

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

---

**ESTUDO DO FLAVONÓIDE RUTINA NA CITOTOXICIDADE E ANÁLISE  
DE BIOMARCADORES GÊNICOS E BIOQUÍMICOS DE ESTRESSE  
GENOTÓXICO E OXIDATIVO EM CULTURA DE CÉLULAS.**

**JULIANA CRISTINA MARCARINI**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do  
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor em Ciências  
Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Maio/2013**

**JULIANA CRISTINA MARCARINI**

**Estudo do flavonóide rutina na citotoxicidade e análise de biomarcadores  
gênicos e bioquímicos de estresse genotóxico e oxidativo em cultura de  
células.**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do  
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Doutor em Ciências Biológicas  
(Biologia Celular e Molecular).

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Regina Ribeiro

Co – Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Rio Claro,SP  
Maio/2013

**JULIANA CRISTINA MARCARINI**

**Estudo do flavonóide rutina na citotoxicidade e análise de biomarcadores  
gênicos e bioquímicos de estresse genotóxico e oxidativo em cultura de  
células.**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do  
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Doutor em Ciências Biológicas  
(Biologia Celular e Molecular)

**Comissão Examinadora:**

Prof. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Regina Ribeiro – UNESP/Campus Rio Claro-SP

Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Izabel Camargo Mathias – UNESP/Campus Rio Claro-SP

Prof. Dr. Edson Luis Maistro – UNESP/ Campus Marília- SP

Prof. Dr<sup>a</sup>. Veronica Elisa Pimenta Vicentini – UEM / Maringá-PR

Prof. Dr<sup>a</sup>. Denise Crispim Tavares – Unifran / Franca-SP

574.88 Marcarini, Juliana Cristina  
M313e      Estudo do flavonóide rutina na citotoxicidade e análise de biomarcadores gênicos e bioquímicos de estresse genotóxico e oxidativo em cultura de células / Juliana Cristina Marcarini. - Rio Claro, 2013  
155 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Lúcia Regina Ribeiro  
Coorientador: Mário Sérgio Mantovani

1. Biologia molecular. 2. Flavonol. 3. Expressão gênica. 4. Enzimas antioxidantes. 5. Linhagens tumorais. 6. Nutrigenômica. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dr<sup>a</sup> Lúcia Regina Ribeiro que aceitou me orientar e me deu a oportunidade de fazer o Doutorado. Obrigada pela confiança, atenção e respeito durante esses quatro anos;

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani, pela orientação segura, confiança e seriedade. Obrigada por transmitir seus conhecimentos, suas experiências profissionais e de vida e mais uma vez agradeço por abrir as portas do seu laboratório e ter possibilitado a realização deste trabalho;

À Universidade Estadual Paulista, UNESP, campus Rio Claro, SP e a Universidade Estadual de Londrina, UEL, PR;

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) da UNESP, campus Rio Claro, SP;

A Capes pela concessão da bolsa, e ao CNPq e a Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

A todos os membros titulares e suplentes da comissão examinadora, por aceitarem participar de minha banca de defesa e trazerem importantes sugestões para a finalização deste trabalho.

Às Professoras Dr<sup>a</sup> Veronica Elisa Pimenta Vicentini e Dr<sup>a</sup> Denise Crispim Tavares por participarem da banca examinadora da minha qualificação.

A todos os Docentes do programa, especialmente às Professoras Maria Izabel Camargo Mathias, Patrícia Pasquali Parise Maltempo e Maria Aparecida Marin Morales que muito contribuíram para meu crescimento profissional. Agradeço pela atenção e apoio durante o processo de doutorado.

A todos os colegas do curso de doutorado, especialmente a Jaqueline Bianchi e Raquel Vaz Hara do laboratório de Mutagênese da UNESP, Rio Claro.

A todos os funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação, principalmente à Rosemary Oliveira Cardoso e a Josiele Fernanda Magri pela atenção e pelos auxílios prestados durante todo o curso de doutorado.

Aos Professores Dr. Rodrigo Cabral Luiz e Dr<sup>a</sup> Cláudia Bueno Reis Martinez pela contribuição em todas as etapas experimentais do trabalho.

Às minhas amigas e colaboradoras Daniele Sartori e Dalita Cavalcante. Meninas, obrigada pela ajuda incondicional, pelos conselhos e os momentos de descontração.

A todos os colegas e amigos do laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Estadual de Londrina (UEL): Maria Eliane Barroso, Marcela Tsuboy, Josiane Mendes, Andressa Niwa, Nathalia de Paula, Simone Semprebon, Diogo Vesenick, Gláucia D'epiro, Lilian Marques, Tatiana Mozer, Giuliana Castelo, Leonardo Zanelatto, Ingrid Felicidade, Daniela Santos e Sandra Lepri.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Mutagênese da UEM, Igor de Almeida, Michele Heck e Liliane Menezes.

A toda a minha família, especialmente minha nona Anastácia, meus pais Ivo e Clara que apesar da distância nunca mediram esforços para que todos os meus anseios pudessem ser alcançados. Obrigada pelo apoio, incentivo e dedicação constante que foram imprescindíveis em todos os momentos da minha vida. Aos meus queridos irmãos Sílvia e Ivan pelo estímulo e por apostarem sempre no meu sucesso. Vocês foram os pilares que sustentaram essa conquista!

Ao meu querido namorado Rafael, pelo seu amor, compreensão, e paciência durante todo o tempo que desenvolvi o meu trabalho. Sua companhia me deu forças nos momentos difíceis e me motivaram a continuar sempre.

E por fim, a todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

**Meus Sinceros Agradecimentos.**

*“META, a gente busca.  
CAMINHO, a gente acha.  
DESAFIO, a gente topa.  
VIDA, a gente enfrenta.  
SAUDADE, a gente mata.  
SONHO, a gente realiza...”*

*Clarice Lispector*

MARCARINI, JC. **Estudo do flavonóide rutina na citotoxicidade e análise de biomarcadores gênicos e bioquímicos de estresse genotóxico e oxidativo em cultura de células**. 2013. 155p. TESE (Doutorado em Ciências Biológicas – área de concentração em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP - Campus Rio Claro/SP/Brasil.

## RESUMO

Há um interesse crescente na investigação de substâncias de origem natural como os flavonóides, devido ao grande número de evidências dos benefícios que eles proporcionam para a saúde, principalmente reduzindo o desenvolvimento de doenças crônicas. Nesse contexto, a rutina é um flavonóide que tem sido bem caracterizado na literatura por apresentar uma variedade de atividades farmacológicas incluindo propriedades antiinflamatória, antialérgica, antimutagênica, imunomoduladora e hepatoprotetora. Estes efeitos protetores atribuídos a rutina estão relacionados, em grande parte, à sua propriedade antioxidante direta, no entanto, as vias moleculares e os mecanismos de ação desses processos são pouco conhecidos. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e protetores do flavonóide rutina em concentrações fisiológicas relevantes *in vitro*. Para isso, foram utilizadas quatro linhagens de células tumorais: HTC (hepatoma de *Rattus norvegicus*); HepG2 (hepatoma humano); HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) e 786-O (carcinoma renal humano). Os resultados obtidos com as células HTC mostraram que a concentração de 810  $\mu\text{M}$  de rutina não foi citotóxica, apresentou efeito genotóxico e não alterou a expressão dos genes *GSTa2* e *p38*, relacionados ao metabolismo de drogas e controle do ciclo celular, respectivamente. Além disso, a análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN  $^1\text{H}$ ) dos metabólitos das células expostas a concentração genotóxica da rutina (810 $\mu\text{M}$ ), revelou menores níveis de fosfocolina, glicerosfosfocolina, creatina, lactato, acetato e glutatona. A análise dos resultados das linhagens HepG2 e HT-29 revelou que 100  $\mu\text{M}$  de rutina foi citotóxica e reduziu a expressão e a atividade das principais enzimas antioxidantes endógenas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (Gr). Por outro lado, 10  $\mu\text{M}$  de rutina não alterou a viabilidade e cinética de proliferação celular, aumentou significativamente a expressão e a atividade das enzimas SOD, CAT, GPx e Gr entre 12-28h de exposição nas duas linhagens em estudo. O aumento no RNAm do *CYP1A1* nas células HepG2 e HT-29 foi evidenciado após 12 e 24h com 100  $\mu\text{M}$ . Para a linhagem 786-O, a avaliação do efeito protetor contra o estresse oxidativo onde as culturas foram pré-incubadas com 10  $\mu\text{M}$  de rutina e em seguida expostas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (80  $\mu\text{M}$ ) por 30 min. apresentaram: redução de 80% nos danos causados ao DNA em 4h de pós-

tratamento; diminuição na atividade das enzimas SOD, CAT e Gpx de 44, 42 e 32 % respectivamente, após 30 min; indução da expressão dos genes *CuZnSOD* (4,46x) e *CAT* (3,0x) após 2h de pós-tratamento. A rutina também apresentou efeito protetor contra estresse de retículo endoplasmático induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois houve uma redução gradual nos níveis dos transcritos gênicos *HSPA5*, *ERN1* e *GADD153* nos quatro tempos analisados de pós-tratamento sendo que, após 4 horas os níveis de expressão desses genes alcançaram valores próximos ao controle do experimento. Conjuntamente, nossos resultados indicam que apesar da rutina apresentar efeito genotóxico em altas concentrações e alterar o perfil metabólico celular ela pode agir em baixas concentrações potencializando as defesas antioxidantes das células, mesmo na ausência de qualquer substância indutora de espécies reativas de oxigênio, exercendo assim, atividade antioxidante indireta e, conseqüentemente, podendo atuar impedindo ou retardando o estresse oxidativo celular.

**Palavras-chave:** flavonol, expressão gênica; enzimas antioxidantes, linhagens tumorais, nutrigenômica.

MARCARINI, JC. **Study of the flavonoid rutin in cytotoxicity and analysis of genetic and biochemical biomarker genotoxic and oxidative stress in cell culture.** 2013. 155p. (Ph.D. in Biological Sciences- Area of Concentration in Cellular and Molecular Biology) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP - Campus Rio Claro/SP/Brazil.

### ABSTRACT

There is growing interest in the investigation of naturally occurring substances such as flavonoids, due to the large volume of evidence of the benefits they provide for health, mainly by reducing the development of chronic diseases. In this context, rutin is a flavonoid that has been well characterized in the literature by presenting a variety of pharmacological activities including antiinflammatory, antiallergic, antimutagenic, immunomodulating and hepatoprotective. These protective effects attributed to rutin are related in large part to their direct antioxidant properties, however, the molecular pathways and mechanisms of action of these processes are poorly understood. Thus, the objective of this study was to investigate the cytotoxic, genotoxic and protective flavonoid rutin in the relevant physiological concentrations *in vitro*. Therefore, it was using four different strains: HTC (Rattus norvegicus hepatocellular); HepG2 (Human carcinoma), HT-29 (human colon adenocarcinoma) and 786-O (human kidney carcinoma). The results obtained with HTC cells showed that the concentration of 810  $\mu\text{M}$  genotoxic effect of rutin showed no changes in gene expression GSTa2 and p38, related to drug metabolism and cell cycle control, respectively. In addition, NMR analysis of cells exposed to the genotoxic concentration rutin (810  $\mu\text{M}$ ) revealed lower levels of phosphocholine, glicerphosphocholine, creatine, lactate, acetate and glutathione. The results of the lines HepG2 and HT-29 revealed that 100  $\mu\text{M}$  of rutin was cytotoxic and reduced the expression and activity of the major endogenous antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (Gr). On the other hand, 10  $\mu\text{M}$  of rutin did not alter the viability and kinetics of cell proliferation, significantly increased the expression and activity of SOD, CAT, GPx and Gr between 12-28h exposure in both strains under study. The increase in *CYP1A1* mRNA in cells HT-29 and HepG2 was evident after 12 and 24 h with 100  $\mu\text{M}$  For the 786-line, evaluating the protective effect against oxidative stress where cultures were pre-incubated with 10 mM of rutin and then exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80  $\mu\text{M}$ ) for 30 min. presented: 80% reduction in damage to DNA in 4h post-treatment decrease in the activity of SOD, CAT and GPx 44, 42 and 32% after 30 min; induction of expression *CuZnSOD* gene (4,46 x) and CAT (3.0 x) after 2h post-treatment. Rutin also showed a protective effect against endoplasmic reticulum stress induced

by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, because there was a gradual reduction in the levels of gene transcripts *HSPA5*, *ERNI* and *GADD153* in the four times analyzed post-treatment and, after 4 hours the expression levels of these genes reached values close to the control experiment. Together, our results indicate that despite the genotoxic effect rutin present in high concentrations and alter the metabolic profile cell she can act at low concentrations enhancing the antioxidant defenses of the cells even in the absence of any substance induces reactive oxygen species, thereby exerting antioxidant activity indirect and thus may act by preventing or delaying oxidative stress.

Keywords: flavonol, gene expression, antioxidant enzymes, carcinoma cell lines, nutrigenomics.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>14</b>
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	15
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
3.1 Doenças associadas ao estresse oxidativo.....	16
3.1.1. Origem dos radicais livres.....	18
3.1.2 Estresse oxidativo e de retículo endoplasmático.....	20
3.2 Defesas antioxidantes.....	23
3.3. Flavonóides.....	28
3.4 Mecanismos de ação dos flavonóides.....	31
3.4.1. Ação antioxidante.....	32
3.2.2. Interação dos flavonóides com outros sistemas enzimáticos.....	34
3.5. Rutina e suas atividades biológicas .....	36
<b>4 . MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
4.1. Substância-teste: rutina.....	41
4.2. Agentes indutores de dano celular.....	41
4.3. Linhagens celulares .....	42
4.4. Ensaio de citotoxicidade com a resuzurina .....	43
4.5. Ensaio de cinética de proliferação e viabilidade e celular .....	44
4.6. Ensaio do Cometa.....	45
4.7. Expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.....	46
4.8. Atividade de enzimas antioxidantes endógenas .....	48
4.9. Perfil metabólico por RMN H <sup>1</sup> .....	48
4.10. Análise estatística .....	51
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
5.1. ARTIGO 1.....	53
5.2. ARTIGO 2.....	78
5.3. ARTIGO 3.....	109
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>142</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>145</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

O estresse oxidativo induzido nas células e tecidos por espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio entre outras espécies reativas, está relacionado com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças crônico-degenerativas como o câncer, cardiopatias, inflamações, disfunção cerebral, aterosclerose e o envelhecimento. Em vista disso, inúmeras pesquisas estão sendo direcionadas para investigar novos compostos que possam atuar como antioxidantes (HADZIABDIĆ et al., 2012; BARBATO et al., 2013; BASU et al., 2013; ZAMORA-ROS et al., 2013).

Os antioxidantes são compostos responsáveis por inibir e/ou reduzir as lesões causadas pelos radicais livres nas células. Estes compostos podem ser produzidos pelo próprio organismo através do sistema enzimático antioxidante endógeno ou pelo sistema não-enzimático que são absorvidos por meio da dieta (SIES, 2010). Desse modo, a ingestão diária de antioxidantes possui um papel fundamental sobre os sistemas biológicos, promovendo ações benéficas para a saúde.

Nos últimos anos, pesquisas realizadas com os flavonóides têm-se intensificado, uma vez que essas substâncias são consideradas de grande interesse científico e terapêutico, pois apresentam em sua estrutura química um número variável de grupos hidroxil-fenólicos responsáveis pela capacidade antioxidante. Os flavonóides são substâncias de origem natural, encontrados em frutas, legumes, verduras, chás, sucos, chocolates e em vinhos tintos (SCALBERT et al., 2005).

Essas substâncias são consumidas diariamente, porém são considerados compostos com pouco valor nutricional. Dessa forma, a quantificação mais precisa do total de flavonóides ingeridos torna-se difícil devido à falta de tabelas com dados sobre sua distribuição nos alimentos (YAO et al. 2004). Entretanto, estima-se que o consumo total varia entre 200 mg/dia a 300mg/dia (ZAMORA-ROS et al., 2010).

Dentro do grupo dos flavonóides muitos estudos são realizados com a rutina, por auxiliar na melhora dos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, e por aumentar a resistência e permeabilidade da parede desses vasos. Outros sintomas de fragilidade capilar também são melhorados, e entre eles, a perda da acuidade visual e de alterações do campo visual (PATHAK et al., 1991). Esses efeitos podem ser observados por ação da rutina isolada ou associada ao ácido ascórbico, inclusive a absorção deste último composto é facilitada quando administrado junto com a rutina (MILDE et al., 2004).

Embora haja evidência de que uma dieta rica em flavonóides possa promover uma boa saúde, permanece a incerteza sobre os níveis necessários e as condições de consumo, uma vez que os flavonóides também são substâncias químicas potencialmente prejudiciais. Estudos recentes demonstraram que tratamentos prolongados com concentrações elevadas induziram a apoptose. Nestes casos, os flavonóides atuaram como um pró-oxidante e não como um antioxidante, resultando na morte celular programada (KIM e JANG, 2009).

De acordo com as informações apresentadas e considerando a utilização em larga escala dos flavonóides como constituintes de fármacos disponíveis atualmente no mercado, novos estudos deveriam direcionar-se a avaliar e comprovar a sua segurança e eficácia. Para isso, novas informações sobre possíveis efeitos adversos, como citotoxicidade, genotoxicidade, mecanismo de ação e biodisponibilidade em diferentes formas de administração, juntamente com caracterizações das propriedades individuais, e sobretudo, as dosagens necessárias desses constituintes, são imprescindíveis para o favorecimento da formulação de novos produtos que venham contribuir para a promoção da saúde.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e protetores do flavonóide rutina em sistema de cultura de células utilizando quatro linhagens de células tumorais: HTC (hepatoma de *Rattus norvegicus*); HepG2 (hepatoma humano); HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) e 786-O (carcinoma renal humano).

### 2.2. Objetivos Específicos

➤ Para a linhagem HTC:

- Avaliar a citotoxicidade com a resazurina após 20 horas de tratamento de cinco concentrações de rutina (10-810 $\mu$ M);
- Investigar os efeitos genotóxicos através do ensaio do cometa após 20 horas de tratamento.
- Avaliar a expressão gênica transcricional utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real dos genes *GSTa2* e *p38* após 12 horas de tratamento.
- Avaliar o perfil metabólico das células tratadas com uma concentração genotóxica e identificar os principais metabólitos alterados através da técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de H<sup>1</sup> (RMN H<sup>1</sup>) após 24 horas de tratamento.

➤ Para as linhagens HepG2 e HT-29:

- Avaliar o efeito citotóxico com a resazurina da rutina após 24 horas de tratamento e determinar as concentrações que serão utilizadas nos demais experimentos.
- Avaliar a viabilidade celular e verificar alterações na cinética de proliferação celular pelo método de exclusão do azul de Trypan nos tempos de 24, 48, 72 e 96h .

- Avaliar a expressão gênica transcricional utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real do gene do metabolismo celular: *CYP1A1* e dos genes relacionados ao estresse oxidativo: *SOD1*, *CAT*, *GPx1* e *GR* após 12 e 24 horas de tratamento.
  - Avaliar as atividades das enzimas antioxidantes (*SOD*, *CAT*, *GPx* e *GR*) após 16, 20, 24 e 28 horas de tratamento.
- Para as linhagens 786-O
- Determinar as concentrações de rutina que serão utilizadas nos demais experimentos utilizando o ensaio de citotoxicidade pela rezasurina.
  - Avaliar a viabilidade celular e verificar alterações na cinética de proliferação celular pelo método de exclusão do azul de Trypan nos tempos de 24, 48, 72 e 96h .
  - Avaliar as atividades genotóxica e antigenóxica utilizando o ensaio do Cometa.
  - Avaliar a expressão gênica transcricional utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real dos genes ligados ao sistema ubiquitina-proteossomo e UPR: *ERN1* (*IRE1*), *GADD153*(*CHOP*); e *HSPA5* (*BIP/GRP78*) e genes ligados ao sistema antioxidante: *SOD1*, *CAT* e *GPx1* após 24 horas de tratamento com a rutina e no pós-tratamento de tempos 0, 30 min, 2 e 4 horas em resposta ao tratamento com  $H_2O_2$  , indutor de danos através da formação de espécies reativas de oxigênio.
  - Avaliar as atividades das enzimas antioxidantes (*SOD*, *CAT* e *GPx*) após 24 horas de exposição a rutina e no pós-tratamento nos tempos 0, 30 min, 2 e 4 horas em resposta ao tratamento com  $H_2O_2$ .

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

---

#### 3.1. Doenças associadas ao estresse oxidativo

Durante as últimas duas décadas extensas pesquisas têm revelado os mecanismos pelos quais o estresse oxidativo está relacionado com a maioria das doenças crônicas, incluindo principalmente o câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, doenças pulmonares, renais entre outras (Tabela 1) (SPECTOR, 2000; REUTER et al.; 2010).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos reativos, denominados oxidantes ou espécies reativas de oxigênio (ERO), e sua eliminação por mecanismos de proteção, os agentes antioxidantes. Este desequilíbrio pode ativar uma variedade de transcrição incluindo NF- $\kappa$ B, AP-1, p53, HIF-1 $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ ,  $\beta$ -catenina, e Nrf2. A ativação desses fatores de transcrição pode conduzir a expressão de mais de 500 genes diferentes, incluindo os fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, quimiocinas, moléculas reguladoras do ciclo celular e moléculas antiinflamatórias (REUTER et al., 2010; CZAPLIŃSKA et al., 2012 ). Dessa forma, o estresse oxidativo ocasiona danos graves em várias biomoléculas da célula causando um grande impacto sobre todo o organismo (DURACKOVA, 2010).

**Tabela 1.** Lista parcial de doenças associadas ao Estresse Oxidativo.

- 
- Câncer
  - Doença cardiovascular
  - Aterosclerose
  - Inflamação crônica
  - Síndrome respiratória aguda grave
  - Envelhecimento
  - Alzheimer
  - Diabetes
  - Doença neurológica
  - Obesidade
  - Parkinson
  - Fibrose pulmonar
  - Artrite reumatóide
- 

Fonte: REUTER et al., (2010).

O desenvolvimento de câncer em seres humanos é um processo complexo, incluindo alterações celulares e moleculares mediados por diversos estímulos endógenos e exógenos, e já está estabelecido que os danos oxidativos ao DNA são responsáveis em parte, pelo desenvolvimento do tumor (VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007). A iniciação e promoção do câncer estão associadas com defeitos cromossômicos e ativação de oncogenes induzidos pelos radicais livres. O estresse oxidativo também produz uma multiplicidade de modificações na estrutura do DNA, incluindo lesões de base e açúcar e ligações cruzadas do tipo DNA-proteína (VALKO et al., 2004).

A doença cardiovascular é de etiologia multifatorial associada com uma variedade de fatores de risco para o seu desenvolvimento incluindo hipercolesterolemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo, diabetes melito entre outras. Recentemente, estudos têm fornecido evidências que o estresse oxidativo pode ser a causa primária ou secundária de muitas doenças cardiovasculares com a aterosclerose (CHATTERJEE et al., 2007; CERIELLO et al., 2008).

O evento inicial na aterosclerose se caracteriza por uma lesão endotelial causada por fatores de risco tradicionais (dislipidemia, hipertensão (HAS), tabagismo, diabetes), porém vários estudos avaliaram o papel do estresse oxidativo na aterogênese e demonstraram que a aterosclerose é o resultado da modificação oxidativa de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na parede arterial por espécies reativas de oxigênio (ROS). Evidências sugerem que os fatores de risco comuns para aterosclerose aumentam a produção de ROS não só das células endoteliais, mas também a partir das células musculares e adventícias (MUNTNER et al., 2005; HULSMANS e HOLVOET, 2010).

A breve descrição acima das doenças mais comuns que atingem a população mundial mostra a relação direta destas com estresse oxidativo. Em vista disso, muitos esforços são realizados com intuito de diminuir a taxa de mortalidade por essas doenças. Entre as

alternativas, a terapia com antioxidantes representa uma via promissora para o tratamento, no entanto é preciso conhecer os principais alvos que contribuem para o processo oxidativo celular e as defesas antioxidantes.

### 3.1.1 Origem dos radicais livres

Os radicais livres podem ser definidos como espécies, grupo de átomos ou moléculas que contenham um ou mais elétrons de valência desemparelhados, como por exemplo: o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e radical peroxila ( $ROO^{\bullet}$ ). No entanto, existem outros compostos reativos que não são radicais livres, classificados como: espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) que abrangem o: peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o ozônio ( $O_3$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (GUTTERIDGE, 1994).

As espécies reativas são produzidas nas células através das: 1) mitocôndrias, em consequência da respiração aeróbia normal que consome oxigênio molecular; 2) células fagocitárias como os linfócitos que reconhecem as células do próprio organismo que se tornam tumorais ou foram infectadas por parasitas, fungos, bactérias ou vírus, e as destroem por uma oxidação através de  $NO$ ,  $O_2$  e  $H_2O_2$ ; 3) peroxissomas, os quais são organelas responsáveis pela degradação de ácidos graxos e outras moléculas e produzem  $H_2O_2$ , e 4) enzimas do citocromo p-450 que constituem um sistema primário contra substâncias químicas tóxicas (FANG et al., 2002).

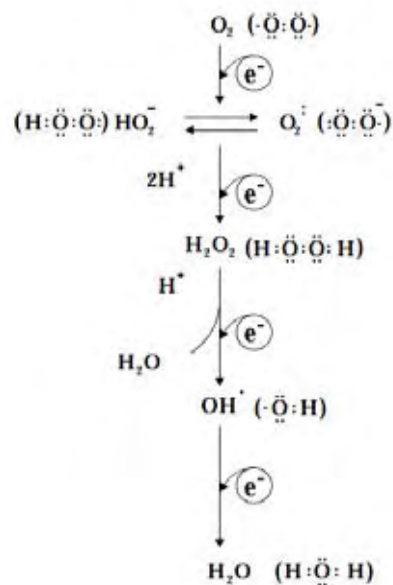
Além destas espécies reativas geradas no processo endógeno fisiológico, elas também são produzidas nos processos patológicos e por fontes exógenas que estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres.

ENDÓGENAS	EXÓGENAS
○ Respiração aeróbia	○ Dieta
○ Inflamações	○ Fármacos
○ Peroxissomos	○ Luz ultravioleta e radiação ionizante
○ Enzimas do citocromo P450	○ Poluição
	○ Tabaco
	○ Álcool

Fonte: Adaptado de PHAM-HUY et al., (2008).

Na maioria das reações intracelulares cada molécula de oxigênio recebe quatro elétrons de uma só vez, neutralizando a tendência do oxigênio a redução monoelétrica, sendo importante a existência de um sistema enzimático, como o citocromo oxidase, sem a formação de intermediários como mostra a Figura 1. Ainda assim, o processo de redução de cerca de 5% do oxigênio consumido passa por etapas monoelétrônicas, com formação das espécies reativas de oxigênio como radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet}$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (COHEN, 1989).



**Figura 1:** Redução tetraeletrônica do oxigênio ( $O_2$ ) na mitocôndria até a formação de água ( $H_2O$ ) (Adaptado de Cohen, 1989).

A geração intracelular de  $H_2O_2$ , considerada a ERO mais estável, está relacionada com desencadeamento da apoptose, e até mesmo a adição exógena de  $H_2O_2$  que é um potente ativador dessa maquinaria (DINI, 2005).

A presença dessas espécies reativas é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais, e um desequilíbrio entre a produção de ERO/ERN e a remoção pelos sistemas de defesa antioxidantes leva a uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração dessas espécies, o que pode causar danos estruturais e lesões oxidativas com prejuízo as funções vitais da célula (SIES, 1997; BLOKHINA et al., 2003).

### **3.1.2 Relação entre o estresse oxidativo e o estresse de retículo endoplasmático**

Estudos recentes sugerem que o estresse oxidativo e o estresse de retículo endoplasmático (RE) são eventos que estão fortemente ligados, embora as vias moleculares destes processos ainda sejam desconhecidas (KIM et al., 2008; ZHANG, 2010; BHANDARY et al., 2013; van DAM et al., 2013).

O RE é uma organela responsável pela montagem, dobramento e secreção das proteínas, síntese de lipídeos e esteróis e armazenamento de cálcio (BAUMANN e WALZ, 2001). Por ser um compartimento que favorece o dobramento das proteínas, o RE possui um sistema de controle de qualidade para garantir que somente as proteínas que foram corretamente dobradas sejam transportadas para o aparelho de Golgi e por sua vez liberadas ao meio extracelular. No entanto, processos fisiológicos que aumentam a demanda de dobramento de proteínas, ou estímulos que interrompam as reações de dobras, podem criar um desequilíbrio entre as proteínas e a sua capacidade funcional, levando a produção de proteínas mal-dobradas no lúmen do RE (FORMAN et al., 2003; KIM et al., 2008).

O RE responde a esse estado de estresse como o início de uma cascata de eventos conhecida como “*unfolded-protein response*” (UPR). A ativação da UPR leva a uma ativação

de transcrição de vários genes e à concomitante redução da tradução protéica. Em consequência, o efeito final é a redução da quantidade de novas proteínas que seriam translocadas para o RE, conferindo tempo e maior capacidade do RE processar a degradação de proteínas alteradas (FORMAN et al., 2003; KIM et al., 2008; DUDEK et al., 2009).

As principais proteínas sensoras que atuam nesse mecanismo de respostas coordenadas promovendo a adaptação ao estresse ou a morte celular são: HSPA5 (BIP/GR78), ERN1 (IRE1), ATF6, EIF2AK3 (PERK), TRAF2, ATF4 e CHOP (GADD153) (Forman et al., 2003). A Figura 2 ilustra a resposta a proteínas alteradas (UPR) que se inicia com uma chaperona do RE, a HSPA5, que regula negativamente as três proteínas sensoras: ERN1 (IRE1), ATF6, EIF2AK3 (PERK) (SHARMAN et al., 2008; BERNARDINELLI, 2011).

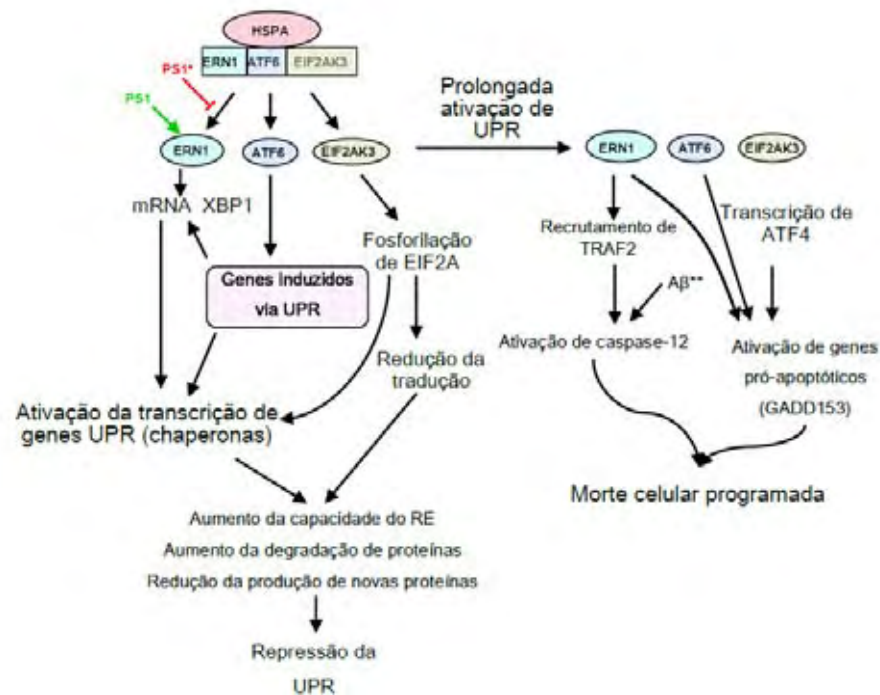


Figura 2: Resposta a proteínas alteradas via *Unfolded-protein response* (UPR) (BERNARDINELLI, 2011).

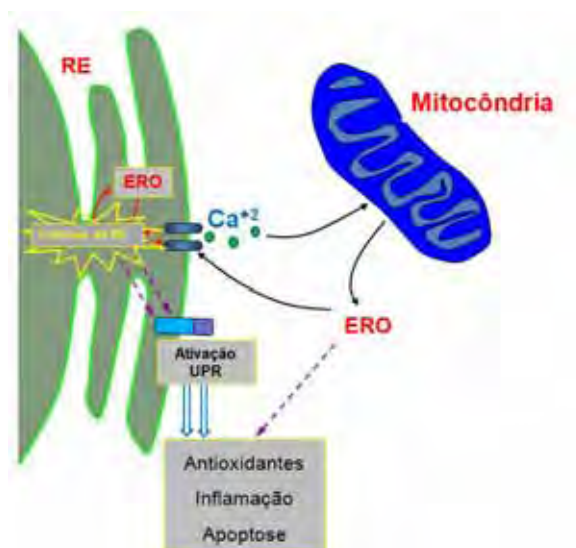
Na presença de uma proteína mal-dobrada, ou alterada no RE, a HSPA se dissocia dos sensores e se liga a essa proteína, na tentativa de dobrá-la e assim, liberando os sensores da inibição e ativando múltiplas vias de sinalização, que culminam na indução dos genes

induzidos por UPR e repressão no mecanismo de tradução. Essas mudanças aumentam a capacidade de dobramento do RE, reduz a translocação de novas proteínas e aumenta a degradação de proteínas mal processadas. Com ativação prolongada da UPR, as três moléculas sensoras iniciam uma cascata distinta, a qual leva a morte celular programada (FORMAN et al., 2003).

O gene ERN1 (IRE1) codifica uma proteína cuja atividade quinase e endoribonuclease é importante para a resposta a sinais de estresse no RE, atuando como um sensor de proteínas mal dobradas no lúmen do RE. O gene EIF2AK3 (PERK) atua conjuntamente com ATF6 e IRE1, participa do mecanismo de UPR como um efetor de resposta a proteínas mal dobradas. Por sua vez, ativação de um desses genes, ERN1, ATF6 ou EIF2AK3, pode acionar genes pró-apoptóticos como o GADD153. De acordo com Marciniak et al. (2004) a ativação desse gene pode ser um demonstrativo da real indução de estresse no RE, uma vez que genes da família GADD ( GADD34, GADD45 e GADD 153) são induzidos por estresse genotóxico e sinais de parada do ciclo celular. Também foi demonstrado que o GADD153 pode ativar genes que conferem a secreção de proteínas em curso durante o estresse de RE.

Uma das evidências que o processo de estresse oxidativo pode estar ligado ao estresse de RE está representada na Figura 3. A estimulação da produção de ERO em condições fisiológicas ou patológicas pode ativar os canais do RE levando a liberação de cálcio para o citosol. Esse aumento de cálcio pode estimular o metabolismo a produzir mais ERO, dessa forma a liberação de espécies reativas pela mitocôndria acentua a eliminação de cálcio pelo RE. Nessas condições ocorre a perturbação na homeostase de cálcio e no processo de dobramento das proteínas, causando o estresse de RE e por consequência a ativação da via UPR. Posteriormente, a UPR pode ativar resposta das defesas antioxidantes, promover o processo inflamatório ou induzir a morte celular programada, a apoptose (ZANG, 2010). Em vista disso, a ligação entre estresse oxidativo e de RE é um evento crítico que deve ser

considerado em estudo sobre o processo de estresse celular, uma vez que este evento está presente no desenvolvimento de várias doenças.



**Figura 3.** Interação entre o estresse oxidativo e de RE. Adaptado para o português de ZANG, (2010).

### 3.2. Sistema de defesa antioxidante

Para neutralizar a produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos, as células em seu processo evolutivo desenvolveram muitos mecanismos de defesa antioxidantes para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Dessa forma, os agentes antioxidantes são responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células (VALKO et al., 2006; SIES, 2010;

De maneira geral, uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES, 1997). Esses compostos que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos, e estão apresentados na Tabela 3 (FANG et al., 2002).

**Tabela 3.** Principais agentes de defesas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos:

<b>Enzimáticos</b>	<b>Não-enzimáticos</b>
Superóxido dismutase	$\alpha$ -tocoferol (vitamina E)
Catalase	Ácido ascórbio (vitamina C)
Glutathione peroxidase	$\beta$ -caroteno
NADPH-quinona oxidoreductase	Flavonóides
Enzimas de reparo	Clorofila
	L-cisteína
	Selênio

Fonte: Adaptado de FANG et al., (2002).

Os antioxidantes atuam de três formas diferentes na proteção dos organismos: (a) bloqueando a etapa de iniciação do processo oxidativo impedindo a geração de espécies reativas ou as sequestrando de forma a impedir sua interação com alvos celulares como, por exemplo, as enzimas antioxidantes, tocoferóis, flavonóides e carotenóides; (b) bloqueando a etapa de progressão da cadeia ao sequestrarem radicais intermediários, como os tocoferóis e flavonoides e, (c) reparando as lesões causadas pelas ERO relacionadas com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas (SIES, 1992)

O sistema antioxidante enzimático constitui a primeira linha de defesa endógena aos ataques das espécies reativas, impedindo sua formação ou sequestrando-as de forma a impedir sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar (Sies, 1993). Esse sistema é formado, principalmente pela: Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e a Glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) (SIES, 1992; BENZIE et al., 2002).

A função da SOD é catalisar a reação de dismutação do ânion radical superóxido, gerando oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (Figura 4A). É a principal isoenzima presente nos fluidos extracelulares e possui três formas diferentes em mamíferos: a cobre-

zinco (CuZn-SOD) presente no citoplasma; manganês (MnSOD) localizada nas mitocôndrias e a SOD extracelular que se encontra em equilíbrio entre o plasma e a superfície das células endoteliais, onde exerce ação protetora antioxidante (ZELKO et al., 2002).

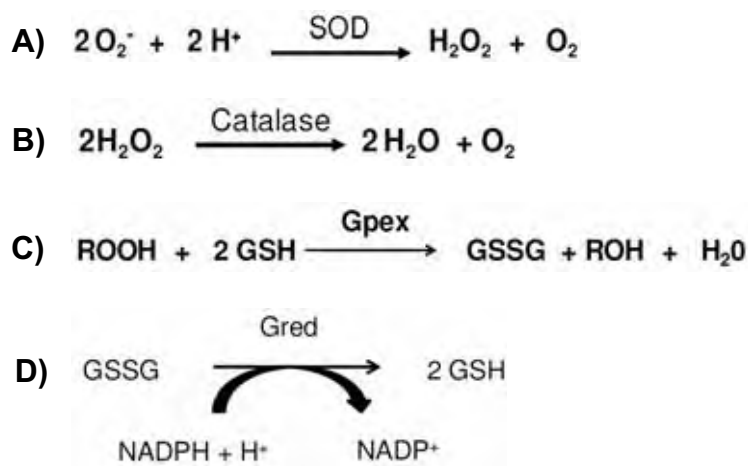
A CAT é encontrada principalmente nos peroxissomos celulares e em alguma extensão no citosol, decompondo diretamente o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, o qual resulta da dismutação do ânion radical superóxido (Figura 4B).

