

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/02/2021.



**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 Mestra 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 doxorubicina 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. Doxorubicina. 3. Estresse oxidativo. 4. Laranja. 5. Suco de laranja.

Palavras-chave: Cardiotoxicidade; Doxorubicina; 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!

AGRADECIMENTO

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 doxorrubicina, 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 glutational 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 sobrevida 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 sobrevida 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 Doxorrubicina (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 doxorrubicina contra células tumorais envolvem interação com o DNA celular, mitocôndria e membranas biológicas. A ação direta da doxorrubicina 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 doxorrubicina pode levar a diversos efeitos colaterais, como alopecia, neutropenia, neuropatia, náuseas e vômitos. Entretanto o uso da doxorrubicina 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 doxorrubicina 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 doxorrubicina (4). Mais recentemente, Zhang et al. evidenciaram que uma das bases fisiopatológicas mais importantes da cardiotoxicidade envolve a ligação da doxorrubicina 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 doxorrubicina 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 doxorrubicina, 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 doxorrubicina.

Além das alterações mitocondriais, que podem levar a um déficit energético no miocárdio devido à diminuição da produção de ATP por essa organela, a doxorrubicina também interfere em outras vias metabólicas. Estudo prévio utilizando o modelo agudo de cardiotoxicidade evidenciou que a administração de doxorrubicina 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 doxorrubicina 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.

CONCLUSÃO

A suplementação de ambos os tipos de suco de laranja atenuou a disfunção ventricular esquerda, sistólica e diastólica, induzida pela doxorrubicina, 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 glutational 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 adrenomedullated 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 alphasglycerophosphate 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.