5,04 ^{&}	15,1±2,86 [§]	0,045	<0,001	0,074
S' médio (cm/s)	5,84±0,50	5,90±0,32	5,87±0,47	4,91±0,70	5,38±0,67	5,21±0,47	0,233	<0,001	0,091
FENC	0,61±0,04	0,59±0,05	0,60±0,06	0,48±0,07 [#]	0,57±0,06 [§]	0,56±0,06 ^{§@}	<0,001	<0,001	0,017

C: controle; P: suco de laranja Pera; M: suco de laranja Moro; D: doxorubicina; DP: doxorubicina + suco de laranja Pera; DM: doxorubicina + suco de laranja Moro. E: pico de velocidade do enchimento diastólico inicial obtido pelo doppler transmitral; A: pico de velocidade do enchimento diastólico tardio obtido pelo doppler transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; S': velocidade de fluxo tecidual durante a sístole; E': velocidade de fluxo tecidual durante a fase de enchimento diastólico inicial; FENC: fração de encurtamento do ventrículo esquerdo. Valores expressos em média ± desvio-padrão. Valor de p: ANOVA de 2 vias; pi: valor de p da interação doxo vs suco; p_{doxo}: valor de p para o fator doxorubicina; p_{suco}: valor de p para o fator suco. * diferença entre não tomar suco e tomar suco de laranja Moro; [#]diferente do grupo C; [§]diferente do grupo D; [&]diferente do grupo LP; [@]diferente do grupo LM.

Figura 3: Resultados ecocardiográficos

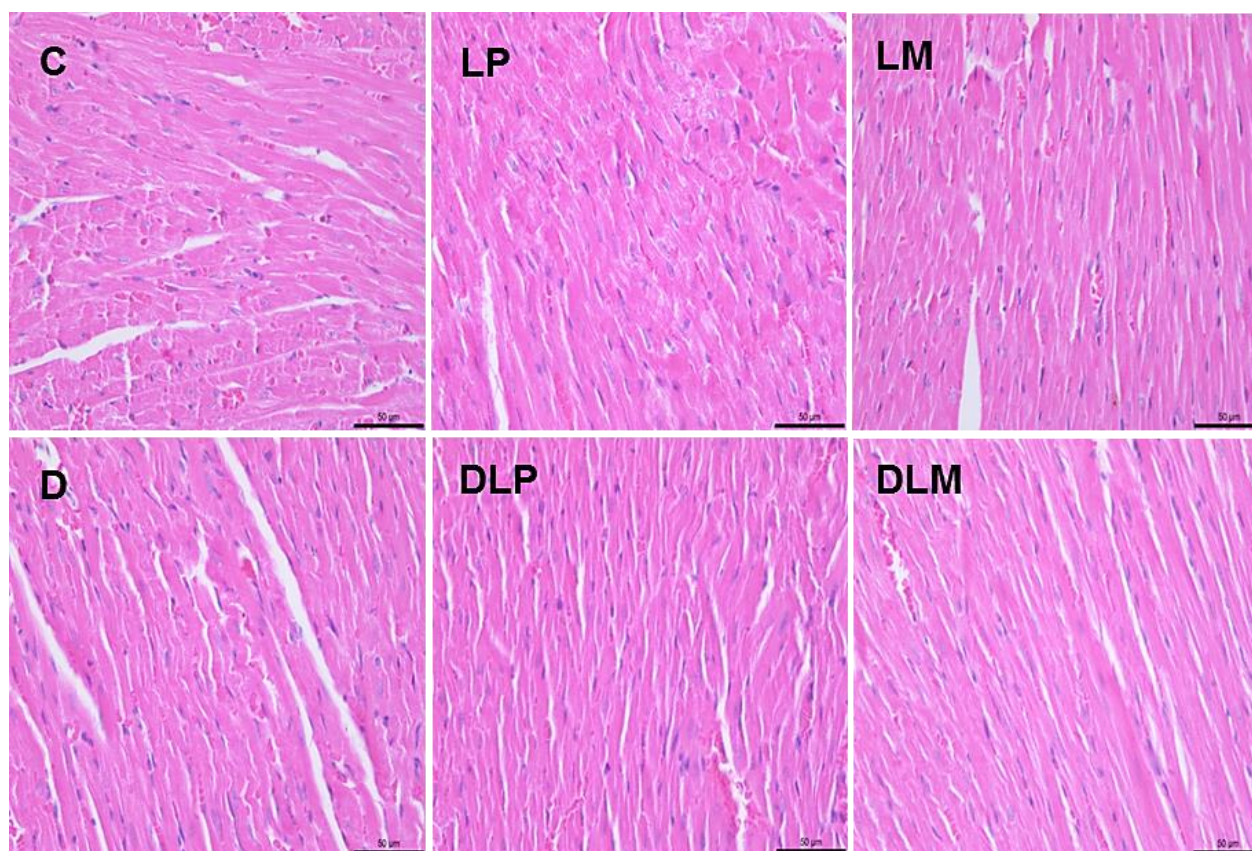


C: grupo controle (ingestão de água com maltodextrina); LP: grupo com ingestão de suco de laranja Pera; LM: grupo com ingestão de suco de laranja Moro; D: grupo tratado com doxorubicina; DLP: grupo tratado com doxorubicina + suco de laranja Pera; DLM: grupo tratado com doxorubicina + suco de laranja Moro. Valor de p: ANOVA de 2 vias; p_{doxo} : valor de p para efeito do fator doxorubicina; p_{suco} : valor de p para efeito do fator suco; π : valor de p para a interação entre os fatores doxorubicina e suco. Os colchetes ligam grupos estatisticamente diferentes quando $\pi < 0,05$.

Histologia

A análise qualitativa das lâminas histológicas coradas por HE não evidenciou presença de infiltrado inflamatório ou alteração da arquitetura tecidual do miocárdio em nenhum grupo (figura 4).

