

RESUMO DO ARTIGO

Efeitos anti-inflamatórios
e antioxidantes da
diosmetina-3-O- β -D-glicuronídeo,
o principal metabólito da diosmina:
Evidências de modelos *ex vivo* de pele humana.

Sylvie Boisnic
Marie-Christine Branchet
Barbara Quioc-Salomon
Julie Doan
Catherine Delva
Célia Gendron



Acesso para
artigo completo.



1. INTRODUÇÃO

A Doença Venosa Crônica (DVC) é uma condição comum que afeta até 80% da população mundial. Sua etiologia exata permanece incerta, mas alterações estruturais na parede venosa e nas válvulas têm sido relatadas como causadoras de refluxo venoso e/ou obstrução, induzindo a hipertensão venosa.

A hipertensão venosa crônica induz o **estresse pressórico sobre a parede venosa** que podem levar ao **recrutamento e adesão de leucócitos**. Isto pode desencadear uma **cascata inflamatória**, e, potencialmente, levar ao **aumento adicional da insuficiência valvar e da própria hipertensão venosa**. O sequestro de leucócitos também pode **diminuir a perfusão capilar local e induzir a geração de radicais livres**, criando um ambiente **oxidativo que promove a inflamação e dificulta a cicatrização**. **Portanto, sugere-se que a inflamação e estresse oxidativo desempenhem um papel crucial no início e desenvolvimento da DVC.**

A diosmina, um flavonoide natural, é considerada o tratamento de escolha da DVC. Os efeitos benéficos da diosmina são atribuídos às suas **propriedades anti-inflamatórias**, particularmente através da redução da adesão de leucócitos e da produção de citocinas; e à sua **atividade antioxidante**, que envolve a eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Após a ingestão, a diosmina é rapidamente hidrolisada por enzimas da microbiota intestinal em sua forma aglicona, a diosmetina livre. Em seguida, a diosmetina é absorvida e **metabolizada em glicoconjugados**. Entre eles, a **diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo** que foi identificada como o principal metabólito circulante da diosmina.

O objetivo deste estudo foi **avaliar o potencial anti-inflamatório e antioxidante da diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo** em diferentes concentrações, utilizando explantes de pele humana saudável mantidos vivos em cultura de órgão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultura de explantes de pele humana

Explantes de pele humana saudável foram obtidos de 22 doadores adultos. Os fragmentos foram divididos e submetidos à estimulação através de **exposição ao estresse por substância P (SP) ou radiação UVB** (figura 1).

Cada explante foi fragmentado em amostras de peso igual para o cultivo de cada grupo, respectivamente:

- **Grupo 1:** grupo controle **não estimulado e sem tratamento**.
- **Grupo 2:** grupo **estimulado e sem tratamento**.
- **Grupo 3:** grupo **estimulado e com tratamento em 5 diferentes concentrações de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo**.

No total, foram usados 66 fragmentos, 22 em cada grupo, e o tempo de cultura foi de 3 dias, correspondendo ao tempo em que os fragmentos estiveram em contato com a diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo.

2.2. Diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo

A diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo foi adicionada ao meio de cultura em 5 concentrações diferentes, uma vez ao dia em D0, D1 e D2, no momento da renovação do meio de cultura:

- 300 pg/mL.
- 900 pg/mL.
- 2.700 pg/mL (concentração estimada para ser alcançada após a **ingestão oral de 600 mg de diosmina pura**).
- 8.500 pg/mL (concentração estimada para ser alcançada após a **ingestão oral de 450 mg de diosmina micronizada**).
- 17.000 pg/mL (concentração estimada para ser alcançada após a **ingestão oral de 900 mg de diosmina micronizada**).

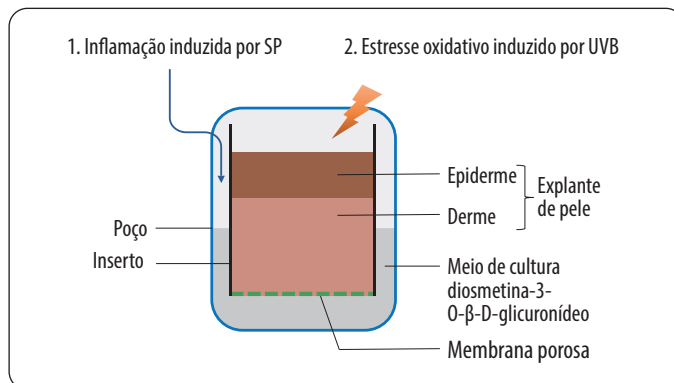


Figura 1. Modelo experimental: os fragmentos de explante de pele foram colocados com a epiderme voltada para cima sobre a membrana porosa dos inserts de cultura de tecido, e inseridos nos poços com meio de cultura. Os fragmentos de pele foram expostos à substância P (SP) ou à radiação UVB, e depois a diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo foi adicionada ao meio de cultura em diferentes concentrações.