A glutathione peroxidase (GPx), uma enzima dependente de selênio coopera com a CAT na remoção de hidroperóxidos (ROOH). A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e outros peróxidos orgânicos às custas da conversão da glutathione reduzida (GSH) à glutathione oxidada (GSSG) (Figura 4C). Esta enzima é específica quanto ao doador de hidrogênio (GSH), mas pode reduzir vários hidroperóxidos orgânicos, inclusive hidroperóxidos lipídicos. Além do seu papel central na atividade da glutathione peroxidase, a glutathione está envolvida em várias outras vias antioxidantes, incluindo sequestro de radicais livres, no metabolismo do ascorbato e na detoxificação de xenobióticos via glutathione transferase (OTT et al., 2007).

O processo catalítico da GPx é diretamente dependente da redução da glutathione oxidada pela glutathione reductase (Gred). A Gred é uma flavoproteína dependente de NADPH que faz a redução da glutathione oxidada (Figura 3D) e, portanto, depende da integridade da via das pentoses fosfato. Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glico-6-fosfato desidrogenase (G6PD) quando há prejuízo da função da Gred (HALLWEEL e GUTTERIDGE, 2007).

As três enzimas citadas acima são necessárias para a sobrevivência da célula, mesmo em condições normais, pois elas atuam por mecanismos sinérgicos de modo a garantir a proteção e manter a homeostase celular. Entretanto, esta proteção é assegurada apenas quando

há manutenção de um equilíbrio na sua atividade, que pode ser afetado na presença de espécies reativas (DROGE et al., 2002).



**Figura 4.** Reações das enzimas antioxidantes: A) Superóxido dismutase; B) Catalase; C) Glutaciona peroxidase e d) Glutaciona redutase. Fonte: Modificada de ROVER et al., (2001).

O desempenho das enzimas antioxidantes também depende da modulação da expressão gênica. Dessa forma, as células desenvolveram o programa adaptativo para neutralizar as espécies reativas. A indução desta resposta protetora envolve pelo menos três componentes essenciais: (a) elementos antioxidantes de resposta (ARE) com sequências reguladoras presentes em cada gene em cópias únicas ou múltiplas; (b) Nrf2 -fator nuclear eritróide 2- o principal fator de transcrição que liga-se a AREs e recruta a maquinaria transcrricional para a expressão de antioxidantes como os genes que codificam a catalase, superóxido dismutase e glutaciona S-transferase (GST), e (c) Keap1, uma proteína citosólica repressora que se liga ao Nrf2 e a retém no citoplasma promovendo a sua degradação proteosomal. Desse modo, os resíduos de cisteína em Keap1 podem servir como sensores primários para os sinais de estresse e sua alteração leva a mudanças conformacionais produzindo a liberação de Nrf2. Na ausência do estresse, o Nrf2 localizado no citoplasma, e está

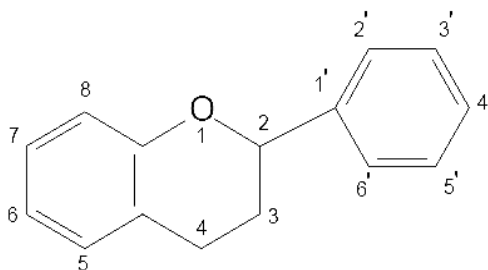
ligado a Keap1, o que facilita a degradação de Nrf2 através da via da ubiquitina-proteassoma (ANTELMANN *et al.*, 2011; TAGUCHI *et al.*; 2011).

Os antioxidantes não enzimáticos, em sua maioria, necessitam ser adquiridos pela alimentação. As frutas, verduras e legumes são as principais fontes destes antioxidantes (CHEN *et al.*, 2013). Além dos exemplos da Tabela 3 são componentes não enzimáticos da defesa antioxidantes: os oligoelementos (zinco e cobre); vitaminas (vitamina E, vitamina A, riboflavina); piruvato, carotenóides (beta-caroteno, licopeno e luteína) e os flavonóides, dos quais um composto deste grupo, a rutina, foi o objeto de estudo do presente trabalho.

### 3.3 Flavonóides

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural encontrados nas frutas, verduras e legumes (SCALBERT *et al.*, 2005). São hidrossolúveis e lipossolúveis que ocorrem na forma de agliconas, quando não apresentam ligações com açúcares, ou na forma de glicosídios, quando estão associados a açúcares (ACKER *et al.*, 1996; YAO *et al.*, 2004).

Estruturalmente, os flavonóides constituem-se por um anel aromático com 15 átomos de carbono ( $C_{15}$ ) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos, que possuem nessa estrutura os anéis aromáticos nas posições  $C_6-C_3-C_6$ . O esqueleto  $C_{15}$  dos flavonóides é biogeneticamente derivado do fenilpropano ( $C_6-C_3$ ) e três unidades de acetato ( $C_6$ ). (Fig.5). Portanto, flavonóides são derivados de bezo-gama-pirona de origem vegetal, podendo haver facilmente interconversão entre eles (YOKOZAWA *et al.*, 1997).

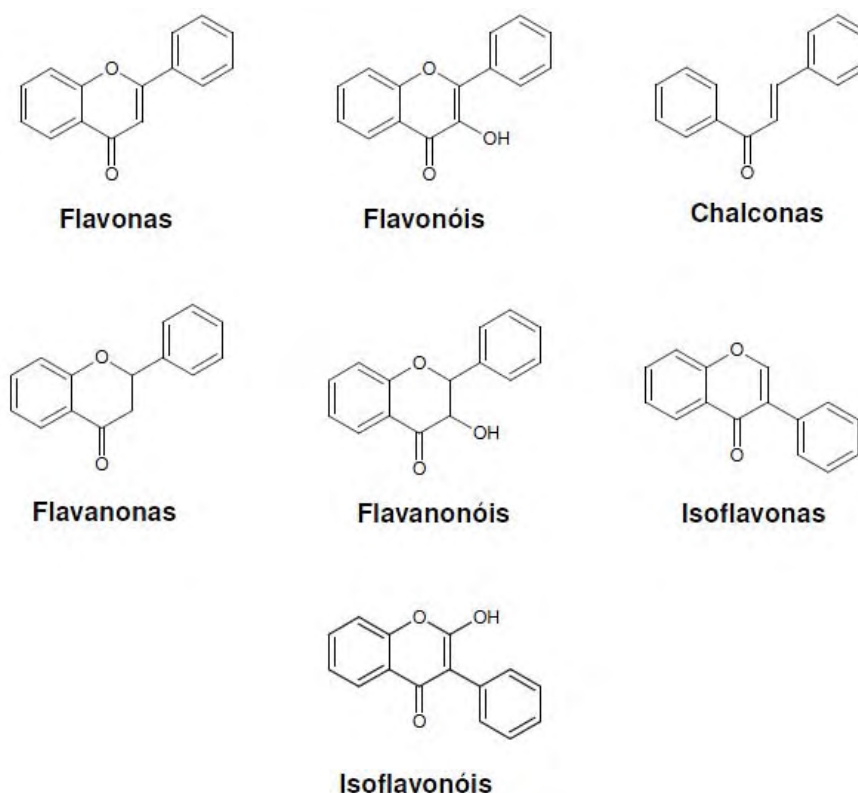


**Figura 5:** Origem dos flavonóides e a representação do esqueleto de carbono  $C_6-C_3-C_6$ . Fonte: Bravo, (1998).

As atividades bioquímicas dos flavonóides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que pode variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicolisações (PIETTA *et al.*, 2000).

Nos vegetais a distribuição dos flavonóides depende de diversos fatores de acordo com sua taxonomia, bem como as variações entre as espécies. Flavonóides encontrados nas folhas são diferentes daqueles presentes nas flores, nos galhos, raízes e frutos ou ainda podem apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra. Outros

fatores importantes como a radiação solar, períodos de chuva ou seca, nutrientes e estações do ano influenciam no metabolismo e na produção destas substâncias (BEECHER, 2003). Mais de 4.000 flavonóides já foram identificados em plantas (Di CARLO et al., 1999; O'Brien, 2002) mas estima-se que esse número seja ainda maior atingindo até 6.000 compostos (KAMIYAMA e SHIBAMOTO, 2012; GALLEANO et al., 2013). Em virtude do grande número, os flavonóides são divididos em subclasses de acordo com a ligação do anel B com o C, assim como o estado de oxidação e dos grupos funcionais do anel C. As principais subclasses conhecidas são: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas, chalconas, auronas e neoflavonóides (Fig. 6) (HOLLMAN *et al.*, 1996).



**Figura 6:** Estruturas químicas das subclasses dos flavonóides (HOLLMAN *et al.*, 1996).

As principais subclasses dos flavonóides estão descritas a seguir na Tabela 4.

**Tabela 4:** Principais subclasses dos flavonóides, exemplos e respectivas fontes alimentares.

Sub-classes	Cor	Flavonóides representativo	Fontes alimentares
Antocianinas	Azul Vermelho Violeta	Cianidina Peonidina Petunidina	Morango Framboesa Cereja Brócolis
Flavanol	Incolor	Procianidinas	Maçã verde, chá verde, cerveja
Catequina	Amarelo	Catequinas Epicatequinas	Melão, vinho branco
Flavanona	Incolor Amarelo	Hesperidina Naringenina	Frutas cítricas
Flavona	Amarelo claro	Apigenina Luteolina	Cereais Alface Couve-flor
Flavonol	Amarelo claro Branco	Quercetina Miracetina <b>Rutina</b>	Cebolas, maçã, tomates, vinho tinto, trigo sarraceno, alho
Isoflavona	Incolor	Genisteína Daizeína	Legumes, derivados de soja

Fonte: BEECHER, (2003).

Os flavonóides amarelos, vermelhos e azuis são responsáveis pela cor das flores, frutas e algumas folhas. Quando não são diretamente visíveis, a sua contribuição em relação à cor se dá através da co-pigmentação dos flavonóides os quais protegem as antocianinas. Em alguns esta “cor” só é percebida pelos insetos que são atraídos e guiados ao néctar (BORS et al. 1990).

As atividades biológicas dos flavonóides foram observadas pela primeira vez em 1936, por Rusznýak e pelo bioquímico húngaro Albert Szent-Györgyi, em uma mistura de duas flavononas as quais diminuía a fragilidade e a permeabilidade de vasos sanguíneos capilares em humanos. Graças a este achado, os flavonóides passaram a ser denominados de *vitamina P* (de permeabilidade), porém, este termo foi abolido por volta de 1950, pois a deficiência destes flavonóides não causa nenhuma síndrome em particular (HOLLMAN et al., 1996).

Embora os flavonóides não sejam sintetizados pela espécie humana, seu consumo através da ingestão de frutos, chás, sucos, vinhos tintos através da dieta, tem proporcionado uma série de efeitos benéficos para a saúde (RIEMERSMA et al., 2001; HALLIWELL, 2007; HOENSCH e OERTEL , 2012). Ensaio biológicos usando combinações isoladas revelam que os flavonóides exibem uma grande ação sobre os sistemas biológicos demonstrando propriedades farmacológicas importantes como antioxidantes, antiinflamatórias, antialérgicas, antivirais, bactericidas, estimulante do sistema imunológico, vasodilatadoras e cardioprotetoras (KEEN, 2001; MURSU et al., 2004; KEEN et al., 2005; PROCHÁZKOVÁ et al, 2011).

A cinética de absorção dos flavonóides varia consideravelmente entre os alimentos devido à heterogeneidade de açúcares e outros grupos funcionais ligados ao núcleo de flavonas (WALLE, 2004). Após serem ingeridos os flavonóides são glicosilados e/ou convertidos em agliconas por glicosidases presentes na mucosa gastrointestinal e microflora do cólon, em seguida são absorvidos normalmente, passando pelos enterócitos, células epiteliais da camada do intestino delgado e intestino grosso (HOLLMAN et al., 1995; MARCHAND, 2002). Depois da sua absorção eles são conjugados no intestino delgado e no fígado pela glicuronidação, sulfatação ou metilação, ou são metabolizados a pequenos compostos fenólicos tornando-se metabólitos mais ativos (WALLE, 2004).

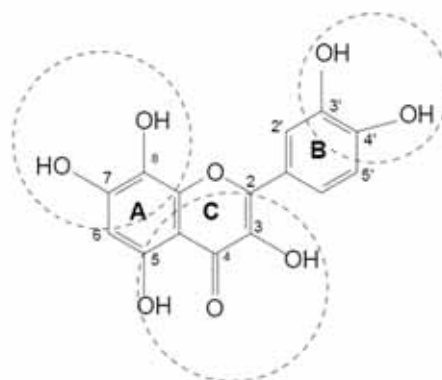
### **3.4 Mecanismos de ação dos flavonóides**

Os principais mecanismos de ação descritos na literatura sobre os flavonóides são: atividade antioxidante, antiinflamatória, inibição da síntese de óxido nítrico, ação antiestrogênica, inibição do sistema proteossomo e interação com outros sistemas enzimáticos (HANNEKEN et al., 2006; MILLER, 2006;) Nesse tópico serão abordados somente dois

mecanismos ligados a este trabalho: a ação antioxidante e interação com outros sistemas enzimáticos.

### 3.4.1 Ação antioxidante

Os flavonóides apresentam em sua estrutura química regiões conjugadas em anel, ricas em grupos hidroxilas capazes de doarem elétrons (Fig. 7). De modo geral, a atividade de sequestro de radicais livres se dá pela rápida doação de um átomo de hidrogênio aos radicais, e depende da sua estrutura molecular, substituição feita nos grupos hidroxilas, da possibilidade de estabilização dos radicais fenoxilas formados via ligação com hidrogênio ou pelo deslocamento expandido de elétrons (AMIC et al., 2003).

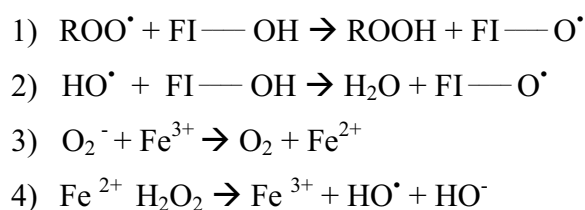


**Figura 7.** Regiões estruturais dos flavonóides com uma alta atividade de sequestro de radicais livres. Fonte AMIC et al (2003).

No primeiro caso, se os compostos possuírem grupos hidroxilas na posição 3' e 4' do anel B e ou na posição 7 e 8 do anel A, a sua atividade anti-radical é bastante aumentada. Portanto, o número e localização das hidroxilas fenólicas são fatores muito importantes para a eficácia da atividade antiradical. O segundo caso ocorre entre a dupla ligação conjugada entre C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> com um grupo 4-ceto, o qual é responsável pelo deslocamento de elétrons do anel B. Se

houver uma associação desta dupla com a presença de hidroxilas na posição 3 e 5, há um aumento dessa atividade (AMIC et al., 2003).

Quimicamente, a ação antioxidante dos flavonóides é desempenhada de acordo com as equações representadas na Figura 8. O flavonóide reduzido (FI – OH) e flavonóide oxidado (FI-O<sup>•</sup>) previnem a peroxidação lipídica através de aprisionamento de radicais de iniciação da peroxidação lipídica (Reação 1 e 2 da Fig. 8), entre eles: O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, OH<sup>•</sup>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>; e ligação a íons metálicos, podendo complexarem-se com íons de ferro e suprimir a reação de Fenton (Reação 3 e 4 da Fig. 8). Também agem aprisionando radicais peroxilas lipídicos e inibindo o sistema enzimático responsável pela produção de radicais livres (GROOT e RAUEN, 1998; BIRT et al., 2001). Dessa forma, a estrutura molecular dos flavonóides contribui para a geração de radicais ou intermediários estáveis (radicais fenoxilas) terminando assim a reação em cadeia.



**Figura 8.** Reação dos flavonóides como antioxidantes e anti-radicaís. Adaptado de GROOT e RAUEN, (1998).

Os flavonóides também exercem atividade antioxidante indireta por meio da ativação das regiões AREs (elementos antioxidantes de resposta) e favorecem a translocação do Nrf2 nuclear. Dessa forma, a ativação da via Keap1-Nrf2-ARE resulta no aumento da expressão do RNAm de algumas enzimas de proteção, incluindo a superóxido dismutase (CuZnSOD e MnSOD), glutathione S-transferase (GST) e catalase aumentando as defesas antioxidantes da célula (OSBURN e KENSLER, 2008).

De acordo com pesquisas realizadas por TANIGAWA e colaboradores (2007) flavonóis como a quercetina são citoprotetores, pois aumentaram a atividade de AREs pela *upregulação* da expressão de Nrf2, impedindo a sua ubiquitinação e degradação proteossomal, e acelerando a degradação de Keap1 de maneira proteossoma-independente em células de hepatoma (HepG2).

### **3.4.2 Interação com o sistema enzimático citocromo P450**

As enzimas do citocromo P450 são amplamente conhecidas pelo seu papel no metabolismo de fármacos e xenobióticos, desse modo a modulação deste sistema enzimático pode influenciar o metabolismo produzindo importantes efeitos farmacológicos e toxicológicos (CASCORBI, 2006).

De acordo com Conforti (2004) o genoma humano possui em torno de 60 a 100 genes codificadores de enzimas P450, muitos deles envolvidos na codificação de enzimas que metabolizam compostos exógenos. Os substratos para CYP450 incluem: vitaminas, esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas, aminas e xenobióticos de um modo geral, tais como drogas, carcinógenos ambientais, antioxidantes, solventes, anestésicos, corantes, pesticidas, produtos derivados do petróleo, álcool, entre outros.

Estudos sobre o mecanismo de ação dos flavonóides demonstraram a interação desses compostos com o citocromo P450 por meio da inibição da atividade enzimática das CYPs, principalmente as CYP 1A1, 1A2, 2E1 e 3A4. Essas enzimas são responsáveis pela ativação de um grande número de substâncias carcinogênicas como os hidrocarbonetos policíclicos e aminas heterocíclicas, uma vez que a maioria dessas substâncias necessitam de uma transformação metabólica para tornarem-se reativas e danificar o DNA. Assim, se as mutações não forem reparadas pelo sistema de triagem celular é possível que se inicie o

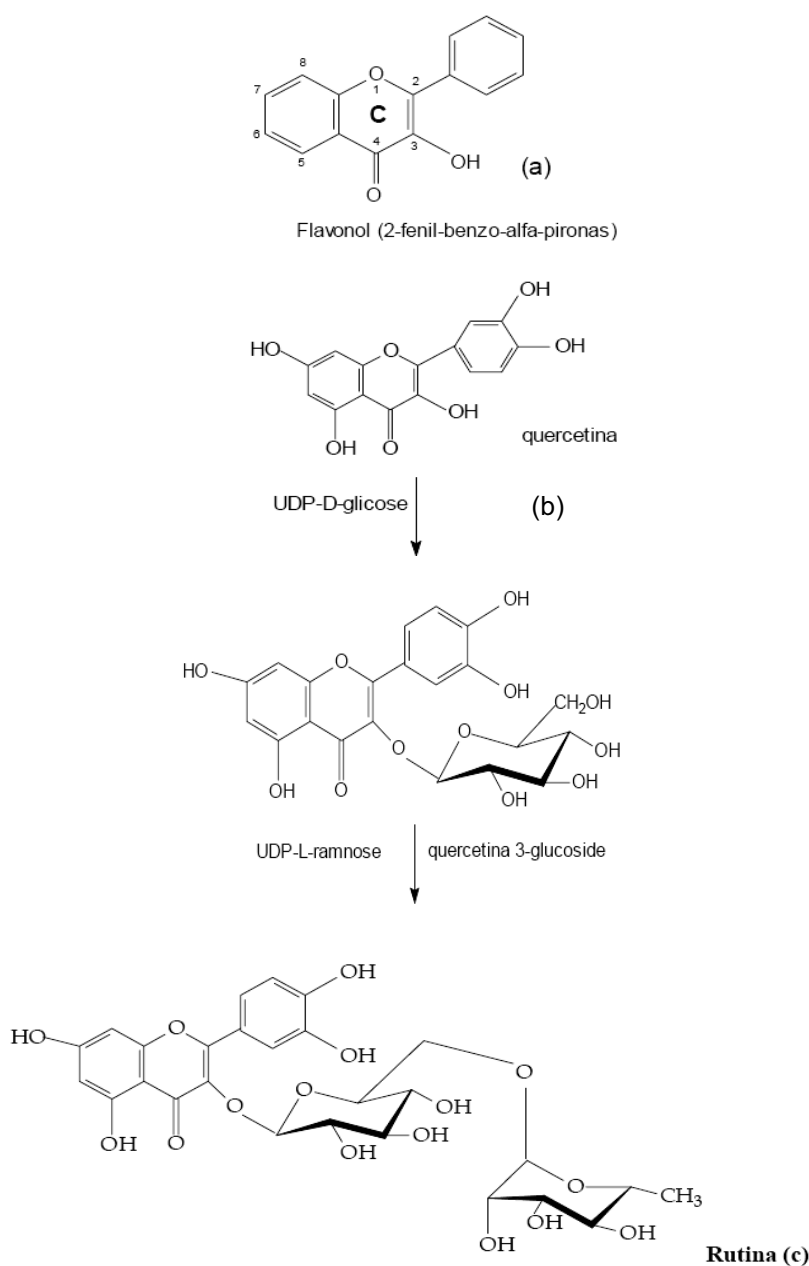
processo da carcinogênese (GUENGERICH et al., 1991; SIVARAMAN et al., 2004, SHASTR, 2006).

Os flavonóides como kaempferol, galangina e apigenina possuem efeitos inibitórios sobre o sistema enzimático citocromo P450 como as enzimas da família CYP1A, que evitam as transformações metabólicas de carcinógenos químicos impedindo a maior reatividade desses compostos com o DNA. Além disso, alguns efeitos dos flavonóides podem ser resultados da combinação da eliminação de radicais livres e de interações com enzimas do sistema hepático responsáveis pela detoxificação de drogas (MOON et al., 2006).

A indução de CYP1A pelos flavonóides como quercetina e kaempferol envolve alguns mecanismos, como a indução direta da expressão do gene via receptor específico, proteína CYP ou estabilização do RNAm (SHIH et al., 2000). Outro mecanismo de indução é a ligação ao AhR (receptor dos hidrocarbonetos aromáticos). Esta ligação pode ser explicada pela similaridade entre as estruturas, uma vez que tanto os flavonóides quanto os AhRs possuem forma planar (HODEK et al., 2002, CONNEY, 2003).

### 3.5 Rutina e suas atividades biológicas

A rutina, também denominada de quercetina-3-ramnosilglicosídeo é um flavonóide pertencente à subclasse dos flavonóis. Esta subclasse possui como característica molecular uma hidroxila ligada na posição 3 do anel pirano central como mostra Figura 9a. A quercetina (Fig. 9b) é a molécula pela qual a rutina (Fig. 9c) deriva-se e há uma ligação glicosídica na posição 3 do anel pirano central (YAO *et al.*, 2004).



**Figura 9:** Formação da rutina a partir da quercetina – pertencentes à subclasse dos flavonóis.

Fonte: Pedriali et al., (2008).

A rutina pode ser isolada de várias espécies de plantas, como da *Opuntia ficus indica* (figo-da-índia) (GALLATI et al., 2003), *Petasites japonicus* (MATSURA et al., 2002), *Fagopyrum esculentum* (trigo mourisco) (BAUMGERTEL et al., 2003), *Glehinia littoralis* (YUAN et al., 2002), entre outras.

No Brasil, a rutina tem sido extraída das favas de *Dimorphandra mollis* (Fig. 10) e comercializada sob a forma de um pó sem sabor e de cor amarelo-esverdeado (Fig. 11) (HENRIQUES, 1999).



**Figura 10:** Favas de *Dimorphandra mollis*.  
Fonte: <http://goo.gl/OHZJk> (acessado em 06/11)



**Figura 11.** Rutina comercial em pó (Sigma-Aldrich®).

A rutina é um glicosídeo encontrado em várias fontes alimentares como cebola, uva, trigo serraceno, feijão vermelho, maçã, tomate cereja e bebidas como vinho tinto e chá preto (GHARRAS, 2009). A afinidade dos glicosídeos pela membrana das células epiteliais exerce um importante papel na absorção dos compostos lipofílicos. Embora a absorção no intestino delgado seja dificultada devido aos açúcares ligados a sua molécula, a rutina é completamente hidrolizada por glicosidases produzidas pelas enterobactérias dando origem a quercetina 3-

glicosídica e a quercetina aglicona. Após a hidrólise dos açúcares, esta molécula passa a apresentar maior afinidade pelas membranas das células epiteliais, dessa forma é melhor absorvida e metabolizada. Concentrações de flavonóis em geral não ultrapassam 1-5 mmol/L no plasma sanguíneo (WALLE, 2004).

Nas últimas décadas as atividades farmacológicas da rutina têm sido intensamente pesquisadas e seus resultados são de grande interesse para a indústria farmacêutica. O uso da rutina em formulações cosméticas e farmacológicas se deve a melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos os quais estão associados a algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão. Este fato está relacionado com a propriedade desse flavonóide em promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede destes vasos. Outros sintomas de fragilidade capilar também são melhorados, entre eles estão o da perda da acuidade e alterações do campo visual. Estes efeitos podem ocorrer pela utilização isolada ou associada ao ácido ascórbico, inclusive a absorção deste último composto é melhorada quando administrado junto com a rutina (PATHAK *et al.*, 1991).

A rutina também foi descrita em eventos relacionados ao sistema imunológico atuando como inibidora de neoplasia induzida por azoximetanol (DESCHNER *et al.*, 1991); promovendo aumento da lipase pancreática com conseqüente redução dos níveis de triacilgliceróis em ratos (LIMA *et al.*, 1999); supressora do estresse oxidativo em leucócitos na artrite reumatóide (AFANAS'EV *et al.*, 2001), e atividade hepatoprotetora contra o paracetamol e CCL<sub>4</sub> em roedores (JANBAZ ET al., 2002).

Gao e colaboradores (2002) comprovaram que quantidades adequadas de ingestão de rutina administradas em camundongos, podem acentuar o estado antioxidante do fígado sem alterar os níveis de zinco, cobre e ferro, uma vez que a rutina aumentou significativamente a atividade da enzima MnSOD e diminuiu os teores altos de ferro, zinco e cobre nos animais tratados.

Rodrigues e colaboradores (2003) também demonstraram os efeitos benéficos da rutina sobre a circulação sanguínea de roedores. A administração de rutina (120mg/kg/semana), durante 15 dias, além de não alterar os índices glicêmicos de jejum, elevaram significativamente os níveis de lipoproteína de alta densidade (colesterol-HDL) e aumentaram a atividade da enzima superóxido dismutase. A suplementação nutricional com rutina demonstrou importante papel na prevenção da aterosclerose.

Estudos realizados por Aliá et al. (2006) investigaram os efeitos da rutina no crescimento e no sistema de defesa antioxidante das células HepG2. Os resultados mostraram que rutina nas concentrações de 0,1 a 100 $\mu$ M não apresentou efeito tóxico após 24 horas, diminuiu a atividade da glutathione redutase e reduziu a geração de ROS e MDA (malonaldeído). Os autores sugerem que este flavonóide pode agir impedindo o estresse oxidativo nas células de hepatoma.

Na tentativa de ampliar as aplicações da rutina, a de fim melhorar a solubilidade em água e facilitar o uso, estudos realizados por Pedriali et al., (2008) da síntese química de derivados hidrossolúveis, determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação da atividade antioxidante demonstraram que, apesar das modificações químicas, outros derivados, rutina succinil e rutina fenil-glutaroil, também apresentaram atividade de sequestro de radical livre, concluindo que a discreta modificação ocorrida no núcleo flavonóide não foi suficiente para impedir sua atividade de sequestro de radicais livres.

Recentemente, pesquisas sugerem uma nova aplicação para rutina no tratamento de doenças cardiovasculares. Segundo Gong et al. (2010) a rutina poderia atenuar a citotoxicidade causada pelo  $H_2O_2$  e impedir a indução da apoptose em células endoteliais (HUVECs) através da diminuição da ERO, indução do níveis de glutathione (GSH) e inibição do colapso do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), protegendo assim, contra os danos ao DNA. De acordo com Khan et al. (2009), a rutina inibe a apoptose através da

redução do níveis de expressão do gene p53 (supressor tumoral) e indução da atividade das enzimas antioxidantes endógenas (SOD, CAT, GPx e GR).

Panchal et al (2011) avaliaram o efeito da rutina sobre a síndrome metabólica induzida em ratos. Os resultados confirmaram que a administração de rutina preveniu as alterações metabólicas, tais como: gordura abdominal, tolerância à glicose, estresse oxidativo, inflamação no fígado e no coração e normalizou a expressão dos biomarcadores de apoptose. Dessa forma, a rutina pode atenuar as alterações crônicas da síndrome metabólica como obesidade, diabetes e hipertensão envolvidas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Atualmente, estudos epidemiológicos têm comprovado o potencial protetor da rutina contra danos no material genético. Zegota e colaboradores (2012) investigaram o potencial protetor da rutina em linfócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes recém-diagnosticados com câncer de cólon. Em suma, a rutina reduziu o estresse oxidativo causado por agentes mutagênicos de alimentos em linfócitos de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer de cólon. De acordo com os autores, a suplementação com vegetais e frutas ricos em flavonóides pode ser muito eficaz na proteção contra o estresse oxidativo.

Estudos realizados por Acquaviva et al. (2012) investigaram os efeitos da rutina em linfócitos de pacientes com câncer de colon retal. Para isso, foram selecionados pacientes afetados em uma fase inicial (T1, N0, M0 de acordo com a escala) e pacientes afetados em estágio avançado (T4, N1-2, M0) do tumor. Os resultados finais mostraram que a rutina protegeu as células sanguíneas do estresse oxidativo causado pelo estadiamento do tumor. No entanto, seus efeitos são significativos em estágios iniciais de câncer, desse modo, antioxidantes naturais como a rutina podem ser úteis para prevenir a progressão da carcinogênese.

## 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1. Substância-teste: flavonóide rutina

Para uso em cultura a solução de rutina (Sigma Chemical, CAS nº 153-18-4) foi dissolvida em DMSO (dimetilsulfóxido) e diluída em meio DMEM, sendo que a concentração de DMSO não ultrapassou 0,01% em cultura. A solução foi esterilizada utilizando-se uma unidade filtrante descartável de 0,22µm de porosidade (Millex<sup>®</sup> - Millipore).

As concentrações utilizadas nos experimentos variaram de 0,1-810µM. Essas concentrações foram selecionadas com base nas concentrações fisiológicas plasmáticas encontradas na literatura (AHERNE e O'BRIEN, 2000; ALÍA et al., 2006; RAMOS et al., 2008).

### 4.2. Agentes indutores de dano celular

A doxorubicina (CAS 25316-40-9; Adriblastina<sup>®</sup> - Pharmacia) foi utilizada como agente citotóxico e anti-proliferativo nos ensaios de citotoxicidade, cinética de proliferação e viabilidade celular na concentração final de 0,9 µM. Para a indução de danos ao DNA no ensaio do cometa foi utilizado o benzo(a)pireno (CAS 50-32-8; Fluka) na concentração final de 80µM. O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (CAS 7722-84-1 Perhydrol – Merk) também foi utilizado na concentração final de 80 µM com o indutor de estresse oxidativo nos ensaios de expressão gênica e análise da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e Gr).

A doxorubicina é uma potente droga citotóxica que se intercala na molécula de DNA, inibindo a síntese de RNA e DNA e a síntese proteica, fragmentando o DNA e inibindo seu reparo, com consequente morte celular (TOKUDOME et al., 2000). O benzo(a)pireno é considerado um agente mutagênico indireto, pois necessita ser metabolizado para que seus

metabólitos danifiquem o DNA através da formação de adutos induzindo a fragmentação ou oxidação (ALEXANDROV et al., 2010).

O  $H_2O_2$  é um dos oxidantes mais versáteis, superior ao cloro e dióxido de cloro. É através da catálise que o  $H_2O_2$  pode ser convertido em radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) com reatividade inferior apenas ao flúor. Apesar do poder de reação, o  $H_2O_2$  é um metabólito natural em muitos organismos, sendo decomposto, resulta em oxigênio e água. No entanto, é citado como o oxidante mais eficiente e também capaz de causar quebras no DNA. Dessa forma, o  $H_2O_2$  tem sido utilizado em experimentos *in vivo* e *in vitro* devido à relação direta entre os distúrbios celulares e a concentração de  $H_2O_2$  (VALKO et al., 2006)

#### **4.3. Linhagens celulares**

As células HTC provenientes de hepatoma de *Rattus norvegicus* e as linhagens celulares humanas de hepatoma (HepG2) e adenocarcinoma coloretal (HT-29) foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ). Já a linhagem 786-O (carcinoma renal humano) foi gentilmente cedida pelo Prof. João Ernesto de Carvalho - CPQBA / UNICAMP.

As quatro linhagens celulares foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco) com antibiótico/antimicótico (0,1%), mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. Nestas condições, o ciclo celular das linhagens foi de aproximadamente 24 horas.

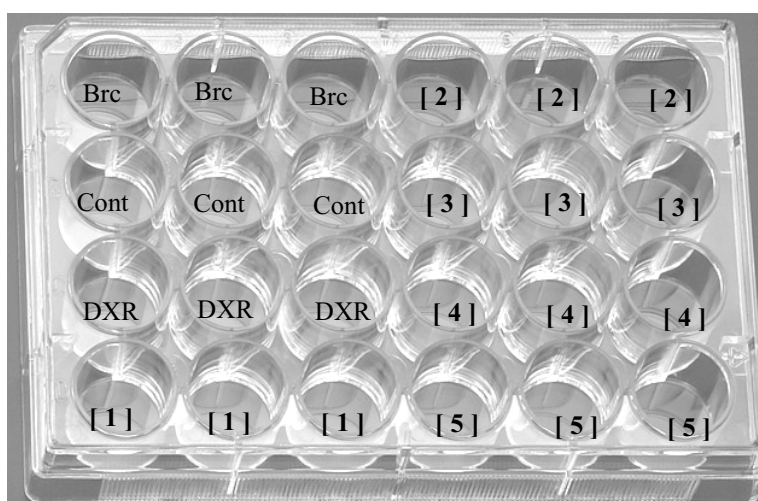
#### **4.4. Ensaio de citotoxicidade com a resazurina**

O ensaio de citotoxicidade foi realizado de acordo com o protocolo descrito por McMillia et al. (2002) com modificações. Neste ensaio, a citotoxicidade da rutina foi avaliada nas quatro linhagens utilizando a resazurina (Acros Organics, CAS 62758-13-8).

O ensaio foi realizado da seguinte forma: as células HTC, HepG2, HT-29 ou 786-O foram semeadas em placas de cultivo de 24 poços e permaneceram em cultura por um período de 24 horas para estabilização.

Posteriormente, o meio de cultura das placas foi descartado, deixando somente as células aderidas, em seguida foram adicionados os tratamentos. Após os tempos de exposição, os tratamentos com a rutina foram retirados e em seguida foi adicionado meio de cultura com a resazurina na concentração final de  $60\mu\text{M}$ . As placas foram incubadas por 3 horas. A leitura da fluorescência emitida pela resofurina (resazurina oxidada em células viáveis) foi feita em leitor de microplacas VICTOR 3 (530-560 nm de excitação e 580-600 nm de emissão). Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

Para os experimentos com as células HTC foram semeadas aproximadamente  $4 \times 10^4$  por poço. As células foram tratadas com concentrações 10, 30, 90, 270 ou  $810 \mu\text{M}$  de rutina por 20 horas. Para as linhagens Hepg2 e HT-29 foram semeadas aproximadamente  $5 \times 10^4$  células por poço e para as células 786-O foram semeadas  $5 \times 10^3$ . As culturas foram expostas ao tratamento com a rutina nas concentrações finais de 0,1; 1; 10; 50 e  $100 \mu\text{M}$  por 24 e 48 horas de acordo com a ilustração da Figura 11.



**Figura 11.** Esquema de placa de cultivo celular para o ensaio de citotoxicidade. Branco (Brc): meio de cultura sem células; Controle (Cont): meio de cultura com células; Doxorubicina (DRX): agente citotóxico,  $0,9 \mu\text{M}$ ; [1]:  $0,1 \mu\text{M}$  de rutina; [2]:  $1 \mu\text{M}$  de rutina; [3]:  $10 \mu\text{M}$  de rutina; [4]:  $50 \mu\text{M}$  de rutina e [5]:  $100\mu\text{M}$  de rutina. Fonte: Arquivo pessoal (2010).

#### 4.5. Ensaio de cinética de proliferação e viabilidade e celular

A cinética de proliferação e viabilidade celular utiliza o método de exclusão do azul de Trypan, um corante não lipofílico que não consegue entrar normalmente nas células, o que passa a ocorrer caso haja a ruptura da membrana plasmática, um sinal característico que antecede a morte celular. Assim, somente as células em morte celular se apresentam coradas em azul e com limites irregulares. As células vivas apresentam-se arredondadas, transparentes, com a membrana refringente e os limites nítidos (EISENBRAND et al., 2002).

O ensaio foi realizado de acordo com Marcarini et al. (2011), os tratamentos foram realizados em três repetições biológicas e para análise foi traçada uma curva de cinética de proliferação nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas. Foram semeadas  $10^5$  células/tratamento para a linhagem HepG2,  $2 \times 10^5$  células/tratamento para a linhagem HT-29, e  $2,6 \times 10^4$  células/tratamento para a linhagem 786-O.

Após 24h de estabilização as culturas receberam seus respectivos tratamentos: a) controle (PBS: phosphate buffered saline); b) agente anti-proliferativo (doxorubicina 0,9  $\mu$ M); e c) tratamentos com a rutina em três concentrações. Foram semeados 4 tubos de cultura para cada tratamento, cada um correspondendo a um tempo de colheita (24, 48, 72 ou 96 horas). Dessa forma, as células do tubo 1 foram contadas 24 horas após serem semeadas, no tubo 2 após 48 horas e assim sucessivamente.