Figura 4: Cortes histológicos



C: controle; P: suco de laranja Pera; M: suco de laranja Moro; D: doxorubicina; DP: doxorubicina + suco de laranja Pera; DM: doxorubicina + suco de laranja Moro. Lâminas coradas por hematoxilina e eosina e fotografadas em aumento de 40 vezes. Não foram observadas diferenças na arquitetura tecidual ou presença de infiltrado inflamatório entre os grupos.

Western Blot

Em relação à expressão proteica de Bax e Nrf2, não observamos diferenças entre os grupos, conforme pode ser visto na tabela 5.

Tabela 5: Expressão proteica analisada por Western blot

	C (n=8)	LP (n=8)	LM (n=8)	D (n=8)	DLP (n=8)	DLM (n=8)	pi	p _{doxo}	p _{suco}
Bax	1,02±0,03	0,92±0,22	1,02±0,06	0,90±0,35	1,04±0,14	1,16±0,32	0,200	0,443	0,237
Nrf2	1,04±0,21	1,36±0,70	1,33±0,55	0,99±0,24	1,05±0,30	1,09±0,10	0,348	0,128	0,660

C: controle; P: suco de laranja Pera; M: suco de laranja Moro; D: doxorubicina; DP: doxorubicina + suco de laranja Pera; DM: doxorubicina + suco de laranja Moro. Expressão proteica de Bax foi normalizada pela proteína β -actina e a expressão proteica de Nrf2 foi normalizada pela proteína GAPDH. Valores expressos em média \pm desvio-padrão, em unidades arbitrárias. Valor de p: ANOVA de 2 vias; pi: valor de p da interação doxo vs suco; p_{doxo}: valor de p para o fator doxorubicina; p_{suco}: valor de p para o fator suco.

Estresse oxidativo miocárdico

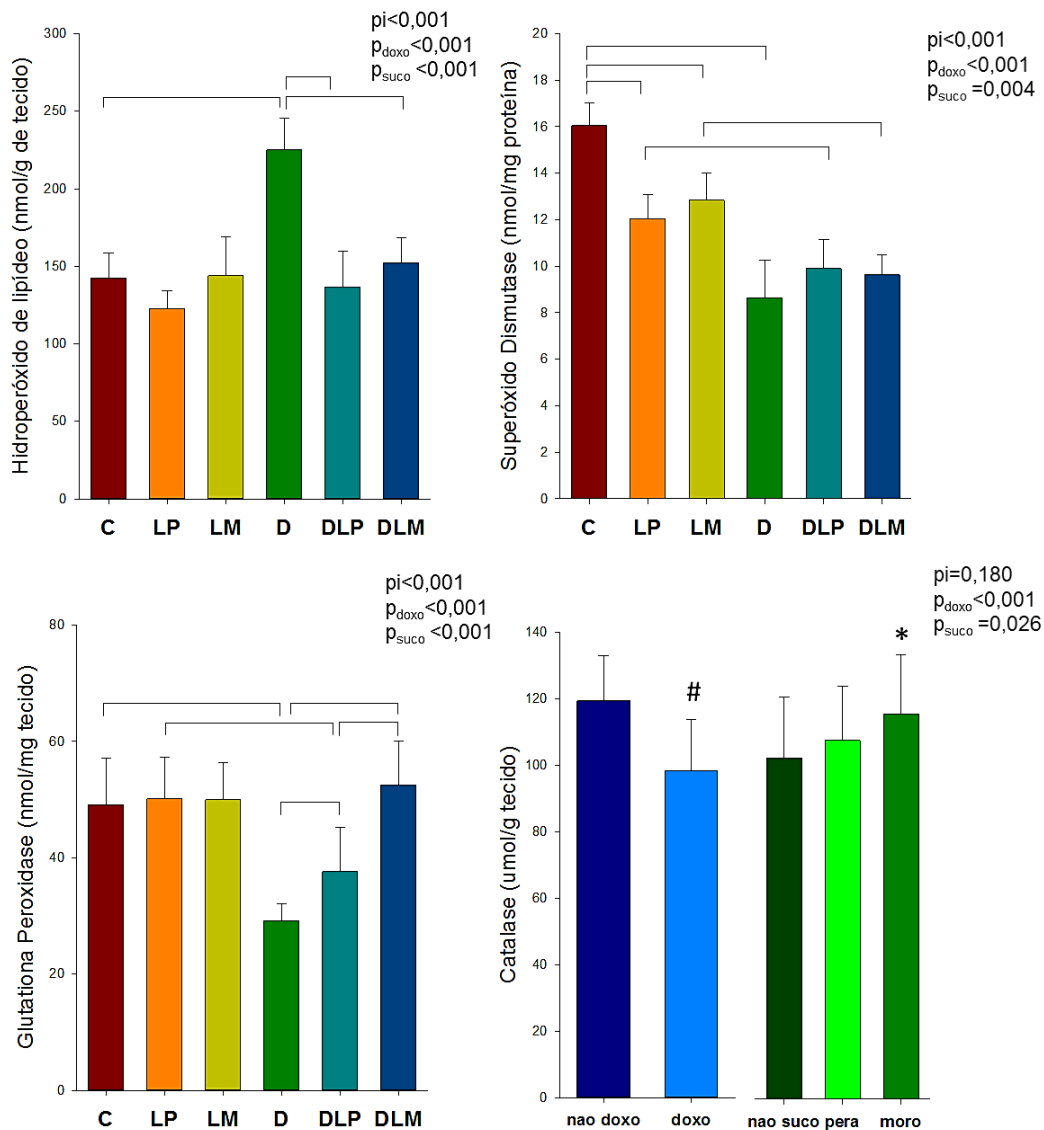
A administração de doxorrubicina provocou aumento do estresse oxidativo no coração evidenciado por meio da concentração de hidroperóxido de lipídeo. Acompanhando o aumento do estresse oxidativo, tivemos menor atividade da catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase nesses mesmos animais. A administração de ambos os tipos de suco de laranja melhorou os valores de hidroperóxido de lipídeo, demonstrando que ambos os sucos foram capazes de atenuar o dano oxidativo miocárdico. Os sucos de laranja não conseguiram melhorar a atividade da superóxido dismutase, entretanto, foram capazes de melhorar a atividade da glutatona peroxidase e o suco de laranja Moro teve um efeito mais pronunciado que o suco de laranja Pera em relação à atividade da glutatona peroxidase (tabela 6).

