



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JULIANA CRISTINA MARCARIN

**INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, INDUÇÃO DE  
APOPTOSE, EFEITOS GENOTÓXICOS E PROTETORES DO  
FLAVONÓIDE RUTINA EM CÉLULAS HEPÁTICAS HTC.**

---

Londrina  
2009

JULIANA CRISTINA MARCARIN

**INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, INDUÇÃO DE  
APOPTOSE, EFEITOS GENOTÓXICOS E PROTETORES DO  
FLAVONÓIDE RUTINA EM CÉLULAS HEPÁTICAS HTC.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina  
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M313i Marcarini, Juliana Cristina.  
A Investigação da citotoxicidade, indução de apoptose, efeitos genotóxicos e protetores do flavonóide rutina em células hepáticas HTC / Juliana Cristina Marcarini. – Londrina, 2009.  
72f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2009.  
Inclui bibliografia.

1. Flavonóides – Teses. 2. Rutina - Efeito citotóxico – Teses. 3. Células hepáticas – Teses. 4. Apoptose – Teses. 5. Citogenética – Teses. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 576.302.32

JULIANA CRISTINA MARCARIN

**INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, INDUÇÃO DE APOPTOSE,  
EFEITOS GENOTÓXICOS E PROTETORES DO FLAVONÓIDE  
RUTINA EM CÉLULAS HEPÁTICAS HTC.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani  
Universidade Estadual de Londrina, UEL.

---

Prof. Dr. Edson Luis Maistro  
Universidade Estadual Paulista, UNESP.

---

Profa. Dra. Ana Lúcia Dias  
Universidade Estadual de Londrina, UEL.

Londrina, 17 de fevereiro de 2009.

## DEDICATÓRIA

### *Dedico esse trabalho*

*...Aos meus amados 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 Letícia e Ivan Luciano pelo estímulo e por apostarem sempre no meu sucesso.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani, pela dedicação ao ensino, a pesquisa, pela orientação segura, pela confiança e sinceridade. Obrigada por transmitir seus conhecimentos, suas experiências profissionais e de vida. Obrigada por abrir as portas do laboratório e ter possibilitado a realização deste trabalho.

Aos Professores Dr. Rodrigo Cabral Luiz e Dra Ilce Mara de Syllos Cólus, por aceitarem participar de minha banca de qualificação, pela ajuda na discussão dos resultados e contribuições para a redação final do artigo.

Aos Professores Dra Ana Lúcia Dias, Dr. Edson Luís Maistro, Dra Silvia Helana Sofia e Dra Veronica Elisa Pimenta Vicentini, por aceitarem participar de minha banca de defesa e trazerem importantes sugestões para a finalização deste trabalho.

À Dra Clara Beatriz Hoffmann-Campo, por ter cedido o composto utilizado neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade oferecida.

A todos os Docentes do programa, que muito contribuíram para meu crescimento profissional. Agradeço pela atenção, pelos ensinamentos e apoio durante o processo de Mestrado.

Aos funcionários Dário e Melissa, pela atenção e assistência diária no laboratório. A Sueli, pela atenção, paciência, conselhos e pelo auxílio prestados durante todo o Mestrado.

À minha grande amiga Marcela, obrigada pela amizade, pelos seus ensinamentos, pela sua dedicação, seu carinho, sua ajuda incondicional, paciência e conselhos. Obrigada pelos inesquecíveis momentos de descontração, mas também pelos momentos de tristeza compartilhados. Obrigada por sempre me incentivar e torcer pelo meu sucesso.

À minha grande amiga Josiane, obrigada por sua ajuda, pela atenção, por todos os momentos de alegria e, acima de tudo, por sua amizade.

À grande colega de laboratório Sandra, obrigada pelo auxílio durante o mestrado. Obrigada por compartilhar suas experiências profissionais e de vida.

Aos estagiários do laboratório, Andressa, Simone, Nathalia, Diogo e Vander, obrigada pela ajuda e por todos os momentos de alegria.

A todos os amigos e colegas da turma de mestrado, Vanessa, Hellen, Clelton Rafael, Iara, Michelli, Victor, Marcos, Breno, Tiago, Amanda, Ariane, Kenia e Francieli.