2.3. AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA: modelo de inflamação induzida pela substância P

A **substância P (SP)** é o principal neuropeptídeo desencadeador de respostas inflamatórias na pele, e foi utilizada neste modelo para **reproduzir o processo de inflamação** neurogênica nos fragmentos de explantes de pele humana cultivados.

- **D0:** Indução do modelo inflamatório (SP) + início do tratamento com diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo
- **D1:** Reexposição à SP + continuidade do tratamento
- **D2:** Manutenção do tratamento com o metabólito (sem nova exposição à SP)
- **D3:** Análises de desfechos inflamatórios e oxidativos

• **Ensaio bioquímico:** Quantificação da interleucina-8 (IL-8, citocina pro-inflamatória) em pg/mL encontrada no sobrenadante da cultura e determinada por imunoensaio enzimático ELISA.

• **Análise histológica:** Análise da dilatação capilar por quantidade de capilares dilatados e área da superfície do lúmen capilar nos vasos.

2.4. AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE: modelo de estresse oxidativo induzido por UVB

Os fragmentos de explante de pele foram irradiados no dia 0 (D0) com uma fonte de UVB de 6 J/cm². Imediatamente após a irradiação, adicionou-se diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo ao meio de cultura.

As culturas foram interrompidas em D3, e cada fragmento de explante de pele exposto à radiação UVB foi dividido ao meio. Cada metade foi utilizada para a avaliação de um marcador de estresse oxidativo.

- **Análise imunohistoquímica:** metade dos fragmentos foram submetidos a análise por imunofluorescência com a marcação verde para a detecção de dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPDs) por contagem de células positivas, refletindo danos ao DNA induzidos por UVB.

- **Ensaio bioquímico:** a outra metade dos fragmentos foi submetida a análise por espectrofotometria para a quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os resultados são expressos em μmols de H₂O₂ por mg de tecido.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito anti-inflamatório da diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo após estresse inflamatório com SP

ENSAIO BIOQUÍMICO: avaliação do nível de IL-8

A produção do marcador inflamatório IL-8 pelas células do tecido em cultura foi avaliada por imunensaio. Os resultados indicam que a SP provocou a inflamação do tecido, **induzindo um aumento significativo na secreção de IL-8 (p<0,0001) no grupo estimulado e sem tratamento (grupo 2) em comparação ao grupo controle não estimulado (grupo 1).**

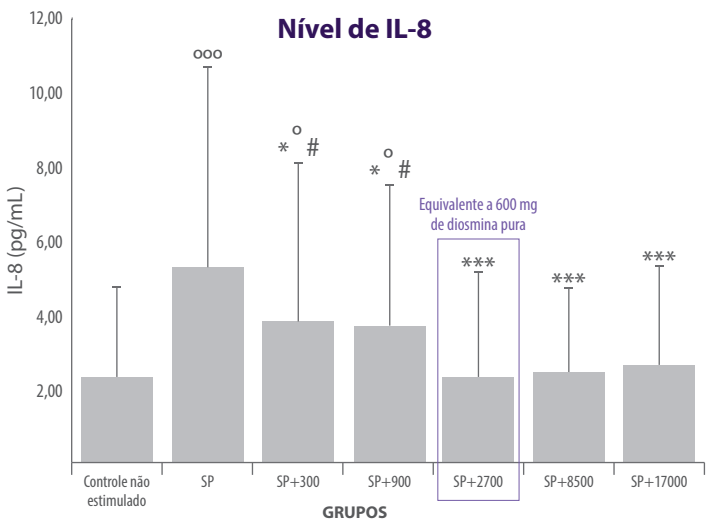
- Com a adição de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo foi observada a **diminuição de até 49,6% nos níveis de IL-8 (p<0,05)**, em comparação com fragmentos de pele estimulados com SP **não expostos ao metabólito da diosmina (grupo 2).**

- O **máximo efeito anti-inflamatório** foi observado na concentração de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo 2.700 pg/mL (**associada ao uso de 600 mg de diosmina pura**) (figura 2).