Tabela 6: Estresse oxidativo miocárdico

	C (n=8)	LP (n=8)	LM (n=8)	D (n=8)	DLP (n=8)	DLM (n=8)	pi	p _{doxo}	p _{suco}
HL (nmol/g de tecido)	142±16,4	123±20,2	144±23,1	225±25,3 [#]	136±11,7 [§]	152±16,0 [§]	<0,001	<0,001	<0,001
SOD (nmol/mg proteína)	16±1,0	12±1,6 [#]	13±1,3 [#]	9±1,2 [#]	10±1,0 ^{&}	10±0,8 [@]	<0,001	<0,001	0,004
CAT (µmol/g tecido)	119±9,7	116±7,4	124±12,9	87±15,3	100±15,7	108±17,1	0,180	<0,001	0,026*
GSH-Px (nmol/mg tecido)	49±8,0	50±3,0	50±7,6	29±6,4 [#]	38±7,2 ^{§&}	52±7,6 ^{§%}	<0,001	<0,001	<0,001

C: grupo controle (ingestão de água com maltodextrina); LP: grupo com ingestão de suco de laranja Pera; LM: grupo com ingestão de suco de laranja Moro; D: grupo tratado com doxorrubicina; DLP: grupo tratado com doxorrubicina + suco de laranja Pera; DLM: grupo tratado com doxorrubicina + suco de laranja Moro. HL: hidroperóxido de lipídeo; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GSH-Px: glutatona peroxidase. Valores expressos em média ± desvio-padrão. Valor de p: ANOVA de 2 vias; pi: valor de p da interação doxo vs suco; p_{doxo}: valor de p para o fator doxorrubicina; p_{suco}: valor de p para o fator suco. * diferença entre não tomar suco e tomar suco de laranja Moro. Quando pi<0,05, os seguintes símbolos indicam: [#]diferente do grupo C; [§]diferente do grupo D; [&]diferente do grupo LP; [@]diferente do grupo LM; [%]diferente do grupo DLP.

Figura 5: Marcador do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes



C: grupo controle (ingestão de água com maltodextrina); LP: grupo com ingestão de suco de laranja Pera; LM: grupo com ingestão de suco de laranja Moro; D: grupo tratado com doxorubicina; DLP: grupo tratado com doxorubicina + suco de laranja Pera; DLM: grupo tratado com doxorubicina + suco de laranja Moro. Valor de p: ANOVA de 2 vias; pi: valor de p da interação doxo vs suco; p_{doxo} : valor de p para o fator doxorubicina; p_{suco} : valor de p para o fator suco. Os colchetes ligam grupos estatisticamente significantes quando houve interação entre os fatores doxorubicina e suco de laranja ($p < 0,05$). Em relação à catalase, como não houve interação entre os fatores, são apresentados os marginais: #diferente de não receber doxorubicina; * diferente de não tomar suco.

Metabolismo energético miocárdico

Os animais tratados com doxorubicina apresentaram aumento da atividade da fosfofrutoquinase e diminuição da atividade da β -hidroxiacil Co-A desidrogenase, indicando aumento do metabolismo de glicose e diminuição no metabolismo de lipídeo pelo miocárdio. Além disso, o tratamento com doxorubicina diminuiu a atividade da piruvato desidrogenase e da citrato sintase. A administração de ambos os sucos de

laranja foi capaz de atenuar a alteração da atividade da fosfofrutoquinase, entretanto, somente o suco de laranja Moro melhorou a atividade da β -hidroxiacil Co-A desidrogenase e da citrato sintase, cuja atividade ficou muito próxima do grupo C (tabela 7).

Em relação à atividade dos complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, a doxorrubicina diminuiu a atividade do complexo I, II e da ATP sintase. Ambos os sucos de laranja foram capazes de melhorar a atividade da ATP sintase (tabela 8).

Tabela 7: Metabolismo energético miocárdico

	C (n=8)	LP (n=8)	LM (n=8)	D (n=8)	DLP (n=8)	DLM (n=8)	pi	p _{doxo}	p _{suco}
PFK (nmol/gtecido)	122±26,2	142±40,3	112±25,2	191±43,3 [#]	113±23,2 [§]	174±49,3 ^{§@}	<0,001	0,002	0,088
β-OH-acilCoA-DH (nmol/mg proteína)	37±7,9	41±10,3	35±6,3	24±6,3 [#]	27±7,7 ^{&}	36±4,7 ^{§%}	0,008	<0,001	0,217
PDH (nmol/g tecido)	310±24,9	263±29,9 [#]	280±42,8	231±13,8 [#]	233±26,5 ^{&}	248±31,7 [@]	0,040	<0,001	0,099
CS (nmol/mg proteína)	22±4,9	21±2,8	22±4,9	13±2,5 [#]	14±2,0 ^{&}	23±2,7 ^{§%}	<0,001	<0,001	<0,001