A curva de proliferação foi montada de acordo com os dados obtidos nas contagens das células nos diferentes tempos. Foram contadas todas as células dos dois quadrantes centrais da câmara de *Neubauer*. Para a viabilidade celular determinada pelo método de exclusão com o reagente Azul de Trypan (0,2%) (Gibco, CAS 15250-061) foram contadas todas as células dos dois quadrantes centrais da câmara de *Neubauer*, distinguindo as células viáveis (c.v) (transparentes) das células não viáveis (c.nv) (azuis). A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a fórmula:  $\{\sum c.v / (\sum c.v + c.nv)\} \times 100$ .

#### 4.6. Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado segundo o protocolo de Tice et al. (2000). Para a avaliação da genotoxicidade da rutina a células HTC foram semeadas ( $\cong 5 \times 10^5$  céls/frasco) e após o período de estabilização (24h) as células receberam os tratamentos com benzo(a)pireno (80 $\mu$ M) agente indutor de danos ou com a rutina (10, 30, 90, 270 ou 810  $\mu$ M).

Na avaliação da genotoxicidade em células 786-O foram semeadas ( $\cong 2 \times 10^6$  céls/frasco) e tratadas com duas concentrações de rutina (10 e 50  $\mu$ M). Na avaliação do efeito protetor as células foram expostas por 24 horas somente com 10  $\mu$ M de rutina. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram lavadas (2x, PBS) e tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80  $\mu$ M) por 30 minutos. Após esse período foi realizada uma análise pós-tratamento a partir de: 0, 30min, 2 e 4h da exposição com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A porcentagem de redução dos danos do agente genotóxico pela rutina foi calculada de acordo com Waters et al. (1990) utilizando a seguinte fórmula: Redução (%) =  $(A - B/A - C) \times 100$  onde **A** é a média de nucleóides com dano tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, **B** é número de células observadas no pós-tratamento associado, e **C** é o número de nucleóides com danos do controle do ensaio.

Resumidamente, após os tratamento as células foram tripsinizadas (500  $\mu$ L de tripsina-EDTA 0,025%; 37°C), a suspensão celular centrifugada (5 minutos, 1000 rpm) e ressuspendida em 500  $\mu$ L de meio de cultura. Em seguida, esta recebeu 120  $\mu$ L de agarose baixo ponto de fusão (LMP – 0,5%), sendo este material depositado em lâminas pré-gelatinizadas (agarose de ponto de fusão normal; 1,5%) e levadas para solução de lise por pelo menos 1h. Após desnaturação (20 minutos) e eletroforese alcalina (25 V, 300 mA, 20 minutos), as lâminas foram neutralizadas, fixadas e mantidas sob refrigeração (4°C) até o momento da análise.

A coloração das lâminas foi realizada com brometo de etídeo e os nucleóides foram analisados em microscópio de fluorescência, com filtro de excitação 450-490 nm e filtro de emissão (barreira) de 515 nm, em aumento de 40X. Para cada tratamento foram analisados 300 nucleóides. Para a células HTC a análise foi visual (KOBAYASHI, 1995) e para as células 786-O a análise foi feita pelo software CometScore v.1,5 (TriTek, Sumerduck, VA, USA, [http://www. autocomet.com](http://www.autocomet.com)). Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas biológicas.

#### **4.7. Expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real**

##### *4.7.1 Tratamentos*

Para análise da expressão gênica, foram semeadas  $2 \times 10^6$  células por frasco de cultura ( $25\text{cm}^2$ ) para todas as linhagens em estudo. Após 24 horas de estabilização as células foram tratadas da seguinte forma: HTC com PBS ou  $810\mu\text{M}$  de rutina por 12 h; HepG2 e HT-29 com PBS ou  $10\mu\text{M}$  ou  $100\mu\text{M}$  de rutina por 12 e 24 horas e, 786-O com PBS ou 10 ou  $50\mu\text{M}$  de rutina por 24 horas.

Nas análises de pós-tratamento, as células 786-O receberam  $10\mu\text{M}$  de rutina por 24 horas e logo após foram expostas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 minutos. Após esse período foram realizadas as análises a partir de: 0, 30min, 2 e 4h da exposição com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para cada tratamento foram realizadas triplicatas biológicas.

##### *4.7.2 Extração do RNA total*

O procedimento de extração de RNA total das células foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do reagente do TRIZOL LS<sup>®</sup> (Invitrogen).

Após a extração do RNA foi feito o tratamento com DNase I<sup>®</sup> (Invitrogen). Em seguida verificou-se a integridade do RNA. Para isso, o RNA foi quantificado em

espectrômetro (Biophotometer – Eppendorf) sendo que a razão A260/280 deve estar entre 1.9 e 2.1, e foi submetido a uma corrida de eletroforese (70-80V, 30mA, 25-30 min) em gel de agarose 1% para verificar o padrão de bandas dos RNAs ribossomais 28S e 18S.

#### 4.7.3 Síntese do cDNA

Para a síntese de cDNA foi realizado o seguinte procedimento: a) preparação de um mix contendo: 9,9 µL de água DEPC (cat. 750023 Invitrogen); 2 µL de dNTP 2,5mM mix (cat. 18427-088 Invitrogen); 1 µL de oligodT 10pmol/µL; 4 µL de tampão M-MLV; 0,1 µL de RNase Out<sup>TM</sup> (cat. 10777-019 Invitrogen); 1µL de transcriptase Reversa M-MLV (cat. 28025-021 Invitrogen) e 2µL RNA total a 500 ng/mL; b) Incubação no termociclador por 50 min, 37°C, seguido de 15 seg a 70°C.

#### 4.7.4 PCR em tempo real

Para análise de expressão gênica foi utilizado o método de PCR quantitativa em tempo real. As reações foram realizadas no termociclador *PTC 200 DNA Engine Cycler*, usando o sistema de detecção *Chromo4* (MJ Research). Foi utilizado na reação *O Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix-UDG* (Invitrogen) (composto fluorescente que se liga à DNA dupla-fita).

As condições da PCR no termociclador foram às seguintes: uma etapa inicial a 50°C por 1 min, seguido de 95°C por 3 min, e 35 ciclos a 95°C por 20 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 20 seg, seguidos de 95°C por 10 seg e 40°C 1 min. A análise da curva de melting foi realizada no final da reação com temperatura de 50°C a 95°C a cada 0,5 graus por 5 seg.

Os dados foram normalizados com cDNAs de gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*) amplificados em cada conjunto de experimentos de PCRs. Todos os experimentos foram realizados com três culturas independentes.

Os dados de expressão gênica foram anotados como valores de Ct (*cycle threshold*). O valor de Ct refere-se ao número de ciclos de PCR no qual o sinal de fluorescência é detectado e está acima do valor de limiar da curva de amplificação (BUSTIN, 2000). Valores de Ct são representativos do número de cópias de moléculas de RNA e serve como base para a comparação entre amostras. O limiar (*threshold*) é posicionado na região de amplificação exponencial ou geométrica das curvas da amplificação onde a eficiência de PCR é maior.

A expressão relativa dos genes analisados foi determinada pelo método de Pfaffl (PFAFFL, 2001) através do programa REST© (Pfaffl et al., 2002) que utiliza o modelo *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*© para comparar a diferença de expressão entre os tratamentos (Figura 12).

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{CP}_{\text{alvo}}(\text{controle} - \text{amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{controle} - \text{amostra})}}$$

**Figura 12.** Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle.  $E_{\text{alvo}}$  é a eficiência do transcrito do gene alvo;  $E_{\text{ref}}$  é a eficiência do transcrito gene referência;  $\Delta\text{CP}_{\text{alvo}}$  é desvio de CP do controle – amostra do gene alvo transcrito;  $\Delta\text{CP}_{\text{ref}}$  é desvio de CP do controle – amostra do gene referência transcrito (Pfaffl et al., 2002).

#### 4.8. Atividade de enzimas antioxidantes endógenas

Para avaliar a atividade de enzimas antioxidantes foram semeadas  $3 \times 10^6$  células em frascos de  $75\text{cm}^2$  para as três linhagens (HepG2, HT-29 e 786-O). Após o período de estabilização (24h) as culturas receberam os seguintes tratamentos de acordo com item 4.7.1. Depois do período de incubação, o meio foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS e desprendidas da parede do frasco com 1mL tripsina-EDTA (0,025%;  $37^\circ\text{C}$ ). As células foram centrifugadas (1032 rpm;  $4^\circ\text{C}$ ), os sobrenadantes removidos e o sedimento suspenso em 500  $\mu\text{L}$  de PBS. Em seguida as amostras foram sonicadas durante 5 minutos por

4 vezes e centrifugadas novamente (7500 rpm, 4°C); os sobrenadantes foram coletados novamente e mantidos congelados (-80°C) até o momento das análises.

Para as análises bioquímicas foram utilizadas 50 uL de amostra, para cada ensaio. As enzimas antioxidantes que tiveram suas atividades medidas foram: a SOD, CAT, GPx e GR. A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de McCord e Fridovich (1969), pela inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido, observado no comprimento de onda de 550 nm a 25°C, em espectrofotômetro. A atividade da CAT foi determinada de acordo com a técnica descrita por Beutler (1975), seguindo-se a velocidade de decomposição da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através do decréscimo de absorbância a 240 nm em espectrofotômetro. A atividade da GPx foi determinada pela oxidação do NADPH<sup>+</sup> H<sup>+</sup> em presença de peróxido, de acordo com Hopkins e Tudhope (1973), em espectrofotômetro a 340 nm a 25°C. A GR foi determinada indiretamente, com base na redução de NADPH na presença de GSH oxidada (CARLBERG e MANNERVIK, 1975), a 340 nm. A concentração de proteína total desses sobrenadantes foi determinada por meio de método de Bradford (1976) em 595nm. Para cada tratamento foram realizadas de 3-4 repetições biológicas.

#### **4.9. Perfil metabólico por RMN H<sup>1</sup>**

##### *4.9.1 Tratamento e armazenagem*

As culturas de células HTC foram incubadas com rutina na concentração de 810µM durante 24 horas. Em seguida as células foram tripsinizadas com 1,5 mL de solução de tripsina a 0,025% (Invitrogen) e inativada com adição de 5 mL de meio DMEM com 10% de SBF. As suspensões celulares foram transferidas para tubos de centrifuga e suavemente homogeneizadas. Após a centrifugação (5min 1000rpm) o sobrenadante foi eliminado e o sedimento restante foi cuidadosamente ressuspendido em tampão PBS. A suspensão foi

congelada imediatamente em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração dos metabólitos.

#### 4.9.2 Extração do metabólito

Os metabólitos celulares foram extraídos como descrito por Le Belle et al. (2002). A solução metanol e clorofórmio ( $4^{\circ}\text{C}$ ) numa razão de 2:1 (v / v, 250  $\mu\text{L}$  / sedimento celular), foram adicionadas aos peletes congelados, em seguida a solução foi sonicada. Após 15 min. O clorofórmio e água destilada foram adicionados às amostras frias em uma proporção de 1:1 (250  $\mu\text{L}$ /sedimento celular), para formar uma emulsão. As amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . A fase superior (metanol e água) foi separada da fase inferior (orgânica), utilizando uma seringa de vidro. Os solventes de ambas as frações foram então removidos à temperatura ambiente sob pressão reduzida de um dispositivo de velocidade. Os extratos de solventes foram re-suspensos em 1,0 mMol/L solução de sódio.

#### 4.9.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear ( $\text{RMN } H^1$ )

Os espectros foram adquiridos com um espectrômetro Varian INOVA-500 ( $B_0 = 11,7$ ), operando a 499.886MHz de  $^1\text{H}$  usando uma ressonância tripla 5 milímetros (H, C, N) A sonda inversa com um gradiente de z. Cada experiência foi adquirida com 256 transiente a  $25^{\circ}\text{C}$ . O sinal da água residual intenso foi suprimido através de pré-saturação seqüência de pulsos. Os desvios químicos foram comparados com TSP (3 - (trimetilsilil)-tetradeutero-propionato de sódio) como referência. Os picos foram normalizados, e a diferença entre tratamentos foi calculado a partir da intensidade da área de pico pelo programa Origin 8.0. Deslocamentos químicos de  $\text{RMN } H^1$  e as constantes de acoplamento dos metabólitos mais característicos foram designados utilizando o MDL Magnetic Resonance Metabolomics Database (LUNDBERG et al., 2005).

#### **4.10. Análise estatística**

Os dados obtidos nos experimentos foram analisados pelo teste estatístico ANOVA seguido de Dunnett através do programa GraphPad Prism® considerando  $p < 0,05$ , comparando os tratamentos com diferentes concentrações de rutina com o grupo controle, exceto a análise dos níveis de expressão gênica que foram determinados pelo programa REST© (Pfaffl et al., 2002) utilizando o modelo *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*© para comparar a diferença de expressão entre os tratamentos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

ESTE TÓPICO SERÁ APRESENTADO A SEGUIR NA FORMA DE ARTIGOS CIENTÍFICOS.

**ARTIGO 1:** Influence of rutin flavonoid on *GSTa2* and *p38* genes expression and metabolic profile through NMR from HTC hepatic cells.

**ARTIGO 2:** Efeitos da rutina na proliferação celular, atividade enzimática antioxidante e expressão dos genes CuZnSOD, CAT, GPx1, GR, CYP1A1 em células HepG2 e HT-29.

**ARTIGO 3:** Rutina protege células renais 786-O do estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via expressão de HSPA5 e GADD153.

## 5.1 ARTIGO 1

---

### **Influence of rutin flavonoid on *GSTa2* and *p38* genes expression and metabolic profile through NMR from HTC hepatic cells.**

Juliana C. Marcarini<sup>a\*</sup>; Daniele Sartori<sup>b</sup>; Andressa M. Niwa; Marcela S. F. Tsuboy<sup>a</sup>; José P. F. Angeli<sup>c</sup>; Fernando C. de Macedo Jr<sup>d</sup>; Mário S. Mantovani<sup>b</sup>; Lúcia R. Ribeiro<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidades Estadual “Júlio Mesquita Filho” Rio Claro, São Paulo, Brazil;

<sup>b</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

<sup>c</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil;

<sup>d</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

\*Corresponding author

Universidade Estadual Paulista-Unesp  
Instituto de Biociências, campus Rio Claro, SP, Brazil  
CEP. 13506-900  
E-mail: marcarini.jc@gmail.com  
Phone: +55 (19) 3526-4136

**Abstract**

Rutin is an active flavonoid, well known for having vasodilator and anti-inflammatory properties, also playing an important role on oxidative stress as antioxidant. Although this properties could be related to human health promotion, little is known about the rutin role on genes expression and metabolic profile. Considering that many of these effects depend on used concentrations, we tested five rutin concentrations (10- 810uM) in HTC hepatic cells and none of them was citotoxic, however the comet essay presented genotoxicity for the highest concentration (810uM). The metabolic profile analysis through RMN from HTC cells which were exposed to genotoxic concentration of rutin (810uM) revealed lower levels of phosphocholine, glycerophosphocholine, creatine, lactate, acetate and glutathione. However, there was no changes in *GSTa2* and *p38* genes expression, respectively related to drugs metabolism and cell cycle control. Considering the obtained results, rutin presents genotoxic potential when in high concentrations and leads to changes on metabolic profiles from hepatic cells.

Keywords: flavonol, cell culture, genotoxicity, gene expression, metabolic.

## 1. INTRODUCTION

Flavonoids are polyphenolic compounds biosynthesized from phenylpropanoid pathway and acetate, precursor of several substances groups as aliphatic amino acids, terpenoids, fatty acids and others (Middleton et al., 2000). Are important components of human diet although, generally, do not be considered nutrients. Naturally found in fruits and vegetables, the estimated total consumption varies between 0.026 mg and 1 g/day (Hertog et al., 1992).

Rutin consumption is linked to body protection against heart diseases and cancer (Lin et al., 2001) and there are reports that it exercises multiple biological effects, including anti-inflammatory, antiviral, anti-allergic, and are regarded as potent antioxidants in the catch of free radicals (Bravo, 1998; Gong et al., 2010; Gupta et al., 2010). Flavonoids consumption can also model the activity of several enzymes such as cytochrome P450, epoxide hydrolase, glutathione transferase, DNA and RNA polymerases and topoisomerase (Ono and Nakane, 1990). Though these properties can be related by flavonoids antigenotoxic activity in experimental systems, little is known about the cytoprotective potential offered by these components to diet of human beings.

Although there are evidence that a diet rich in flavonoids may promote good health, uncertainly remains about its needed levels and conditions of use, since flavonoids are also chemical substances potentially harmful. (Procházková et al., 2011). Moreover, results from different studies (Lee-Hilz et al., 2006; Park e Pezzuto, 2012; Van Dan et al; 2013) demonstrated that flavonoids can act as pro-oxidants, this way they can inhibit the cell antioxidant defense system and lead to DNA oxidative damage related to genotoxic activity.

Flavonoid rutin used in this study, is a flavonol which has a disaccharide bound to position 3 of pyran ring. It is found in many food sources such as onions, grapes, wheat buckwheat, red beans, apples, tomatoes and beverages like red wine and black tea (Thomson

et al., 1999). Although absorption in small intestine be hampered due to attached sugar to its molecule, the glycosides affinity by epithelial cells membrane plays a key role easing this flavonoid absorption (Murota, 2003).

Rutin has been reported in events related to improvement of symptoms over impaired lymphatic and venous blood vessels, associated with some hemorrhagic or hypertension diseases, by promoting resistance and permeability normalization of walls from these vessels (Pathak et al., 1991).

Other studies have demonstrated dose-response effect on inhibiting the peroxidation of low density lipoprotein (LDL) (Jiang et al., 2007), hepatoprotective activity in mice treated against hepatotoxic chemicals agents such as paracetamol and carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) (Janbaz et al., 2002) and decreased of oxidative stress in leukocytes in rheumatoid arthritis (Afanas'ev et al., 2001).

Previous researches that we have made in our lab demonstrated genotoxic activity for high Rutin concentrations (810 µM) into HTC cells (hepatoma from *Rattus norvegicus*). However, these genetic material damages were not able to induce apoptosis (Marcarini et al. 2011).

In order to verify the genotoxic activity of Rutin, this study held the comet assay, evaluated the expression of *GSTa2* and *p38* genes which are respectively involved in drugs metabolism and cell cycle control, while it has been identified the main metabolites related to genotoxicity from hepatoma cells (HTC) that were exposed to this flavonoid in a short period of time, with respect to those already described in literature.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *2.1. Rutin*

For use in cell cultures, rutin (Sigma Chemical, CAS no. 153-18-4) was dissolved in DMSO (dimethylsulfoxide) and diluted in DMEM-F12 medium, where the concentration of DMSO did not exceed 0.01% in culture. The solution was sterilized using a disposable filtration unit of 0.22  $\mu\text{m}$  porosity (Millex<sup>®</sup> - Millipore).

### 2.2. DNA damage-inducing agent

The DNA damage-inducing agents used for the positive control of the experiments were doxorubicin (CAS 25316-40-9; Adriblastina<sup>®</sup> - Pharmacia), benzo[a]pyrene (CAS 50-32-8; Fluka). Doxorubicin was used as the agent cytotoxicity at a concentration 0,9  $\mu\text{M}$ . Benzo[a]pyrene, was used as the DNA damage inducing agent at a concentration of 80 $\mu\text{M}$  in the comet assay.

### 2.3. HTC cell line

HTC cells, from hepatoma of *Rattus norvegicus*, were acquired from the Cell Bank of Rio de Janeiro (UFRJ). The cells were grown in 25cm<sup>2</sup> culture flasks containing DMEM/F12 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), in chamber incubator 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Under these conditions, the cell cycle of this line was approximately 24 hours.

### 2.4. Cytotoxicity evaluation – resazurin-based assay

Approximately  $4 \times 10^4$  cells were seeded in each well of a 24 wells-microplate. After 24h stabilization, cells were treated with rutin for 20 hours. At the end of this period, medium was removed, wells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and cells were incubated with resazurin 60  $\mu\text{M}$  (CAS 62758-13-8; Acros Organics) for 3h. Fluorescence was measured with VICTOR 3 (Perkin Elmer) at 530-560 nm of excitation and 580-600 nm of emission

ranges. Final concentrations of rutin used in cytotoxicity experiments were 10, 30, 90, 270 and 810  $\mu\text{M}$ . Control treatment was medium with 1% DMSO and control of cytotoxicity induction was doxorubicin at final concentration of 0,9  $\mu\text{M}$ . Were performed three repetition in biological triplicate.

### 2.5. Comet assay

For evaluate the genotoxicity cells were treated with five concentrations of rutin defined by citotoxicity assay for 20 hours.

The comet assay was carried out according to the protocol of Tice et al. (2000). Thereafter,  $5 \times 10^5$  cells were mixed with agarose Low Melting Point (1,5%) and then transferred to agarose-coated slides, coverslipped and cooled at  $4^\circ\text{C}$  for 20 min. After removal of the coverslips, the slides were immersed in fresh lyses solution composed of 89 mL of lysis stock solution (2.5 M NaCl, 100mM EDTA, 10.0 mM Tris, pH 10, adjusted with solid NaOH, 890 mL distilled water and 1% sodium lauryl sarcosinate), 1.0 mL Triton X-100 (Merck) and 10 mL dimethyl sulfoxide. Cells were lysed for 1 h at  $4^\circ\text{C}$ , in the dark and next, the slides were transferred to an alkaline solution (pH 13.0; 300 mM NaOH and 1 mM EDTA, prepared from a stock solution of 10 M NaOH and 200 mM EDTA) at  $4^\circ\text{C}$  for 40 min to denature DNA. Electrophoresis was run at 25 V and 300 mA (25 V/cm) for 20 min and subsequently, the slides were neutralized with pH 7.5 buffer (0.4 M Tris-HCl) with 3 5-min changes, air dried, fixed in absolute ethanol for 10 min and stored for later scoring. The slides were stained by covering with 100  $\mu\text{L}$  of ethidium bromide and a coverslip and the cells were evaluated with a fluorescence microscope (Nikon) at 40 X, using a 420–490 nm excitation filter and a 520 nm barrier filter. A total of 100 cells per treatment were inspected visually. The comets were classified as the following: Class 0 - cells showing no tail, Class 1 - cells with a tail size less than the diameter of the nucleoid, Class 2 - cells with a tail size two times

longer than the diameter of the nucleoid, Class 3 - cells with a tail size greater than twice the diameter of the nucleoid and Class 4 - cells with a tail size greater than three times the diameter of the nucleoid (Colins et al., 2008). The total score was calculated as the sum of the number of cells scored for each class multiplied by the value of that class.

Cell viability was determined along with the comet assay for each treatment. After the treatment period and harvesting the cells by trypsinization, 20  $\mu$ L of the cell suspension was mixed with 20  $\mu$ L of trypan blue (Gibco) in a 1.5-mL microtube. The cells were counted in a Neubauer chamber using light microscope, where the viable cells were unstained and nonviable cells appeared blue. Cell viability was expressed as the percentage of viable of total number of cells examined.

*Modified comet assay.* After lysis, slides for measurement of oxidized bases were washed three times in enzyme buffer (0.1 M KCl, 0.5 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 40 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulphonic acid and 0.2mg/mL bovine serum albumin, pH 8.0) and then incubated for 30 min at 37°C with 45  $\mu$ L of enzyme Endonuclease III (ENDO III) from *Escherichia coli* and formamidopyrimidine glycosylase (FPG) from *E. coli*, Sigma-Aldrich or 45  $\mu$ L of enzyme buffer.

## 2.6. Real time RT-PCR

The HTC cells ( $2.0 \times 10^6$ /flask) were incubated for 24 h and subsequently treated for 12h with the following treatments: 1) Control (PBS) and 2) 810 $\mu$ M of rutin. Total RNA was extracted using TRIzol LS reagent (Invitrogen, Life Technologies).

First-strand cDNA synthesis was performed with reverse transcriptase (RT M-MLV, Invitrogen) according to the manufacturer's protocol and using 1  $\mu$ g of total RNA as the template.

Real time PCR reactions were performed in a PTC 200 DNA Engine Cycler using a Chromo4 Detection System (MJ Research).

The oligonucleotides utilized in these experiments are synthesized according to the following sequences:

*p38* - forward - 5' AAGTCATTAGCTTTGTGCCACCGC 3',

reverse - 5' AGTGGGATGGACAGAACAGAAGCA 3' (Niwa et al., 2013);

*GSTa2* - forward - 5' AGCCATGGCCAAGACTACTTGTA 3',

reverse - 5' AGAGGTCAGAAGGCTGGCATCAAA 3' (Pickett et al., 1986);

*GPDH* – forward - 5' ACAAGATGGTGAAGGTCGGTGTCA 3',

reverse - 5' AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT 3' (Tso et al., 1985).

The Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen, Life Technologies) was used as the reaction mixture to which 0.4  $\mu$ M of each primer and 2  $\mu$ L of template cDNA were added. The final reaction volume was 25  $\mu$ L. The PCR thermal cycling conditions included an initial step at 95°C for 5 min; 40 cycles at 95°C for 20 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 20 sec; another step at 95°C for 10 sec; and finally 40°C for 1 min. A melting curve analysis was consistently performed at the end of the reaction with temperatures between 50°C to 90°C. The data were normalized using the *GPDH* housekeeping gene (Tso et al., 1985) cDNA that was amplified in each set of PCR experiments. The relative expression data were obtained using the Pfaffl method (Pfaffl, 2001). Each experiment was performed in biological triplicate.

## 2.7. NMR metabolomics

*Cell treatment.* The cell cultures were incubated with rutin at a concentration of 810  $\mu$ M for 24 hours. The cells were then detached from the culture flasks by adding 1.5 mL of 0.025 %

trypsin solution (Invitrogen). The trypsin was inactivated by adding 5 mL DMEM medium with 10 % FBS. Single-cell suspensions were gently homogenized into tubes and centrifuged. The supernatant was discarded and the remaining pellet was cautiously resuspended in PBS (Phosphate Buffered Saline) buffer. The suspension was centrifuged and the cell culture pellets were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

*Cell extraction.* The cell pellets were extracted as described by Le Belle et al. (2002). Reagent-grade methanol and chloroform (4°C) in a ratio of 2:1 (v/v, 250 µL/cell pellet) were added to the frozen cell pellets and the cell pellet–solvent mixture was sonicated. After approximately 15 min., chloroform and distilled water were added to the cold samples in a ratio of 1:1 (250 µL/cell pellet) to form an emulsion. The samples were then centrifuged at 13,000 rpm for 20 min at 4°C. The upper phase (methanol and water) was separated from the lower (organic) phase using a glass syringe. The solvents of both fractions were then removed at room temperature under reduced pressure in a speed vac device. The solvent free extracts were re-suspended in a 1.0 mMol/L sodium trimethylsilylpropionate D<sub>2</sub>O solution.

*NMR spectroscopy.* The <sup>1</sup>H NMR spectra were acquired with a Varian INOVA-500 spectrometer (B<sub>0</sub> = 11.7), operating at 499.886MHz for <sup>1</sup>H using a 5mm triple resonance (H, C, N) inverse probe with a z-gradient. Each experiment was acquired with 256 transient at 25°C. The intense residual water signal was suppressed using pre-saturation pulse sequence. Chemical shifts were compared to TSP (3-(trimethylsilyl)-tetradeutero-sodium propionate) as a reference. The peaks were normalized, and the difference between treatments was calculated from the intensity of the peak area by the program Origin 8.0. Chemical shifts of <sup>1</sup>H NMR and coupling constants of the most characteristic metabolites were assigned using the MDL Magnetic Resonance Metabolomics Database (Lundberg et al., 2005).

### 2.8 . *Statistical analysis*

The data obtained in the cytotoxicity assay were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet's tests.

The scores obtained in Comet assay, were analyzed using Student's t-test comparing treated cultures in relation to control. In all tests,  $\alpha = 0.05$  was considered. The analyses were carried out with the help of the GraphPad InStat<sup>®</sup> program, version 3.02.

For *Real time RT-PCR* was used software REST 2009 (Relative Expression Software Tool – V2.0.13 Qiagen<sup>®</sup>).

## 3. RESULTS

### 3.1. *Cytotoxicity evaluation – resazurin-based assay*

Figure 1 shows the values obtained in assay the cytotoxicity in HTC cells treated with rutin. The readings of the cytotoxicity assay showed that rutin concentrations of 10, 30, 90, 270 and 810  $\mu\text{M}$  after 20h of treatment gave an absorbance next to that of control.

### 3.2. *Comet assay*

The data analyzed for the evaluation of the genotoxicity and cell viability of rutin are shown in Figure 2. Statistical analysis showed that only the highest concentration of rutin, 810  $\mu\text{M}$  showed genotoxic effects after 20 hours of treatment.

In order to better clarify how rutin induces DNA damage, it was performed a modified version of the comet assay with ENDO III and FPG enzymes and the use of the probe 2'7'-dichlorofluoresceinviacetate (DCFH).The results showed that the 810  $\mu\text{M}$  concentration of rutin leads to an increase in the number of ENDO III and FPG- sensitive sites (Figure 3).

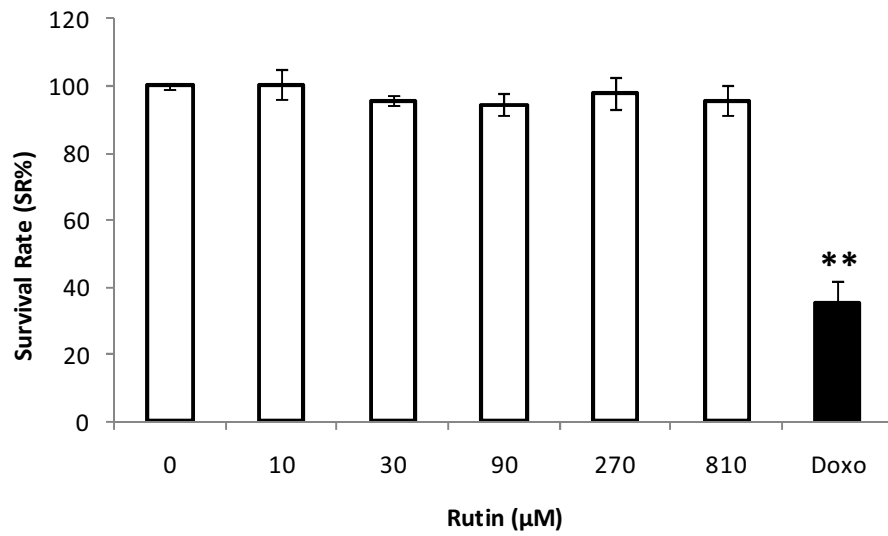
### 3.3. Real time RT-PCR

The p38 MAP kinase and GSTa2 genes expression results represented in Figure 4 showed that rutin concentration of 810 $\mu$ M did not altered these genes expression after 12 hours of treatment.

### 3.4. NMR metabolomics

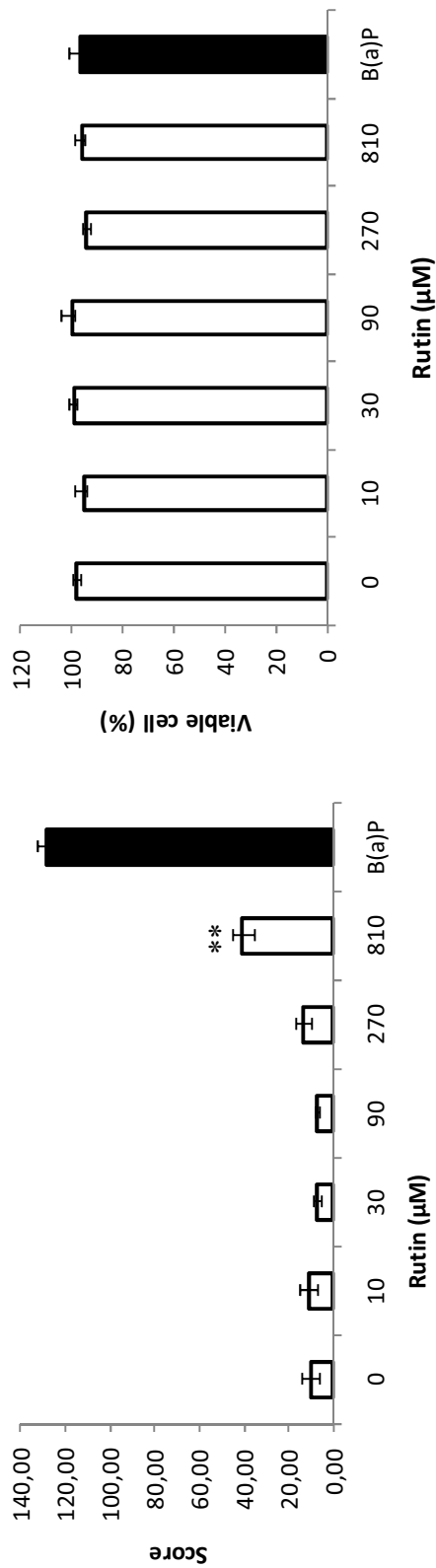
The analysis of differential intensity areas from NMR normalized spectra had a metabolites profile decrease on HTC cells which were treated with rutin (Fig. 5).

After 24 hours of treatment with rutin (810  $\mu$ M) HTC cell cultures showed a phosphocholine and glycerophosphocholine lower levels (83% and 81% respectively (Fig. 6E). Creatine and lactate were reduced by 39% (Fig. 6F) and 43% (Fig. 6A,B) while acetate (Fig. 6C) and glutathione (Fig. 6D) were decreased by 75% and 60% for cells that did not received the treatment.

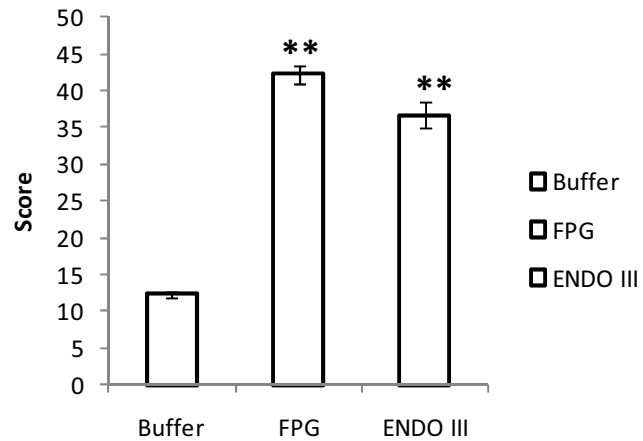


**Figure 1.** Cytotoxicity of the flavonoid Rutin. Survival Rate obtained after treatment of 20 h with rutin. Each bar represents the mean  $\pm$ S.D. of results from three independent experiments.

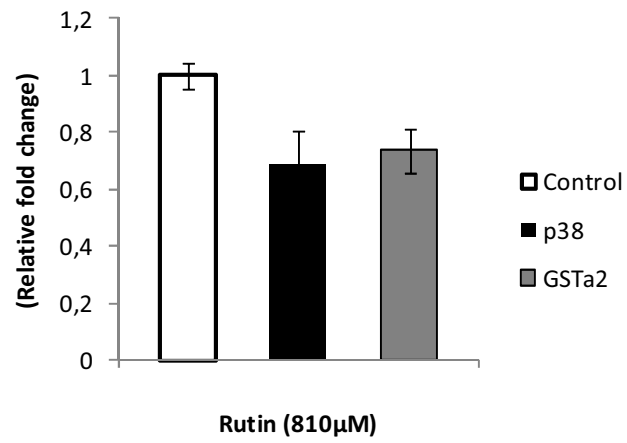
\*\* Statistically significant difference in relation to the control (Dunnett's test,  $p < 0.01$ ).



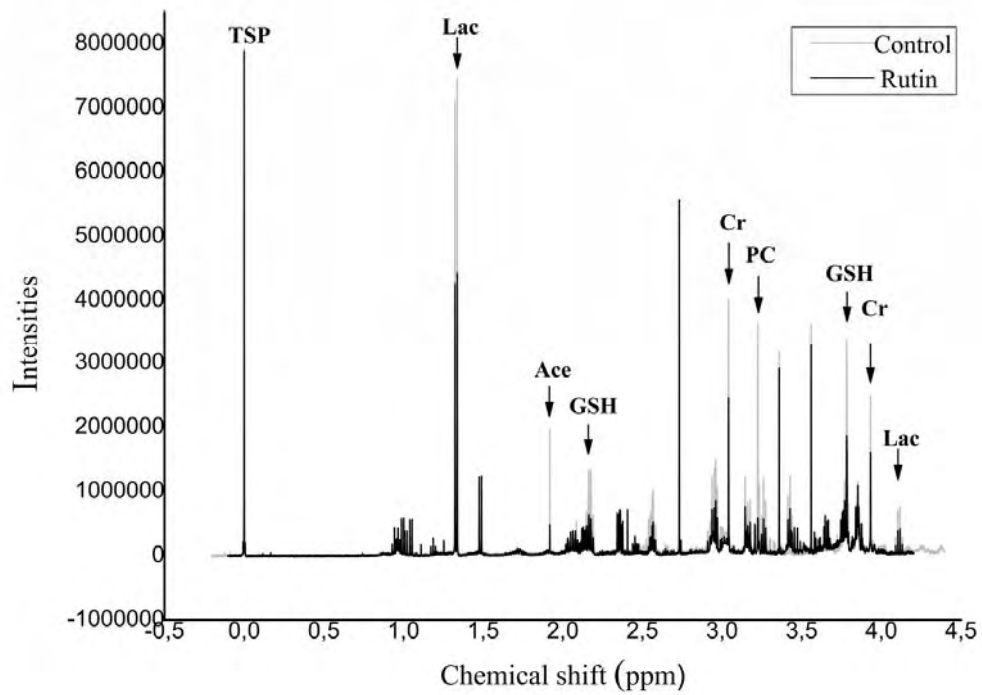
**Figure 2.** Mean score of comets observed in HTC cells (a) and cell viability (b) found after treatment of 20 h with five concentrations of the flavonoid rutin in HTC cells. Analysis of 300 cells per treatment. Each bar represents the mean  $\pm$ S.D. of results from three independent experiments. Control, PBS; (B[a]P), benzo[a]pyrene - 80 $\mu$ M. \*\* Statistically significant difference in relation to control (Dunnett's test,  $p < 0.01$ ).