Aos Professores Dr. Orlando Seiko Takemura e Dr. Wagner José Martins Paiva pelo auxílio e colaboração que possibilitaram minha entrada no grupo de pesquisa de Genética Toxicológica.

Especialmente, aos amigos Rodrigo, Renata, Véssia e Ariane, obrigada por terem me ajudado a dar os primeiros passos para a entrada no mestrado. Obrigada pela dedicação, pela paciência e principalmente pelos seus ensinamentos.

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

Meus Sinceros Agradecimentos.

*“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”*

*(Charles Chaplin)*

MARCARINI, Juliana Cristina. **Investigação da citotoxicidade, indução de apoptose, efeitos genotóxicos e protetores do flavonóide Rutina em células hepáticas HTC**. 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## RESUMO

A rutina é um flavonóide que apresenta grande importância terapêutica, pois possui algumas atividades biológicas como: antioxidante, vasodilatadora e estimulante do sistema imunológico. Considerando que há poucos e controversos relatos na literatura sobre a toxicidade da rutina e o seu efeito protetor, o presente trabalho investigou os efeitos citotóxicos, genotóxicos e protetores da rutina em células hepáticas (HTC – hematoma de *Rattus norvegicus*). No ensaio de citotoxicidade - MTT nenhuma concentração da rutina (10 $\mu$ M a 810 $\mu$ M) apresentou efeito citotóxico após 24 e 48h de tratamento, porém com 72h de tratamento houve citotoxicidade da maior concentração. Os ensaios de Viabilidade Celular e de Cinética de Proliferação também demonstraram que somente a maior concentração (810 $\mu$ M) diminuiu a viabilidade ou interferiu na curva de crescimento após 72h de tratamento. Na avaliação da indução de apoptose *in situ*, nenhuma concentração de rutina após 24 horas de tratamento induziu a apoptose. Os resultados obtidos no Ensaio do Cometa (SCGE) mostraram que somente a maior concentração de rutina (810 $\mu$ M) após 24 horas de tratamento induziu danos no DNA, contudo, no Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (MNCtB) não foi observado efeito genotóxico. Na avaliação do efeito protetor, sobre o agente pró-carcinogênico benzo[a]pireno em MNCtB, as três maiores concentrações (90, 270 e 810 $\mu$ M) reduziram danos significativamente (redução de danos de 36,7%, 51,4% e 54,4%, respectivamente). Apesar do efeito genotóxico evidenciado no Ensaio do Cometa para a rutina, esse dano não foi fixado como observado no Ensaio MNCtB, sugerindo que o sistema de reparo atua eficientemente nos danos produzidos pela alta concentração de rutina (810 $\mu$ M). Além disso, os dados de efeito protetor da rutina, frente a um pró-carcinógeno bastante comum, sugerem uma atividade biológica importante que pode contribuir para a saúde humana.

**Palavras-chave:** Flavonóide rutina. HTC. Citotoxicidade. Apoptose. Efeito protetor.

MARCARINI, Juliana Cristina. **Investigation of the cytotoxicity, apoptosis induction, genotoxic and protector effects of the flavonoid rutin in hepatic cell line HTC**. 2009. 72 f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