- Concentrações **mais baixas de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo** estiveram associadas a **níveis** significativamente mais **elevados de IL-8**, e **concentrações mais altas** (equivalentes à ingestão das doses de 450 e 900 mg de diosmina micronizada) **não ultrapassaram o limiar anti-inflamatório observado com 2.700 pg/mL** (figura 2).

- **Não foi observado efeito anti-inflamatório adicional com o aumento da concentração acima do equivalente a 600 mg de diosmina pura** (figura 2).

- A partir da concentração de 2.700 pg/mL, os níveis de IL-8 se assemelharam ao controle não estimulado (grupo 1) (figura 2).



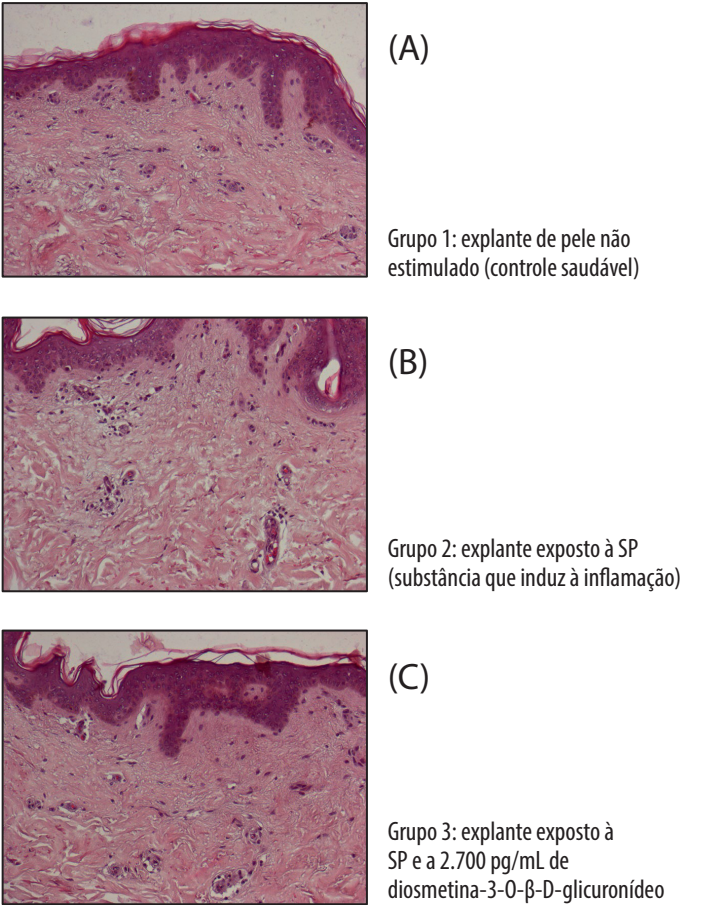
Adaptado de Boisnic *et al.*, 2023.

Figura 2. Efeito anti-inflamatório da diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo: níveis de IL-8 no sobrenadante de fragmentos de explantes de pele (n = 22 fragmentos por grupo), não estimulados ou estimulados por substância P (SP) e expostos a diferentes concentrações de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo. Os valores são expressos como média, e as barras

representam o desvio padrão (DP). Os símbolos indicam que o tratamento é significativamente diferente do controle não estimulado em ° p<0,05 e °°° p<0,0001, significativamente diferente de SP em * p<0,05 e *** p<0,0001, e significativamente diferente de SP + 2700 em # p<0,05.

ANÁLISE HISTOLÓGICA: avaliação da dilatação capilar

O grau de dilatação dos vasos capilares foi analisado por imuno-histoquímica após cultura, comparando-se o controle não estimulado (figura 3 - A), os fragmentos estimulados com SP e não tratados (figura 3 - B), e os estimulados com SP e tratados com diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo (figura 3 - C).



Adaptado de Boisnic *et al.*, 2023.

Figura 3. Observação imuno-histoquímica dos fragmentos de explantes de pele. (A). Explante de pele não estimulado. (B). Explante estimulado, exposto à SP. (C). Explante de pele estimulado e tratado com 2.700 pg/mL de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo. O efeito vasoconstritor da diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo é observado com a concentração referente à dose de 600 mg de diosmina pura.