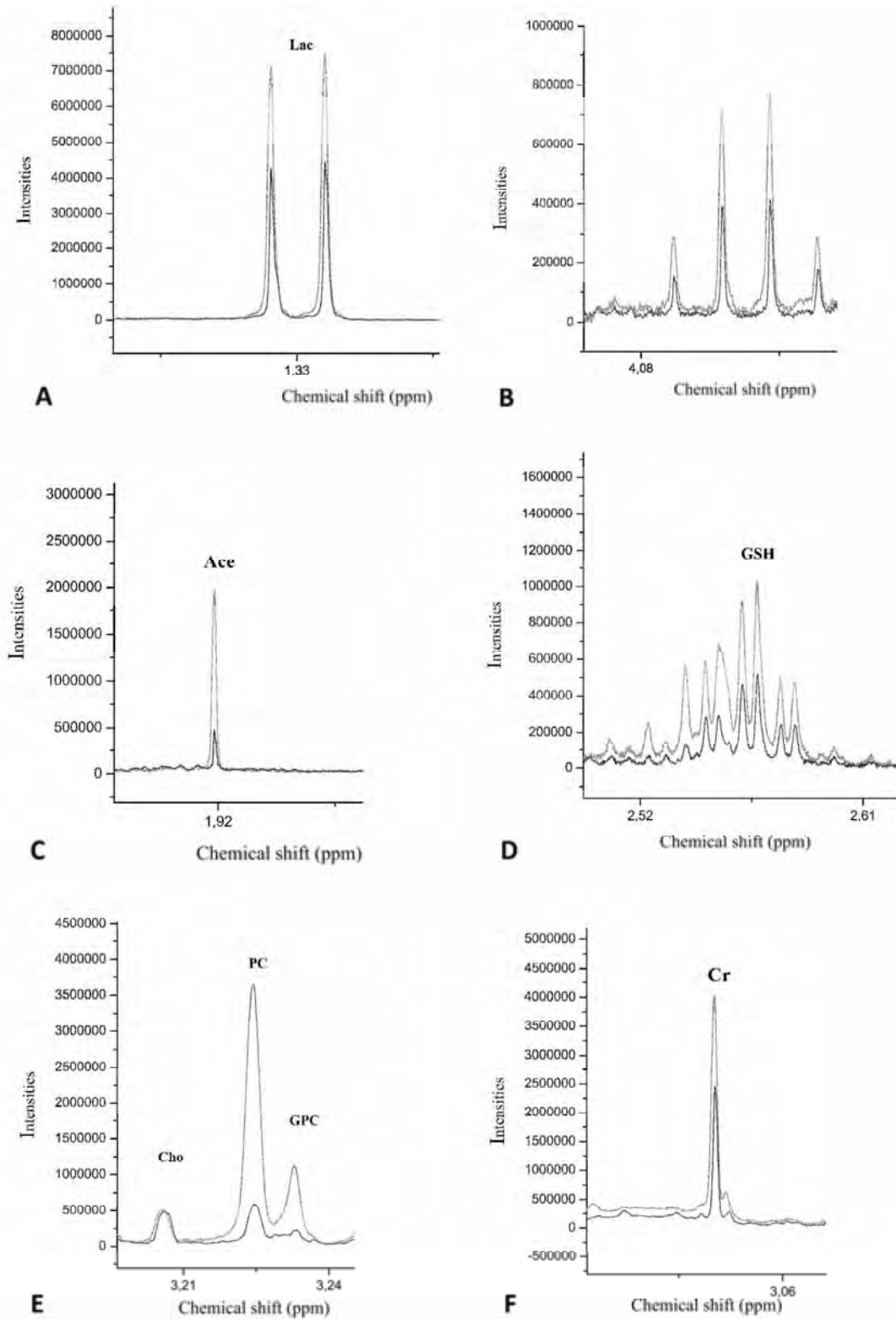
**Figura 3.** Induction of FPG- and ENDO III-sensitive lesions by 810 uM rutin in HTC cells. After lysis, the nuclei were incubated with the enzyme for 30 min. Each bar represents the mean  $\pm$ S.D. of results from three independent experiments. \*\* Statistically significant differences in relation to control (Dunnett's test,  $p < 0.01$ ).



**Figura 4.** Real time RT-PCR analysis of the *p38* and *GSTa2* transcripts of the HTC cells treated for 12h with rutin.



**Figure 5.** Representation of two overlapping  $^1\text{H}$  NMR spectra showing sample control signs and treated. The reference for the chemical shift was TSP (3 - (trimethylsilyl)-tetra deuterio sodium propionate).



**Figure 6.** Representation of two overlapping <sup>1</sup>H NMR spectra showing control sample signals and treated of identified main metabolites: Lac - lactate singlet (A) and lactate quartet (B); Ace - acetate (C); GSH - glutathione (D); Cho - choline, PC - phosphocholine, GPC - glycerophosphocholine (E) and Cr - creatine (F). Legenda: — Control; - - - Rutina.

#### 4. DISCUSSION

Rutin is a flavonoid present at varying amounts in most fruits, vegetables and cereals, e.g. apples, grapes, onions, tomatoes and buckwheat (Acker et al., 2006). It is considered a pro-drug, metabolized in active way by intestinal microflora of colon. Walle and collaborators (2004) have demonstrated that rutin was completely hydrolyzed by glycosidases produced by enterobacteria, yielding quercetin 3-glucoside and quercetin aglycone. After its absorption, rutin is conjugated in small intestine and liver by glucuronidation, methylation, sulfation or metabolized into small phenolic compound (Yang et al., 2001; Heim et al., 2002). In general, flavonols concentrations does not exceeds 1-5 mmol/L of blood plasma (Hertog, 1992). Although being less active than others flavonols, it was reported that rutin can inhibit cyclooxygenase (COX) enzyme and lipooxygenase (LOX), kinase C protein and some tyrosine kinases enzymes (Hong et al., 2001).

Although rutin possesses biological activities of interest, eg. antioxidant and anti-inflammatory action (Harborne and Williams, 2000) little is known about its cytotoxic and genotoxic potential, since flavonoids are potentially harmful chemicals substances, because they showed mutagenic effect in studies using test systems on bacteria and mammals. (Skibola and Smith, 2000).

Previous studies our research group showed the cytotoxic and genotoxic activity of rutin after 24 hours of treatment with HTC cells (Marcarini et al., 2011). However, this genotoxic activity may be related to exposure time, because it accentuates the pro-oxidant effect of this flavonoid.

With the aim of checking whether the genotoxic effect of rutin persisted in shorter exposure time, we reduced to 20 hours treatment time. This interval does not affect the cell cycle, since in our experimental conditions the division cycle of that lineage is approximately 24 hours (Marcarini et al., 2011).

Aiming to ensure our results reliability, there was held the cytotoxicity assay, since cytotoxic concentrations could eventually lead to false-positive results due to chromosomic damages (Muller et al., 2001). Our results have demonstrated again that the tested rutin concentrations (10-810 $\mu$ M) did not displayed cytotoxic effect after 20 hours of treatment.

The absence of cytotoxic effect was also observed by Chow et al. (2005) at *in vitro* experiments using MTT assay. According to this results, concentrations between 25 and 100  $\mu$ M of rutin did not displayed cytotoxic effect after 12 hours of treatment in RAW 264.7 lineage macrophages.

Considering information from the literature where it is stated that a flavonoid-rich diet can offer preventive health effects, it remains uncertain about the conditions and consumption levels of this flavonoid. Therefore, were performed the test for rutin genotoxicity.

In our experimental conditions, the highest concentration (810  $\mu$ M) continued to present the genotoxic effect after 20 hours of treatment. This result was also found with 24 hours of exposure within a previous work (Marcarini et al. 2011). In order to better clarify the mechanism in which rutin induces DNA damages, there was made a modified version from comet essay. The results shown that 810  $\mu$ M rutin concentration increased the FPG and Endo III sites (Figure 3), suggesting the genotoxic effect involves oxigen reactive species, since this enzymes are able to recognize oxidized bases. According to Kessler (2003), flavonoids such as quercetin and rutin can act as pro-oxidant and not as antioxidant after prolonged treatment at high concentrations. Thus, auto-oxidation or reactive alkylating products yielding by rutin exposure can be responsible for DNA damages found in HTC cells.

Another hypothesis for DNA oxidation proposed by Hadi et al. (2007) can be related to some polyphenols ability to form a rutin-DNA-Cu<sup>+2</sup> ternary complex in presence of transition metals (as copper). This can lead to Cu<sup>+2</sup> yielding, which could catalyze on OH radical generation, leading to DNA oxidation as evidenced by Comet assay.

In order to clarify what is the presumable mechanism of rutin genotoxicity in HTC cells, it was evaluated the p38 MAP kinase and GSTa2 genes expression and analyzed the metabolic profile of exposed cultures to flavonoid.

The p38 pathway activation is involved in processes of growth, differentiation and activation from cellular death (Zarubin and Han, 2005). Genes of class alpha, which encode the enzymes glutathione transferase responsible for the detoxification of electrophilic compounds, are more highly expressed in the liver. Besides bilirubin metabolizing and certain anti-cancer drugs, the alpha class of these enzymes exhibits glutathione peroxidase activity, thus protecting cells from reactive oxygen species and peroxidation products (Sahu and Gray, 1996).

Although 810uM rutin concentration has been genotoxic, there were no changes over p38 MAP kinase and GSTa2 genes expression, since DNA damages could trigger changes in the cellular context, by modifying cytosolic proteins and membrane receptors expression that would affect the cell cycle or lead to apoptosis.

Analysis of the metabolic profile after a cell cycle (24 hours) showed reduction of phosphocholine and glicerophosphocoline (83 and 81% respectively).

These compounds containing choline are important metabolites involved in phospholipids metabolism, which consists in a complex set of biosynthetic and catabolic collapse pathways (Glunde et al., 2004).

The decrease of these metabolites can reflect a cell population reduction (Chung et al., 2002), however, this reduction did not occurred in our experimental conditions, since the HTC cells exposure to 810uM of rutin was not cytotoxic and did not changed the p38 and GSTa2 genes expression.

The phosphocoline and glycerophosphocoline depletion caused by Rutin can also affect the VLDL (very low density lipoprotein) lipoprotein secretion, responsible for

transporting endogenous triglycerides to peripheral tissues which would be or stored or used by means of energy source (Fast and Vance, 1995).

The metabolic profile analysis also reinforces the hypothesis that genotoxic effect involves oxygen reactive species, since glutathione (GSH) levels has decreased by 60% when compared to experiment control. According to Sahu and Gray (1996) changes in glutathione levels are associated to changes in antioxidant status and oxidative stress increase. Thus, the glutathione reduction in present study leads us to a possible correlation between the increased damaged DNA bases due to rutin genotoxicity.

The genotoxic effect was also reflected in decreased levels of lactate metabolite (43%). This change can be related to PARP-1 (Poly (ADP-ribose) polymerase) activation with consequent depletion of its  $\text{NAD}^+$  substrate. With  $\text{NAD}^+$  reduction, the glucose consumption and lactate yielding are inhibited, then softening the ATP cellular reserves and changing the cells energetic metabolism (Geraets et al, 2000).

The analysis also revealed acetate (75%) and creatine (39%) metabolites reduction. According to Tiziani et al. (2009) the increased levels of acetate has been reported in patients with cancer at final stage of disease as a way of metabolic adaptation in order to increase ATP production, compared to glycolysis that occurs in cellular respiration process. Acetate decrease, under our experimental conditions, can be linked to the fall of cellular respiration level with  $\text{O}_2$  depletion.

Whereas acetate and lactate metabolites decrease it was expected to find a reduction on creatine levels, since it acts as creatine kinase substrate for creatine phosphate production, responsible by ATP generation (Yoshimoto et al. 2001). This result reinforces the hypothesis that high concentrations of rutin, although lacking cytotoxic effect, could lead to a progressive decline in cellular bioenergetic state.

According Soobrattee and Ferguson (2005) researches, polyphenolic compounds can either induce or prevent DNA damages. This way, an investigation is needed over these compounds conditions before establishing any kind of preventive strategy. Therefore, this work demonstrated that even the rutin being characterized as a protective substance within literature, it presented a high concentration of genotoxic activity in our experimental environment, which leads to changes in cellular metabolic profile from major biosynthetic pathways.

### **Acknowledgements**

This research had the financial support of CNPq, CAPES and Fundação Araucária, PR/Brazil.

### **References**

- Acker SA, Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, Bennekom WPV, Vijgh W, Bast A Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad Biol Med* 1996; 20:331-42.
- Afanas'ev IB Oxidative stress in rheumathoid arthritis leukocytes: supression by rutin and other antioxidants and chelators. *Bioch Pharmal* 200;62:743-46.
- Chow JM, Shen SC, Huan SK, Lin HY, Chen YC Quercetin but not rutin and quercitrin prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochem Pharmacol* 2005;69:1839-51.
- Chung Y-L, Troy H, Judson IR, Leach MO, Stubbs M, Ronen S, Workman P, Griffiths JR The effects of CYC202 on tumors monitored by magnetic resonance spectroscopy. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2002;43:336-40.
- Fast DG, Vance DE, Nascent VLDL phospholipid composition is altered when phosphatidylcholine biosynthesis is inhibited: evidence for a novel mechanism that regulates VLDL secretion. *Biochim Biophys Acta* 1995;2:159-68.
- Geraets L, Moonen HJ, Brauers K, Wouters EF, Bast A, Hageman GJ Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. *J Nutr* 2007;137:2190-95
- Glunde K, Jie C, Bhujwala ZM Mechanism of indomethacin-induced alterations in the choline phospholipid metabolism of breast cancer cells. *Neoplasia* 2006; 8:758-71.

- Gong G, Qin Y, Huang W, Zhou S, Yang X, Li D. Rutin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis through regulating reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 2010; 628: 27–35.
- Gupta C, Vikram A, Tripathi DN, Ramarao P, Jena GB (2010) Antioxidant and antimutagenic effect of quercetin against DEN induced hepatotoxicity in rat. *Phytother Res* 24:119–128
- Harborne JB, Williams, CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem* 2000;55:481-504.
- Hertog MG, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agr Food Chem*1992;40: 2379-83.
- Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agr Food Chem*1992; 40:2379-87.
- Hong J, Smith TJ, Ho CT, August DA, Yang CS. Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1175-1183.
- Janbaz A, Sheikh A, Saeedb AH. Protective effect of rutin on paracetamol-and CCl4-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitot* 2002;73 557–63.
- Jiang P, Burczynski F, Campbell C, Pierce G, Austria JA, Briggs CJ. Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum* F tataricum and F homotropicum and their protective effects against lipid peroxidation. *F Res Inter* 2007;40:356–64.
- Kessler M, Ubeaud G, Jung L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives *J Pharm Pharmacol* 2003;55:131-42.
- Le JE, Belle NG, Harris SR, Williams KK, Bhakoo. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 2002;15:37-44.
- Lee-Hilz Y, Boerboom A, Westphal A, Berkel V, Aarts G, Rietjens MC Pro-Oxidant Activity of Flavonoids Induces EpRE-Mediated Gene Expression. *Chem Res Toxicol* 2006; 19: 1499–1505.
- Lin JK, Tsai SH, Lin Shiau SY Antiinflammatory and antitumor effects of flavonoids and flavanoids. *Drugs Fut* 2001; 26:145–150.
- Lundberg P, Vogel T, Malusek A, Lundquist PO, Cohen L, Dahlqvist O MDL - The Magnetic Resonance Metabolomics Database (mdlimvliuse) ESMRMB, 2005.

- Marcarini JC, Tsuboy MSF, Luiz RC, Ribeiro LR, Hoffmann-Campo CB Mantovani MS. Investigation of cytotoxic apoptosis-inducing genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. *Exp Tox Patho* 2011 63:459-65.
- Middleton EJR, Kandaswam C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation heart disease and cancer *Pharmacol Ther* 53:673-751.
- Muller L, Kasper P, Schechtma L Guidances on Genotoxicity and Carcinogenicity: Scientific Background and Regulatory Practice in: WN Choy (Eds) *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment* 1st edition New York Marcel Dekker 2001:187-235.
- Murota K, Terao J Antioxidative flavonóide quercetin: implication of it's intestinal absorption and metabolism. *Arch of Biochem Bioph* 2003; 417:12-17.
- Niwa AM, Marcarini JC, Sartori D, Maistro EL, Mantovani MS Effects of (-)-cubebin (Piper cubeba) on cytotoxicity, mutagenicity and expression of p38 MAP kinase and GSTa2 in a hepatoma cell line. *J Food Comp and Analysis* 2013 30:1-5.
- Ono K, Nakane H. Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids *J Biochem* 1990;108:609–613
- Park EJ, Pezzuto JM. Flavonoids in cancer prevention. *Anticancer Agents Med Chem* 2012;12: 836-51.
- Pathak D, Pathak K, Singla AK ;Flavonoids as medicinal agents: recent advances. *Fitot* 1991; 57:371-89.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29: 2002-07.
- Pickett CB, Telakowski-Hopkins CA, Ding GJ, Ding VD. Expression and sequence analysis of rat liver glutathione S-transferase genes. *Ad Exp Med Biol* 1986;197:185-193.
- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 2011; 82:513-23.
- Sahu SC, Gray GC Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett* 1996; 104:193-96.
- Skibola CF, Smith MT Potential health impacts of excessive flavonoid . *Free Rad Biol Med* 2000; 29:375–83.
- Hadi SH, Bhat AS, Azmi S, Hanif U, Shamim MF, Ullah. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. *Semin Cancer Biol* 2007;17:370–76.

- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res* 2005;579:200-13.
- Thomson C, Bloch A, Hasler CM. Position of the American Dietetic Association: functional foods. *J Am Diet Assoc* 1999;99:1280-128.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagenesis* 2000; 35:206-221
- Tiziani S, Lopes V, Günther UL Early stage diagnosis of oral cancer using <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics. *Neoplasia* 2009;11:269-76.
- Tso JY, Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acid Res* 1985; 13:2485-02.
- van Dam RM, Naidoo N, Landberg R Dietary flavonoids and the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases: review of recent findings *Curr Opin Lipidol* 2013; 1:25-33.
- Walle T Flavonoids and Isoflavones (Photoestrogens): Absorption Metabolism and Bioactivity. *Free Rad Biol Med* 2004; 36:829-37.
- Yoshimoto M, Waki A, Yonekurz Y, Sadato N, Murata T, Omata N, Takahashi N, Welch MJ, Fujibayashi Y Characterization of acetate metabolism in tumor cells in relation to cell proliferation: acetate metabolism in tumor . *Nucl Med Biol* 2001;28:117-122.
- Zarubin T, Han J Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005;1511-18.

## 5.2 ARTIGO 2

---

### **Efeitos da rotina na proliferação celular, atividade enzimática antioxidante e expressão dos genes CuZnSOD, CAT, GPx1, GR, CYP1A1 em células HepG2 e HT-29.**

Juliana C. Marcarini <sup>a</sup>; Marcela S. F. Tsuboy <sup>a</sup>; Dalita G. S. M. Cavalcante <sup>a</sup>; Daniele Sartori <sup>b</sup>; Cláudia B. R. Martinez <sup>b</sup>; Mário S. Mantovani <sup>b</sup>; Lúcia R. Ribeiro <sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual “Júlio Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo, Brasil;

<sup>b</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil;

\*Corresponding author

Universidade Estadual Paulista-Unesp  
Instituto de Biociências, campus Rio Claro, SP, Brazil  
CEP. 13506-900  
E-mail: marcarini.jc@gmail.com  
Phone: +55 (19) 3526-4136

## Resumo

Flavonóis como a rutina são considerados benéficos para a saúde, pois apresentam uma série de atividades biológicas. As propriedades antioxidantes diretas da rutina são consideradas responsáveis, na maior parte por seus efeitos protetores. Com o objetivo de determinar se este flavonóide possa influenciar indiretamente no sistema enzimático antioxidante endógeno, investigamos o efeito de concentrações fisiológicas sobre a expressão e a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e Gr. Para isso avaliamos a influência da rutina no crescimento, na proliferação e na resposta do sistema de defesa endógeno das células HepG2 e HT-29. Os resultados mostraram que 100  $\mu$ M de rutina foi citotóxica e reduziu a expressão e a atividade das enzimas antioxidantes (CuZnSod, CAT, GPx1 e Gr) nas duas linhagens estudadas. Enquanto que 10  $\mu$ M não alterou a viabilidade e cinética de proliferação celular, aumentou significativamente a expressão e a atividade das enzimas SOD, CAT, GPx e Gr entre 12-28h de exposição nas duas linhagens em estudo. O aumento no RNAm do CYP1A1 nas células HepG2 e HT-29 foi evidenciado após 12 e 24h com 100  $\mu$ M. Conjuntamente, nossos resultados indicam que a rutina pode atuar em baixas concentrações potencializando as defesas antioxidantes das células mesmo na ausência de qualquer substância indutora de espécies reativas de oxigênio, exercendo assim, atividade antioxidante indireta e, conseqüentemente, pode atuar impedindo ou retardando o estresse oxidativo celular.

Palavras-chave: polifenol; antioxidantes dietéticos; superóxido dismutase; citocromo P450.

## 1. Introdução

Os flavonóides são compostos fenólicos de origem vegetal, desse modo não são sintetizados pela espécie humana, no entanto, podem ser consumidos por meio da dieta como frutas, verduras, legumes, chás, sucos, chocolates e vinhos tintos (SCALBERT *et al.*, 2005). São utilizados principalmente como fonte de matéria-prima na indústria farmacêutica e alimentícia e apresentam inúmeras atividades biológicas de interesse como, por exemplo, a capacidade antioxidante, a qual possui importante papel protetor na patogênese de várias doenças associadas ao estresse oxidativo, tais como doenças cardíacas e câncer RÖHRDANZ *et al.*, 2002

Os flavonóides mais comumente encontrados na dieta humana são aqueles com hidroxilação na posição 3' e 4' do anel B no núcleo flavan como por exemplo, quercetina, rutina e mercitina. A rutina, flavonol utilizado nesse estudo, possui sua atividade antioxidante bem caracterizada *in vitro*. Apresenta capacidade de diminuir a peroxidação lipídica e a produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) em células de hepatoma (ALIÁ *et al.*, 2006), tem ação antiinflamatória (PATHAK *et al.*, 1999), estimulante do sistema imunológico e auxilia na melhora dos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

O efeito antioxidante da rutina está envolvido com a estimulação da atividade da enzima superóxido dismutase, o que resulta na redução dos níveis do radical superóxido ( $O_2^-$ ). Esta capacidade também é observada em outros flavonóides que também apresentam atividade antioxidante direta. Três mecanismos são propostos para a atividade antioxidante direta: (a) os grupos hidroxila reduzidos (Fl-OH) capturam radicais livres ( $O_2^{*-}$ ,  $OH^-$ ,  $^1O_2^-$ ) se convertendo na forma oxidada (Fl-O\*); (b) ligação a íons metálicos como o ferro, inibindo a reação de Fenton; (c) aprisionamento de radicais peroxila lipídicos (ACKER *et al.*, 1996; ARORA *et al.*, 1998).

A rutina é considerada uma pró-droga metabolizada de forma ativa pela microflora do cólon intestinal. Após sua absorção, ela é conjugada no intestino delgado e no fígado pela glicuronidação, sulfatação ou metilação, ou metabolizados a pequenos compostos fenólicos. A absorção deste flavonóide leva a quantidades mensuráveis no sangue que podem afetar a bioquímica das células de diferentes tecidos, em particular o intestino e o fígado (WALLE, 2004). Desse modo, o estudo do efeito desses flavonóides na regulação dos mecanismos de defesa antioxidante podem ser melhor compreendidos utilizando linhagens celulares derivadas desses tecidos.

A linhagem de hepatoma humano (HepG2), apresenta células bem caracterizadas, transformadas e proliferantes, considerada um modelo confiável. É amplamente utilizada em estudos bioquímicos e nutricionais (AHERNE E O'BRIEN, 2000) e a linhagem de adenocarcinoma coloretal (HT-29) possui células epiteliais do intestino humano, com microvilosidades e microfilamentos responsáveis pela absorção dos nutrientes, além disso, expressa aspectos de diferenciação característicos dessas células (HAYSLETT et al., 1987). Dessa forma, essas duas linhagens podem ser utilizadas para avaliar a ação de antioxidantes naturais, pois apresentam condições favoráveis e podem ser mais facilmente detectadas e testadas com variações menores.

Considerando as atividades biológicas de interesse apresentadas pela rutina, o objetivo do presente trabalho foi determinar se esse flavonóide pode exercer efeitos antioxidantes não só diretamente, mas também indiretamente através da modulação do sistema enzimático antioxidante. Para isto, foram realizados os ensaios de citotoxicidade (resazurina), viabilidade celular e cinética de proliferação, expressão gênica e atividade de enzimas antioxidantes: catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona redutase (GR), e também o gene de metabolismo CYP1A1 (citocromo P450) em sistema de cultura de células HepG2 e HT-29.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Agentes químicos

A rutina (Sigma Chemical, CAS nº 153-18-4) foi dissolvida em DMSO (dimetilsulfóxido) e diluída em meio de cultura DMEM e esterilizada por filtração (Millex<sup>®</sup> 0.22 µm, Millipore), sendo que a concentração de DMSO não ultrapassou 0,01% em cultura. Os agentes indutores de citotoxicidade empregados para controle positivo do experimento foi a doxorrubicina (CAS 25316-40-9; Adriblastina<sup>®</sup> - Pharmacia) na concentração final de 0,9 µM.

### 2.2. Cultura celular

As linhagens celulares humanas de hepatoma (HepG2) e adenocarcinoma coloretal (HT-29) foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ). Foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco) com antibiótico/antimicótico (0,1%), mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. Nestas condições, o ciclo celular das linhagens foi de aproximadamente 24 horas.

### 2.3. Ensaio de citotoxicidade – Resazurina

O ensaio de citotoxicidade foi realizado de acordo com o protocolo descrito por McMillia et al. (2002) com modificações. Neste ensaio, a citotoxicidade da rutina foi avaliada nas duas linhagens Hepg2 e HT-29 utilizando resazurina (Acros Organics, CAS 62758-13-8).

Em cada um dos 24 poços da placa de cultivo celular foram semeadas aproximadamente  $5 \times 10^4$  células. Estas foram expostas ao tratamento com a rutina nas concentrações finais de 0,1; 1; 10; 50 e 100 µM por 24 e 48 horas. Ao final deste período, as

células foram incubadas por 3 horas com a resazurina na concentração final de 60 $\mu$ M. A leitura da fluorescência emitida pela resofurina (resazurina oxidada em células viáveis) foi feita em leitor de microplacas VICTOR 3 (Perkin Elmer) com 530-560 nm de excitação e 580-600 nm de emissão. Os tratamentos foram realizados em três repetições biológicas.

#### *2.4 Ensaio de cinética de Proliferação e viabilidade celular*

O ensaio de cinética de proliferação e viabilidade celular foi realizado de acordo com Marcarini et al. (2011), efetuado tratamentos em três repetições biológicas e para análise foi traçada uma curva de cinética de proliferação nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas. Foram semeadas 10<sup>5</sup> células/tratamento para a linhagem HepG2 e 2x10<sup>5</sup> células/ tratamento para a linhagem HT-29 em tubos de cultura juntamente com seus respectivos tratamentos: a) controle (PBS: phosphate buffered saline); b) agente anti-proliferativo (doxorrubicina 0,9 $\mu$ M); e c) tratamentos com a rutina em 3 concentrações.

Foram semeados 4 tubos de cultura para cada tratamento, cada um correspondendo a um tempo de colheita (24, 48, 72 ou 96 horas). Dessa forma, as células do tubo 1 foram contadas 24 horas após serem semeadas, no tubo 2 após 48 horas e assim sucessivamente. A curva de proliferação foi montada de acordo com os dados obtidos nas contagens das células nos diferentes tempos. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão com o reagente Azul de Trypan (0,2%) (Gibco, CAS 15250-061).

#### *2.6 RT-PCR em tempo real*

Para análise da expressão gênica foram semeadas 2x 10<sup>6</sup> células por frasco de cultura (25cm<sup>2</sup>) para ambas as linhagens. Após 24 horas de estabilização as células foram tratadas por 12 e 24 horas das seguintes formas: a) controle (PBS); b) 10 $\mu$ M de rutina, e c) 100 $\mu$ M de rutina.

O procedimento de extração de RNA total das células foi efetuado conforme as instruções do fabricante do reagente do TRIZOL LS<sup>®</sup> (Invitrogen, MLV – Invitrogen, Life Technologies). O cDNA foi sintetizado após a verificação da qualidade do RNA total em gel de agarose 0,8% (padrão de bandas 28S e 18S) e razão entre A260/280 (Biophotometer – Eppendorf). A síntese de cDNA foi feita a partir de 1µg de RNA, com oligo(dT) e com a enzima transcriptase reversa (M-MLV – Invitrogen, Life Technologies). O cDNA (2 µL) foi encaminhado para a reação de PCR em tempo real realizada no termociclador PTC 200 DNA Engine Cycler, usando o sistema de detecção Chromo 4 (MJ Research- BIO RAD) com os *primers* que amplificam transcritos de regiões parciais dos genes em estudo.

A amplificação dos fragmentos foi detectada através da fluorescência emitida pelo fluoróforo SYBR Green<sup>®</sup> contido no kit (Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG - Invitrogen). As condições da PCR no termociclador foram as seguintes: um passo inicial a 50°C por 2 min, seguido de 95°C por 3 minutos, 39 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 20 segundos, seguidos de 95°C por 10 seg. e 40°C por 1 min. A análise da curva de Melting foi realizada no final da reação com temperatura de 50°C até 95°C a cada 0,5°C por 5 segundos. Os tratamentos foram realizados em três repetições biológicas e cada amostra de cDNA foi analisada em três repetições técnicas. Neste trabalho os dados foram normalizados com o gene de referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH). Os *primers* utilizados e suas referências estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Sequências de *primers* utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real.

Genes	Primers	Referências
GPDH	F: 5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' R: 5'- GAAGATGGTGATGGGATTT-3'	SUGAYA et al., 2005
CuZnSOD	F: 5'-CTAGCGAGTTATGGCGAC-3' R: 5'-GAATGTTTATTGGGCGATC'	DING et al., 2004
Gpx1	F: 5'-CAACCAGTTTGGGCATCAG-3' R- CGATGTCAATGGTCTGGAAG-3'	SABLINA et al.,2005
CAT	F: 5'-CATCGCCACATGAATGGATA-3' R: 5'-CCAAC TGGGATGAGAGGGTA-3'	SUN et al., 2006
GR	F: 5'-GAAAAAGTTTACCGCTCCAC-3' R: 5'- TAAACGCCTTTGACGTTGGTA-3'	GRUNBLATT et al., 2010
CYP1A1	F: 5'-TCATCCCTATTCTTCGCTACC-3' R: 5'-CAGGAGATAGCAGTTGTGAC-3'	JIAO et al., 2007

### 2.7 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Para avaliar a atividade de enzimas antioxidantes foram semeadas  $3 \times 10^6$  células em frascos de  $75 \text{cm}^2$  para as duas linhagens. Após o período de estabilização (24h) as culturas receberam os seguintes tratamentos: a) controle (PBS); b)  $10 \mu\text{M}$  e c)  $100 \mu\text{M}$  de rutina. As culturas ficaram expostas por 16, 20, 24 e 28h. Depois do período de incubação, o meio foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS e desprendidas da parede do frasco com 1mL tripsina-EDTA (0,025%;  $37^\circ\text{C}$ ). As células foram centrifugadas (1032 rpm;  $4^\circ\text{C}$ ), os sobrenadantes removidos e o sedimento suspenso em  $500 \mu\text{L}$  de PBS. Em seguida as amostras foram sonicadas durante 5 minutos por 4 vezes e centrifugadas novamente (7500 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ); os sobrenadantes foram coletados novamente e mantidos congelados até o momento das análises.

Para as análises bioquímicas foram utilizadas  $50 \mu\text{L}$  de amostra, para cada ensaio. As enzimas antioxidantes que tiverem suas atividades medidas foram: a SOD, CAT, GPx e GR. A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de McCord e Fridovich (1969), pela inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido, observado no

comprimento de onda de 550 nm a 25°C, em espectrofotômetro. A atividade da CAT foi determinada de acordo com a técnica descrita por Beutler (1975), seguindo-se a velocidade de decomposição da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através do decréscimo de absorbância a 240 nm em espectrofotômetro. A atividade da GPx foi determinada pela oxidação do NADPH<sup>+</sup> H<sup>+</sup> em presença de peróxido, de acordo com Hopkins e Tudhope (1973), em espectrofotômetro a 340 nm a 25°C. A GR foi determinada indiretamente, com base na redução de NADPH na presença de GSH oxidada (CARLBERG e MANNERVIK, 1975), a 340 nm. A concentração de proteína total desses sobrenadantes foi determinada por meio de método de Bradford (1976) em 595nm. Para cada tratamento foram realizadas de 3-4 repetições biológicas.

## 2.8 Análise estatística

Os dados obtidos pelos ensaios de citotoxicidade, cinética de proliferação, viabilidade celular e atividade das enzimas antioxidantes foram analisados pelo teste estatístico ANOVA seguido de Dunnett, através do programa GraphPad InStat, considerando p<0,05, comparando os tratamentos com diferentes concentrações de rutina com o grupo controle. Os níveis de expressão dos genes em estudo foram determinados pelo programa REST© (Pfaffl et al., 2002) que utiliza o modelo *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*© para comparar a diferença de expressão entre os tratamentos.

## 3. Resultados

### 3.1 Efeito citotóxico da rutina nas células HepG2 e HT-29

Os resultados da leitura do ensaio de citotoxicidade mostraram que as concentrações 0,1; 1; 10; 50 e 100 µM após 24h de tratamento tiveram as intensidades de fluorescência próximas a do grupo controle, ou seja, essas cinco concentrações testadas não foram

citotóxicas para as duas linhagens HepG2 (Fig.1 A) e HT-29 (Fig.1B). No entanto, aumentado o tempo de exposição para 48 h verificou-se que a maior concentração testada (100  $\mu$ M) apresentou efeito citotóxico para as células HepG2 e HT-29, contudo a citotoxicidade da rutina foi mais evidente na linhagem HT-29, na qual a citotoxicidade foi de aproximadamente 40% e para a HepG2 24,8 %.

### *3.2 Efeito da rutina na proliferação e viabilidade celular*

As Figuras 2 e 3 mostram os resultados da proliferação e viabilidade celular realizados nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Pelos ensaios, foi verificado que somente a maior concentração testada da rutina (100  $\mu$ M) reduziu o crescimento e viabilidade das células HepG2 e HT-29 a partir de 48 horas de incubação. As concentrações de 10 e 50  $\mu$ M não alteraram a curva de crescimento e a viabilidade das duas linhagens, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Considerando os resultados com exposições mais longas da concentração de 100  $\mu$ M do flavonóide os demais ensaios foram focados no efeito a curto prazo da rutina, ou seja, condições de alta viabilidade celular.

### *3.3 Efeito da rutina sobre a expressão de genes de enzimas antioxidantes.*

A expressão ao nível transcricional dos genes CuZnSOD, CAT, GPx1 e Gr foram determinadas em culturas de HepG2 e HT-29 tratadas por 12 e 24 horas com 10 e 100  $\mu$ M de rutina. Os resultados referem-se a um controle normalizado pela expressão do gene constitutivo GAPDH.

As células HepG2 tratadas por 12h, 10  $\mu$ M de rutina provocou uma diminuição (0,44 vezes) e 100  $\mu$ M induziu significativamente os níveis de RNAm da CuZnSOD (2,09 vezes) (Fig.4a). No tratamento por 24 horas com 10  $\mu$ M de rutina foi observado um aumento da

expressão do RNAm da CuZnSOD, CAT, GPx1 e Gr de 2,11; 3,35; 2,38 e 2,26 vezes, respectivamente (Fig.4b). No entanto, a exposição com 100  $\mu$ M de rutina diminuiu os níveis de RNAm da CuZnSOD (0,45 vezes) (Fig.4b).

A linhagem HT-29 exposta a rutina por 12h apresentou aumento do RNAm da Gpx1 após o tratamento com 10 e 100  $\mu$ M (1,98 e 2,83 vezes respectivamente). A concentração de 100  $\mu$ M aumentou em 2,0 vezes a expressão do RNAm da Gr (Fig. 5a).

No tratamento da HT-29 por 24 horas com 10  $\mu$ M de rutina também foi observado um aumento da expressão do RNAm da CuZnSOD, CAT, GPx1 e Gr (2,00; 4,10; 3,02 e 2,13 vezes respectivamente). Por outro lado, 100  $\mu$ M diminuiu os níveis de expressão do RNAm da CuZnSOD em 0,57 vezes e da CAT em 0,5 vezes (Fig.5b).

#### *3.4 Efeito da rutina sobre a expressão do CYP1A1*

A expressão do RNAm de CYP1A1 foi avaliada em culturas de HepG2 e HT-29 tratadas por 12 e 24 horas com 10 e 100  $\mu$ M de rutina. A Figura 6 mostra que a expressão desse gene aumentou com 100  $\mu$ M nos dois tempos de tratamento. Para a HepG2 a indução foi de 2,36 vezes (12h) e 2,64 vezes (24h) e para a HT-29 foi de 2,32 vezes (12h) e 2,85 vezes (24h).

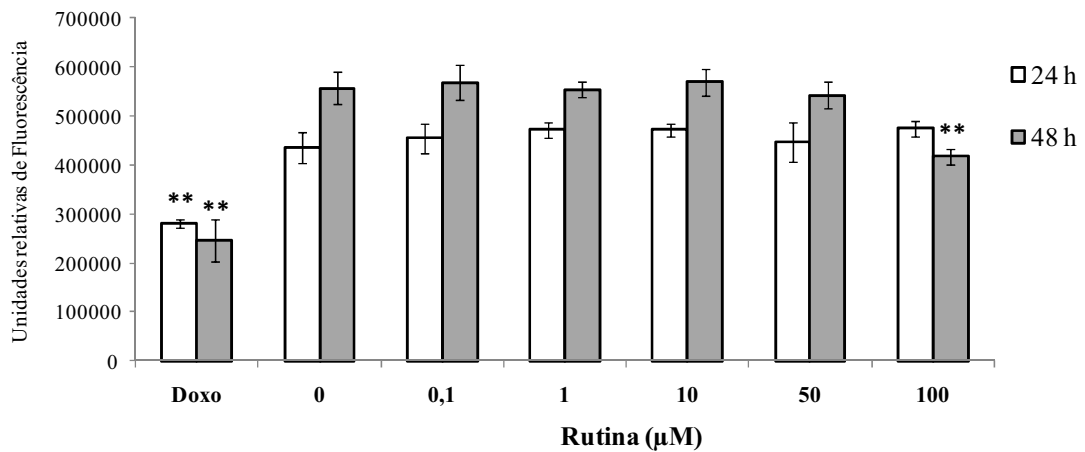
#### *3.5 Efeito da rutina sobre a atividade das enzimas antioxidantes*

A atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e Gr foram determinadas em culturas de HepG2 e HT-29 tratadas por 16, 20, 24 e 28 horas com 10 e 100  $\mu$ M de rutina.