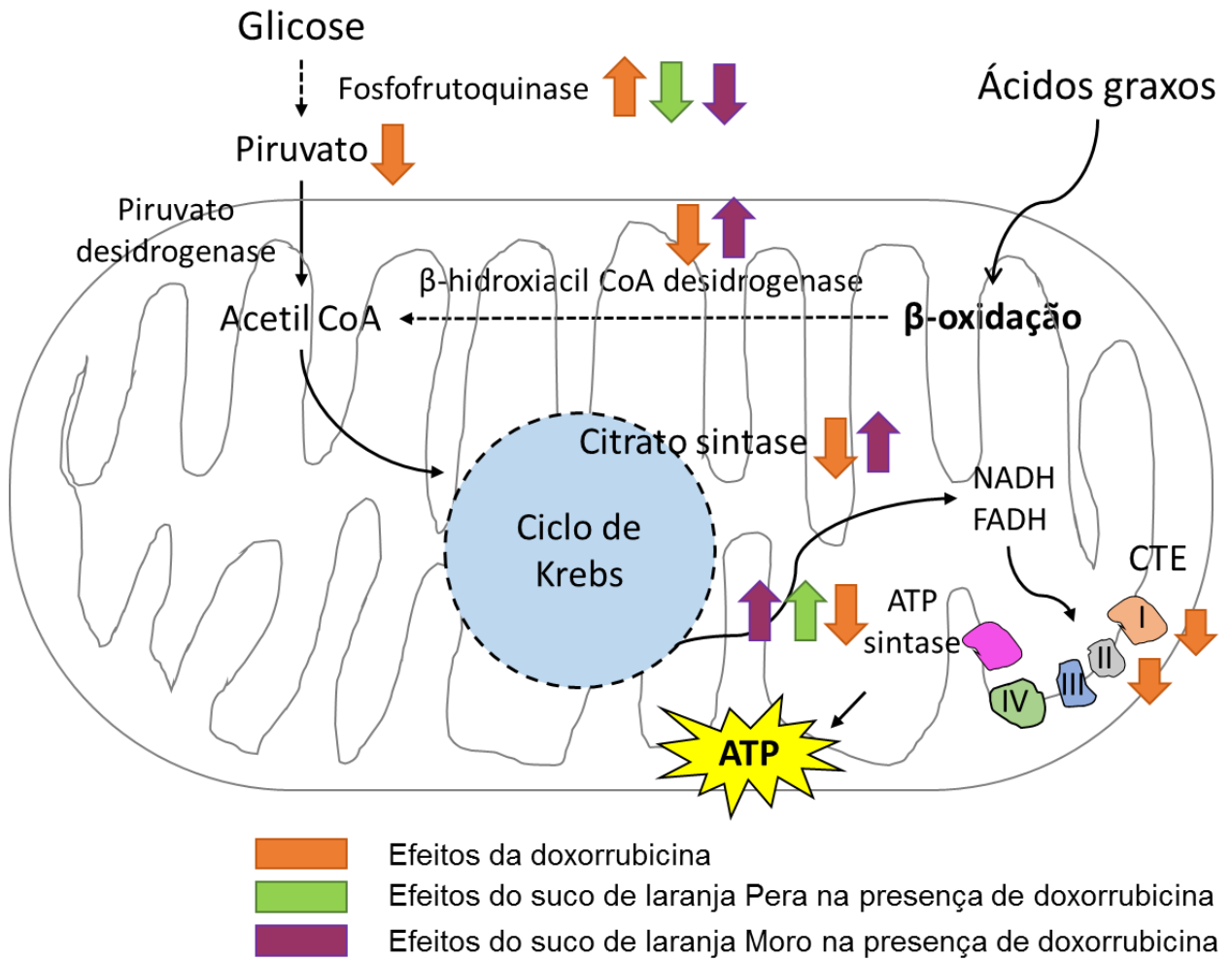
Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. C: grupo controle (ingestão de água com maltodextrina); LP: grupo com ingestão de suco de laranja Pera; LM: grupo com ingestão de suco de laranja Moro; D: grupo tratado com doxorrubicina; DLP: grupo tratado com doxorrubicina + suco de laranja Pera; DLM: grupo tratado com doxorrubicina + suco de laranja Moro. PFK: fosfofrutoquinase; β -OH-acilCoA-DH: β -hidroxiacil-coenzimaA-desidrogenase; PDH: piruvato desidrogenase; CS: citrato sintase. Valores expressos em média \pm desvio-padrão. Valor de p: ANOVA de 2 vias; pi: valor de p da interação doxo vs suco; p_{doxo}: valor de p para o fator doxorrubicina; p_{suco}: valor de p para o fator suco. Quando pi<0,05, os seguintes símbolos indicam: [#]diferente do grupo C; [§]diferente do grupo D; [&]diferente do grupo LP; [@]diferente do grupo LM; [%]diferente do grupo DLP.

Tabela 8: Atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial

	C (n=8)	LP (n=8)	LM (n=8)	D (n=8)	DLP (n=8)	DLM (n=8)	pi	p _{doxo}	p _{suco}
Complexo I (nmol/mg proteína)	4,14±1,13	2,53±0,75 [#]	2,54±0,49 [#]	2,08±0,65 [#]	1,85±0,29	1,96±0,40	0,005	<0,001	<0,001
Complexo II (nmol/mg proteína)	2,78±0,50	3,04±0,64	2,71±0,67	2,18±0,48	1,93±0,46	2,35±0,40	0,140	<0,001	0,954
ATP sintase (nmol/mg proteína)	4,16±0,90	7,49±1,67 [#]	5,80±1,04 ^{#&}	2,42±0,47 [#]	5,50±1,29 ^{§&}	6,07±0,85 [§]	0,011	<0,001	<0,001

C: controle; P: suco de laranja Pera; M: suco de laranja Moro; D: doxorrubicina; DP: doxorrubicina + suco de laranja Pera; DM: doxorrubicina + suco de laranja Moro. Valores expressos em média \pm desvio-padrão. Valor de p: ANOVA de 2 vias; pi: valor de p da interação doxo vs suco; p_{doxo}: valor de p para o fator doxorrubicina; p_{suco}: valor de p para o fator suco. Quando pi<0,05, os seguintes símbolos indicam: [#]diferente do grupo C; [§]diferente do grupo D; [&]diferente do grupo LP.