### ABSTRACT

Rutin is a flavonoid of great therapeutic importance because it possesses some biological activities such as antioxidant, vasodilator and stimulant of immune system. Considering that there are few and controversial reports in literature about rutin toxicity and its protector effect, the present study investigated the cytotoxic, genotoxic and protector effects of rutin on hepatic cells (HTC – hepatoma of *Rattus norvegicus*). In the cytotoxicity assay - MTT - none of the concentrations of rutin (10 $\mu$ M to 810 $\mu$ M) were cytotoxic after 24 and 48h of treatment, however with 72h of treatment the highest concentration presented cytotoxicity. The Cell Viability and Kinetics Proliferation assays also demonstrated that only the highest concentration (810 $\mu$ M) decreased the viability or interfered on growth curve after 72h of treatment. In the evaluation of apoptosis induction in situ, none of the concentrations of rutin induced apoptosis in 24h treatment. The results obtained in Comet assay (SCGE) showed that only the highest concentration of rutin (810 $\mu$ M) induced DNA damage after 24h of treatment, nevertheless in Micronucleus test with cytokinesis block (MNCtB) it was not observed genotoxic effect. In evaluating the protector effect against the pro-carcinogenic agent benzo[a]pyrene in MNCtB, the three highest concentrations (90, 270 and 810 $\mu$ M) reduced damages significantly (reduction of damages of 36,7%, 51, 4% e 54,4%, respectively). Even though the genotoxic effect of rutin evidenced in Comet assay, this damage was not fixed and did not was observed in MNCtB assay, suggesting that the repair system acts efficiently against the damages produced by highest concentration of rutin (810 $\mu$ M). Moreover, data demonstrating protection of rutin, against a quite common pro-carcinogen, suggest an important biological activity that can contribute to human health.

**Keywords:** Flavonoid rutin. HTC. Cytotoxicity. Apoptosis. Protector effect.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Principais subclasses dos flavonóides, exemplos e respectivas fontes alimentares.....	15
---	----

### ARTIGO

<b>Tabela 1</b> – Freqüência media de células com dano, distribuição das classes de danos e escore referente ao teste de genotoxicidade em células HTC apos tratamento com o flavonóide rutina (Media $\pm$ Desvio Padrão).....	49
---	----

<b>Tabela 2</b> – Avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade do flavonóide rutina em células HTC. Total de células binucleadas com micronúcleo, valor médio encontrado de células micronucleadas e respectivo nível de significância (p) obtido no Test-t.....	51
--	----

<b>Tabela 3</b> – Valor médio e desvio padrão de 1.500 células analisadas por tratamento referente ao Índice de Divisão Nuclear (IDN) após tratamento de 24h com o flavonóide rutina em células HTC e seu respectivo nível de significância (p) obtido no Test-t.....	52
---	----

### ANEXOS

<b>Tabela 1</b> – Valores médios $\pm$ desvio padrão da absorbância obtida no teste de citotoxicidade MTT, após 24 horas de tratamento .....	70
--	----

<b>Tabela 2</b> – Valores médios $\pm$ desvio padrão da absorbância obtida no teste de citotoxicidade MTT, apos 48 horas de tratamento .....	70
--	----

<b>Tabela 3</b> – Valores médios $\pm$ desvio padrão da absorbância obtida no teste de citotoxicidade MTT, apos 72 horas de tratamento .....	71
--	----

<b>Tabela 4</b> – Freqüência media e desvio padrão (nº de células x 10 <sup>5</sup> /mL) referente ao Ensaio de Cinética de Proliferação em células HTC apos tratamento com o flavonóide rutina nos tempos 24, 48, 72 e 96h.....	71
--	----

**Tabela 5** – Frequência média e desvio padrão (n° de células x 10<sup>5</sup>/mL) referente ao Ensaio de Viabilidade Celular em células HTC após tratamento com o flavonóide rutina nos tempos 24, 48, 72 e 96h..... 72

**Tabela 6** – Avaliação da indução de apoptose após tratamento das células HTC por 24 horas com o flavonóide rutina. Número total de células analisadas, número de células apoptóticas encontradas, média ± desvio padrão de células apoptóticas e frequência de células apoptóticas ..... 72

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Origem dos flavonóides e a representação do esqueleto de carbono C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> .....	14
<b>Figura 2</b> – As estruturas químicas das sub-classes dos flavonóides (HOLLMAN et al., 1996).....	15
<b>Figura 3</b> – Formação da rutina a partir da quercetina – pertencentes a sub-classe dos flavonóis. (PEDRIALLI, 2005).....	18
<b>Figura 4</b> – Favas de <i>Dimorphandra mollis</i> .....	19
<b>Figura 5</b> – Células HTC inviável (A) e viável (B). Coloração: Azul de Trypan. Microscopia óptica, objetiva de 100x .....	27
<b>Figura 6</b> – Células HTC normais (A), e em apoptose (B). Coloração: Acridina Orange. Microscopia de fluorescência (Aumento de 100x).....	28
<b>Figura 7</b> – Critérios de classificação para análise do Ensaio do Cometa. Classes 0, 1, 2 e 3. Coloração: Brometo de Etídeo. Microscopia de fluorescência, objetiva de 40x .....	30
<b>Figura 8</b> – Formação de célula micronucleada por clastogênese, contendo fragmento cromatídeo acêntrico.....	32
<b>Figura 9</b> – Formação de célula micronucleada por aneugênese, contendo cromossomo inteiro .....	32
<b>Figura 10</b> – Célula mononucleada (A), célula binucleada (B) e célula tetranucleada (C). (FENECH, 2006) .....	33
<b>Figura 11</b> – Células binucleadas sem micronúcleo (A) e com micronúcleo (B). Coloração: Giemsa 5%. Microscopia óptica, aumento de 400x .....	34