A exposição ao SP resultou em **vasodilatação**, que foi associada a um **aumento significativo na área transversal luminal média dos capilares** e na **porcentagem de capilares dilatados** em comparação com os valores determinados nos fragmentos de pele do grupo controle **não estimulado (grupo 1).**

- Na presença de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo, o diâmetro do lúmen capilar **diminuiu 48,6%.**

- A quantidade de capilares dilatados apresentou **redução de até 33,5%, em comparação com a observada em explantes expostos apenas a SP (p<0,0001).**

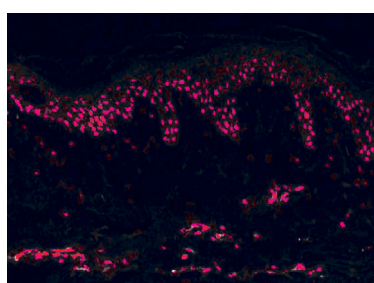
3.2. Efeito antioxidante da diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo: proteção contra a liberação de radicais livres após dano do sistema microvascular induzido por UVB

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA: avaliação de células CPD-positivas

Após estimulação com irradiação UVB, o tecido dos fragmentos de pele foi avaliado quanto à presença de CPD no DNA das células, através da identificação por microscopia de fluorescência.

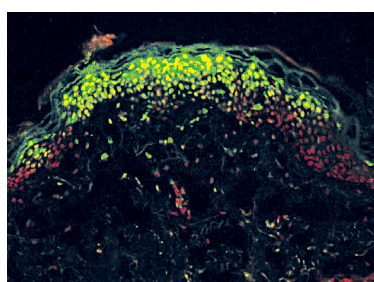
No grupo controle estimulado (grupo 2), foi observado que a **irradiação UVB induziu um aumento acentuado no número de células CPD-positivas**. Enquanto no grupo controle não estimulado (grupo 1), 97,7% das células apresentavam-se CPD-negativas.

Com a adição do tratamento com diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo aos fragmentos de pele expostos à UVB, foi observada uma **diminuição significativa na porcentagem de células CPD-positivas** (figura 4).



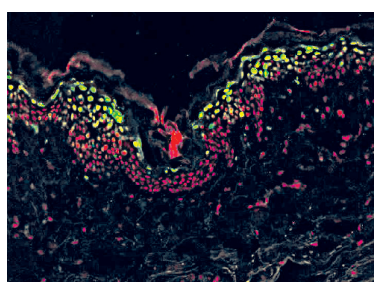
(A)

Grupo 1: explantes de pele não estimulados



(B)

Grupo 2: explantes expostos à UVB



(C)

Grupo 3: explantes expostos à UVB e a 2.700 pg/mL de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo

Adaptado de Boisnic *et al.*, 2023.

Figura 4. Efeito protetor da diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo contra a irradiação UVB: visualização por imunofluorescência de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) em fragmentos de explantes de pele não estimulados (A), expostos apenas à radiação UVB (B) ou expostos à radiação UVB e a 2.700 pg/mL de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo (C).

• Foi observada a redução de 52% do número de células CPD-positivas sob 2.700 pg/mL de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo ($p < 0,0001$), **equivalente a ingestão de 600 mg de diosmina pura** (figura 4).

• Esse efeito demonstrou-se em **platô (máximo potencial alcançado), em concentrações ≥ 2.700 pg/mL**.

• Não foi observado efeito antioxidante adicional com o aumento da concentração acima do equivalente a 600 mg de diosmina pura.

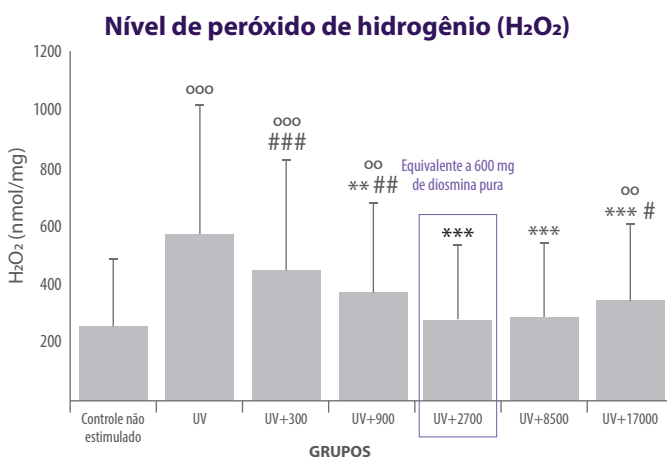
ENSAIO BIOQUÍMICO: avaliação da produção de H_2O_2

Após a exposição à UVB, houve a produção e liberação de peróxido de hidrogênio. O estresse oxidativo induzido por UVB gerou um **aumento significativo nos níveis de H_2O_2** do grupo controle estimulado e sem tratamento (grupo 2), em comparação com o controle não estimulado (grupo 1).