Figura 6: Metabolismo energético miocárdico



DISCUSSÃO

A doxorubicina foi capaz de induzir cardiotoxicidade evidenciada por alterações bioquímicas, como aumento do estresse oxidativo e modificações no metabolismo energético miocárdico, e também alterações morfológicas e da função sistólica e diastólica ao ecocardiograma. A cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina foi atenuada pela administração de ambos os tipos de suco de laranja, uma vez que observamos melhora da função cardíaca, diminuição do estresse oxidativo e mudança do metabolismo energético para próximo de situações fisiológicas nos animais tratados com os sucos. Adicionalmente, o suco de laranja Moro foi mais efetivo que o suco de laranja Pera em modificar a atividade da citrato sintase, β -hidroxiacil CoA desidrogenase e glutathiona peroxidase.

Nesse estudo nós pudemos observar diminuição da ingestão de ração e de suco de laranja após a introdução da doxorubicina, o que já era esperado, uma vez que a doxorubicina induz inapetência, náuseas, vômitos e irritação da mucosa do trato gastrointestinal, como ocorre em pacientes humanos (41). Também observamos diminuição do peso corporal dentre os animais tratados com doxorubicina, como já foi visto anteriormente em outros estudos (41,42). Provavelmente, a diminuição do peso foi secundária a menor ingestão de líquido, uma vez que o tempo decorrido entre a administração de doxorubicina e a eutanásia foi muito curto para ser decorrente da diminuição da ingestão de ração.

Em relação ao peso dos órgãos, houve aumento do peso do fígado nos animais que receberam a doxorubicina, que pode ser devido à hepatotoxicidade induzida por essa droga (7), e diminuição do peso do VE, mesmo quando corrigido pelo peso corporal. Apesar dessa diminuição do peso do VE, observamos alterações estruturais ao ecocardiograma, como aumento do diâmetro do átrio esquerdo e do diâmetro sistólico do VE, indicando que houve remodelação cardíaca (9). A remodelação cardíaca é caracterizada por alterações bioquímicas, moleculares e intersticiais que cursam com alteração na geometria e consequente disfunção do órgão (9). Os animais tratados com doxorubicina apresentaram remodelação cardíaca, uma vez que, acompanhando as alterações morfológicas já citadas, observamos disfunção sistólica (diminuição da FENC e da onda S' média) e diastólica (aumento da área do AE, do TRIV e da relação E/E') do VE induzida pela doxorubicina.

A função cardíaca é determinada de maneira importante pelas variáveis hemodinâmicas, como a volemia (7). Interessantemente, os animais que receberam os

sucos apresentaram manutenção da ingestão líquida, o que pode ter contribuído para manutenção da volemia desses animais e melhora dos parâmetros funcionais ao ecocardiograma. Entretanto, acreditamos que a hipovolemia não foi o único determinante na piora da função cardíaca, uma vez que, em situações de hipovolemia, espera-se que haja diminuição das dimensões do átrio esquerdo e do VE na diástole (9), o oposto do que ocorreu nos nossos animais. Portanto, os sucos de laranja contribuíram para manutenção da volemia e também atuaram, possivelmente, em outras vias determinantes da lesão miocárdica.

No metabolismo energético normal do coração, há maior utilização de lipídeos como substrato energético, e menor utilização de glicose, sendo assim mais produtivo, uma vez que o metabolismo dos lipídeos gera mais ATP que o metabolismo da glicose. Porém, em uma situação de agressão, ocorre o inverso, o coração muda o metabolismo pra economizar a energia que está deficitária, passando a utilizar uma maior quantidade de glicose, pois o metabolismo lipídico necessita de 10% a 12% a mais de oxigênio do que o da glicose para gerar a mesma quantidade de ATP (7).

No entanto, cronicamente, essa mudança leva a alguns malefícios como, por exemplo, o acúmulo de lipídeos dentro da célula e lipotoxicidade. O processo de lipotoxicidade tem um papel crítico na disfunção cardíaca, embora os mecanismos não sejam bem compreendidos. A apoptose induzida por lipotoxicidade desempenha um papel importante na disfunção cardíaca. Nessa situação, os ácidos graxos não oxidados serão armazenados em triglicerídeos que se acumulam no interior da célula (7).

De fato, a administração de doxorrubicina levou a diminuição da atividade da β -OH-acil CoA-DH e aumento da atividade da PFK. A β -OH-acil CoA-DH é uma das principais enzimas responsáveis pela oxidação de ácidos graxos em acetil-CoA (7,9). A administração de ambos os sucos de laranja conjuntamente com a administração de doxorrubicina melhorou a atividade β -OH-acil CoA-DH e da PFK, entretanto, o grupo DLM apresentou maior atividade da β -OH-acil CoA-DH que o grupo DLP, mostrando que os sucos de laranja permitiram a manutenção do metabolismo energético próximo a de situações fisiológicas, porém com efeito mais pronunciado do suco de laranja Moro.

A administração do suco de laranja Moro também melhorou a atividade da citrato sintase nos animais tratados com doxorrubicina, efeito benéfico que não foi observado

com o suco de laranja Pera. A citrato sintase é a primeira enzima do ciclo de Krebs e converte acetil-CoA em citrato, e dará origem a NADH e FADH₂ ao final do ciclo, que servirão como substrato para a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (7) (9). Esta cadeia é composta de 5 complexos enzimáticos, denominados I, II, III, IV e V (ATP sintase). Frente a uma situação de agressão, ocorre piora da função dos complexos enzimáticos que fazem o transporte de elétrons com consequente acúmulo de elétrons desemparelhados (9).

Com o acúmulo de elétrons desemparelhados, irá ocorrer reação destes com os lipídeos das membranas e consequente formação de hidroperóxido de lipídeo, sendo este composto considerado um marcador do dano oxidativo celular (43). A lesão dos lipídeos de membrana faz com que ocorra perda da permeabilidade, alteração da fluidez das membranas, provocando menor seletividade no transporte iônico e na sinalização transmembrana, o que prejudica o transporte celular e, em última instância, pode induzir lise e morte celular (apoptose) (9). Já é sabido que a doxorrubicina induz aumento de hidroperóxido de lipídeo e que este aumento está relacionado à cardiotoxicidade induzida por esta droga (9), bem como prejudica a atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial (5,9).