## ARTIGO

<b>Figura 1</b> – Absorbância média observada no Ensaio MTT após tratamento de 24, 48 e 72 horas com a rutina. *** Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0.001$ ).....	45
<b>Figura 2</b> – Viabilidade celular em células HTC tratadas com rutina nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h .....	46

- Figura 3** – Cinética de proliferação em células HTC tratadas com rutina nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h..... 47
- Figura 4** – Frequência de células apoptóticas encontradas apos tratamento de 24 horas com cinco concentrações diferentes do flavonóide rutina em células HTC. Análise de 1.500 células por tratamento. Controle (PBS); Cisplatina 20 $\mu$ M. \*\*Diferença significativa em relação ao controle ..... 47
- Figura 5** – Escore médio de cometas observados em células HTC (barras) e viabilidade celular (linha) encontrada apos o tratamento de 24 horas com cinco concentrações do flavonóide rutina em células HTC. Análise de 300 células por tratamento. Controle (PBS), (B[a]P): Benzo[a]pireno - 80 $\mu$ M \*\*Diferença significativa em relação ao controle ..... 48
- Figura 6** – Frequência de células binucleadas com micronúcleo encontradas apos tratamento de 24 horas com rutina em células HTC. Controle (PBS), B[a]P: Benzo[a]pireno ( 20 $\mu$ g/ml),. R1: 10 $\mu$ M de rutina, R2: 30 $\mu$ M de rutina, R3: 90 $\mu$ M de rutina, R4: 270 $\mu$ M de rutina, R5: 810 $\mu$ M de rutina. Análise de 6.000 células por tratamento. \*\*Diferença estatisticamente significativa em relação ao B[a]P ( $p < 0.01$ ). ## Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0.001$ ) ..... 50

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 FLAVONÓIDES .....	14
1.2 RUTINA .....	17
1.3 ASPECTOS DA METAGÊNESE .....	20
1.4 ASPECTOS DA ANTIMUTAGÊNESE .....	22
1.5 CULTURA DE CÉLULAS NA GENÉTICA TOXICOLÓGICA.....	24
1.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO.....	25
1.6.1 Ensaio de Citotoxicidade MTT .....	25
1.6.2 Ensaio de Viabilidade e Cinética de Proliferação celular .....	26
1.6.3 Ensaio de Detecção de Apoptose In Situ.....	27
1.6.4 Ensaio do Cometa (SCGE).....	29
1.6.5 Teste do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese.....	31
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	35
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	36
3.1 OBJETIVO GERAL .....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>4 ARTIGO</b> .....	37
4.1 INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, INDUÇÃO DE APOPTOSE, EFEITOS GENOTÓXICOS E PROTETORES DO FLAVONÓIDE RUTINA EM CÉLULAS HEPÁTICAS HTC .....	37
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60
<b>ANEXOS</b> .....	69

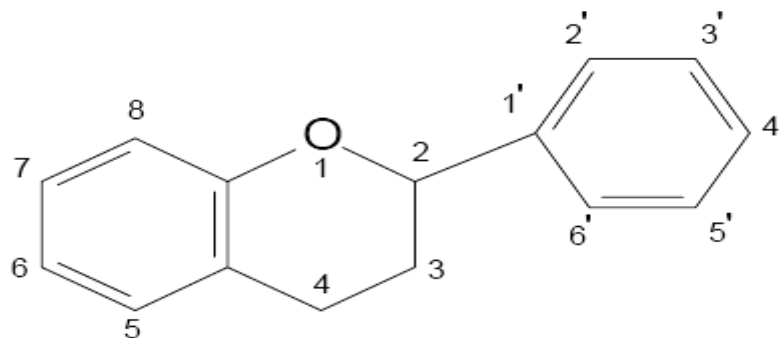
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 FLAVONÓIDES