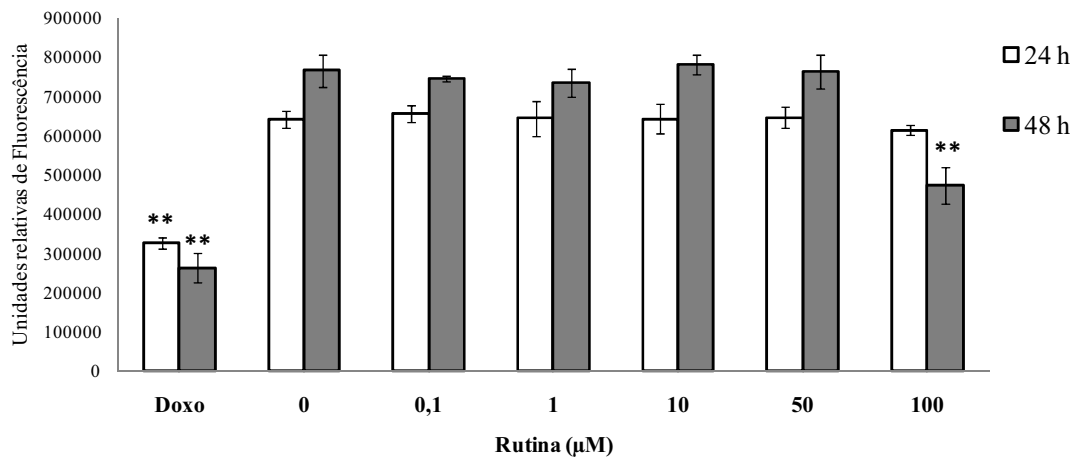
Nas células HepG2 foi observado um aumento significativo na atividade das enzimas SOD e CAT nas 16 e 20h de exposição com 10  $\mu$ M de rutina (Fig.7a e 7b). Por outro lado, o tratamento com 100  $\mu$ M diminuiu a atividade da CAT a partir de 20 h e a GPx somente com 24 horas de tratamento (Fig. 7b e 7c).

Nas células HT-29 foi observado um aumento significativo na atividade das enzimas SOD e Gpx nas 16h exposição com 10  $\mu$ M de rutina (Fig.8a e 8d). Por sua vez, o tratamento com 100  $\mu$ M diminui a atividade da SOD com 20 e 28h de incubação e a atividade CAT reduziu a partir de 24 h de tratamento. (Fig.8a e 8b).

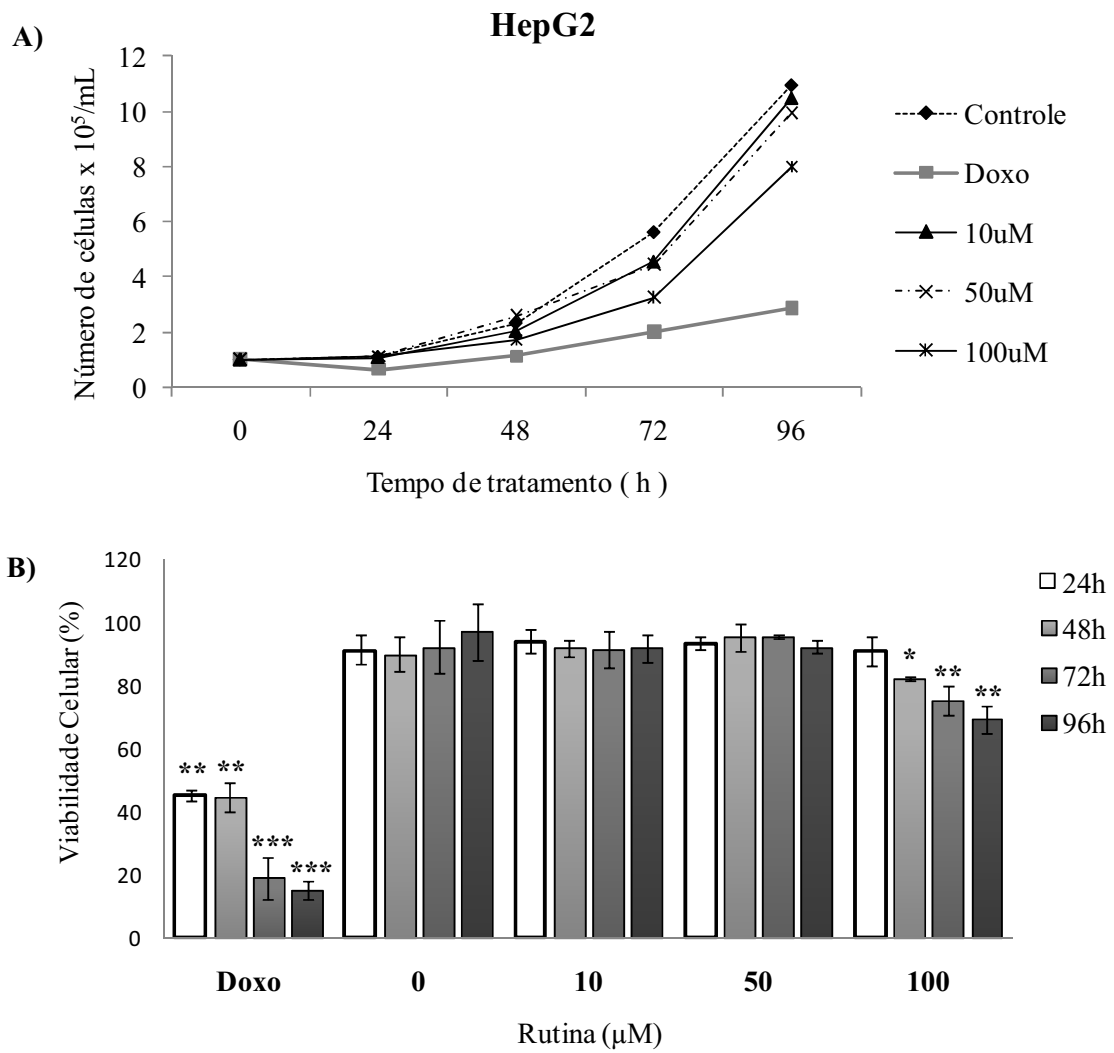
## a) HepG2



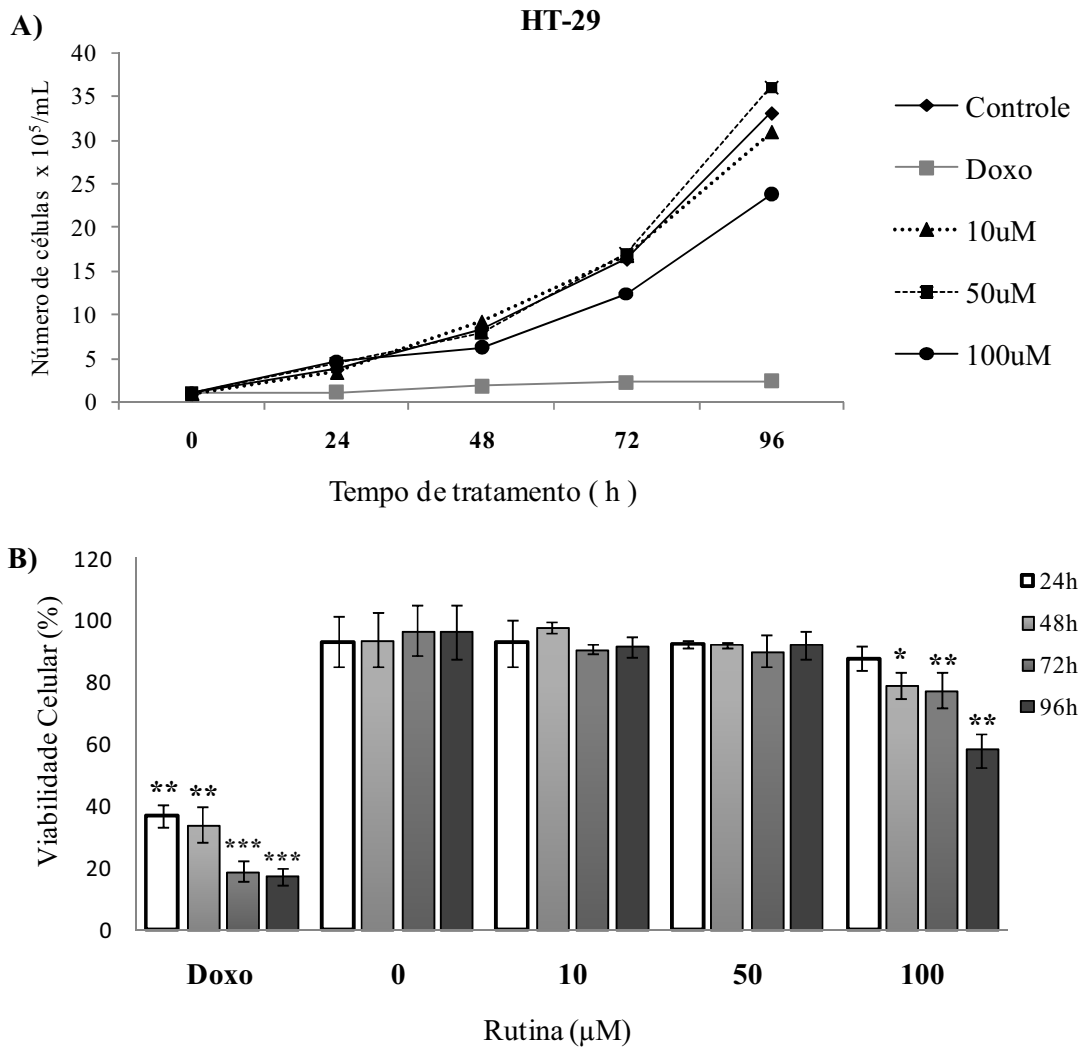
## b) HT-29



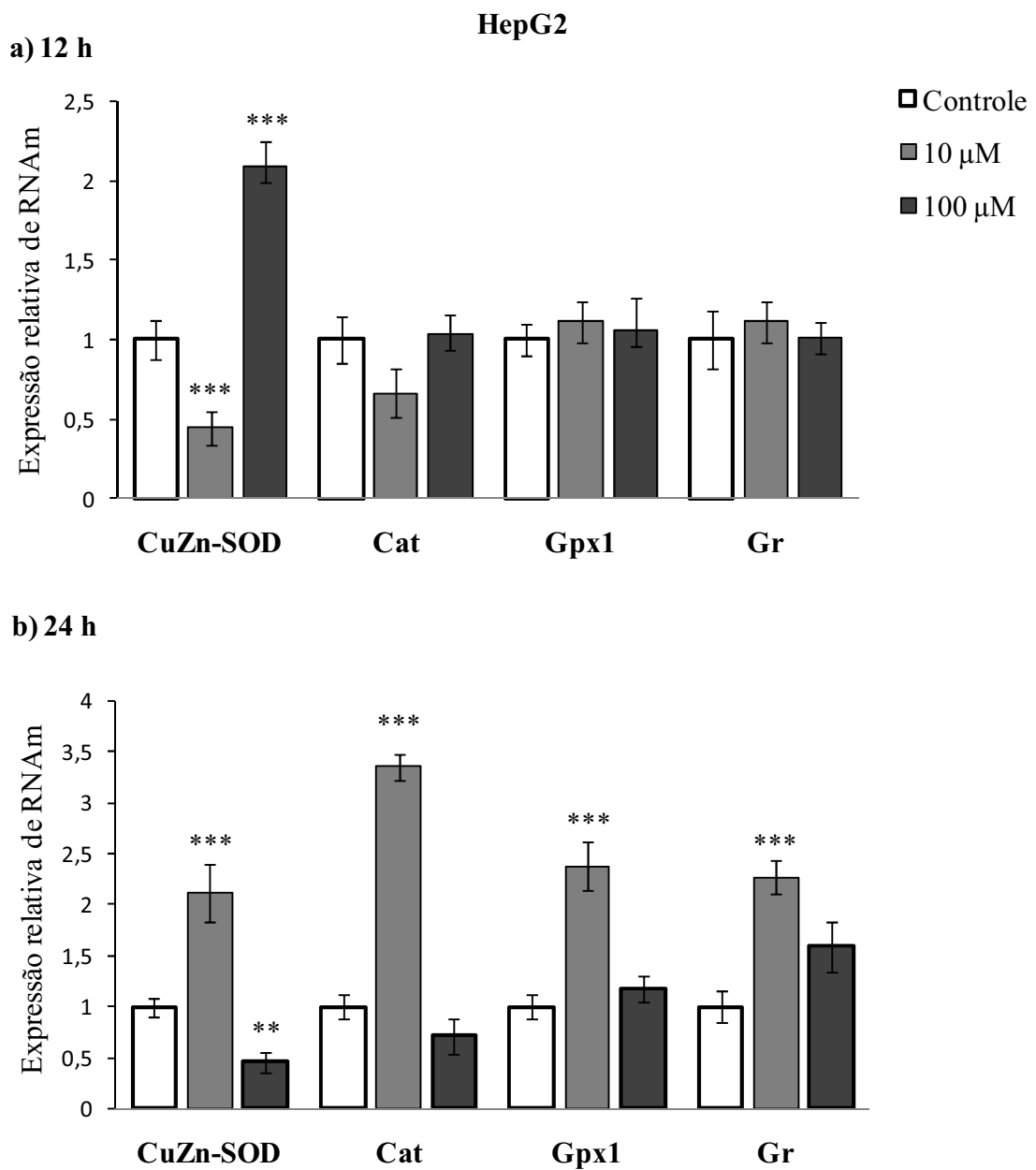
**Figura 1.** Efeito da rutina na citotoxicidade das linhagens HepG2 (a) e HT-29 (b) medidas pelo ensaio da rezasurina. Os valores representam a média das unidades relativas de fluorescência  $\pm$  DP obtidos após o tratamento com diferentes concentrações de rutina (24, 48 h). Doxo = doxorubicina 0,9  $\mu$ M. \*\* Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (\*\* $p < 0.01$ ; ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).



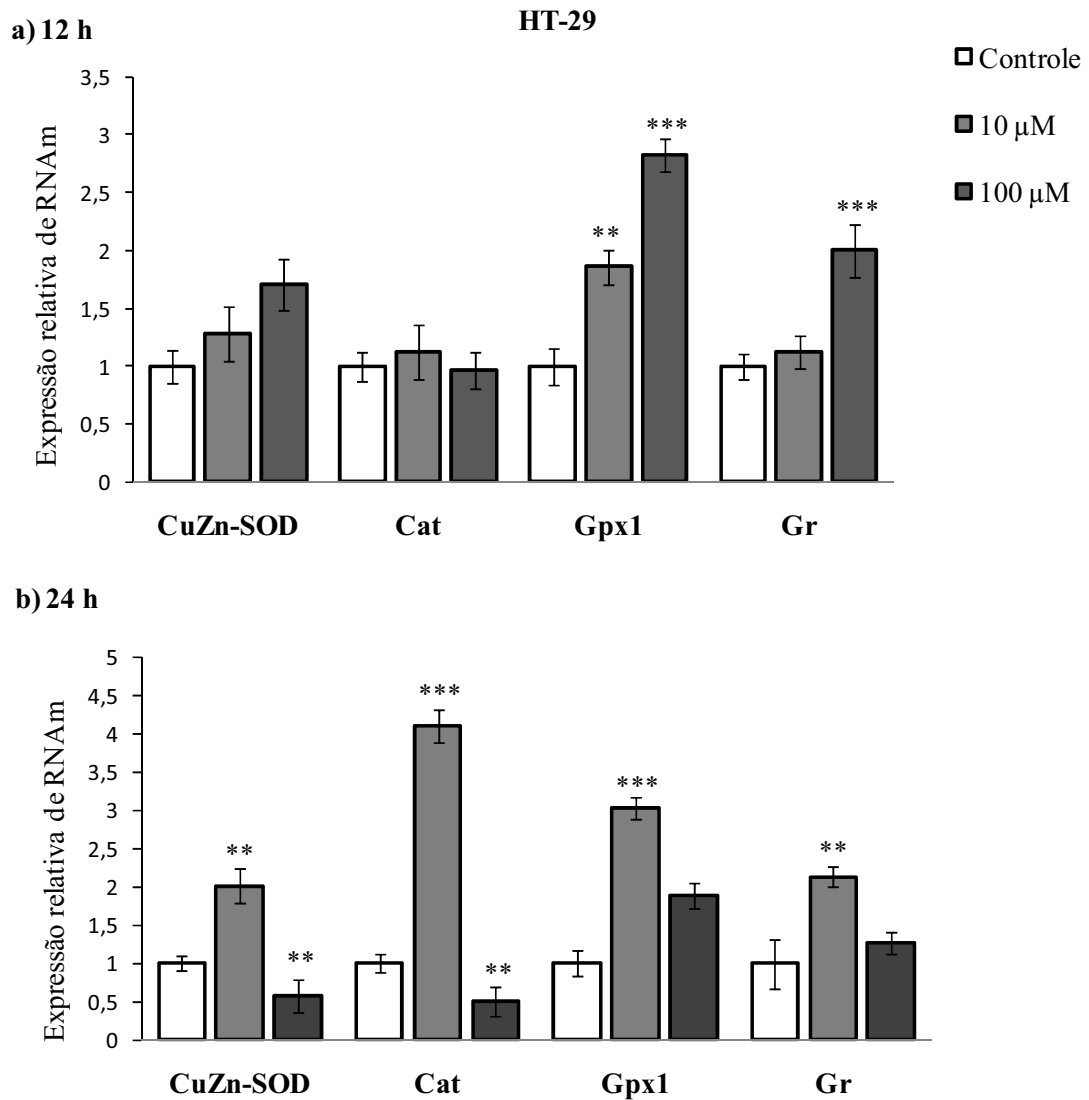
**Figura 2.** Efeito da rutina na proliferação (A) e viabilidade (B) das células HepG2. Os valores representam a média  $\pm$  DP obtidos após o tratamento com três concentrações de rutina (24, 48, 72 e 96 h). Doxo = doxorubicina 0,9  $\mu$ M. \* Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).



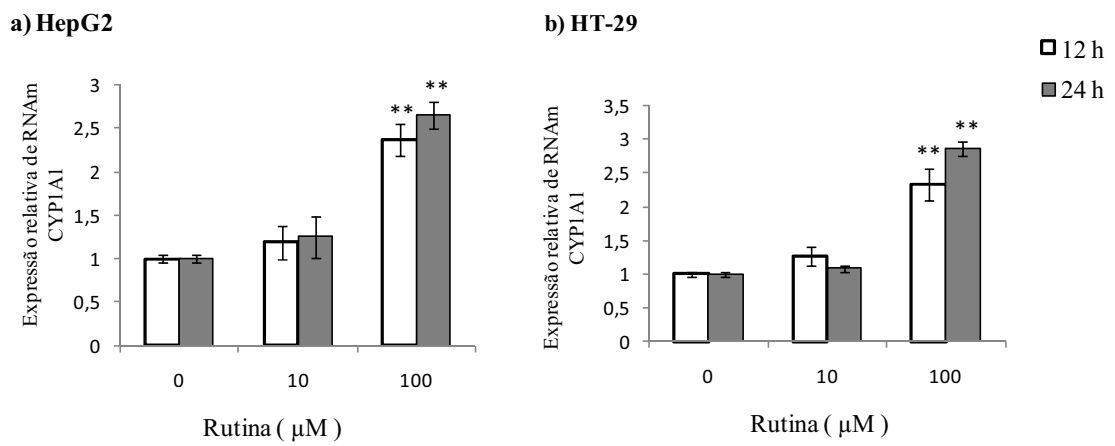
**Figura 3.** Efeito da rutina na proliferação (A) e viabilidade (B) das células HT-29. Os valores representam a média  $\pm$  DP obtidos após o tratamento com três concentrações de rutina (24, 48, 72 e 96 h). Doxo = doxorubicina 0,9 $\mu$ M. \* Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).



**Figura 4.** Efeito da rutina na expressão do RNAm das enzimas antioxidantes das células HepG2 após 12 h (a) e 24 h (b) de tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  DP calculados pelo software REST<sup>®</sup> 2009, normalizados com o gene *GPDH*. \*\* Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

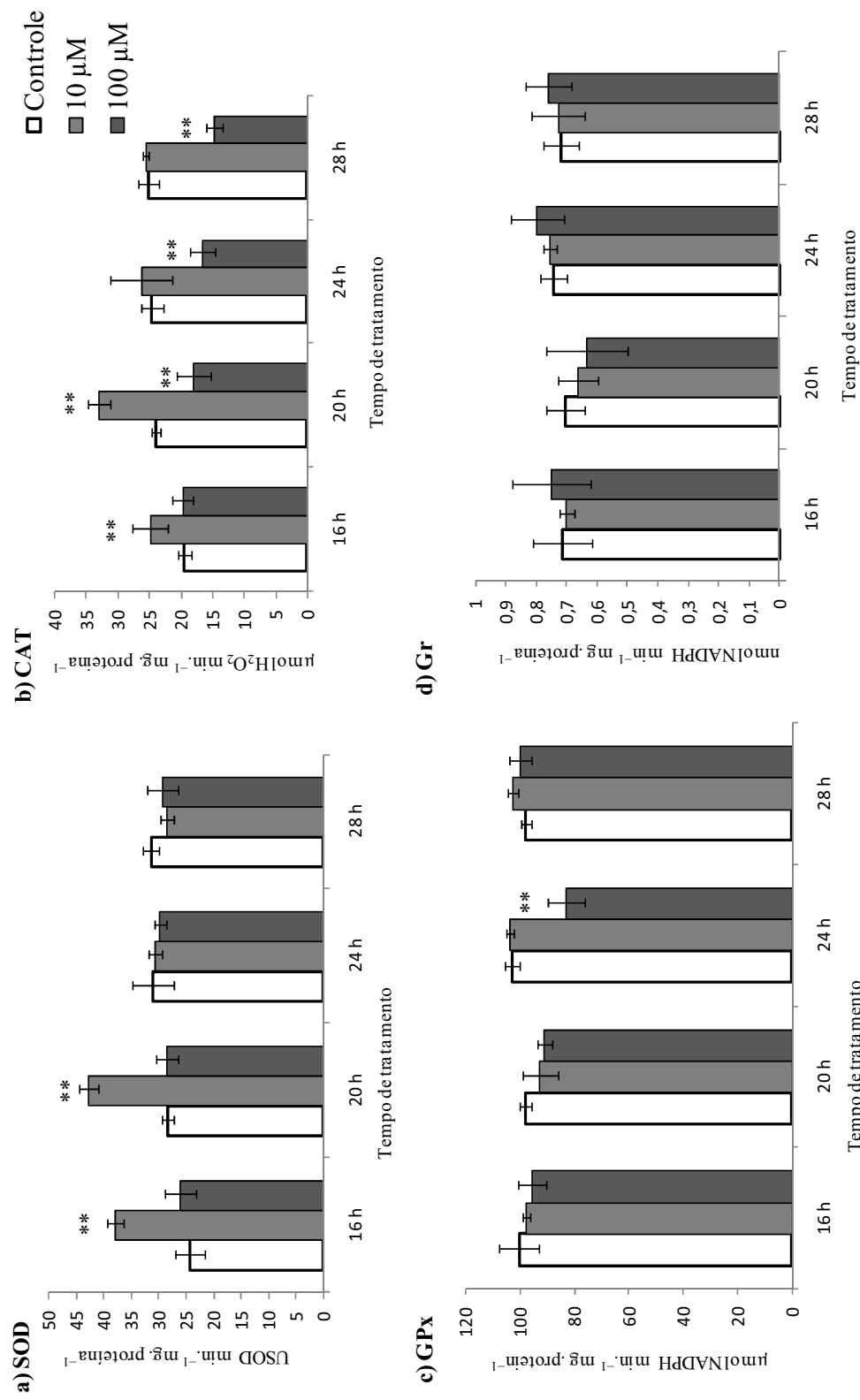


**Figura 5.** Efeito da rutina na expressão do RNAm das enzimas antioxidantes das células HT-29 após 12 h (a) e 24 h (b) de tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  DP calculados pelo software REST<sup>®</sup> 2009, normalizados com o gene *GPDH*. \*\* Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

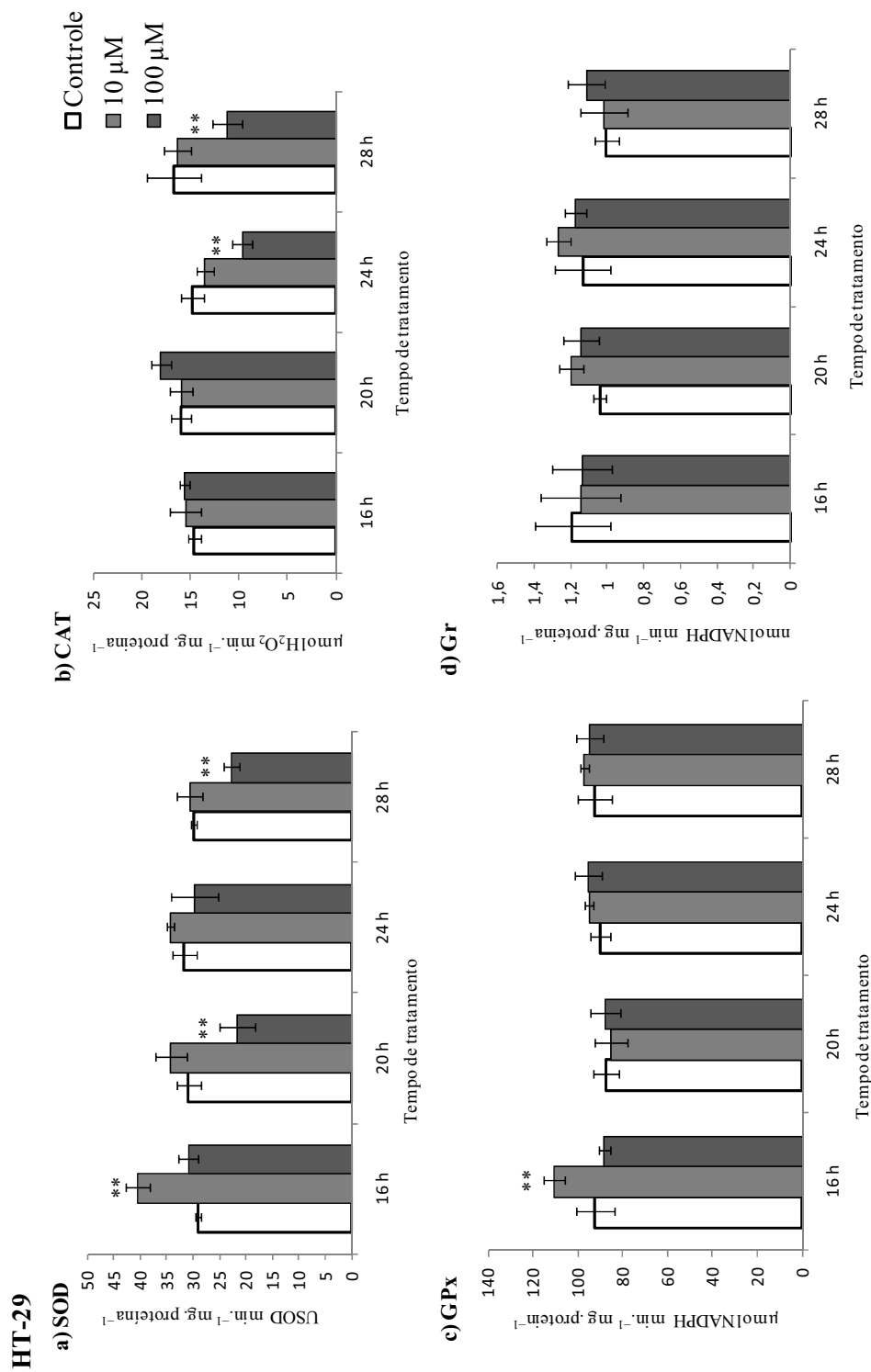


**Figura 6.** Efeito da rutina na expressão do RNAm do CYP1A1 das células HepG2 (a) e HT-29 (b) após 12 h e 24 h de tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  DP calculados pelo software REST<sup>®</sup> 2009, normalizados com o gene *GPDH*. \*\* Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (\*\* $p < 0.01$ )

## HepG2



**Figura 7.** Efeito da rutina na atividade das enzimas antioxidantes das células HepG2. Atividade da SOD (a), Cat (b), Gpx (c) e Gr (d). Os valores representam a média  $\pm$  DP obtidos após o tratamento com duas concentrações de rutina (16, 20, 24 e 28 h). \*\* Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (\*\* $p < 0.01$ ; ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).



**Figura 8.** Efeito da rutina na atividade das enzimas antioxidantes das células HT-29. Atividade da SOD (a), Cat (b), Gpx (c) e Gr (d). Os valores representam a média  $\pm$  DP obtidos após o tratamento com duas concentrações de rutina (16, 20, 24 e 28 h). \*\* Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (\*\* $p < 0.01$ ; ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

#### 4. Discussão

A rutina é um glicosídeo pertencente à subclasse dos flavonóis presente em quantidades variáveis na uva, maçã, cebola, tomate, grãos como o trigo serraceno e feijão vermelho e bebidas como vinho tinto e chá preto. A afinidade dos glicosídeos pela membrana das células epiteliais exerce um importante papel na absorção dos compostos lipofílicos. Embora a absorção no intestino delgado seja dificultada devido aos açúcares ligados a sua molécula, a rutina é completamente hidrolizada por glicosidasas produzidas pelas enterobactérias dando origem a quercetina 3-glicosídica e a quercetina aglicona. Após a hidrólise dos açúcares, esta molécula passa a apresentar maior afinidade pelas membranas das células epiteliais, dessa forma é melhor absorvida e metabolizada. Concentrações de flavonóis em geral não ultrapassam 1-5 mmol/L no plasma sanguíneo (WALLE, 2004).

Várias pesquisas com flavonóis como a rutina têm sido realizadas por apresentarem uma série de propriedades benéficas para a saúde, incluindo antiinflamatória, antialérgica antioxidante e modulação de atividades enzimáticas de mamíferos, tais como o citocromo P450, epóxido hidrolase, glutathione transferase, DNA e RNA polimerases e topoisomerase (ONO e NAKANE, 1990; WANG et al., 2012). Ainda que essas propriedades possam ser responsáveis pelo grande interesse citoprotetor dos flavonóis a influência da rutina no sistema de defesa antioxidante enzimático ainda não foi investigada em detalhes.

A partir disso, avaliamos o efeito citotóxico da rutina (0,1- 100 $\mu$ M) nas células HepG2 e HT-29 e os resultados mostraram a ausência desse efeito após 24 h de tratamento nas duas linhagens em estudo. Contudo, quando aumentamos o tempo de exposição para 48h, observamos o efeito contrário para maior concentração (100 $\mu$ M), pois apresentou efeito citotóxico para as células.

Com a finalidade de verificar se o efeito citotóxico da rutina persistia com maior tempo de exposição, avaliamos o seu efeito na proliferação e viabilidade celular incluindo 72 e 96 h de incubação.

Os resultados mostram que o mesmo tipo de efeito citotóxico foi evidenciado pelo ensaio de viabilidade celular, onde a concentração de 100  $\mu\text{M}$  reduziu significativamente a sobrevivência das células HepG2 e Ht-29, após 48, 72 e 96h. Essa mesma concentração e tempos de tratamento também apontam uma redução na proliferação celular observada através da curva de crescimento. Observamos também que 100  $\mu\text{M}$  de rutina afetou com maior intensidade as células de adenocarcinoma coloretal, talvez esse resultado seja consequência da metabolização mais rápida das células de hepatoma.

Nossos resultados confirmam as pesquisas realizadas por Aliá e colaboradores (2006). Eles avaliaram o potencial citotóxico da rutina em células HepG2 utilizando o ensaio LDH e o efeito do flavonóide na proliferação celular. Os resultados mostraram que rutina nas mesmas concentrações (0,1- 100 $\mu\text{M}$ ) não desenvolveu nenhum efeito tóxico para essa linhagem celular após 24 horas, todavia, diminuiu a proliferação das células HepG2 após 48h de incubação. Por outro lado, Lee e colaboradores (2004), descreveram que a rutina, em concentração de 50 $\mu\text{M}$  por 24 horas de tratamento, manifestou efeito citotóxico sobre células NCI-H889 (carcinoma de pulmão), utilizando o ensaio MTT.

De acordo com Kim e Jang (2009), flavonóides como a quercetina e a rutina induzem a apoptose em linhagens HepG2 (hepatoma humano) após tratamentos prolongados em concentrações elevadas (>100  $\mu\text{M}$ ). Segundos esses autores, nestes casos, a rutina pode atuar como um pró-oxidante e não como um antioxidante, resultando na morte celular programada. Logo, para testar a resposta do sistema de defesa antioxidante da rutina, descartamos maiores tempos de tratamento.

O sistema antioxidante enzimático desempenha um papel importante na defesa contra o estresse oxidativo, sendo assim, mudanças na atividade na expressão ou na atividade de enzimas podem ser consideradas como biomarcadores da resposta antioxidante (GOYA et al., 2007).

Em mamíferos existem três formas da enzima SOD, responsável por catalisar a dismutação do ânion radical superóxido: a) MnSOD, localizado na mitocôndria; b) CuZnSOD encontrado principalmente no citosol, e c) SOD extracelular localizada na líquido extracelular (ZELKO et al., 2002). A CAT promove a decomposição do  $H_2O_2$  em água e  $O_2$  (AEBI, 1984). O  $H_2O_2$  pode ser produzido através de diversas oxidases como as monoamino oxidases ou por meio da dismutação do radical superóxido pelas superóxido dismutases (HALLIWELL et al., 1995) A GPx1 é a versão mais abundante, encontrada no citoplasma de quase todos os tecidos de mamíferos, esta enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de outros hidroperóxidos lipídicos, utilizando glutathione reduzida (GSH) como um doador de elétrons (OTT et al., 2007) e GR é a enzima responsável pela redução da glutathione oxidada (GSSG) a GSH, sendo importante para a manutenção dos níveis de GSH necessários para a atividade da GPx (DUTHIE et al., 2000).

São poucos os trabalhos relacionados a respeito do efeito da rutina sobre a atividade de enzimas antioxidantes em culturas de células, porém outros antioxidantes naturais têm sido testados e alterações significativas na atividade da enzima ou na expressão dos genes das enzimas antioxidantes foram observados (Röhrdanz et al., 2002; ALIÁ et al., 2006; ). Nesse trabalho avaliamos a expressão gênica das enzimas antioxidantes (CuZnSOD, CAT, GPx1 e Gr) das células HepG2 e HT-29 tratadas com 10 e 100  $\mu$ M de rutina após 12 e 24 horas.

Nas células HepG2 expostas por 12h com a menor concentração de rutina (10 $\mu$ M) foi detectada uma repressão (0,444 vezes), enquanto que a maior concentração apresentou uma indução dos transcritos de CuZn-SOD (2,09 vezes). Neste mesmo tempo de tratamento (12h)

100 $\mu$ M de rutina aumentou os níveis de expressão dos genes Gpx1 e Gr somente na linhagem HT-29 (2,83 e 2,03 vezes respectivamente). Avaliamos também a expressão do gene CYP1A1 para verificar se a rutina estava sendo metabolizada pelas duas linhagens e encontramos modulação positiva exercida pelo flavonóide somente na maior concentração (100 $\mu$ M).

Analisando os dados descritos acima podemos verificar que a rutina interferiu na expressão gênica das duas linhagens em estudo. Ademais essas alterações dependem da concentração, do tempo e do tipo de linhagem celular utilizada.

Resultados semelhantes foram encontrados para a quercetina, após 4 horas de tratamentos em HepG2 concentração de 0,1 e 1  $\mu$ M provocaram uma diminuição e 10, 50 e 100  $\mu$ M causaram uma aumento significativo nos níveis de RNA de CuZnSOD de Hepg2 e concentração mais baixa (1  $\mu$ M) aumentaram significativamente os níveis de mRNA de GPx (ALIÁ et al., 2006b). Segundo os autores, os mecanismos pelos quais a quercetina regula a expressão para cima e para baixo são desconhecidos, porém as mudanças significativas nos níveis RNAm de CuZnSOD e GPx encontrados nas células tratadas não foram relevantes o suficiente para afetarem a atividade enzimática em tratamentos a curto prazo.

Com a finalidade de verificar se o efeito rutina na expressão gênica persistia em maior tempo de exposição, aumentamos para 24 horas o tempo de tratamento e os resultados revelaram que 10  $\mu$ M de rutina aumentou a expressão gênica de todas as enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx1 e Gr) nas duas linhagens em estudo. Os resultados confirmam a modulação positiva exercida pela menor concentração de rutina em nossas condições experimentais.

Chan et al. (2002) também demonstraram uma relação entre as culturas de astrócitos cerebrais de ratos tratadas com catequina e o aumento da expressão dos genes CuZnSOD, MnSOD, CAT e GPx. Neste trabalho os autores sugerem que o consumo de flavonóides como catequina pode impedir o desenvolvimento da aterosclerose, uma vez que a suplementação em

curto prazo com esses antioxidantes naturais pode potencializar a atividade de genes como SOD responsáveis por atuar contra a oxidação de LDL.

Também foram encontrados em células de hepatoma de rato (H4IIE) tratadas com daidzeína, um aumento de 3 vezes na expressão da CAT (RÖHRDANZ et al., 2002). Para melhor elucidar o mecanismos subjacentes ao aumento do mRNA da CAT pela daidzeína, os autores realizaram experimentos de transfecção, onde as células de hepatoma receberam o gene repórter contendo diferentes partes da região a montante da catalase. Após exposição com daidzeína, observou-se um aumento na expressão do gene repórter tratado em comparação com as células não tratadas. Segundo os autores, os resultados indicam claramente que o aumento dos níveis de mRNA da CAT após tratamento com daidzeína é devido à ativação do promotor para transcrição da catalase. Esse mesmo mecanismo pode ser atribuído a rutina, uma vez que a expressão da catalase aumentou em 3,35 vezes na HepG2 e 4,01 na vezes HT-29 em nossos experimentos.