A adição de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo **diminuiu significativamente a liberação de H_2O_2 induzida por UVB**. Revelando o controle antioxidante sob a produção de **radicais livres que promovem estresse oxidativo no tecido cutâneo e danificam o DNA**.

• O **maior efeito inibitório** foi observado no grupo exposto à UVB e tratado (grupo 3) com **2.700 pg/mL de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo: redução de até 48,6% na liberação de H_2O_2** comparado ao grupo controle estimulado e sem tratamento (grupo 2).

• **Nenhum efeito inibitório adicional** foi observado em concentrações ≥ 2.700 pg/mL de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo, **correspondente a concentração estimada após a ingestão única de 600 mg de diosmina pura** (figura 5).



Adaptado de Boisnic *et al.*, 2023.

Figura 5. Quantificação dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em fragmentos de explantes de pele ($n = 22$ fragmentos por grupo) não estimulados (não irradiados com UVB) ou expostos à radiação UVB e a diferentes concentrações de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo. Os valores são expressos como média, e as barras representam o desvio padrão (DP). Os símbolos indicam que o tratamento é significativamente diferente do controle não estimulado em $^{\circ\circ} p < 0,005$ e $^{\circ\circ\circ} p < 0,0001$, significativamente diferente de UV em $^{**} p < 0,001$ e $^{***} p < 0,0001$, e significativamente diferente de UV + 2700 em $^{\#} p < 0,05$, $^{##} p < 0,005$ e $^{###} p < 0,0001$.

Adaptado de Boisnic *et al.*, 2023.

4. DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro a se concentrar no papel protetor da diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo contra dois contribuintes na fisiopatologia da DVC: inflamação e o estresse oxidativo. Neste estudo, modelos de cultura de órgãos de pele humana expostos à substância P ou UVB foram usados para desencadear reações inflamatórias ou oxidativas, respectivamente.

Na ampla amostra de explantes de pele estudada, a liberação da citocina IL-8 foi reduzida de forma dependente da concentração após a exposição ao metabólito da diosmetina. Esse achado é consistente com evidências prévias envolvendo flavonoides em culturas de células sanguíneas totais estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS), nas quais também foram descritas reduções concomitantes de outros marcadores pró-inflamatórios, como IL-1, TNF-α e IL-6.

O ambiente inflamatório persistente associado à DVC estende-se ao **sistema microvascular**, no qual os capilares podem tornar-se marcadamente dilatados, alongados e tortuosos. **Os flavonoides podem reduzir os sintomas relacionados através de sua ação venotônica.**

A carga inflamatória na DVC também é acompanhada por um ambiente pró-oxidante, que, por sua vez, **leva a uma inflamação ainda maior, criando um ciclo contínuo de oxidação, inflamação e dano endotelial.** Sabe-se que os flavonoides medeiam mecanismos de eliminação de ROS e inibem a sua geração. De forma semelhante, foi observada neste estudo uma **atividade antioxidante** da diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo, expressa por uma **redução nos níveis de H₂O₂ e pela inibição da formação de CPD.**

Os resultados obtidos são consistentes e demonstram efeitos positivos da diosmina sobre a inflamação, o estresse oxidativo e na contratilidade da parede venosa.

Os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes máximos foram observados em uma concentração de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo correspondente ao nível estimado atingido após **uma única ingestão de 600 mg de diosmina (2.700 pg/mL).** Essa descoberta é consistente com os resultados de um ensaio clínico de não inferioridade robusto, realizado por *Steinbruch et al., 2020*², que demonstrou que o tratamento com 600 mg de diosmina (Flebodia®), **1x ao dia durante seis meses, foi efetivo no alívio dos sintomas da DVC**, superando o tratamento com 900 mg de fração flavonoide purificada micronizada + 100 mg de hesperidina (Daflon®) usado como comparativo e correspondendo aproximadamente à concentração de 17.000 pg/mL de diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo testada neste modelo.