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, não sintetizadas na espécie humana, que são encontrados em frutas, legumes, verduras, chás, sucos, chocolates e em vinhos tintos (SCALBERT et al., 2005). Tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas sobre os sistemas biológicos, promovendo ações benéficas para a saúde.

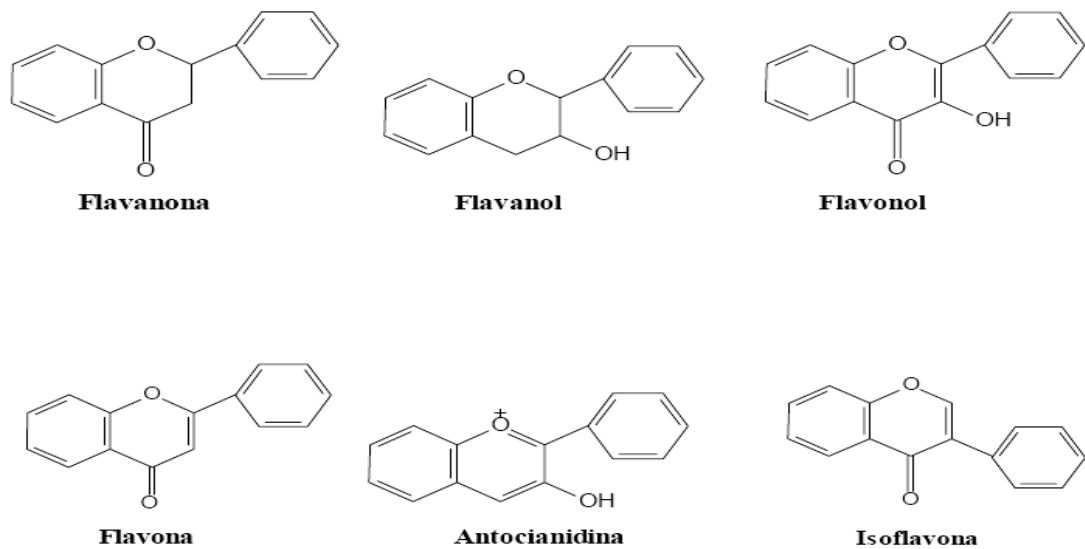
Os flavonóides são um grupo de substâncias antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis. Eles ocorrem na forma de agliconas, quando não apresentam ligações com açúcares, ou na forma de glicósidos, quando estão associados a açúcares (ACKER et al., 1996; YAO et al., 2004). Já foram identificadas mais de 4.000 substâncias pertencentes ao grupo dos flavonóides (LOPES et al., 2000).

Estruturalmente, os flavonóides constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono ( $C_{15}$ ) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos, que possuem nessa estrutura anéis aromáticos  $C_6-C_3-C_6$ . O esqueleto  $C_{15}$  dos flavonóides é biogeneticamente derivado do fenilpropano ( $C_6-C_3$ ) e três unidades de acetato ( $C_6$ ). (Figura 1). Portanto, flavonóides são derivados de bezo-gama-pirona de origem vegetal, podendo haver facilmente interconversão entre eles (YOKOZAWA et al., 1997). Estão amplamente distribuídos em praticamente todas as partes das plantas, particularmente em células fotossintéticas.



**Figura 1** – Origem dos flavonóides e a representação do esqueleto de carbono  $C_6-C_3-C_6$ .

As atividades bioquímicas dos flavonóides e sua natureza dependem da classe estrutural, grau de hidroxilação, outras substituições e conjugações, além do grau de polimerização (Figura 2). Este grande grupo de compostos está dividido em sub-classes que estão descritas na Tabela 1.