Em nosso estudo, observamos que os animais que receberam doxorrubicina apresentaram diminuição da atividade do complexo I, II e da ATP sintase. Acompanhando a piora a atividade dos complexos enzimáticos mitocondriais, houve aumento da concentração de hidroperóxido de lipídeo e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GSH-Px. A SOD converte o radical superóxido a peróxido de hidrogênio, que posteriormente é convertido em água pela CAT e GSH-Px, e é considerada a primeira linha de defesa para proteger a mitocôndria contra os efeitos deletérios dos radicais superóxido em condições fisiológicas e patológicas (44). Sabe-se que a doxorrubicina consome rapidamente a glutatona (3) e a suplementação de glutatona se mostrou benéfica em atenuar o dano cardíaco, como foi mostrado em estudos in vitro e in vivo (45).

É importante ressaltarmos que o Nrf2 é um dos mais importantes reguladores da produção de enzimas antioxidantes. O Nrf2 é um fator presente no citoplasma celular que atua na resposta primária à citotoxicidade e ao estresse oxidativo. Ele se liga ao elemento de resposta antioxidante no DNA estimulando a transcrição de diversas enzimas antioxidantes, entre elas a superóxido dismutase e a catalase. Frente à

agressão, o Nrf2 se dissocia da proteína Keap1 e vai até o núcleo onde estimula a produção de proteínas antioxidantes e então codifica proteínas como glutathione e glutathione peroxidase. Depois de atuar no núcleo, ele volta ao citoplasma onde é degradado (45,46).

Apesar de observarmos diminuição da atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase nos animais tratados com doxorubicina, não detectamos modificações na expressão proteica de Nrf2 em nosso estudo. Nosso resultado difere de outros estudos, em que a doxorubicina aumentou a expressão de Nrf2 (47). Talvez esses resultados controversos possam ser atribuídos ao nosso modelo agudo de lesão cardíaca, em que não houve tempo para o suco de laranja modular fatores transcricionais após a agressão, como o Nrf2.

Conforme o esperado, a administração de ambos os sucos de laranja nos animais tratados com doxorubicina levou à diminuição do hidroperóxido de lipídeo e aumento da atividade da glutathione peroxidase. Interessantemente, observamos que o suco de laranja Moro teve efeito mais pronunciado em melhorar a atividade da glutathione peroxidase que o suco de laranja Pera. Esses efeitos benéficos do suco em relação ao estresse oxidativo também podem ter contribuído para a melhora funcional do coração.

Sabe-se que os compostos flavonoides mais importantes do suco de laranja são a hesperidina e naringina, que já se mostraram eficazes na diminuição da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina (28,29). Esses dois componentes apresentam também atividade antioxidante muito importante, atuando na eliminação de radicais livres (20,48). Esses compostos também protegem as lipoproteínas de baixa densidade contra a oxidação induzida por macrófagos, impedindo a geração de hidroperóxidos lipídicos e preservando o R-tocoferol, um antioxidante endógeno transportado nas lipoproteínas (48). Outro componente importante encontrado no suco de laranja é o ácido ascórbico (vitamina C), considerado um dos antioxidantes naturais mais poderosos e com menor toxicidade. O ácido ascórbico já se mostrou eficaz em sequestrar as espécies reativas e em soluções aquosas elimina eficientemente as espécies reativas de óxido de nitrogênio (49).

Do ponto de vista clínico, os efeitos do suco de laranja e seus compostos já foram estudados em pacientes com hepatite C, com síndrome metabólica e doença arterial periférica e com risco cardiovascular aumentado. O consumo regular de suco

de laranja por pacientes com hepatite C sob terapia antiviral melhorou a capacidade antioxidante no soro, o perfil lipídico e os marcadores inflamatórios hepáticos (50). Em pacientes com síndrome metabólica, o suco de laranja de outra variedade vermelha apresentou propriedades antiinflamatórias, antioxidantes e hipolipemiantes, que poderiam atenuar essa síndrome (51). A suplementação de suco de laranja também reduziu os marcadores de inflamação em pacientes com doença arterial periférica (52).

A avaliação do efeito da fração flavonóide de sucos de laranja sobre o estresse oxidativo induzido por H₂O₂ em células epiteliais humanas do pulmão, descobriu-se que extratos de suco de laranja reduzem a geração de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica da membrana, melhoram a funcionalidade mitocondrial e previnem o dano oxidativo do DNA (53).

Adicionalmente, alguns estudos provaram que os extratos ricos em flavonóides do suco de laranja seriam capazes de se ligar ao Fe³⁺ prevenindo sua redução, necessária para desencadear a reação de Fenton e a cascata radical, melhorando assim as funções mitocondriais. Os complexos formados pelos flavonóides do suco de laranja com o ferro foram efetivos na redução de espécies reativas intracelulares e, conseqüentemente, dos danos oxidativos de fosfolípidos membranares e DNA (54).

Com relação aos efeitos do suco de laranja Moro, em um estudo com indivíduos não diabéticos com risco cardiovascular aumentado, o consumo durante sete dias de suco de laranja vermelho melhorou a função endotelial e reduziu significativamente as concentrações de marcadores inflamatórios como a proteína C-reativa de alta sensibilidade, IL-6 e TNF- α (55). Em um outro estudo, o suco também se mostrou efetivo em impedir a síndrome metabólica, diminuindo a lipoproteína de baixa densidade, proteína C-reativa no soro, a resistência à insulina e a pressão arterial sistólica em voluntários com peso normal, enquanto a pressão arterial diastólica diminuiu em voluntários com excesso de peso após a intervenção (56).

Como já visto anteriormente, a laranja Moro apresenta grandes quantidades de antocianinas, um diferencial não encontrado na laranja Pera. Um estudo com células de fígado de rato sugeriu que as antocianinas possam reduzir indiretamente o estresse oxidativo, ativando enzimas específicas de desintoxicação como a glutatona redutase, glutatona peroxidase, glutatona S-transferase e quinona oxidoreductase (57), o que possivelmente possa justificar o efeito mais pronunciado do

suco de laranja Moro em melhorar a atividade da glutathione peroxidase em nosso estudo.