Em relação à ativação da GPx Cowan et al. (1993) verificaram que a mesma contém dois elementos responsivos ao oxigênio localizados na região 5'flanqueadora do gene Gpx1 humano. Estes elementos foram encontrados ativos em células HeLa, regiões importantes responsáveis por preparar a célula contra o estresse oxidativo e é provável que nas linhagens HepG2 e HT-29 o gene GPx1 seja regulado de forma semelhante. Conseqüentemente, com aumento nos níveis de mRNA GPx1 nas células tratadas com 10  $\mu$ M de rutina ocorreu um aumento na expressão da Gr de 2,13 vezes. A GR é responsável por manter o estado reduzido da glutathiona, dessa forma podemos sugerir que a rutina manteve o estado redox das células.

Por outro lado, quando analisamos os valores de expressão das células tratadas com 100  $\mu$ M observamos uma diminuição nos níveis de RNA da CuZnSOD nas células HepG2, enquanto que para a HT-29 a diminuição nos níveis de expressão gênica foi observadas nas CuZnSOD e CAT.

Outros flavonóides também reduziram a expressão gênica de enzimas antioxidantes. Valdameri et al. (2011), observaram em células HepG2 que o tratamento com 100  $\mu$ M de apigenina por 24h diminuiu significativamente a expressão da CAT em aproximadamente 40%. Röhrdanz et al. (2003) encontrou alteração na expressão do mRNA de CuZnSOD, MnSOD e Gpx em células H4IIE tratadas com 100  $\mu$ M de quercetina por 24 horas. Níveis de expressão de mRNA revelaram diminuição significativa de 35% para a CuZnSOD, 30% para MnSOD e também um decréscimo de aproximadamente 40% na expressão da GPx. Os autores dos trabalhos acima sugerem que a diminuição da expressão gênica das enzimas antioxidantes pode estar relacionada ao aumento dos níveis de  $H_2O_2$ , o qual estaria contribuindo para a morte celular induzidas pela apigenina ou quercetina. Embora a rutina tenha diminuído a expressão gênica da CuZnSOD e da CAT não foi observado efeito citotóxico após 24h.

De acordo com as diferenças significativas encontradas na expressão gênica após 24 horas de tratamento e com a finalidade de elucidar melhor o efeito da rutina avaliamos o seu efeito na atividade das enzimas antioxidantes em quatro tempos diferentes: 16, 20, 24 e 28 h.

Em nossas condições experimentais, observamos claramente que a menor concentração de rutina (10  $\mu$ M) aumentou significativamente a atividade de algumas enzimas antioxidantes, enquanto que a maior concentração diminuiu a atividade nas duas linhagens estudadas. Esse mesmo padrão de resposta foi observado na análise dos transcritos de RNAm, porém a falta de relação direta entre as mudanças na atividade das enzimas antioxidantes e a expressão gênica induzidas pela rutina parecem indicar que essas enzimas antioxidantes apresentam uma regulação pós-transcricional.

Recentemente, foi observado que os níveis de expressão de RNAm das enzimas antioxidantes são regulados pelo complexo Nrf2-Keap1 (LEONARDUZZI et al., 2010) e elementos antioxidantes de resposta (AREs) (PARK e RHO, 2005). De acordo com

Leonarduzzi et al. (2010) alguns flavonóides favorecem tanto a translocação do Nrf2 nuclear quanto a ativação de AREs em diversas linhagens celulares, tornando-se assim uma importante estratégia celular para enfrentar condições de estresse oxidativo.

Constatamos também uma variação entre as linhagens celulares e os tempos analisados nas atividades das enzimas antioxidantes, sendo que 10  $\mu$ M de rutina aumentou a atividade da SOD e CAT após 16 e 20h para as células Hepg2 e para HT-29 foi observado um aumento significativo das enzimas SOD e Gpx após 16h exposição. Talvez essas diferenças estejam relacionadas com a especificidade de cada linhagem, perfil hormonal e disponibilidade de cofatores.

O efeito da rutina sobre a atividade das enzimas antioxidantes em células Hepg2 já havia sido descrita anteriormente. Aherne et al. (1999) não encontraram alteração na atividade das enzimas SOD e CAT após 24 h de exposição com 10, 50 e 200  $\mu$ M de rutina, porém o flavonóide impediu danos no DNA induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Alía et al. (2000) avaliaram a rutina após 4h de tratamento e encontraram modificação somente na atividade da GR, no entanto ela reduziu a geração de ROS e MDA (malonaldeído). Os trabalhos citados acima recomendam a rutina para impedir ou retardar o estresse oxidativo celular, eventos envolvidos em várias doenças crônicas não transmissíveis.

Todavia, nossos resultados indicaram que a maior concentração de rutina (100  $\mu$ M) apresenta resultados contrários, pois ela diminui tanto a expressão quanto a atividade das enzimas antioxidantes, principalmente da SOD e da CAT. Sabe-se que compostos que inibem a atividade das enzimas antioxidantes podem reduzir a capacidade das células de se protegerem contra danos oxidativos e induzir a morte celular (Sies e Cadenas 1985). Dessa forma, essas alterações podem ter contribuído para o efeito citotóxico e a redução da viabilidade e proliferação celular após 48 h. Portanto, ao avaliar a capacidade antioxidante de

flavonóides para modular a expressão e a atividade das enzimas antioxidantes o tempo de exposição e as concentrações utilizadas também devem ser considerados.

Em conclusão, nossos resultados indicam que a rutina em baixas concentrações atua potencializando as defesas antioxidantes das células mesmo na ausência de qualquer substância indutora de ERRO, exercendo assim, atividade antioxidante indireta.

## Referências

- ACKER S.; BERG, D.; TROMP M.; GRIFFIOEN D.; BENNEKOMW.; VIJGH D.; BAST. A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radi Biology Med.** 20:331-342, 1996.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology.** San Diego, 105:121–126, 1984.
- AHERNE S. A.; O'BRIEN N. M. Lack of Effect of the Flavonoids, Myricetin, Quercetin, and Rutin, on Repair of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced DNA Single-Strand Breaks in Caco-2, Hep G2, and V79 Cells. **Nutrition and Cancer**, 38: 106–115, 2000.
- AHERNE, S.A., O'BRIEN, N.M. The flavonoids, myricetin, quercetin and rutin, protect against cholestan-3h, 5a, 6h-triol-induced toxicity in Chinese hamster ovary cells in vitro. **Nutr Res.** 19, 749– 760, 1999.
- ALÍA M., RAMOS S., MATEOS R., GRANADO-SERRANO A.B., BRAVO L., GOYA L. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. **Tox and App Pharm.** 212: 110 – 118, 2006.
- ALÍA M.; MATEOS R.; RAMOS S.; LECUMBERRI E.; BRAVO, L.; GOYA, L. Influence of quercetin and rutin on growth and the antioxidant defense system in a human hepatoma cell line (HepG2). **Eur J Nutr**, 45:19–28, 2006.
- ARORA A.; NAIR M.G.; STRASBURG G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radi Biology Med.** 24:1355-58, 1998.
- BEUTLER E. Red Cell Metabolism A manual of biochemical methods. New York: Grune & Straton, 1975.
- BRADFORD M. A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem** 72:248-254, 1976.
- CARLBERG I, MANNERVIK B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **J Biol Chem** 250:5475–5480, 1975.

- CHANA, P., CHENG T., TSAIB C., LIENB C.S., CHENB F.C. KAOA C., LIUA, J.C., CHENA, L.Y., HSIEHA M.H. Effect of catechin on the activity and gene expression of superoxide dismutase in cultured rat brain astrocytes. **Neuroscience Letters** 328:281–284, 2002.
- COWAN D.B., WEISEL R.D., WILLIAMS W.G., MICKLE D.A. Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione peroxidase gene. **J Biol Chem.** 268:26904-10, 1993.
- DING, W. Q.; VAUGHT, J. L.; YAMAUCHI, H.; LIND, S. E. Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity: The potential importance of down-regulation of superoxide dismutase 1 expression. **Molecular Cancer Therapy.** v.9, p.1109-1117, 2004.
- DUTHIE G.G., DUTHIE S.J., KYLE J.A. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutr Res Rev.** 13:79-106, 2000.
- GOYA L, DELGADO-ANDRADE C, HENARESJ, BRAVO L., MORALES F.M. Effect of coffee Melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. **Mol Nutr Food Res**, 51; 536 – 545, 2007.
- GRUNBLATT, E.; MANDEL, S.; MAOR, G.; YODIM, M. B. H. Gene expression analysis in N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine mice model of Parkinson's disease using cDNA microarray: effect of R-apomorphine. **Journal of Neurochemistry.** v.78, p. 1-12, 2001.
- HALLIWELL B., AESCHBACH R., LÖLIGER J., ARUOMA O.I. The characterization of antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology.** 33: 601-617, 1995.
- HARBORNE J.B.; WILLIAMS C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochem** 55:481-504, 2000.
- HAYSLETT, J. P., GÖGELEIN, H., KUNZELMANN, K. AND GREGER, R. Characteristics of apical chloride channels in human colon cells (HT29). **Pflügers Arch.** 410: 487–494, 1987.
- HOPKINS J, TUDHOPE G. R. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. **J Haematol.** 25: 563–57, 1973.
- HOPKINS J, TUDHOPE G.R. Glutathione peroxidase in human red blood cells in health and disease. **J Haematol** 25:563–575, 1973.
- JIAO, H.; ALLINSON, S. I., WALSH, M.J.; HEWITT, R.; COLE, K.J.; PHILLIPS, D. H.; MARTIN, F. I. Growth kinetics in MCF-7 cells modulate modulate benzo[a]pyrene-induced **CYP1A1** up-regulation. **Mutagenesis.** v. 22, p. 111-116.
- KIM, G.N.; JANG, H.D. Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on HO-induced oxidative stress in HepG2 cells. **Ann N Y Acad Sci** 1171: 350-7, 2009.

- LEE C.S, PARK S.Y., KO H.H., HAN E.S. Effect of change in cellular GSH levels on mitochondrial damage and cell viability loss due to mitomycin c in small cell lung cancer cells. **Bioch Pharm** 68:1857–1867, 2004.
- LEONARDUZZI G., SOTTERO, B., POLI, G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. **Pharmacol Ther.** 128:336–374, 2010.
- MARCARINI J.C, TSUBOY M.S.F, LUIZ R.C, RIBEIRO L.R, HOFFMANN-CAMPO C.B, MANTOVANI M.S. Investigation of cytotoxic apoptosis-inducing genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. **Exp Patol Tox** 63:459-465, 2011.
- MCCORD J.M., FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Biol Chem.** 244: 6049 – 6055, 1969.
- MCMILLIAN, M.K., LI, L., JPARKER, .B., PATEL, L. ZHONG, Z., GUNNETT, J.W., POWERS, W.J. JOHNSON, M.D. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. **Cell Biology and Toxicology.** 13: 157-173, 2002.
- ONO, K., NAKANE, H. Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. **Journal of Biochemistry.** 108: 609–613, 1990.
- OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis, Dordrecht.** 12: 913-922, 2007.
- PARK E.Y., RHO H.M. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. *Mol Cell Biochem* 240:47–55, 2002.
- PATHAK D.; PATHAK K.; Singla A.K. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia** 57:371-389. 1991.
- RÖHRDANZ E., OHLER S., TRAN-THI, Q., KAHL R. The Phytoestrogen Daidzein Affects the Antioxidant Enzyme System of Rat Hepatoma H4IIE Cells. **J Nutr** 132: 370–375, 2002.
- SABLINA, A. A.; BUDANOV, A. V.; IYINKAYA, G. V.; AGAPOVA, L. S.; KRAVCHENKO, J. E.; CHUMAKOV, P. M. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. **Natural Medicine.** v.11, p. 1306–1313, 2005.
- SCALBERT A.; MANACH C.; MORAND C.; REMESY C.; JIMENEZ, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in F Sci Nut,** 45:287-306, 2005.
- SIES H., CADENAS E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 1152:617-31, 1985.

- SUGAYA et al. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. *Mutation Research*, v. 578, p.327–332, 2005.
- SUN, X.; LI, B.; LI, X.; WANG, Y.; XU, Y.; JIN, Y.;PIAO, F.;SUN, G. Effects of sodium arsenite on catalase activity, gene and protein expression in HaCaT cells. ***Toxicology in Vitro***. v.20, p.1139–1144, 2006.
- VALDAMERI G., TROMBETTA-LIMA M., WORFEL P. PIRES A.P., MARTINEZ G.R., NOLETO G, CADENA S., SOGAYAR M.C., WINNISCHOFER S.M.B., ROCHA M.E.E. Involvement of catalase in the apoptotic mechanism induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells. ***Chemico-Biological Interactions*** 193:180–189, 2011.
- WALLE T. Absorption and metabolism of flavonoids. ***Free Radic Biol Med***. 36: 829-837, 2004.
- WANG S.W., WANG Y.J., SU Y.J., ZHOU W.W., YANG S.G., ZHANG R., ZHAO M., LI Y.N., ZHANG Z.P., ZHAN D.W., LIU R.T. Rutin inhibits  $\beta$ -amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. ***Neurotoxicology***. 33:482-90, 2012.

### 5.3 ARTIGO 3

---

#### **Rutina protege células renais 786-O do estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via expressão de HSPA5 e GADD153.**

Juliana C. Marcarini<sup>a</sup>; Dalita G. S. M. Cavalcante; Cláudia B. R. Martinez; Mário S. Mantovani<sup>b</sup>; Lúcia R. Ribeiro<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual “Júlio Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo, Brasil;

<sup>b</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil;

## Resumo

O estresse oxidativo e de retículo endoplasmático (RE) estão envolvidos em uma série de patologias humanas como doenças renais crônicas. Flavonóis como rutina são descritos por apresentarem várias propriedades farmacológicas relacionadas à capacidade antioxidante. O presente estudo investigou o efeito da rutina e sua ação protetora após a exposição com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes tempos de pós-tratamento (0; 30min; 2 e 4h). Para isso verificamos a integridade do DNA, expressão e atividade das enzimas antioxidantes endógenas (SOD, CAT e GPx) e expressão dos genes do sistema *unfolded protein response* (HSPA5, ERN1 e GADD153) em célula renais 786-O. O tratamento com 100 μM reduziu o crescimento e viabilidade celular a partir de 24 horas de incubação. No ensaio do cometa, 10 e 50 μM de rutina não causaram danos primários no DNA, como também, 10 μM aumentou significativamente a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em 35%, induziu a expressão relativa dos RNAs da CuZnSOD e GPx, e reprimiu a expressão do gene GADD153 ligado a via de resposta ao estresse de RE. A avaliação do efeito protetor contra o estresse oxidativo onde as culturas foram pré-incubadas com 10 μM de rutina e em seguida expostas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80 μM) por 30 min apresentaram: redução de 80% nos danos causados ao DNA em 4h de pós-tratamento; diminuição na atividade das enzimas SOD, CAT e Gpx de 44, 42 e 32 % após 30 min; indução da expressão dos genes CuZnSOD (4,46x) e CAT (3,0x) após 2h de pós-tratamento. A rutina também apresentou efeito protetor contra estresse de RE induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois houve redução gradual nos níveis dos transcritos gênicos HSPA5, ERN1 e GADD153 nos quatro tempos analisados de pós-tratamento sendo que, após 4 horas os níveis de expressão desses genes alcançaram valores próximos ao controle do experimento. Portanto, sugerimos que a presença da rutina em concentração fisiológica pode preparar o sistema de defesa antioxidante das células renais para enfrentar situações de estresse oxidativo e de RE induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, prevenindo assim, doenças renais.

Palavras-chave: flavonol, superóxido dismutase, catalase, carcinoma renal, sistema UPR.

## 1.Introdução

O estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio entre outras espécies reativas tem sido implicado no desenvolvimento e progressão de várias doenças crônicas como câncer, doença cardiovascular e aterosclerose (Halliwell, 2007; Vogiatzi et al., 2009). Outro mecanismo envolvido nas doenças relacionadas acima é o estresse de retículo endoplasmático (RE). O RE é a organela responsável pela síntese e dobramento de proteínas destinadas à secreção, homeostase do cálcio intracelular e ativação da sinalização para morte celular (Baumann e Walz, 2001). O RE responde ao estresse com o início de uma cascata de eventos conhecida como *Unfolded Protein Response* (UPR). Sob condições adversas de estresse em que são produzidas proteínas alteradas, ocorre a ativação do UPR, acionando assim a transcrição de vários genes e concomitante redução da tradução proteica (Kim et al., 2008).

Estudos epidemiológicos demonstraram uma relação inversa entre o consumo de flavonóides e o desenvolvimento de doenças crônicas provocadas pelo estresse oxidativo e de RE (Arts e Hollman, 2005; Van Dam et al., 2013) e esses efeitos protetores atribuídos a estes compostos estão relacionados, em grande parte, a sua propriedade antioxidante (Sies, 2010).

Alguns mecanismos antioxidantes têm sido propostos para os flavonóides como: a) opressão da formação de espécies reativas do oxigênio pela inibição do sistema enzimático responsável pela geração de radicais livres; b) quelação de íons metálicos que podem iniciar a produção de radicais hidroxil pela Reação de Fenton ou Harber-Weis; c) sequestro de radicais livres; d) regulação positiva ou proteção das defesas antioxidantes por induzir a fase II de enzimas como glutathione transferase que aumenta a excreção de espécies oxidadas, ou e) indução de enzimas antioxidantes como a metalotioneína (Procházková et al., 2011).

Os flavonóides, especificamente flavonóis como a rutina, têm sido descritos por apresentarem uma variedade de atividades farmacológicas incluindo propriedades

antiinflamatória, antialérgica, antimutagênica, imunomoduladora e hepatoprotetora (Jabaz et al., 2002; Marcarini et al., 2011; Mirani et al., 2012). Embora os flavonóis forneçam vários efeitos benéficos para a saúde, há poucos dados na literatura atual sobre a relação entre esses compostos e a doença renal crônica, uma vez que ela caracteriza-se por um estado de vasculopatia generalizada, acompanhada por uma elevada mortalidade, causada, sobretudo, pela aterosclerose (Bonetti et al., 2003). No processo inicial da lesão da aterosclerose ocorre um afluxo de macrófagos e quando ativados, liberam radicais superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e enzimas hidrolíticas.

De acordo com Aliá e colaboradores (2005) o estudo dos mecanismos envolvidos na lesão celular mediada por compostos oxidantes, bem como a avaliação de biomarcadores do sistema de defesa celular em tais condições, poderia ajudar a prevenir o aparecimento e desenvolvimento de doenças relacionadas com o estresse oxidativo. Desta forma, o objetivo do trabalho foi investigar os efeitos protetores da rutina contra o estresse oxidativo e de RE induzido por  $H_2O_2$  em cultura de células de carcinoma renal humano (786-O). Foram realizados os ensaios de citotoxicidade (resazurina), viabilidade e cinética de proliferação para avaliar o efeito da rutina na sobrevivência celular. A indução de danos no DNA e a cinética de reparo nos tempos pós-tratamentos (0, 30min, 2 e 4h) em resposta a exposição com a rutina e associados ao  $H_2O_2$ , foram analisados pelo ensaio do cometa. A expressão gênica transcricional (qPCR em tempo real) foi analisada para os genes da via de resposta ao estresse de RE: HSP5(Bip/GRP78); GADD153 (CHOP); ERN1 (IRE1) e os genes de resposta ao estresse oxidativo: CuZnSOD (superóxido dismutase); CAT (catalase); GPx1 (glutathione peroxidase). A atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e Gpx) também foi determinada.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Agentes químicos

A rutina (95% pura, Sigma-Aldrich) foi dissolvida em DMSO (dimetilsulfóxido) e diluída em meio de cultura DMEM e esterilizada por filtração (Millex<sup>®</sup> 0.22 µm, Millipore), sendo que a concentração de DMSO não ultrapassou 0,01% em cultura. O peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Perhydrol – Merk) e o agente anti-proliferativo Doxorrubicina (Adriblastina - Pharmacia) foram utilizados na concentração final de 80 µM e 0,9 µM, respectivamente.

### 2.2. Cultura celular

O sistema teste utilizou as células da linhagem 786-O (carcinoma renal humano) que foi gentilmente cedida pelo Prof. João Ernesto de Carvalho - CPQBA / UNICAMP. Foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco) com antibiótico/antimicótico (0,1%), mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. Nestas condições, o ciclo celular da linhagem foi de aproximadamente 24 horas.

### 2.3. Ensaio de citotoxicidade – Resazurina

O ensaio de citotoxicidade foi realizado de acordo com o protocolo descrito por McMillia et al. (2002) com modificações. Neste ensaio, a citotoxicidade da rutina foi avaliada utilizando resazurina (Acros Organics). Em cada um dos 24 poços da placa de cultivo celular foram semeadas aproximadamente 5 x 10<sup>3</sup> células. Estas foram expostas ao tratamento com a rutina nas concentrações finais de 0,1; 1; 10; 50 e 100 µM por 24 h. Decorrido o tempo de exposição o meio foi retirado e as células foram incubadas por 3 horas com a resazurina na concentração final de 60µM. A leitura da fluorescência emitida pela

resofurina (resazurina oxidada em células viáveis) foi feita em leitor de microplacões VICTOR 3 (Perkin Elmer) com 530-560 nm de excitação e 580-600 nm de emissão. Os tratamentos foram realizados em três repetições biológicas. A porcentagem de citotoxicidade foi calculada através da seguinte fórmula: % Citox. =  $[(\times \text{UF Tratado} * 100) / \times \text{UF Controle}] - 100$ , onde  $\times \text{UF}$  é a média de unidades de fluorescência.

#### *2.4 Ensaios de cinética de Proliferação e viabilidade celular*

O ensaio de cinética de proliferação e viabilidade celular foi realizado de acordo com Marcarini et al. (2011), efetuado tratamentos em três repetições biológicas e para análise foi traçada uma curva de cinética de proliferação nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas. Foram semeadas  $2,6 \times 10^4$  células/tratamento em tubos de cultura juntamente com seus respectivos tratamentos: a) controle (PBS: phosphate buffered saline); b) agente anti-proliferativo (doxorubicina  $0,9 \mu\text{M}$ .); e c) tratamentos com 10; 50 ou  $100 \mu\text{M}$  de rutina.

Foram semeados quatro tubos de cultura para cada tratamento, cada um correspondendo a um tempo de colheita (24, 48, 72 ou 96 horas). Dessa forma, as células do tubo 1 foram contadas 24 horas após serem semeadas, no tubo 2 após 48 horas e assim sucessivamente. A curva de proliferação foi montada de acordo com os dados obtidos nas contagens das células nos diferentes tempos. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão com o reagente Azul de Trypan (0,2%) (Gibco).

#### *2.6. Ensaio do cometa*

Para a avaliação da genotoxicidade as células receberam tratamento com duas concentrações de rutina (10 e  $50 \mu\text{M}$ ). Na avaliação do efeito protetor as células foram expostas por 24 horas somente com  $10 \mu\text{M}$  de rutina. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram lavadas (2x, PBS) e tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 minutos. Após esse período foi

realizada uma análise pós-tratamento a partir de: 0, 30min, 2 e 4h da exposição com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para cada tratamento foram realizadas triplicatas biológicas.

O ensaio do cometa foi realizado segundo o protocolo de Tice et al. (2000). Foram semeadas aproximadamente  $2 \times 10^6$  células por frasco de cultura experimental. Resumidamente, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas (500 µL de tripsina-EDTA 0,025%; 37°C), centrifugadas por 5 minutos a 64,4 g e ressuspensas em 300µL de meio de cultura. 20µL da ressuspensão foram misturados a 120µL de agarose de baixo ponto de fusão (*low-melting*) 0,5% e aplicados em lâminas pré-gelatinizadas com agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. A seguir, as lâminas foram submersas em solução de lise alcalina (2,5M NaCl; 100 mM ácido etilenodiaminotetraacético; 10nM Tris; 10% dimetilsulfóxido; 1% triton X-100, pH 10) por uma hora. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 40 minutos em tampão de eletroforese (0,3M NaOH; 1mM EDTA, pH13) e a corrida foi realizada (1,5V/cm; 300mA) por 20 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4M, pH 7,5) por 5 minutos, repetindo-se 3 vezes esta etapa e finalizando com a submersão em álcool absoluto para a fixação por 5 minutos. A coloração das lâminas foi realizada com brometo de etídeo e os nucleóides foram analisados em microscópio de fluorescência, com filtro de excitação 450-490 nm e filtro de emissão (barreira) de 515 nm, em aumento de 40X. Para cada tratamento foram analisados 300 nucleóides pelo software CometScore v.1,5 (TriTek, Sumerduck, VA, USA, [http://www. autocomet.com](http://www.autocomet.com)).

A porcentagem de redução dos danos do agente genotóxico pela rotina foi calculada de acordo com Waters et al. (1990) utilizando a seguinte fórmula: Redução (%) =  $(A - B/A - C) \times 100$ , onde **A** é a média de nucleóides com dano tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, **B** é número de células observadas no pós-tratamento associado, e **C** é o número de nucleóides com danos do controle do ensaio.

### *2.7 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes*

Para análise da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) o delineamento experimental seguiu o mesmo padrão do ensaio do cometa (item 2.6). Depois do período de incubação, o meio foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS e desprendidas da parede do frasco com 1mL tripsina-EDTA (0,025%; 37°C). As células foram centrifugadas (1032 rpm; 4°C), os sobrenadantes removidos e o sedimento suspenso em 500 µL de PBS. Em seguida as amostras foram sonicadas durante 5 minutos por 4 vezes e centrifugadas novamente (7500 rpm, 4°C); os sobrenadantes foram coletados novamente e mantidos congelados até o momento das análises.

Para as análises bioquímicas foram utilizadas 50 uL de amostra, para cada ensaio. As enzimas antioxidantes que tiveram suas atividades medidas foram: a SOD, CAT, GPx e GR. A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de McCord e Fridovich (1969), pela inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido, observado no comprimento de onda de 550 nm a 25°C, em espectrofotômetro. A atividade da CAT foi determinada de acordo com a técnica descrita por Beutler (1975), seguindo-se a velocidade de decomposição da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através do decréscimo de absorbância a 240 nm em espectrofotômetro. A atividade da GPx foi determinada pela oxidação do NADPH<sup>+</sup> H<sup>+</sup> em presença de peróxido, de acordo com Hopkins e Tudhope (1973), em espectrofotômetro a 340 nm a 25°C. A GR foi determinada indiretamente, com base na redução de NADPH na presença de GSH oxidada (CARLBERG e MANNERVIK, 1975), a 340 nm. A concentração de proteína total desses sobrenadantes foi determinada por meio de método de Bradford (1976) em 595nm. Para cada tratamento foram realizadas de 3-4 repetições biológicas.

## 2.8 RT-PCR em tempo real

Para análise da expressão gênica o delineamento experimental seguiu o mesmo padrão do ensaio do cometa (item 2.6). O procedimento de extração de RNA total das células foi efetuado conforme as instruções do fabricante do reagente do TRIZOL LS<sup>®</sup> (Invitrogen, MLV – Invitrogen, Life Technologies). O cDNA foi sintetizado após a verificação da qualidade do RNA total em gel de agarose 0,8% (padrão de bandas 28S e 18S) e razão entre A260/280 (Biophotometer – Eppendorf). A síntese de cDNA foi feita a partir de 1µg de RNA, com oligo(dT) e com a enzima transcriptase reversa (M-MLV – Invitrogen, Life Technologies). O cDNA (2 µL) foi encaminhado para a reação de PCR em tempo real realizada no termociclador LightCycler<sup>®</sup> Nano System (Roche) com os *primers* que amplificam transcritos de regiões parciais dos genes em estudo.

A amplificação dos fragmentos foi detectada através da fluorescência emitida pelo fluoróforo SYBR Green<sup>®</sup> contido no kit (Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG - Invitrogen). As condições da PCR no termociclador foram às seguintes: um passo inicial a 50°C por 2 min, seguido de 95°C por 3 minutos, 39 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 20 segundos, seguidos de 95°C por 10 seg e 40°C por 1 min. A análise da curva de Melting foi realizada no final da reação com temperatura de 50°C até 95°C a cada 0,5°C por 5 segundos. Os tratamentos foram realizados em três repetições biológicas. Neste trabalho os dados foram normalizados com o gene de referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH). Os *primers* utilizados e suas referências estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Sequências de *primers* utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real.

<b>Genes</b>	<b>Primers</b>	<b>Referências</b>
GPDH	F: 5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' R: 5'- GAAGATGGTGATGGGATTT-3'	SUGAYA et al., 2005
CuZnSOD	F: 5'-CTAGCGAGTTATGGCGAC-3' R: 5'-GAATGTTTATTGGGCGATC'	DING et al., 2004
Gpx1	F: 5'-CAACCAGTTTGGGCATCAG-3' R- CGATGTCAATGGTCTGGAAG-3'	SABLINA et al.,2005
CAT	F: 5'-CATCGCCACATGAATGGATA-3' R: 5'-CCAACCTGGGATGAGAGGGTA-3'	SUN et al., 2006
HSPA5	F: 5'-GTGGAATGACCCGTCTGTG-3' R: 5'- TGCCCACCTCCAATATCAAC-3'	BERANDINELLI, 2011
ERN1	F: 5'-AGTGGGCAGACACAGTTTCA-3' R: 5'-CCACCGTGTAGGTAGGGTTC-3'	BERANDINELLI, 2011
GADD153	F: 5'-AGCAGATGTGCTTTTCCAGAC-3' R: 5'-GTCCTCATACCAGGCTTCCA-3'	BERANDINELLI, 2011.

## 2.8 Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram analisados pelo teste estatístico ANOVA seguido de Dunnett através do programa GraphPad InStat, considerando  $p < 0,05$ , comparando os tratamentos com diferentes concentrações de rutina com o grupo controle, exceto a análise dos níveis de expressão gênica que foram determinados pelo programa REST© (Pfaffl et al., 2002) utilizando o modelo *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*© para comparar a diferença de expressão entre os tratamentos.

## Resultados

### 3.1 Efeito da rutina na citotoxicidade e cinética de proliferação

A Figura 1 mostra os resultados das intensidades de fluorescência obtidas no ensaio de citotoxicidade (rezasurina) em células 786-O tratadas por 24h com rutina. Os resultados mostraram que as concentrações de 0,1; 1; 10 e 50  $\mu\text{M}$  de rutina não foram citotóxicas. No entanto, verificou-se que a 100  $\mu\text{M}$  de rutina causou citotoxicidade de aproximadamente 42%.

Na Figura 2 estão representados os resultados da cinética de proliferação e viabilidade celular realizados nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas para tratamentos com as concentrações de 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  de rutina. Pelos ensaios, foi verificado que somente a concentração de 100  $\mu\text{M}$  reduziu o crescimento e a viabilidade das células 786-O a partir de 24 horas de incubação, sendo que a redução foi de aproximadamente 15% em 24h e 20% em 48h, 26% em 72h e 30% em 96 h. Considerando os resultados citotóxicos para 100  $\mu\text{M}$  da rutina, esta concentração não foi utilizada nos demais ensaios.

### 3.2 Efeito da rutina na integridade do DNA

O parâmetro analisado para avaliação da genotoxicidade foi a porcentagem de DNA na cauda do cometa (*% DNA in tail*) e os valores estão representados na Figura 3. Após a exposição das células com 10 e 50  $\mu\text{M}$  de rutina por 24 horas de tratamento os dados mostram que não houve efeito genotóxico.

### 3.3 Efeito da rutina contra os danos no DNA induzidos pelo $\text{H}_2\text{O}_2$

A análise das células expostas por 30 minutos (zero hora) com  $\text{H}_2\text{O}_2$  apresentaram níveis de danos significativos de 90% em relação ao grupo controle (Fig.4). Após 30min, 2 e 4 h da retirada do  $\text{H}_2\text{O}_2$  os níveis de danos no DNA permaneceram significativos, porém ocorreu uma redução dos danos sofridos em 88, 75 e 56 % respectivamente.

Na avaliação do efeito protetor da rutina, as células 786-O foram incubadas por 24 horas com 10  $\mu\text{M}$  de rutina e logo após foram expostas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 minutos. A análise dos nucleóides revelou que a rutina reduziu os danos causados no DNA nos quatro tempos de pós-tratamento quando comparados ao grupo de células tratadas somente com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (Fig.4). Os níveis de danos foram bem menores, uma vez que a rutina diminuiu gradativamente as quebras de fita simples induzidas pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduzindo em até 80% os danos ao DNA após 4h

tempos de pós-tratamentos. Nos tempos de pós-tratamentos de 0; 30min e 2h a taxas de redução foram de 10, 21 e 51% respectivamente.

### *3.4 Efeito da rutina na atividade e expressão gênica das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx*

A atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx foram determinadas após 24h de tratamento com 10 e 50  $\mu\text{M}$  de rutina. Foi observado um aumento significativo na atividade das enzimas SOD (35%) e CAT (36%) somente nos tratamentos com 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 5).

A Figura 6 mostra os valores de expressão relativa dos RNAs da CuZnSOD, CAT, GPx1 avaliados após 24 horas de tratamento das células com 10  $\mu\text{M}$  rutina. Foi observada a indução significativa dos transcritos gênicos CuZnSOD e GPx1 de 2,23 e 2,64 vezes respectivamente.

### *3.5 Efeito da rutina na expressão dos genes do sistema UPR*

A expressão gênica ao nível transcricional foi analisada para três genes do sistema UPR (*Unfolded - Protein Response*): *HSPA5*, *GADD153* e *ERN1*. A análise mostrou que houve uma repressão significativa na expressão do *GADD153* (0,517 vezes) após 24 horas de exposição com 10  $\mu\text{M}$  de rutina (Fig 6).

### *3.6 Efeito da rutina contra o estresse oxidativo induzidos pelo $\text{H}_2\text{O}_2$ .*

Inicialmente as culturas expostas somente com  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 minutos apresentaram aumento significativo na atividade das enzimas SOD, CAT e GPx (Fig. 7). As atividades das enzimas foram significativamente maiores com zero hora e meia hora de pós-tratamentos com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uma vez que a SOD aumentou 2,5 vezes; a Catalase 4,0 vezes e a GPx 2,0 vezes em

relação ao grupo controle. No tempo de 2 e 4 horas a atividade das enzimas também houve uma aumento significativamente na atividade, porém com menor intensidade onde a SOD apresentou: 2,1 e 1,5 vezes; Catalase: 2,6 e 1,6 vezes e a GPx: 1,8 e 1,2 vezes; respectivamente. Estes resultados confirmam a indução do estresse oxidativo pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os resultados da expressão dos genes CuZnSOD, CAT, GPx1 representados na Figura 8 mostram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reprimiu a expressão da CuZnSOD (0,26x) somente após zero hora e induziu a expressão da CAT (2,32x) em meia hora de pós-tratamento.

Na avaliação do efeito protetor do flavonóide, a análise das culturas pré-incubadas com 10 µM de rutina por 24 h revelou uma redução significativa na atividade das três enzimas: SOD, Catalase e GPx induzidas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, principalmente em 30min de pós-tratamento, no qual apresentaram a maior taxa de redução na atividade: SOD: 44%; Cat: 42% e GPx 32% (Figura 7). Também foi observada uma diminuição significativa na atividade das enzimas nos outros tempos de pós-tratamento de 0; 2 e 4 h: SOD - 20, 37 e 33%; Cat - 13, 37 e 40%; Gpx - 10, 31e 18% respectivamente.

A expressão relativa dos RNAs da CuZnSOD, CAT, GPx1 também foram alterados com a exposição da rutina, porém houve uma variação de resposta durante os tempos de pós-tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig 8). No pós-tratamento de meia hora houve indução significativa da expressão dos genes CuZnSOD (4,46 vezes) e CAT (3,0 vezes), e após 2 horas os valores de expressão relativa foram de 2,0 e 2,14 vezes, respectivamente. Em quatro horas de pós-tratamento, o gene GPx1 mostrou ser induzido significativamente (2,9 vezes).

### *3.6 Efeito da rutina contra o estresse de RE induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.*

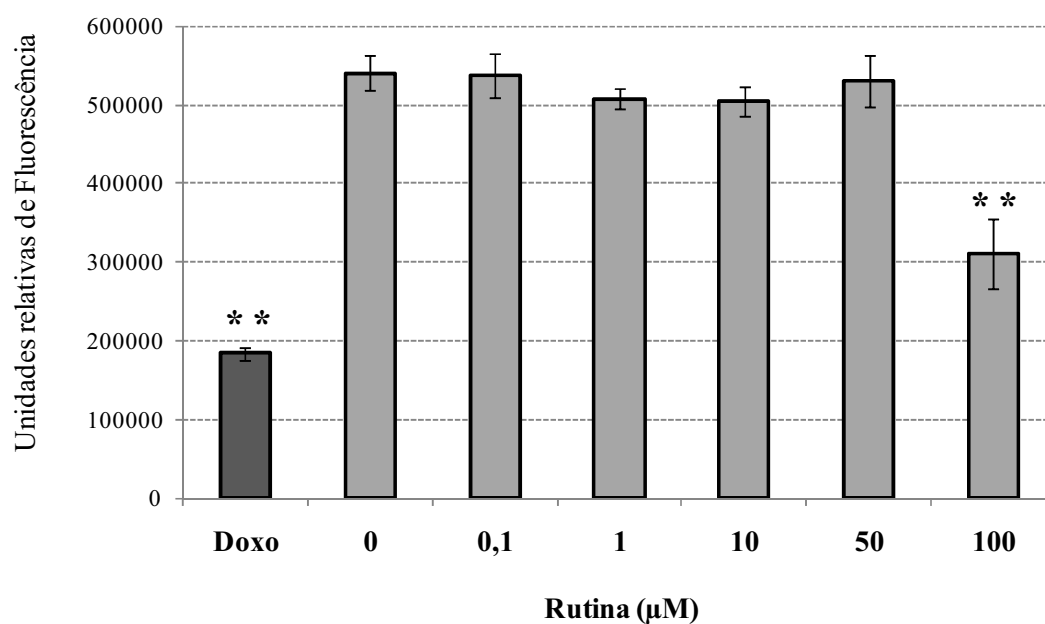
O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 min aumentou significativamente a expressão dos genes *HSPA5*, *ERN1*, *GADD153* em todos os tempos de pós-tratamentos (0; 30min; 2 e 4 h) indicando que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causou estresse no RE (Figura 9). No entanto, a pré-incubação com a

rutina (10  $\mu$ M-24 h) reduziu significativamente os níveis de expressão dos três genes analisados.