**Figura 2** – As estruturas químicas das sub-classes dos flavonóides (HOLLMAN et al., 1996)

**Tabela 1** – Principais subclasses dos flavonóides, exemplos e respectivas fontes alimentares.

Sub-classes	Cor	Flavonóides representativo	Fontes alimentares
Antocianidina	Azul, vermelho, violeta	Cianidina	Frutas e flores
Flavanol	Incolor	Catequinas, epicatequinas	Maças, chá, cerveja
	Amarelo	Procianidina	Sucos de frutas, vinho
Flavanona	Incolor, amarelo	Hesperidina, naringenina	Frutas cítricas
Flavona	Amarelo claro	Apigenina, luteolina	Cereais, frutas, flores, vegetais
Flavonol	Amarelo claro	Quercetina, mircetina, <b>rutina</b>	Cebolas, maçãs, tomates, vinho tinto, trigo sarraceno, chá.
Isoflavona	Incolor	Genisteína, daizeína	Legumes, derivados de soja

Fonte: (ACKER et al., 1996).

As atividades biológicas dos flavonóides foram observadas pela primeira vez em 1936, por Rusznyak e pelo bioquímico húngaro Albert Szent-Gyorgyi, 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).

Em relação as plantas, os flavonóides podem agir contra danos causados pela radiação UV em folhas jovens, como antioxidantes, inibidores enzimáticos e promovendo resistência das plantas a patógenos, como fungos, os insetos e as bactérias. 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 a cor se dá através da co-pigmentação dos flavonóides os quais protegem as antocianinas. Em alguns casos as moléculas absorvem próxima da radiação UV, onde esta “cor” só é percebida pelos insetos que são atraídos e guiados ao néctar (BORS et al.; 1990).

Na indústria os flavonóides são utilizados como corantes, aromatizantes e flavorizantes. Além disso, as pesquisas realizadas nas últimas décadas em relação aos flavonóides demonstraram o seu envolvimento com 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).

Outros estudos realizados demonstraram que alguns flavonóides apresentam atividades de quimioprevenção do câncer, indução da apoptose, inibição da proliferação celular, proteção contra estresse oxidativo, indução de enzimas de detoxificação, e ativação do sistema imunológico (HERTOG et al., 1996). Há também pesquisas sobre o efeito protetor dos flavonóides em doenças do coração, através da prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, importantes na formação aterogênica. Além disso, atuam na diminuição da adesão e agregação de plaquetas e apresentam propriedades vasodilatadoras (YAO et al., 2004).

Os flavonóides também podem exercer efeitos moduladores nas células, independentes da sua atividade antioxidante clássica, através de ações seletivas em diferentes rotas de sinalização das proteínas quinases. Ações inibitórias ou estimuladoras dessas rotas afetam profundamente a função celular por alterar a fosforização de moléculas alvos resultando na modulação da expressão gênica (WILLIAMS, 2004).

Em 2001, Nijveldt e colaboradores relataram que as propriedades farmacológicas dos flavonóides ainda não haviam sido totalmente avaliadas e mesmo após vários anos de pesquisas, pode-se afirmar que ainda novos estudos toxicológicos devem ser realizados, uma vez que a ampla diversidade estrutural desses compostos, bem como a capacidade de interação com outras substâncias, ainda precisam ser elucidadas. Ademais, as novas ferramentas da biologia molecular na última década, como os estudos de genômica funcional, proteômica e metabolômica, têm possibilitado novos avanços e olhares sobre os mecanismos moleculares envolvidos com efeitos benéficos para a saúde humana.