O aumento do estresse oxidativo está relacionado a apoptose. Essa relação se dá de várias formas, como por exemplo, a alteração na permeabilidade da membrana e mudanças da atividade de bombas iônicas na membrana plasmática, conforme já citado anteriormente (9). Além disso, o aumento do estresse oxidativo culminará com aumento do influxo de cálcio intracelular e também para o interior da mitocôndria com consequente liberação de citocromo c por essa organela (9). O citocromo C é uma proteína localizada na mitocôndria, que é liberada no interior da célula onde interage com procaspase-9, levando a ativação da caspase-3, conhecidamente indutora de apoptose (58). Alguns estudos experimentais mostraram que a doxorubicina é capaz de aumentar a expressão e atividade de caspase-3, tanto aguda quanto cronicamente (58).

A regulação da apoptose também depende da concentração de proteínas, como Bax e Bcl-2. A formação de dímeros Bax-Bax cria poros na membrana mitocondrial e facilita a liberação de citocromo c, estimulando, por sua vez, a apoptose; a formação de dímeros Bcl2-Bax previne a formação destes poros, inibindo apoptose (59). Após a administração de doxorubicina ocorre aumento da relação Bax/Bcl-2, constituindo importante estímulo apoptótico (59). Diferentemente do esperado, em nosso estudo, não observamos diferenças na expressão proteica de Bax.

Apesar de, aparentemente, o suco de laranja Moro ter tido um efeito benéfico mais pronunciado que o suco de laranja Pera em relação ao estresse oxidativo e ao metabolismo energético, esses efeitos não foram suficientes para provocar diferenças significativas em relação à função cardíaca.

Uma das limitações no nosso estudo foi não termos analisado os metabólitos do suco de laranja no soro desses animais, uma vez que poderia nos trazer informações a cerca da homogeneidade da ingestão dos dois tipos de suco. Outra limitação é a dificuldade de fazer a translação dos nossos resultados benéficos obtidos em animais muito pequenos (ratos) para humanos. Apesar dos dois tipos de animais compartilharem algumas vias, o metabolismo do rato diverge em alguns pontos do metabolismo humano, além do tamanho diminuto do rato dificultar a adaptação das doses utilizadas em nosso estudo para humanos.

CONCLUSÃO

A suplementação de ambos os tipos de suco de laranja atenuou a disfunção ventricular esquerda, sistólica e diastólica, induzida pela doxorubicina, melhorou o metabolismo energético miocárdico e atenuou o estresse oxidativo. No entanto, o suco de laranja Moro foi mais efetivo que o suco de laranja Pera em modificar a atividade da citrato sintase, β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase e da glutatona peroxidase.

REFERÊNCIAS

1. Corremans R, Adão R, De Keulenaer GW, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. Update on pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018.
2. Vejpongsa P, Yeh ET. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:938-945.
3. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004;56:185-229.
4. Altena R, Perik PJ, van Veldhuisen DJ, de Vries EG, Gietema JA. Cardiovascular toxicity caused by cancer treatment: strategies for early detection. *Lancet Oncol*. 2009;10:391-399.
5. Renu K, V G A, P B TP, Arunachalam S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy - An update. *Eur J Pharmacol*. 2018; 818:241-253.
6. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*. 2012;18:1639-1642.
7. Santos PP, Oliveira F, Ferreira VC, Polegato BF, Roscani MG, Fernandes AA, et al. The role of lipotoxicity in smoke cardiomyopathy. *Plos One*. 2014; 2:e113739.
8. Ghigo A, Li M, Hirsch E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863:1916-1925.
9. Carvalho PB, Gonçalves AF, Alegre PH, Azevedo PS, Roscani MG, Bergamasco CM, Modesto PN, Fernandes AA, Minicucci MF, Paiva SA, Zornoff LAM, Polegato BF. Pamidronate Attenuates Oxidative Stress and Energetic Metabolism Changes but Worsens Functional Outcomes in Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Cell Physiol Biochem*. 2016;40:431-442.

10. Sterba M, Popelova O, Vavrova A, Jirkovsky E, Kovarikova P, Gersl V, et al. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18:899-929.
11. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Batkai S, Kashiwaya Y, Hasko G, Liaudet L, et al. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296:466-483
12. Howden R. Nrf2 and cardiovascular defense. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:104-308.
13. Thompson KL, Rosenzweig BA, Zhang J, Knapton AD, Honchel R, Lipshultz SE, et al. Early alterations in heart gene expression profiles associated with doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;66:303-314.
14. Chong ZZ, Wang S, Shang YC, Maiese K. Targeting cardiovascular disease with novel SIRT1 pathways. *Future Cardiol*. 2012;8:89–100.
15. Pilco-Ferreto N, Calaf GM. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2016;49:753-762.
16. Polegato BF, Minicucci MF, Azevedo PS, Carvalho RF, Chiuso-Minicucci F, Pereira EJ, et al. Acute doxorubicin-induced cardiotoxicity is associated with matrix metalloproteinase-2 alterations in rats. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35:1924-1933.
17. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res*. 2002;62:4592-4598.
18. Zhu W, Soonpaa MH, Chen H, Shen W, Payne RM, Liechty EA, et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway. *Circulation*. 2009;119:99-106.