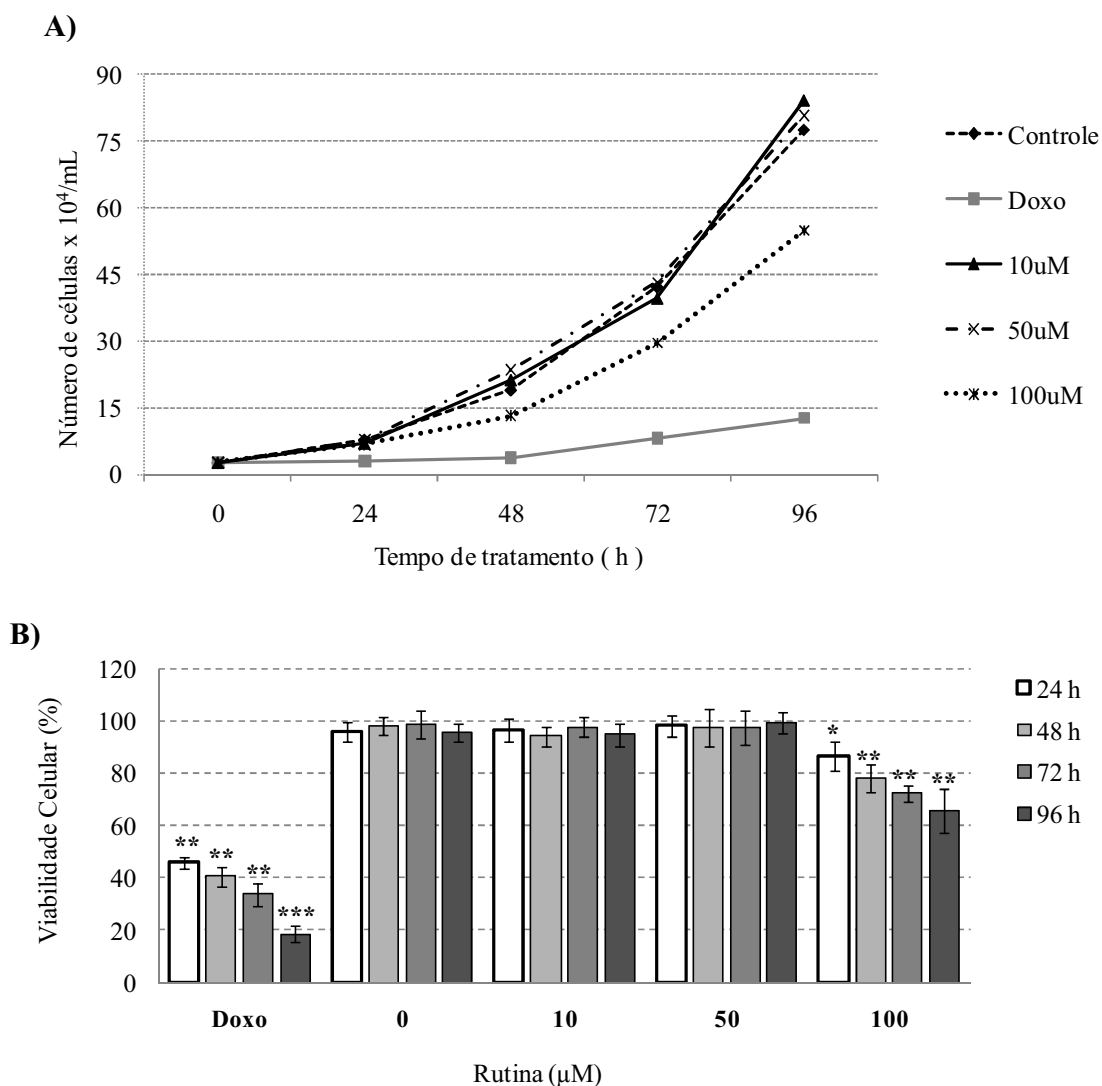
A rotina reprimiu a expressão do gene HSPA5 principalmente após 4h de pós-tratamentos, onde o valor de expressão foi reduzido em 2,0 vezes, atingindo valor próximo ao controle do experimento. Em zero e 2 h de pós-tratamentos a rotina diminuiu em 1,5 vezes a expressão do HSPA5 como mostra a Figura 9 A.

O tratamento com 10  $\mu$ M de rutina também reduziu a expressão do gene que atua na via de sinalização de proteínas mal dobradas ERN1 (Fig. 9B). Os valores mostram uma redução significativa na expressão em 30 min, 2 e 4h de pós-tratamentos.

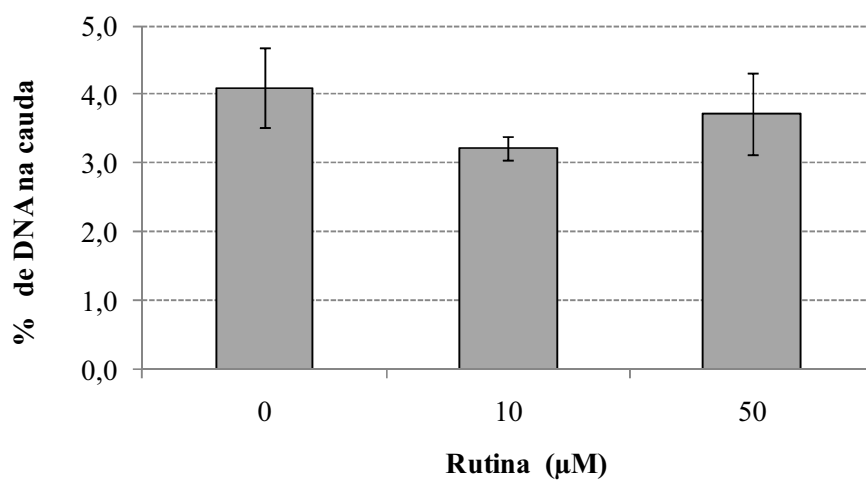
A diminuição da expressão dos genes HSPA5 e ERN1 induzidos pelo pré-tratamento com rutina também refletiu na expressão do gene GADD153 que codifica informação relacionada ao estresse de RE ativando a via apoptótica. Os dados indicam uma redução significativa de 1,5 vez na sua expressão do GADD153 em 2 e 4h de pós-tratamentos. Esta redução mostrou que o tratamento com rutina alcançou valores de expressão para o gene GADD153 próximos ao controle do experimento (Fig. 9C).



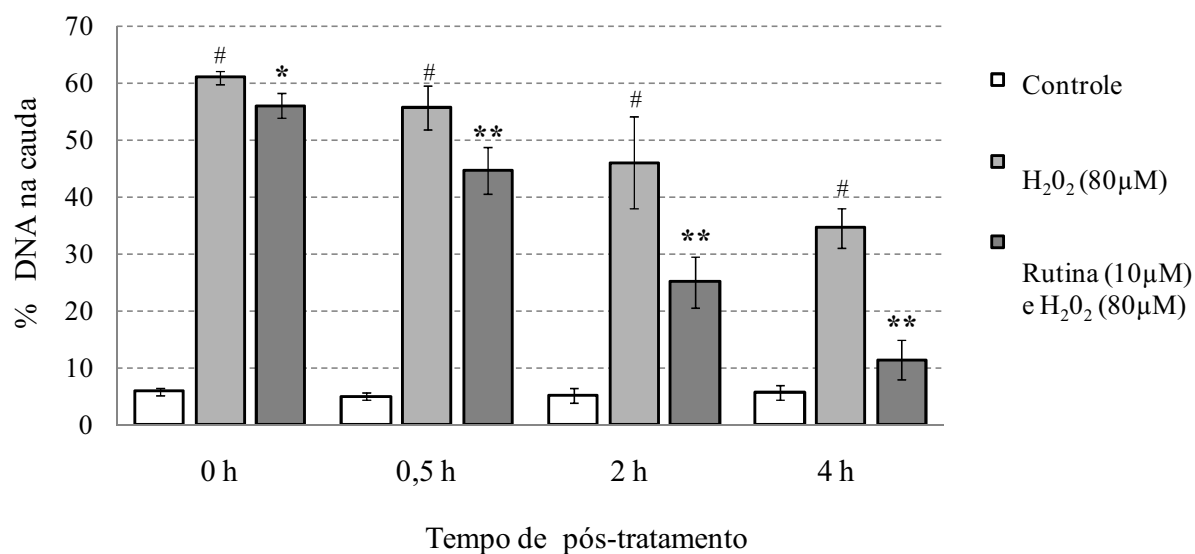
**Figura 1.** Efeito da rutina na citotoxicidade das células 786-O medidas pelo ensaio da resazurina. As barras representam a média das unidades relativas de fluorescência  $\pm$  desvio-padrão, obtidos após 24 h de tratamento com diferentes concentrações de rutina. Doxo = doxorubicina 0,9  $\mu$ M. \*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (\*\* $p < 0.01$ ; ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).



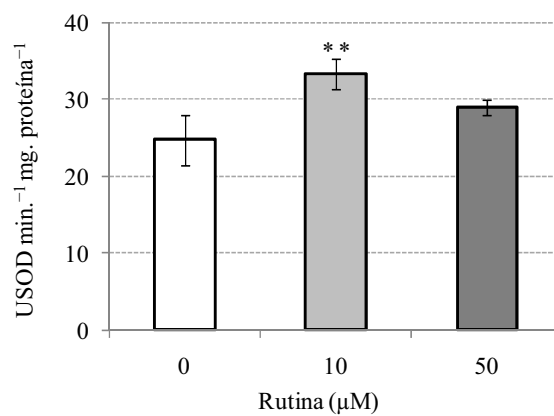
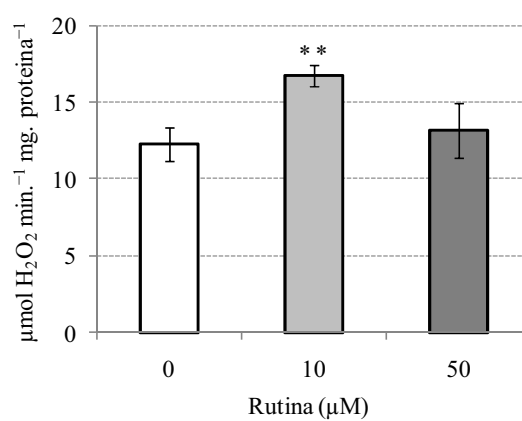
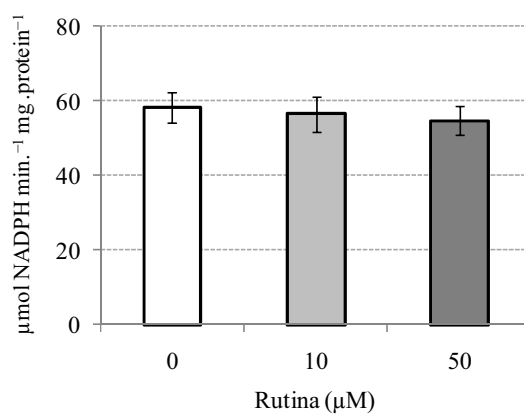
**Figura 2.** Efeito da rutina na proliferação (A) e viabilidade (B) das células 786-O. As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão obtidos após o tratamento com três concentrações de rutina (24, 48, 72 e 96 h). Doxo = doxorubicina 0,9  $\mu$ M. \*, \*\*, \*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).



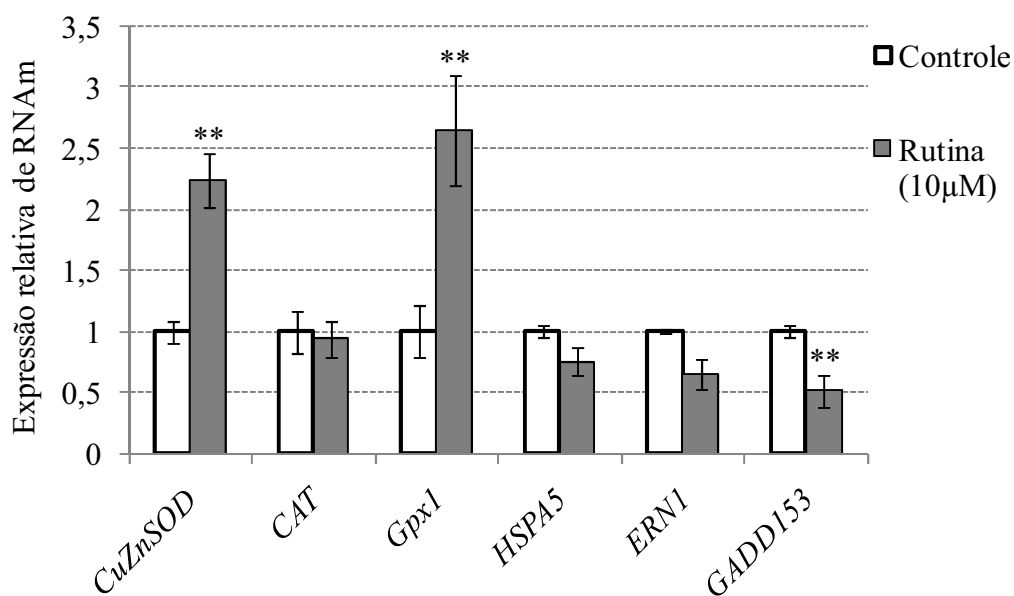
**Figura 3.** Porcentagem de DNA na cauda obtida no Ensaio do Cometa, realizado na linhagem 786-O tratadas com 10 e 50  $\mu\text{M}$  de rutina por 24 h. As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão. ( $p < 0.05$ , ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).



**Figura 4.** Porcentagem de DNA na cauda obtida no Ensaio do Cometa, realizado na linhagem 786-O pré-tratadas com 10 μM de rutina por 24 h e em seguida incubadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80 μM) por 30 min, em diferentes tempos de pós-tratamentos. As barras representam a média ± desvio-padrão. \*, \*\*Diferença estatisticamente significativa em relação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. # Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, # p < 0.001, ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

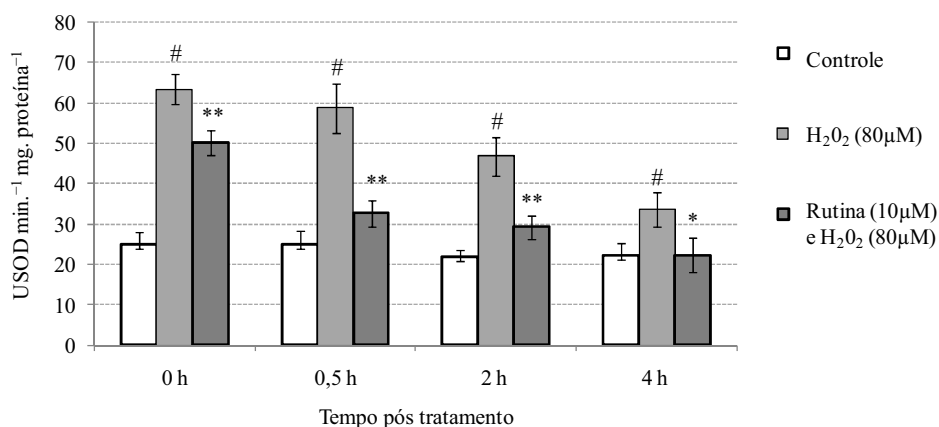
**a) SOD****b) Catalase****c) Gpx**

**Figura 5.** Efeito da rutina na atividade das enzimas antioxidantes das células 786-O. Atividade da SOD (a), CAT (b) e GPx (c). Os valores representam a média  $\pm$  desvio-padrão obtidos após o tratamento com duas concentrações de rutina por 24 h. \*\* Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (\*\* $p < 0.01$ , ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

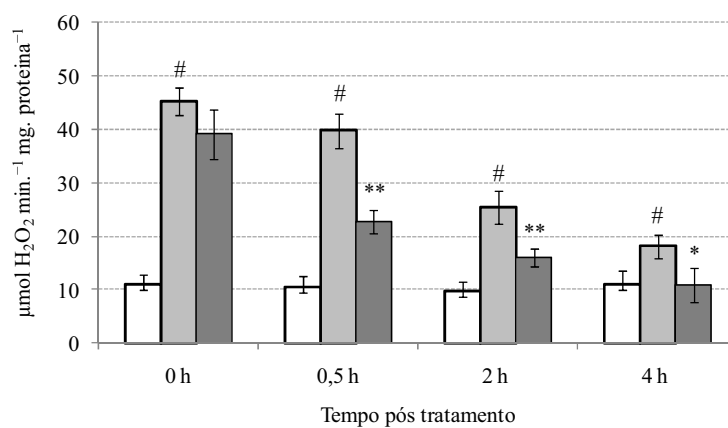


**Figura 6.** Efeito da rutina na expressão do RNAm da CuZnSOD, CAT, GPx1, HSPA5, ERN1 e GADD153 da células 786-O após 24 h de tratamento. As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão calculados pelo software REST<sup>©</sup> 2009, normalizados com o gene *GPDH*. \*\* Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (\*\* $p < 0.01$ )

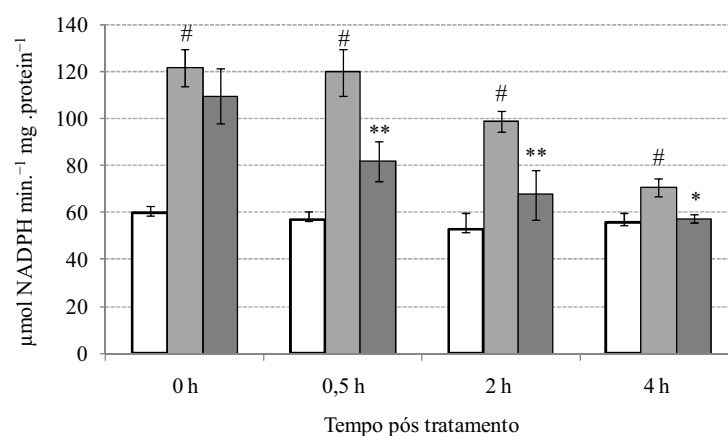
## a) SOD



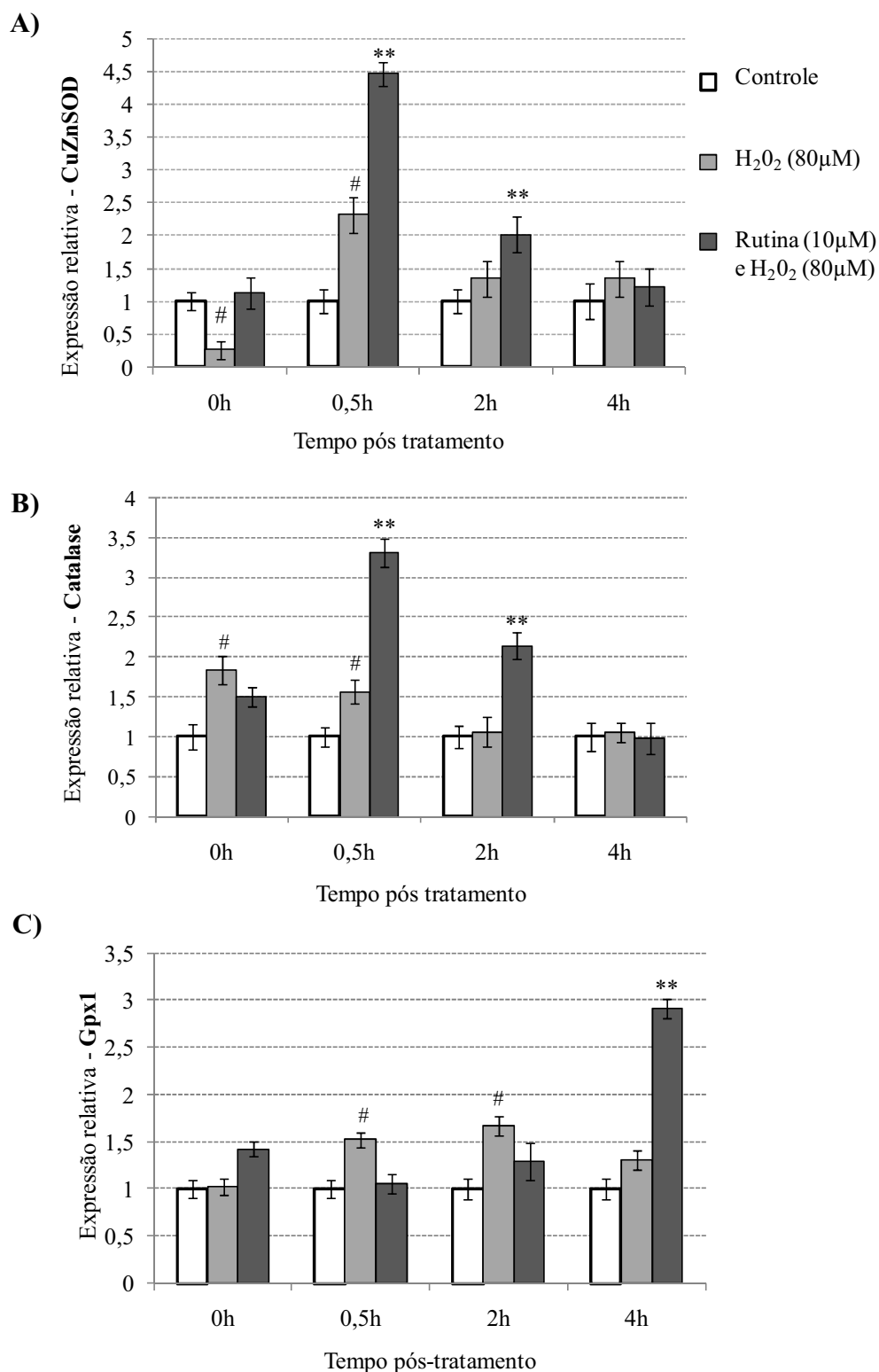
## b) Catalase



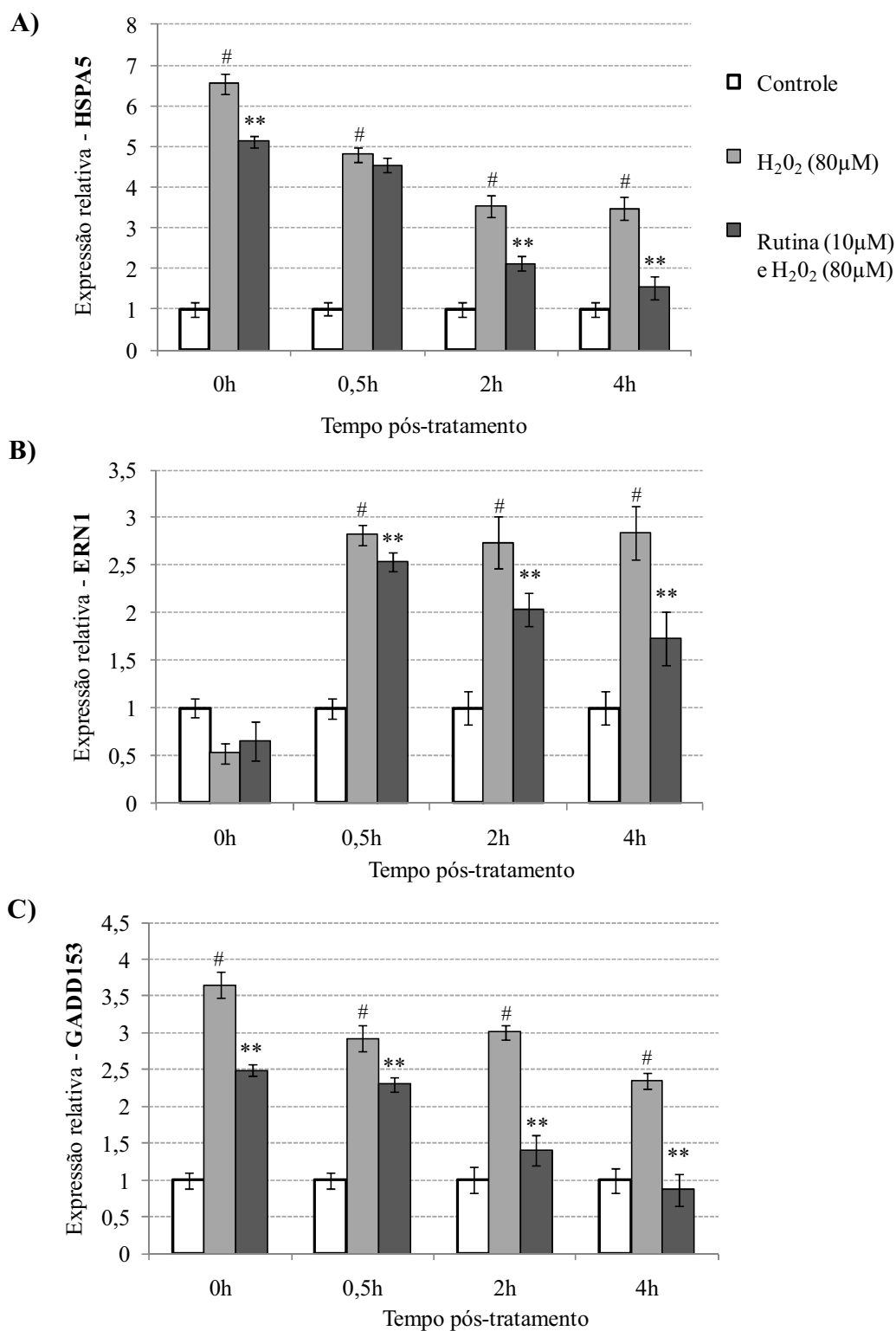
## c) Gpx



**Figura 7.** Efeito da rutina na atividade das enzimas antioxidantes SOD (a), Cat (b) e Gpx (c) das células 786-O pré-tratadas com 10 μM de rutina por 24 h e em seguida incubadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80 μM) por 30 min, em diferentes tempos de pós-tratamentos. As barras representam a média ± desvio-padrão. \*, \*\*Diferença estatisticamente significativa em relação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. # Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, # p < 0.001, ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).



**Figura 7.** Efeito da rutina na Expressão do RNAm da CuZnSOD (A), CAT (B) e GPx (C) das células 786-O pré-tratadas com 10 µM de rutina por 24 h e em seguida incubadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80 µM) por 30 min, em diferentes tempos de pós-tratamentos. As barras representam a média ± desvio-padrão obtidos pelo software REST<sup>®</sup>, normalizados com o gene GPDH. \*\*Diferença estatisticamente significativa em relação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. # Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. (\*\* e # p < 0.01).



**Figura 9.** Efeito da rutina na expressão do RNAm da HSPA5 (A), ERN1 (B), GADD153 (C) da células 786-O pré-tratadas com 10 μM de rutina por 24 h e em seguida incubadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80 μM) por 30 min, em diferentes tempos de pós-tratamentos. Os valores representam a média ± desvio-padrão calculados pelo software REST<sup>®</sup> 2009, normalizados com o gene *GPDH*. \*\*Diferença estatisticamente significativa em relação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. # Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. (\*\* e # p < 0.01).

#### 4. Discussão

A doença renal crônica é uma síndrome causada por um conjunto de enfermidades que têm em comum a redução progressiva da filtração glomerular. Na maioria dos casos o insulto inicial causa lesões que progridem com esclerose glomerular e fibrose intersticial, resultando em insuficiência renal crônica (Go et al., 2004). A aterosclerose é uma condição presente na maioria destes pacientes, muitas vezes, associada à própria gênese da doença renal, como hipertensão e diabetes. Além dos fatores de riscos tradicionais associados à doença renal crônica como hipertensão arterial, obesidade e tabagismo, são descritos outros fatores como inflamação, estresse oxidativo e estresse de RE (Aviram, 2011).

Pesquisas revelam que o estresse oxidativo exacerbado em diferentes fases da doença renal crônica provoca aumento nos níveis plasmáticos de peroxidação lipídica e redução na atividade das enzimas antioxidantes (Vaziri, 2004). Por outro lado, pesquisas relacionadas à prevenção dessa doença têm comprovado a influência positiva de uma dieta rica em vegetais, frutas e verduras (Bosetti et al., 2007).

Nesse contexto há um interesse considerável nos flavonóides como a rutina, presente em alimentos e bebidas de origem vegetal. Como um antioxidante natural, a rutina foi investigada para evitar o estresse oxidativo desencadeado por diferentes indutores, como relacionados ao enfarte do miocárdio em ratos causado por isoproterenol (Karthick e Prince, 2006); redução da taxa de lipogênese causado por ácido oléico em hepatócitos (Wu et al., 2011) e lesão testicular causada por cádmio em ratos (Abarikwu et al., 2013).

Apesar das pesquisas encontradas na literatura atual indicarem que a rutina apresenta função protetora contra o estresse oxidativo, os mecanismos subjacentes a sua proteção ainda não estão totalmente elucidados. Desse modo, pesquisas sobre a modulação celular e níveis de segurança são de grande importância.

O presente trabalho demonstrou que somente a concentração de 100 $\mu$ M de rutina apresentou efeito citotóxico sobre as células renais 786-O no ensaio de citotoxicidade após 24 h de tratamento. O mesmo tipo de efeito citotóxico foi evidenciado pelo ensaio de cinética de proliferação e viabilidade celular, onde a mesma concentração (100 $\mu$ M) reduziu significativamente a sobrevivência das células 786-O a partir de 24 horas de exposição. Em nossas condições experimentais o efeito citotóxico de 100 $\mu$ M de rutina pode estar relacionado à ação pró-oxidante e não ao antioxidante, uma vez que alguns flavonóides já foram relatados com esse efeito após tratamentos prolongados em concentrações elevadas (Ohshima et al., 1998; Galati et al., 2002). Dessa forma, os demais experimentos foram conduzidos utilizando as concentrações abaixo de 100  $\mu$ M.

Para garantir a confiabilidade dos resultados foi feito o ensaio do cometa após 24 horas de tratamento. Os resultados indicam a ausência de efeito genotóxico para 10 e 50  $\mu$ M de rutina nas células renais (786-O). Nossos resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura, os quais mostram que a rutina não causa danos primários no DNA *in vitro*, linhagens como: Caco-2 (Aherne e O'Brien, 1999); linfócitos (Ündeğer et al., 2004); HepG2 (Ramos et al., 2008), HTC (Marcarini et al., 2011) K562 (Rhouma et al., 2013), e *in vivo*: células da medula óssea de camundongos (Silva et al., 2002).

Outra evidência de que o tratamento com a rutina não foi capaz de causar dano genotóxico nas células é a diminuição significativa apresentada pelo gene GADD153. A repressão desse gene pode ser um demonstrativo que não houve indícios de qualquer estado de estresse genotóxico, visto que genes da família GADD (GADD34, GADD45 e GADD153) são induzidos por estresse genotóxico e sinais de parada do ciclo celular (Oyadomari e Mori, 2004).

O sistema enzimático antioxidante desempenha um importante papel na defesa celular contra insultos oxidativos e alguns flavonóides parecem exercer efeitos de antioxidantes

indiretos através da modulação desse sistema (Röhrdanz et al., 2002). Nesse trabalho, demonstramos que 10  $\mu\text{M}$  rutina aumenta em 35% a atividade das principais enzimas do sistema endógeno, a SOD e a catalase. A SOD é responsável por catalisar a dismutação do ânion radical superóxido e a catalase promove a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e  $\text{O}_2$ . Por mecanismos ainda desconhecidos, os valores de expressão relativa mostraram que o aumento da atividade enzimática não está relacionado com expressão desses genes, uma vez que a 10  $\mu\text{M}$  rutina induziu somente os transcritos gênicos CuZnSod e GPx1, enquanto o nível de expressão da catalase permaneceu próximo ao controle.

A regulação transcricional e indução de gene humano CuZnSOD apresenta dois elementos diferentes: elemento de resposta antioxidante (ARE) e elemento responsivo xenobióticos (XRE) (Park e Rho, 2002). Por outro lado, análise dos genes CAT e GPx1 revelou fatores de transcrição como NF kappa  $\beta$  e AP-1 que podem ser ativados em resposta ao estresse oxidativo em diversos tecidos (Zhou et al., 2001). Sendo assim, essas informações implicam que as enzimas antioxidantes podem ser induzidas transcricionalmente pelos fatores acima, em combinação com ou independente dos dois elementos reguladores.

Para determinar se o aumento na expressão gênica e a atividade das enzimas antioxidantes induzidas pela rutina protegem as células 786-O de danos oxidativos, as culturas foram pré-tratadas com 10  $\mu\text{M}$  de rutina e em seguida expostas ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para o tratamento envolvendo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as culturas analisadas apresentaram danos significativos no DNA nos quatro tempos de pós-tratamento, como também, foi possível verificar uma provável ação do mecanismo de reparo das células devido à redução dos danos ao DNA e da expressão do gene GADD153 durante as análises (0, 30min, 2 e 4 h). A atividade enzimática (SOD, CAT e GPx) também aumentou significativamente comparadas ao controle. Na expressão gênica o  $\text{H}_2\text{O}_2$  alterou somente a expressão da CnZnSOD e novamente não há uma relação direta com a atividade das enzimas como citado anteriormente. Em conjunto, estes resultados confirmam

que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> além de causar quebras no DNA respondeu como um oxidante eficiente nessas condições experimentais.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que 10µM de rutina apresentou efeito tempo-dependente devido à diminuição gradual dos danos causados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células 786-O, sendo que o maior índice de redução de danos foi de 80% após 4 horas de pós-tratamento. Esse efeito protetor pode estar relacionado com as enzimas antioxidantes, uma vez que a rutina em concentração fisiológica impediu o aumento da atividade da SOD, CAT e Gpx induzidas pelo estresse oxidativo. Além disso, os valores de expressão gênica indicam a indução dos RNAs da SOD e CAT em 30 min e 2 h de pós-tratamentos e do Gpx1 após 4h.

Aliá e colaboradores (2006) mostraram o mesmo efeito para a quercetina em células HepG2, no qual concentrações na faixa fisiológica (0,1-10 µM) evitou o aumento da atividade da SOD, CAT, GR e GPx induzida pelo estresse oxidativo causado por terc-butil-hidroperóxido. Os autores sugerem que a presença da quercetina pode preparar melhor o sistema de defesa antioxidante celular para enfrentar condições de estresse oxidativo. Dessa mesma forma, a rutina também poderia ser utilizada.

Recentemente, foi sugerido que o estresse oxidativo e o estresse de RE são eventos que estão intimamente ligados, no entanto, as vias moleculares destes processos são pouco conhecidas (Zhang, 2010; Bhandary et al., 2013). As vias sensoras de estresse no RE são reguladas por chaperonas HSPA5 que promovem o dobramento adequado de proteínas no RE de forma dependente de ATP. Sua provável função está ligada à formação de complexo multimérico (IRE1/ATF6/PERK) de proteínas dentro do RE, sob condições de estresse, protegendo as células contra a disfunção dessa organela (Dudek et al., 2009). O gene ERN1 (IRE1) codifica uma proteína cuja atividade quinase e endoribonuclease é importante para a resposta a sinais de estresse no RE, atuando como um sensor de proteína mal dobrada no

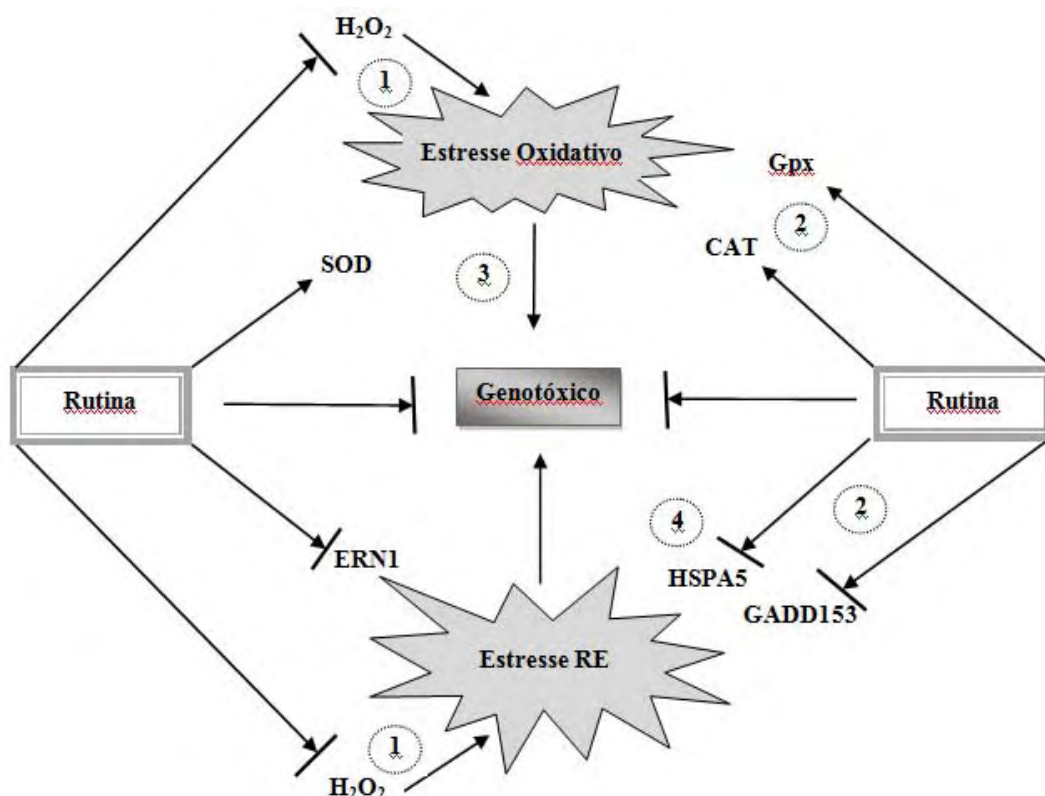
lúmen do RE. Caso o processo não seja reversível, o estresse no RE ativa a via de apoptose mediada pelo GADD153 (Schröder e Kohno, 2007).

Nesse estudo o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demonstrou induzir o estresse de RE, uma vez que a expressão dos genes HSPA5, ERN1 e GADD153 aumentou significativamente nos quatro tempos de pós-tratamento. Em nossas condições experimentais, a pré-incubação por 24h com 10 µM de rutina reduziu gradualmente os níveis dos transcritos gênicos HSPA5, ERN1 e GADD153, sendo que após 4 horas de pós-tratamento os níveis de expressão desses genes alcançaram valores próximos ao controle do experimento. Dessa forma, demonstramos que a rutina também exerce uma função protetora contra o estresse de RE nas células renais 786-O através da redução da expressão dos genes HSPA5, ERN1 e GADD153.