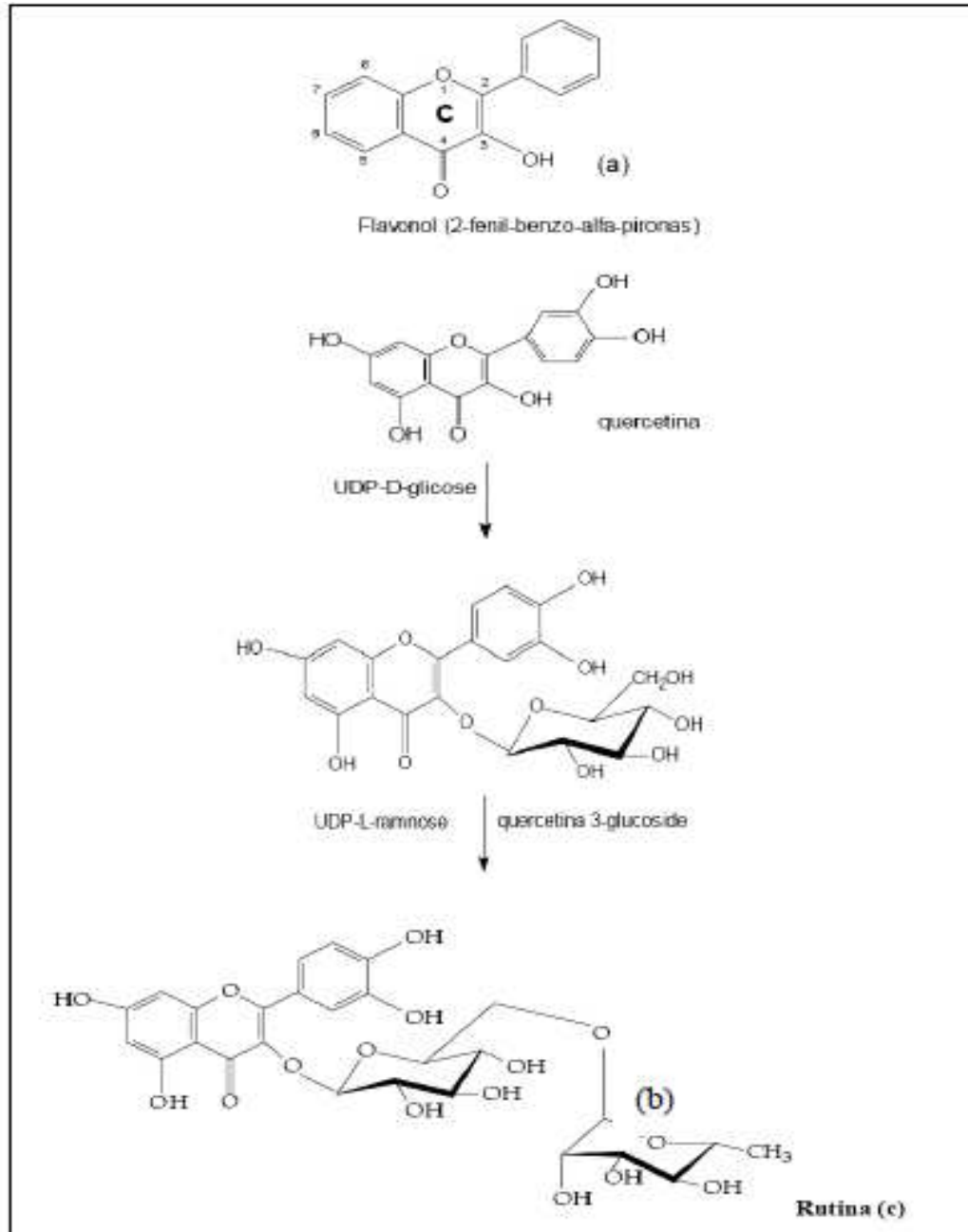
## 1.2 RUTINA

Dentro da sub-classe flavonol dos flavonóides encontra-se a rutina, que também é denominada de quercetina-3-ramnosilglicosídeo. Esta sub-classe possui como característica molecular uma hidroxila ligada na posição 3 do anel pirano central (Figura 3a). A quercetina (Figura 3b) e a molécula pela qual a rutina (Figura 3c) deriva-se e há uma ligação glicosídica na posição 3 do anel pirano central (YAO et al., 2004).

A rutina pode ser isolada de várias espécies de plantas, como da *Opuntia ficus indica* (figo-da-india) (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* (faveira) (Figura 4) e comercializada sob a forma de um pó sem sabor e de cor amarelo-esverdeado (HENRIQUES, 1999).