Este conjunto de achados apoia a hipótese de que **o aumento da dose de diosmina, ou a utilização de diosmina micronizada, podem não proporcionar um alívio adicional dos sintomas da DVC.**

5. CONCLUSÃO

Os dados deste estudo demonstram que a diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo exerce **ações anti-inflamatória e antioxidante** de maneira dose dependente e com **máximo efeito observado na concentração de 2.700 pg/mL**, que corresponde ao pico de concentração plasmática estimado após **a ingestão oral de 600 mg de diosmina pura.** Esses achados demonstram um papel protetor deste principal metabólito da diosmina **contra o estresse inflamatório e o oxidativo**, que afetam o sistema vascular e estão potencialmente envolvidos na fisiopatologia da DVC.

Os achados também complementam a hipótese de que o aumento da dosagem de diosmina micronizada **não pode fornecer alívio adicional nos sintomas da DVC.**^{1,3}

HIGHLIGHTS DO ARTIGO *Boisnic et al., 2023*

- **Diosmetina-3-O-β-D-glicuronídeo**, o principal metabólito da diosmina, **induziu respostas anti-inflamatória e antioxidante** quando adicionada a explantes de pele, à mesma concentração de pico plasmática (2.700 pg/mL) resultante da administração por via oral de diosmina pura 600 mg*.
- Nos explantes de pele houve um **efeito platô nas respostas anti-inflamatória e antioxidante** a partir da concentração de 2.700 pg/mL, sugerindo não haver benefício com a diosmina pura acima de 600 mg.
- Os valores do metabólito de diosmina no explantes de pele - 17.000 pg/mL -, equivalentes a diosmina 900 mg, **não proporcionaram respostas superiores** à diosmina 600 mg.
- O metabólito de diosmina equivalente à dose de 600 mg de diosmina pura demonstrou **efeito vasoconstritor**, fazendo o tecido reassumir suas características saudáveis.
- Flebodia® 600 mg **protege** os tecidos frente ao **estresse oxidativo e inflamatório** envolvidos na fisiopatologia da DVC.

*Dose diária recomendada

Referências: [1] Boisnic S, Branchet MC, Quioc-Salomon B, *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant effects of diosmetin-3-O- β -D-glucuronide, the main metabolite of diosmin: evidence from ex vivo human skin models. *Molecules*. 2023;28(14):5591. [2]. Steinbruch M, Nunes C, Gama R, *et al.* Is nonmicronized diosmin 600 mg as effective as micronized diosmin 900 mg plus hesperidin 100 mg on chronic venous disease symptoms? Results of a noninferiority study. *Int J Vasc Med*. 2020;2020:1–9. [3] Cazaubon M, Benigni JP, Steinbruch M, *et al.* Is there a difference in the clinical efficacy of diosmin and micronized purified flavonoid fraction for treatment of chronic venous disorders? Review of available evidence. *Vasc Health Risk Manag*. 2021;17:591–600. [4] Maruszynski M, Staszkievicz W, Andzisk P. A double-blind randomized study evaluating the influence of semisynthetic diosmin and purified micronized flavonoid fraction (diosmin + hesperidin) on symptoms of chronic venous insufficiency of the lower limb. *Przegl Flebologiczny*. 2004;12(3):89–95. [5] Yu X, *et al.* Multicenter observational study of Phlebodia 600 in treatment of patients with CEAP class C0–C3 chronic venous diseases. *Angiol Sosud Khir*. 2018;24(1):107–114. [6] Henriot JP. Functional venous insufficiency: comparative clinical trial of single daily dose of Diovenor 600 mg versus two daily doses of a combination of flavonoids (900 mg diosmin). *Phlebologie*. 1995;48:285–290. [7] Kemanovic D, Pavlov M, Ceranic M, *et al.* The use of Phlebodia in the management of bleeding non-prolapsed hemorrhoids. *Acta Chir Iugosl*. 2005;14:115–116. [8] Chauvenet P, Libeskind H. The role of semisynthetic diosmin in acute hemorrhoidal crisis. *Rev Fr Gastroenterol*. 1994;303:3–8. [9]. Dados fornecidos pelo fabricante Innothera. Disponível em: <https://www.innothera.com/en/component/search/?searchword=DIOVENOR&searchphrase=all&itemid=324>. Acesso em: 16 de junho de 2025. [10] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Flebodia®: bula profissional. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=flebodia>. Acesso em: 16 de junho de 2025.