19. Sawyer DB. Anthracyclines and heart failure. *N Engl J Med.* 2013;368:1154-1156.
20. Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life Sci.* 2015;124:64–74.
21. Ghanim H, Sia CL, Upadhyay M, Korzeniewski K, Viswanathan P, Abuaysheh S, et al. Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. *Am J Clin Nutr.* 2010;91:940-949.
22. Ferlazzo N, Visalli G, Cirimi S, Lombardo GE, Laganà P, Di Pietro A, et al. Natural iron chelators: Protective role in A549 cells of flavonoids-rich extracts of Citrus juices in Fe(3+)-induced oxidative stress. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2016;43:248-256.
23. Tanaka T, Tanaka M, Kuno T. Cancer chemoprevention by citrus pulp and juices containing high amounts of beta-cryptoxanthin and hesperidin. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:516981.
24. Rizza S, Muniyappa R, Iantorno M, Kim JA, Chen H, Pullikotil P, et al. Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial function and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:782-792.
25. Liobikas J, Skemiene K, Trumbeckaite S, Borutaite V. Anthocyanins in cardioprotection: A path through mitochondria. *Pharmacol Res.* 2016;113:808-815.
26. Barreca D, Bellocco E, Leuzzi U, Gattuso G. First evidence of C- and O-glycosyl flavone in blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidant properties. *Food Chem.* 2014;149:244-252.
27. Grosso G, Galvano F, Mistretta A, Marventano S, Nolfo F, Calabrese G, et al. Red Orange: Experimental Models and Epidemiological Evidence of Its Benefits on Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:157240.

28. Trivedi PP, Kushwaha S, Tripathi DN, Jena GB. Cardioprotective effects of hesperetin against doxorubicin-induced oxidative stress and DNA damage in rat. *Cardiovasc Toxicol.* 2011;11:215-225.
29. Subburaman S, Ganesan K, Ramachandran M. Protective role of naringenin against doxorubicin-induced cardiotoxicity in a rat model: histopathology and mRNA expression profile studies. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2014;33:363-376.
30. Goncalves AF, Congio LH, dos Santos PP, Rafacho BP, Pereira BL, Claro RF, et al. Pamidronate attenuates diastolic dysfunction induced by myocardial infarction associated with changes in geometric patterning. *Cell Physiol Biochem.* 2015;35:259-269.
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;7:248-254.
32. Pereira B, Costa-Rosa LF, Bechara EJ, Newsholme P, Curi R. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adrenalectomized rats. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31:827-833.
33. Zakowski JJ, Tappel AL. Purification and properties of rat liver mitochondrial glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1975; 526:65-76.
34. Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GM, Buse MG, et al. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes.* 1981;30:235-241.
35. Diniz YS, Rocha KK, Souza GA, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, et al. Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006;543:151-157.

36. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.*1996;328:309-316.
37. Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem.* 1969;10:198-206.
38. Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and alphaslycerophosphate dehydrogenases. *Methods Biochem Anal.*1974;22:123-175.
39. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.*1985;153:23-36.
40. Desai VG, Weindruch R, Hart RW, Feuers RJ. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys.*1996;333:145-151.
41. Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Leśniewski-Kmak K. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention--review of the literature. *Med Sci Monit.* 2000;6:411-420.
42. Melo IM, Oliveira MS, Melo MM. Avaliação das alterações cardiotóxicas decorrentes do uso da doxorubicina: estudo experimental em ratos. *Rev Med.* 2012;22:1-48.
43. Miyamoto, S. Hidroperóxido de lipídios como fonte biológica de oxigênio singlete: estudos com marcação isotópica, espectrométrica de massa e luminescência. *Usp, São Paulo, SP, 344p. (Tese de Doutorado) 2005.*
44. Das KC, Muniyappa H. Age-dependent mitochondrial energy dynamics in the mice heart: role of superoxide dismutase-2. *Experimental gerontology.* 2013;48(9):947-959.
45. Rajasekaran NS, Varadharaj S, Khanderao GD, et al. Sustained activation of nuclear erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element signaling promotes

reductive stress in the human mutant protein aggregation cardiomyopathy in mice. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14:957-971.

46. Pi J, Bai Y, Reece JM, et al. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: Role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic Biol Med*. 2007;42:1797-1806.

47. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev*. 2014;34:106-135.

48. Barreca D, Gattuso G, Bellocco E, Calderaro A, Trombetta D, Smeriglio A. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *Biofactors*. 2017;43:495-506.

49. Guarnieri S, Riso P, Porrini M. Orange juice vs vitamin C: effect on hydrogen peroxide-induced DNA damage in mononuclear blood cells. *Br J Nutr*. 2007;97:639-643.

50. Gonçalves D, Lima C, Ferreira P, Costa P, Costa A, Figueiredo W, Cesar T, et al. Orange juice as dietary source of antioxidants for patients with hepatitis C under antiviral therapy. *Food Nutr Res*. 2017;61:1296675.

51. Simpson EJ, Mendis B, Macdonald IA. Orange juice consumption and its effect on blood lipid profile and indices of the metabolic syndrome; a randomised, controlled trial in an at-risk population. *Food Funct*. 2016;7:1884-1891.

52. Dalgård C, Nielsen F, Morrow JD, Enghusen-Poulsen H, Jonung T, Hørder M, Supplementation with orange and blackcurrant juice, but not vitamin E, improves inflammatory markers in patients with peripheral arterial disease. *Br J Nutr*. 2009;101:263-269.

53. Ferlazzo N, Visalli G, Cirimi S, Lombardo GE, Laganà P, Di Pietro A, et al. Natural iron chelators: Protective role in A549 cells of flavonoids-rich extracts of Citrus juices in Fe(3+)-induced oxidative stress. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016;43:248-256.
54. Barreca D, Gattuso G, Bellocco E, Calderaro A, Trombetta D, Smeriglio A, et al. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *Biofactors*. 2017;43:495-506.
55. Buscemi S, Rosafio G, Arcoleo G, Mattina A, Canino B, Montana M, et al. Effects of red orange juice intake on endothelial function and inflammatory markers in adult subjects with increased cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr*. 2012;95:1089-1095.
56. Silveira JQ, Dourado GK, Cesar TB. Red-fleshed sweet orange juice improves the risk factors for metabolic syndrome. *Int J Food Sci Nutr*. 2015;66:830-836.
57. Shih PH, Yeh CT, Yen GC. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J Agric Food Chem*. 2007;55:9427-9435.
58. Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, Murakoshi N, Iemitsu M, Miyauchi T, et al. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J Pharmacol Sci*. 2006;101:151-158.
59. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res*. 2002;62:4592-4598.