Outros estudos oferecem evidências adicionais da relação entre estresse de RE e o efeito protetor de substâncias naturais. Natsume e colaboradores (2009) investigaram o efeito da quercetina no estresse de RE induzidos por taspigargina, tunicamicina e brefeldina A em células epitélio intestinal Caco-2 e mostraram a versatilidade desse flavonóide em suprimir a indução da expressão dos genes HSPA5 e ERN1. Segundo os autores, a quercetina pode atuar inibindo processos inflamatórios desencadeados pela tensão no RE. Pesquisas realizadas por Takano et al (2007) em células β de insulínoma de camundongo (MIN6) identificaram um grupo de flavonóides, as metoxi-flavonas como potentes compostos na proteção contra o estresse de RE induzido por neurotoxinas. Os dados reforçam que a inibição da expressão de genes como HSPA5 e HO-1 (heme oxigenase 1) impedem a morte celular causado pelo estresse de RE.

Com base nas informações da literatura e os resultados atuais, propomos um modelo para o mecanismo de proteção da rutina contra estresse oxidativo e estresse de RE induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; o modelo está representado na Figura 10.

De maneira geral, os resultados do presente trabalho mostram-se coerentes com os da literatura sobre as propriedades antioxidantes da rutina. Além disso, a presença da rutina em concentração fisiológica pode preparar o sistema de defesa antioxidante das células renais para enfrentar situações de estresse oxidativo e de RE induzido por  $H_2O_2$ , prevenindo assim, doenças renais crônicas.



**Figura 10.** Mecanismo proposto de proteção da rutina em células renais 786-O. São quatro etapas para o processo: 1) O  $H_2O_2$  desencadeia o estresse; 2) Este evento leva a indução da atividade das enzimas antioxidantes e os marcadores de estresse de RE: 3) O estresse oxidativo leva ao dano genotóxico e 4) HSPA5, ERN1 ativa o gene GADD153 sinalizando danos no DNA. Rutina exerce sua proteção contra o estresse oxidativo e de RE induzido pelo  $H_2O_2$  através da diminuição das atividades das enzimas antioxidantes e aumenta da expressão dos genes CuZnSOD, CAT e GPx1. Além disso, a rutina protege as células 786-O suprimindo a expressão dos marcadores de RE: HSPA5 ERN1e GADD153.

## Referências

- ABARIKWU, S.O., ISERHIENRHIEN, B.O. BADEJO, T.A. Rutin- and Selenium-attenuated cadmium-induced testicular pathophysiology in rats. **Hum. Exp. Toxicol.** February, 2013.
- AHERNE, S.A., O'BRIEN, N.M Protection by the flavonoids myricetin, quercetin, and rutin against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and Hep G2 cells. **Nutr Cancer.** 34:160-6, 1999.
- ALÍA M., RAMOS S., MATEOS R., BRAVO L., GOYA L. Response of the Antioxidant Defense System to tert-Butyl Hydroperoxide and Hydrogen Peroxide in a Human Hepatoma Cell Line (HepG2). **J Biochem Mol. Tox.,** 19: 119- 129, 2005.
- ALÍA M., RAMOS S., MATEOS R., GRANADO-SERRANO A.B., BRAVO L., GOYA L. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. **Tox and App Pharm.** 212: 110 – 118, 2006.
- ARTS I. C.W., HOLLMAN P.C.H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **Am J Clin Nutr J.** 81, 2005
- BAUMANN, O., WALZ, B.B. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. **Int Rev Cytol.** 205:149-214, 2001
- BERANDINELLI, G. N. Análise de marcadores gênicos de estresse genotóxico em fibroblastos humanos normais e células de glioblastoma. Dissertação de mestrado do Depto de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da **Universidade de São Paulo**, 67p. 2011.
- BEUTLER, E. Red Cell Metabolism A manual of biochemical methods. New York: **Grune e Straton**, 1975.
- BHANDARY, B., MARAHATTA, A., KIM, R.K. CHAE, H.J. An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases. **Int J Mol Sci.** 14:434–456, 2013.
- BONETTI P.O, LERMAN L.O, LERMAN A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 23: 168-75, 2003.
- BRADFORD M. A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem** 72:248-254, 1976.
- BOSETTI C., ROSSI M., MCLAUGHLIN J.K., NEGRI E., TALAMINI R., LAGIOU P., MONTELLA M., RAMAZZOTTI V., FRANCESCHI S., LAVECCHIA C. Flavonoids and the risk of renal cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 16:98-101, 2007.
- CARLBERG, I., MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **J Biol Chem** 250:5475–5480, 1975.
- DING, W. Q.; VAUGHT, J. L.; YAMAUCHI, H.; LIND, S. E. Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid–induced cytotoxicity: The potential importance of down-

- regulation of superoxide dismutase 1 expression. **Molecular Cancer Therapy**. 9:1109-1117, 2004.
- DUDEK, J., BENEDIX, J., CAPPEL, S., GREINER, M., JALAL, C., MÜLLER, L., ZIMMERMANN, R. Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 66:1556-1569, 2009.
- GALATI, G., SABZEVARI, O., WILSON, J.X., O'BRIEN, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxy radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**. 177:91-104, 2002.
- GHIADONI, L., CUPISTI, A., HUANG, Y., MATTEI, P., CARDINAL, H., FAVILLA, S. Endothelial dysfunction and oxidative stress in chronic renal failure. **J Nephrol**. 17: 512-9, 2004.
- GO, A.S., CHERTOW, G.M., FAN, D., MCCULLOCH, C.E., HSU, CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. **N Engl J Med**. 351: 1296-305, 2004.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochem J**. 401(1):1-11, 2007.
- HOPKINS, J., TUDHOPE, G. R. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. **J Haematol**. 25: 563–57, 1973.
- JANBAZ, K.H., SAEED, S.A. GILANI, A.H. Protective effect of rutin on paracetamol-and CCl4-induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**. 73: 557–563, 2002.
- KARTHICK M., PRINCE P. Preventive effect of rutin, a bioflavonoid, on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **J. Pharmacy and Pharmacology**. 58: 701–707, 2006.
- KIM, I., XU, W., REED, J.C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nat Rev Drug Discov**. 12:1013-30, 2008.
- LIAO J.K, BETTMANN M.A, SANDOR T, TUCKER J.I, COLEMAN S.M, CREAGER M.A. Differential impairment of vasodilator responsiveness of peripheral resistance and conduit vessels in humans with atherosclerosis. **Circ Res**. 68:1027-34, 1991.
- MARCARINI J.C, TSUBOY M.S.F, LUIZ R.C, RIBEIRO L.R, HOFFMANN-CAMPO C.B, MANTOVANI M.S. Investigation of cytotoxic apoptosis-inducing genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. **Exp Patol Tox** 63:459-465, 2011.
- MCCORD J.M., FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Biol Chem**. 244: 6049 – 6055, 1969.
- MCMILLIAN, M.K., LI, L., JPARKER, .B., PATEL, L. ZHONG, Z., GUNNETT, J.W., POWERS, W.J. JOHNSON, M.D. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. **Cell Biology and Toxicology**. 13: 157-173, 2002.

- MIRANI, N., ASHRAF, N.J., SIDDIQUE, J., RUB, A. Protective effect of rutin against cadmium induced hepatotoxicity in Swiss albino mice. **J Pharmacol Toxicol.** 7:150–157, 2012.
- NATSUME, Y., ITO, S., SATSU, H., SHIMIZU, M. Protective effect of quercetin on ER stress caused by calcium dynamics dysregulation in intestinal epithelial cells. **Toxicology.** 258: 164–175, 2009.
- OHSHIMA, H., YOSHIE, Y., AURIO, L.S, GILIBERT, I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxy nitrite and nitroxyl anion. *Free Radic Biol Med.* 25:1057-65, 1998.
- OYADOMARI S, MORI M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. **Cell Death Differ.** 11:381-90, 2004.
- PARK, E.Y., RHO, H.M. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzop-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. **Mol. Cell. Biochem.** 240, 47–55, 2002.
- PROCHÁZKOVÁ D, BOUŠOVÁ I, WILHELMOVÁ N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia.** 82:513-23; 2011.
- RAMOS, A. A., LIMA, C.F., PEREIRA, M.L. FERNANDES-FERREIRA, M., PEREIRA-WILSON, C. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. **Toxicology Letters.** 177: 66-73, 2008.
- RHOUMA, G., CHEBIL, L., MUSTAPHA, N., KRIFA, M., GHEDIRA, K., GHOUL, M., CHÉKIR-GHÉDIRA, L. Cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potencies of oligorutins. **Hum Exp Toxicol.** Feb. 2013.
- SABLINA, A. A.; BUDANOV, A. V.; IIYINKAYA, G. V.; AGAPOVA, L. S.; KRAVCHENKO, J. E.; CHUMAKOV, P. M. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. **Natural Medicine.** 11:1306–1313, 2005.
- SCHRÖDER M., KOHNO, K. Recent Advances in Understanding the Unfolded Protein Response. **Antiox. Redox Signaling.** 9:2241-2244. 2007
- SILVA, J., HERMANN, S.M., HEUSER, W., MARRONI, N., GONZÁLEZ-GALLEGO, J., ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food Chem Toxic.** 40:941-947, 2002.
- SUGAYA, S., NAKANISHI, H., TANZAWA, H., SUGITA, K., KITA, K., SUZUKI, N. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. **Mutation Research.** 578: 327–332, 2005.
- SUN, X.; LI, B.; LI, X.; WANG, Y.; XU, Y.; JIN, Y.;PIAO, F.;SUN, G. Effects of sodium arsenite on catalase activity, gene and protein expression in HaCaT cells. **Toxicology in Vitro.** 20:1139–1144, 2006.

- TAKANO K, TABATA Y, KITAO Y, MURAKAMI R, SUZUKI H, YAMADA M, IINUMA M, YONEDA Y, OGAWA S, Hori O. Methoxyflavones protect cells against endoplasmic reticulum stress and neurotoxin. **Am J Physiol Cell Physiol.** 292:C353-61, 2007.
- TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C, SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 35: 206-221, 2000.
- UNDEĞER U, AYDIN S, BAŞARAN AA, BAŞARAN N. The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage. **Toxicol Lett.** 151:143-9, 2004.
- van Dam RM, NAIDOO N, LANDBERG R. Dietary flavonoids and the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases: review of recent findings. **Curr Opin Lipidol.** 1:25-33, 2013.
- VAZIRI, N.D. Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. **Semin Nephrol.** 24:469-73, 2004.
- VOGIATZI, G., TOUSOULIS, D., STEFANADIS D. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Hellenic J Cardiol.** 50: 402-409, 2009.
- WATERS, M.D., BRADY, A.L., STACK, H.F., BROCKMAN, H.E. Antimutagenic profiles for some model compounds. **Mutation Research.** 238: 57-85, 1990.
- WU, C.H., LIN, M.C., WANG, H.C., YANG M.Y., JOU, M.J., WANG, C.J. Rutin Inhibits Oleic Acid Induced Lipid Accumulation via Reducing Lipogenesis and Oxidative Stress in Hepatocarcinoma Cells. **J. of Food Science.** 76:223-265, 2011.
- ZHANG, K. Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. **Int J Clin Exp Med.** 3:33-40. 2010.
- ZHOU, L.Z., JOHNSON, A.P., RANDO, T.A. NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. **Free Radical Biol. Med.** 31, 1405-1416. 2001.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Nos últimos anos, o objetivo de várias pesquisas tem sido analisar e comprovar as consequências do estresse oxidativo na etiologia da várias doenças crônicas e degenerativas. Com os avanços principalmente na área de Nutrigenômica, que tem como foco elucidar a interação gene-nutriente, uma vez que a dieta influencia diretamente na expressão gênica, a terapia com antioxidantes naturais representa uma via promissora na prevenção do desenvolvimento de muitas doenças. Nesse contexto, destacam-se os flavonóides que são substâncias naturais com potente ação antioxidante. Dentro da classe dos flavonóides, a rutina é extensamente encontrada na natureza, principalmente em frutas e grãos vegetais.

Para garantir o uso seguro de antioxidantes naturais como a rutina, pesquisas são necessárias para que esses compostos possam ser recomendados oficialmente como uma terapia adjuvante. Dessa forma, é importante salientar que o desempenho de antioxidantes depende de fatores como: tipos de radicais livres formados, onde e como são gerados esses radicais; análise e métodos para a identificação dos danos, e concentrações ideais para obter a proteção. Além disso, também é possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção em outro, ou agindo como um pró-oxidante aumentando as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos.

Os resultados do presente trabalho buscam contribuir para o entendimento desses resultados controversos. Para isso foram utilizadas quatro diferentes linhagens celulares (HTC; HepG2, HT-29 e 786-O) e selecionadas quatro concentrações de rutina próximas aos valores fisiológicos (0,1; 1; 10; 50  $\mu\text{M}$ ) e concentrações acima desses valores (100, 270 e 810  $\mu\text{M}$ ). A Tabela 5, a seguir, resume todos os resultados significativos encontrados nos experimentos realizados:

**Tabela 5.** Resumo dos resultados obtidos com a rutina em quatro linhagens celulares.

Linhagem celular	Resultados finais
<b>HTC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nenhuma concentração avaliada (10, 30, 90, 270 e 810 <math>\mu</math>M) foi citotóxica após 20h de tratamento;</li> <li>- A concentração de 810 <math>\mu</math>M foi genotóxica em consequência das lesões oxidativas após 20h de tratamento;</li> <li>- A expressão dos genes <i>p38 MAP kinase</i> e <i>GSTa2</i> não foi alterada significativamente após 12h de tratamento com 810 <math>\mu</math>M;</li> <li>- A análise do perfil metabólico por RMN <math>H^1</math> das células expostas à 810<math>\mu</math>M mostrou menores níveis de fosfocolina, glicerofosfocolina, creatina, lactato, acetato e glutatona.</li> </ul>
<b>HepG2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Das cinco concentrações avaliadas (0,1; 1; 10; 50 e 100 <math>\mu</math>M) somente 100 <math>\mu</math>M foi citotóxica a partir 48 h de tratamento reduzindo o crescimento e viabilidade das células;</li> <li>- O tratamento por 12h com 10 <math>\mu</math>M provocou uma redução e 100 <math>\mu</math>M induziu significativamente os níveis de RNAm da <i>CuZnSOD</i>;</li> <li>- O tratamento por 24 horas com 10 <math>\mu</math>M aumentou a expressão do RNAm da <i>CuZnSOD</i>, <i>CAT</i>, <i>GPx1</i> e <i>Gr</i> e 100 <math>\mu</math>M diminuiu significativamente os níveis de RNAm da <i>CuZnSOD</i>;</li> <li>- 100 <math>\mu</math>M induziu significativamente a expressão do gene <i>CYP1A1</i> após 12 e 24 h;</li> <li>- A atividade das enzimas SOD e CAT aumentou significativamente após 16 e 20h com 10 <math>\mu</math>M;</li> <li>- A atividade da CAT diminuiu a partir de 20 h e a GPx diminuiu após 24 h de tratamento com 100 <math>\mu</math>M;</li> </ul>
<b>HT-29</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Das cinco concentrações avaliadas (0,1; 1; 10; 50 e 100 <math>\mu</math>M) somente 100 <math>\mu</math>M foi citotóxica a partir 48 h de tratamento reduzindo o crescimento e viabilidade das células;</li> <li>- No tratamento por 12h: 10 <math>\mu</math>M provocou um aumento do RNAm da Gpx1 após 12 e 24 h, e 100 <math>\mu</math>M induziu a expressão do RNAm da Gr;</li> <li>- No tratamento por 24h: 10 <math>\mu</math>M aumentou a expressão do RNAm da CuZnSOD, CAT, GPx1 e Gr, e 100 <math>\mu</math>M diminuiu os níveis de expressão do RNAm da CuZnSOD e da CAT;</li> <li>- 100 <math>\mu</math>M induziu significativamente a expressão do gene <i>CYP1A1</i> após 12 e 24 h;</li> <li>- A atividade das enzimas SOD e Gpx aumentou significativamente após 16 h com 10 <math>\mu</math>M;</li> <li>- A atividade da SOD diminuiu em 20 e 28h e a CAT diminuiu após 24 h de tratamento com 100<math>\mu</math>M.</li> </ul>
<b>786-O</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- As concentrações de 0,1; 1; 10 e 50 <math>\mu</math>M não foram citotóxicas após 24h de tratamento;</li> <li>- A concentração de 100 <math>\mu</math>M foi citotóxica a partir 24 h de tratamento reduzindo o crescimento e viabilidade das células;</li> <li>- As concentrações de 10 e 50 <math>\mu</math>M não foram genotóxicas após 24 h de tratamento;</li> <li>- 10 <math>\mu</math>M aumentou significativamente a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em 35%, induziu a expressão relativa dos RNAs da CuZnSOD e GPx, e reprimiu a expressão do gene GADD153 ligado a via de resposta ao estresse de retículo endoplasmático.</li> <li>- 10 <math>\mu</math>M reduziu em 80% os danos causados ao DNA pelo pós-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80 <math>\mu</math>M); diminuiu na atividade das enzimas SOD, CAT e Gpx após 30 min, e induziu da expressão dos genes CuZnSOD e CAT após 2h de pós-tratamento;</li> <li>- 10 <math>\mu</math>M também reduziu gradualmente os níveis dos transcritos gênicos HSPA5, ERN1 e GADD153 nos quatro tempos analisados de pós-tratamento (0, 30min, 2 e 4 h).</li> </ul>

De modo geral, os resultados mostram que apesar de concentrações elevadas como 810  $\mu\text{M}$  não apresentarem efeitos citotóxicos, podem causar danos ao material genético como observado nas células HTC tratadas como rotina. Embora, esses danos sejam primários e passíveis de reparo, a análise do perfil metabólico por RMN  $^1\text{H}$  das células HTC exposta à concentração genotóxica da rutina (810 $\mu\text{M}$ ) revelou menores níveis de metabólitos que são essenciais e estão presentes nas principais vias biossintéticas, dessa forma, essas alterações poderiam prejudicar a metabolismo celular em longo prazo.

Outro ponto importante que foi observado é em relação à concentração de 100  $\mu\text{M}$  de rutina que foi citotóxica para as três linhagens celulares humanas estudadas (HepG2, HT-29 e 786-O), porém a citotoxicidade da rutina foi mais evidente na linhagem de carcinoma renal 786-O, na qual a citotoxicidade de aproximadamente 40% é evidenciada após 24 horas de exposição, enquanto que nas linhagens, hepatoma (HepG2) e adenocarcinoma (HT-29) o efeito foi observado somente após 48 horas de tratamento. Os demais experimentos também revelaram que 100  $\mu\text{M}$  de rutina causou danos as células Hepg2 e HT-29 modificando os estado redox, pois diminuiu significativamente os níveis de RNAm da *CuZnSOD* e reduziu as atividades da CAT a partir de 20 h e da GPx após 24 h de tratamento.

Por outro lado, a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de rutina não causou dano significativo nas quatro linhagens em estudo, como também protegeu as células dos danos causados pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  ao DNA. Os resultados indicam que 10  $\mu\text{M}$  de rutina pode atuar como um antioxidante indireto mesmo na ausência de qualquer substância indutora de EROs, ou em casos de estresse oxidativo e de retículo endoplasmático induzidos por  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Conjuntamente, os resultados do presente trabalho mostram-se coerentes com os da literatura sobre as propriedades antioxidantes da rutina. Além disso, sugere-se que a presença da rutina em concentração fisiológica pode preparar o sistema de defesa antioxidante e conseqüentemente, atuar impedindo ou retardando o estresse oxidativo celular.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ACKER, S.A.B.E.V.; BERG, D.J.V.B.; TROMP, M.N.J.L.; GRIFFIOEN, D.H.; BENNEKOM, W.P.V.; VIJGH, W.J.V.D.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology Medicine**. v.20, p.331-342, 1996.

ACQUAVIVA R, IAUK L, SORRENTI V, LANTERI R, SANTANGELO R, LICATA A, LICATA F, VANELLA A, MALAGUARNERA M, RAGUSA S, DI GIACOMO C. Oxidative profile in patients with colon cancer: effects of *Ruta chalepensis* L. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**. v. 15:181-91, 2011.

AFANAS'E,V.I.B. Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators. **Bioch Pharmal**. v.62, p. 743-746, 2001.

AHERNE, S. O'BRIEN, N. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**. v.18, p. 75-81, 2002.

ALEXANDROV, K, ROJAS M, SATARUG S. The critical DNA damage by benzo(a) pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation. **Toxicol Lett**. v.15, 198, p. 63-8, 2010.

ALÍA M.; MATEOS R.; RAMOS S.; LECUMBERRI E.; BRAVO, L.; GOYA, L. Influence of quercetin and rutin on growth and the antioxidant defense system in a human hepatoma cell line (HepG2). **Eur J Nutr**. v.45, p.19–28, 2006.

AMIC, D., D. DAVIDOVIC-AMIC, D. BESLO AND N. TRINAJSTIC. Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. **Croatia Chem. Acta**. v.76, p.55-61, 2003.

ANTELMANN, H.; HELMANN, J.D. Thiol-based redox switches and gene regulation. **Antioxidant Redox Signaling**, v.14, p. 1049–1063, 2011.

ARTS I. C.W., HOLLMAN P.C.H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **Am J Clin Nutr J**. v.81, 2005.

BARBATO, D., TOMEI ,F., SANCINI, A., MORABITO. G, SERAFINI M. Effect of plant foods and beverages on plasma non-enzymatic antioxidant capacity in human subjects: a meta-analysis. **Nutrition**. v.14, p. 1-13, 2013.

BASU, A., BETTS, N.M., MULUGETA A., TONG C., NEWMAN E., LYONS TJ. Green tea supplementation increases glutathione and plasma antioxidant capacity in adults with the metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v.33, p. 180-7, 2013.

BAUMGERTEL, A.; BOTSARIS, A.S. VAN. T.I. Purification and characterization of a flavonol heterodisaccharidase from the dried herb of *Fagopyrum esculentum*. **Phytochemistry**. v.64, n.2, p.411-418. 2003.

BEECHER G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **Journal of the Nutrition**. v.133, p.3248S-54S, 2003.

BENZIE IF. Evolution of antioxidant defence mechanisms. **European Journal of Nutrition**. v.39, p.53-61, 2000.

BEUTLER E. Red Cell Metabolism A manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton, 1975.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonóides and isoflavonoids. **Pharmacology. Therapeutics.**, v. 90, p. 157-177, 2001.

BLOKHINA, O., VIROLAINEN, FAGERSTED, K. V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. **Annals of Botanic**. v.89, p. 179-194, 2003.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods Enzymology**. v.186, p. 343-355, 1990.

BRADFORD, M. A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem** 72:248-254, 1976.

BRAVO, L. Poliphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**. v. 56, p. 317-333, 1998.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol.**, v.25. n.2, p.169-93, 2000.

CARLBERG I, MANNERVIK B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **J Biol Chem** 250:5475–5480, 1975.

CASCORBI, I. Genetic basis of toxic reactions to drugs and chemicals. **Toxicology Letters**, v.162, p. 16-28, 2006.

CERIELLO A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. Review. **Diabetes Care**. v.31, p.181-4, 2008.

CONFORTI, N.D.T. Suscetibilidade Genética ao Câncer. In: Ferreira, C.G.; Rocha, J.C.(org.) Oncologia Molecular .São Paulo: Editora Atheneu, 295-305, 2004.

CHATTERJEE, M., SALUJA, R., KANNEGANTI, S. Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. **Cell and Molecular Biology**. v. 53, p. 84-93, 2012.

CHEN AY, CHEN YC. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. **Food Chemistry**. v.15, 2099-107, 2013.

CHEN S. S. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.59, p-113-122, 2004.

CHEN, A.Y., CHEN, Y.C., A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. **Food Chem.** v.138, p.2099-107, 2013.

COHEN MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann Intern Med.** v.111, p.918-31989, 1989.

CONNAY, A.H., Enzyme induction and dietary chemicals as approaches to cancer chemoprevention: the Seventh DeWitt S. Goodman Lecture. **Cancer Res.** v.63, p. 7005–7031, 2003.

CZAPLIŃSKA M, CZEPAS J, GWOŹDZIŃSKI K. Structure, antioxidative and anticancer properties of flavonoids. **Postepy Biochemii.** v.58, p. 235-44, 2012.

DESCHNER, J.; RUPERTO, G.; WONG, H.L Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis.* v.12, n.7 p. 1193-1196, 1991.

DI CARLO G, MASCOLO N, IZZO AA, CAPASSO F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences.* v. 65, p.:337-53, 1999.

DINI, L. Apoptosis induction in DU-145 human prostate carcinoma cells. **Tissue Cell,** v. 37, p. 379–384; 2005.

DROGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Society Physiological Reviews.** , v.82, 47-95, 2002.

DUDEK, J., BENEDIX, J., CAPPEL, S., GREINER, M., JALAL, C., MÜLLER, L., ZIMMERMANN, R. Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. **Cellular and Molecular Life Sciences.** 66:1556-1569, 2009.

DURACKOVA, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research.** v. 59, p. 459-469. 2010.

EISENBRAND G, POOL-ZOBEL B, BAKER V, BALLS M, BLAAUBOER BJ, BOOBIS A, CARERE A, KEVEKORDES S, LHUGUENOT J-C, PIETERS R, KLEINER J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology,** 40: 193-236, 2002.

FANG Y.Z, YANG S, W.U.G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition.** v.18, p. 872-9, 2002.

FORMAN MS, LEE VM, TROJANOWSKI JQ. 'Unfolding' pathways in neurodegenerative disease. **Trends Neuroscience.** V.16, p. 407-10, 2003.

GALLATI, E.M. HEINEN, E. SAEED, S.A. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica*. Mill, fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* v.51, p.4903-4908, 2003.

GALLEANO M, VERSTRAETEN SV, OTEIZA PI, FRAGA CG. Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Arch Biochem Biophys.* v.501, p. 23-30, 2010.

GAO, Z., XU, H., HUANG, K. Effects of rutin supplementation on antioxidant status and iron, copper, and zinc contents in mouse liver and brain. **Biol Trace Elem Res.** v.88, p. 271-9, 2002.

GHARRAS, H. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology** v. 44, p. 2512–2518, 2009.

GONG G, QIN Y, HUANG W, ZHOU S, YANG X, LI D. Rutin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis through regulating reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction pathway in human umbilical vein endothelial cells. **Eur J Pharmacol.** v.628, p. 27-35, 2010.

GROOT H, RAUEN U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. **Clin Pharmacol.** V.12, p. 249-55. 1998.

Guengerich, F.P., Shimada, T., 1991. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. **Chem. Res. Toxicol.** 4, 391–407.

GUTTERIDGE, M. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. **Chemico-Biological Interactions.** V.91, p. 133-140, 1994.

HADZIABDIĆ, M.O., BOZIKOV, V., PAVIĆ, E., ROMIĆ Z. The antioxidative protecting role of the Mediterranean diet. **Coll Antropol,** v. 36, p. 1427-34, 2012.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochem J.** v.52, p. 4011-11, 2007.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press, 2007.

HANNEKEN A, LIN FF, JOHNSON J, MAHER P. Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v. 24, p. 3164-77, 2006.

HENRIQUES, A.T. Alcalóides, generalidades e aspectos básicos. In: Simões C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 1ª ed., Porto Alegre: Florianópolis. P.641-655. 1999.

HODEK, P., TREFIL, P., STIBOROVA, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chem. Biol. Interact.** v.21, p.139, 1–21, 2002.

HOENSCH H, OERTEL R. Anti-inflammatory effects of tea-flavonoids. **Dtsch Med Wochenschr.** V.137, p. 2738-40, 2012.

HOLLMAN, P. C.; VAN TRIPP, J.; BUYSMAN, M. N.; VAN DER GAAG, M. S.; MENGELERS, M. B., Relative Bioavailability of the flavonóide quercetin from various foods in man. **Federation of European Biochemical Societies letters.** v. 418, p. 152-156, 1995.

HOLLMAN. P.C.H.; HERTOOG, M.G.L.; KATAN, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*. v.57, p.43-46, 1996.

HULSMANS M, HOLVOET P. The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v.14, p. 70-8, 2010.

JANBAZ A, SHEIKH A, SAEEDB AH. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**. v.73, p.557–563, 2002.

KAMIYAMA M, SHIBAMOTO T. Flavonoids with potent antioxidant activity found in young green barley leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 27, p. 6260-7. 2012.

KEEN, C. L. Chocolate: Food as Medicine/Medicine as Food. **Journal of the American College of Nutrition**, v.20, p.436-439, 2001.

KEEN, C. L.; HOLT, R.R.; OTEIZA, P. I.; FRAGA, G.; SCHMITZ, H. H. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.1, p.298-303, 2005.

KHAN MM, AHMAD A, ISHRAT T, KHUWAJA G, SRIVASTAWA P, KHAN MB, RAZA SS, JAVED H, VAIBHAV K, KHAN A, ISLAM F. Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. **Brain Res**. v.1292, p.123-35, 2009.

KIM, G.N.; JANG, H.D. Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on HO<sub>2</sub>-induced oxidative stress in HepG2 cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**.

KIM, I., XU, W., REED, J.C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nat Rev Drug Discov**. 12:1013-30, 2008

LE BELLE NG, HARRIS SR, WILLIAMS KK, BHAKOO. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution 1H NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 2002;15:37-44.

LIEN, A.I., PHAM-HUY, HUA. HE, CHUONG, PHAM-HUYC. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **International Journal of Biomedical Science**.v.15, p. 89-96, 2008.

LIMA LRP, OLIVEIRA TT, OLIVEIRA MGA, NAGEM TJ, PINTO ASP, GOMES SM. Determinação da atividade de lipase na presença de Morina, Naringenina, Naringina e Rutina. *Cienc Agrotec Lavras*. v. 23, p. 626-631 ,1999.

LUNDBERG P, VOGEL T, MALUSEK A, LUNDQUIST PO, COHEN L, Dahlqvist O MDL The Magnetic Resonance Metabolomics Database (mdlimvliuse) ESMRMB, 2005.

MANACH, C.; MORAND, C.; DEMIGNE, C.; TESIER, O.; REGERAT, F.; REMESY, C., Bioavailability of rutin and quercetin in rats. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 409, p. 12-16, 1997.

MARCARINI J.C, TSUBOY M.S.F, LUIZ R.C, RIBEIRO L.R, HOFFMANN-CAMPO C.B, MANTOVANI M.S. Investigation of cytotoxic apoptosis-inducing genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. **Exp Patol Tox.** v.63, p. 459-465, 2011.

MARCINIAK SJ, YUN CY, OYADOMARI S, NOVOA I, ZHANG Y, JUNGREIS R, NAGATA K, HARDING HP, RON D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. **Genes Dev.** V.15, p.3066-77, 2004.

MATSURA, R. SIAED, J. MORAS. P. Chemical characterization and biological effects of *Petasites japonicas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v.48, p.1245-1251, 2002.

MCCORD J.M., FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Biol Chem.** 244: 6049 – 6055, 1969.

MCMILLIAN, M.K., LI, L., JPARKER, .B., PATEL, L. ZHONG, Z., GUNNETT, J.W., POWERS, W.J. JOHNSON, M.D. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. **Cell Biology and Toxicology.** v.13, p.157-173, 2002.

MILDE, J., ELSTNER E.F., GRASSMANN, J. Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, gamma-terpinene, and ascorbic acid. **Phytomedicine.** v.11, p 105-13, 2004.

MILLER A.L. Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. **Alt Med Ver.** V.1, p. 103-11. 1996

MOON YJ, WANG X, MORRIS ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicol In Vitro.** V.20, p.187-210, 2006.

MUNTNER P, H.E J., ASTOR B.C., FOLSOM A.R., CORESH J. Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. **Journal of the American Society of Nephrology.** v.16, p. 529-38, 2005.

MURSU, J.; VOUTILAINEN, S.; NURMI, T.; RISSANEN, T. H.; VIRTANEN, J. K.; KAIKKONEN, J.; NYSSONEN, K.; SALONEN. J.T. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. **Free Radical Biology & Medicine.** v.37, p.1351-1359, 2004.

OSBURN, W.O.; KENSLER, T.W. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults, **Mutation Research,** v. 659 p. 31–39, 2008.

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis, Dordrecht.** 12: 913-922, 2007.

PANCHAL SK, POUDYAL H, ARUMUGAM TV, BROWN L. Rutin attenuates metabolic changes, nonalcoholic steatohepatitis, and cardiovascular remodeling in high-carbohydrate, high-fat diet-fed rats. **J Nutrition.** V.141, p.1062-9, 2011.

PATHAK, D. PATHAK, K.; SINGLA, AK. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**. v.57. n.5, p.371-389, 1991.

PEDRIALI, C.A. FERNANDES A.C., BERNUSSO, C., POLAKIEWICZ, P. The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent. **Quimica Nova**, v.31, p. 2147-2151, 2008.

PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** v.29, p. 2002-07, 2001.

PIETTA, P.G. J. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. v.63, p. 1035-1042, 2000.

PROCHÁZKOVÁ D, BOUŠOVÁ I, WILHELMOVÁ N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**. 82:513-23; 2011.

PROCHÁZKOVÁ D, BOUŠOVÁ I, WILHELMOVÁ N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**. 82:513-23; 2011.

RAMOS, A. A., LIMA, C.F., PEREIRA, M.L . FERNANDES-FERREIRA, M., PEREIRA-WILSON, C. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. **Toxicology Letters**. 177: 66-73, 2008.

REUTER S, GUPTA SC, CHATURVEDI MM, AGGARWAL BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**. v, 49, p. 1603-16, 2010.

RODRIGUES, H.G.; DINIZ. Y.S.A.; FAINE, L.A.; ALMEIDA, J.A. FERNANDES, A.A.H. NOVELLI, E.L.B. Nutricional supplementation with natural antioxidants: effect of rutin on HDL-cholesterol concentration. **Revista de Nutrição**. v.13, p. 315-320, 2003.

Rover, J, Höehr, N., Vellasco A., Kubota L.T. Antioxidant system involving the glutathione metabolic cycle associated to electroanalytical methods in the oxidative stress evaluation. **Quimica Nova**. v. 24, p. 112-119, 2001.

SCALBERT A.; MANACH C.; MORAND C.; REMESY C.; JIMENEZ L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.45, p.287-306, 2005.

SHARMA N.K, DAS S.K, MONDAL A.K, HACKNEY O.G, CHU W.S, KERN P.A, RASOULI N, SPENCER H.J, YAO-BORENGASSER A, ELBEIN S.C. Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. **J Clin Endocrinol Metab**. V.93, p-4532-41, 2008.

SHASTRY, B.S. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. **Pharmacogenomics**, v.6, p.16-21, 2006.

SHIH, H., PICKWELL, G.V., QUATTROCHI, L.C. Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. **Arch. Biochem. Biophys**. 373, 287– 294, 2000.

SIES H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v.82, p. 291-295, 1997.

SIES H. Strategies of antioxidant defense. **Eur J Biochem**. v.225, p. 213-9, 1993.

SIES, H. Polyphenols and health: update and perspectives. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, p. 2-5, 2010.

SIVARAMAN, L., LEATHAM, M.P., YEE, J., WILKENS, L.R., LAU, A.F., LE MARCHAND, L., CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. **Cancer Res**. V. 54, p.3692–3695, 1994.

SPECTOR, A. Review: Oxidative stress and disease. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. v.16, p 193-201, 2000.

TAGUCHI K, MOTOHASHI H, YAMAMOTO M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. **Genes Cells**. v.16, p. 123-40, 2011.

TANIGAWA, S.; FUJII, M.; HOU, D.X. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin, **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, p. 1690–1703, 2007.

TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B, HARTMANN A, KOBAYASHI H, MIYAMAE Y, ROJAS E, RYU J-C, SASAKI YF. Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 35: 206-221, 2000.

TOKUDOME T, MIZUSHIGE K, NOMA T, MANABE K, MURAKAMI K, TSUJI T, NOZAKI S, TOMOHIRO A, MATSUO H. Prevention of doxorubicin (adriamycin)-induced cardiomyopathy by simultaneous administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor assessed by acoustic densitometry. **J Cardiovasc Pharmacol**. v.36, p.361-8, 2000. v. 1171, p. 350-7, 2009.

VALKO M., LEIBFRITZ D., MONCOLA J., CRONIN M.D. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Review. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.39, p. 44-84, 2007.

VALKO, M., RHODES C.J., MONCOL J., IZAKOVIC M . Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Mini-review. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p. 1–40, 2006.

VALKO. M., IZAKOVIC M., MAZUR M, RHODES CJ, TELSER J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.266, p. 37-56, 2004.

VAN DAM, R.M., NAIDOO N, LANDBERG R. Dietary flavonoids and the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases: review of recent findings. **Curr Opin Lipidol**. 1:25-33, 2013.

VOGIATZI, G., TOUSOULIS, D., STEFANADIS D. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Hellenic J Cardiol.** 50: 402-409, 2009.

WALLE T. Absorption and metabolism of flavonoids. **Free Radic Biol Med.** 36: 829-837, 2004.

Waters MD, Brady AL, Stack HF, Brockman HE. Antimutagenic profiles for some model compounds. **Mutation Research;** v.238, p. 57-85, 1990.

YAO, L. H. JIANG, Y. M.SHI, J. TOMÁS-BARBERÁN, F. A. DATTA, N SINGANUSONG, R. YOKOZAWA, T. DONG, E.; LIU, Z.W. SHIMIZU, M. Antioxidantive activity of falvones and flavonols *in vitro*. **Phytotherapy.** v.11, p.446-449. 1997.

YUAN. Z. Constituents of the underground parts of *Glehinia littoralis*. **Chemical & Pharmaceutical bulletin.** v.50, p.73-77, 2002

ZAMORA-ROS. R, SERAFINI M., ESTRUCH R., LAMUELA-RAVENTÓS R.M., MARTÍNEZ-GONZÁLEZ M.A, SALAS-SALVADÓ J, FIOL M., LAPETRA J., ARÓS F, COVAS MI, ANDRES-LACUEVA C. Mediterranean diet and non enzymatic antioxidant capacity in the PREDIMED study: Evidence for a mechanism of antioxidant tuning. **Nutrition, Metabolism.** v.26, 2013.

ZEGOTA M, NAJAFZADEH M, BAUMGARTNER A, ANDERSON D. The protective effect of the flavonoids on food-mutagen-induced DNA damage in peripheral blood lymphocytes from colon cancer patients. **Food Chem Toxicol.** v.50, p. 124-9, 2012.

ZELKO I.Z., MARIANI J., FOLZ R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), AND EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med.** 33:337–349, 2002.

ZHANG, K. Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. **Int J Clin Exp Med.** 3:33–40. 2010.