A rutina apresenta uma série de propriedades biológicas importantes, que envolvem a saúde humana e a agricultura. Segundo Gazzoni et al. (1997) a rutina demonstrou efeitos característicos de antibiose sobre a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), aumentando de forma significativa a duração da fase larval e elevando a mortalidade deste inseto, o que torna a rutina uma substância de relevância no desenvolvimento de cultivares de soja.



**Figura 3** – Formação da rutina a partir da quercetina – pertencentes a sub-classe dos flavonóis. (PEDRIALLI, 2005).



**Figura 4** – Favas de *Dimorphandra mollis*

Já o interesse em usar a 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. Isso se deve ao fato do flavonóide 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 ser pela utilização isolada ou associada ao ácido ascórbico, inclusive a absorção deste último composto e melhorada quando administrado junto com a rutina (PATHAK et al., 1991).

A rutina também tem sido descrita em eventos relacionados ao sistema imunológico atuando como inibidora de neoplasia induzida por azoximetanol (DESCHNER et al., 1991) e supressora do estresse oxidativo em leucócitos na artrite reumatóide (AFANAS'EV et al., 2001).

Rodrigues et al. (2003) demonstraram efeitos benéficos da rutina sobre a circulação sanguínea de roedores ao elevar os níveis de colesterol HDL e diminuir fatores de risco para a aterosclerose, principalmente os relacionados com processos oxidativos.

O efeito antioxidante da rutina está envolvido com a estimulação da atividade da enzima superóxido desmutase, 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 peróxila lipídicos (AFANAS'EV et al., 1989; ACKER et al., 1996; ARORA et al., 1998).

Na tentativa de ampliar as aplicações da rutina, estudos realizados por Pedriali (2005) 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 fenilglutaroil, 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 seqüestro de radicais livres.

Devido as atividades biológicas de interesse apresentadas pela rutina para o uso em seres humanos, surge a necessidade de avaliar a segurança sobre o uso desta substância, do ponto de vista do potencial mutagênico e/ou tóxico. Segundo Das et al. (1994), há poucos estudos sobre o potencial mutagênico da rutina, além disso, os estudos apresentam resultados controversos dependendo do sistema teste utilizado. Pesquisas realizadas in vivo por da Silva et al. (2002), demonstraram ausência de indução de micronúcleos em células da medula óssea de camundongo. No entanto, estudos feitos por Chun-li Yu et al. (1986) apontam efeito mutagênico utilizando o Teste de Ames.

### 1.3 ASPECTOS DA MUTAGÊNESE

A mutagênese é a ciência que estuda o processo de indução de danos no DNA pela ação de agentes químicos, físicos e biológicos. Estes danos são comumente

medidos como mutações, aberrações cromossômicas, quebras de fitas do DNA, aductos ou por interferências no sistema de reparo do dano (GUYTON et al., 2008).

A mutação é definida como sendo qualquer alteração do DNA que não resulte de processos normais como a segregação ou recombinação genética, onde os organismos mais complexos (eucariontes) estão sob um rigoroso controle para reduzir os erros (RABELLO-GAY et al., 1991).

O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos e exerce papel fundamental na evolução e diversidade das espécies. Sem mutação, não há variabilidade genética e assim não há evolução (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Quando a mutação ocorre em células somáticas pode ocorrer propagação durante a proliferação celular e envolver-se com o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis, tais como aterosclerose, doenças cardíacas e câncer (DE FLORA, 1998; DE FLORA; FERGUSON, 2005).

Agentes genotóxicos têm como propriedade causar lesões genômicas que são passíveis de correção pelo sistema de reparo de erros do DNA, no entanto, se não reparadas estas lesões podem resultar em mutação (GONTIJO; TICE, 2003).

Os agentes mutagênicos causam danos no DNA, que podem ou não serem reparados. O dano fixado é considerado uma mutação, sendo assim, um agente mutagênico e aquele que induz uma mutação que não é passível de reparo e é transmitida célula a célula durante a proliferação celular. Todos os danos no DNA são passíveis de reparo. A quantidade, a fase do ciclo celular, a eficiência do reparo, os tipos de reparo atuante em cada tipo celular, entre outros, são fatores que determinam a mutação (WANG et al., 2009).

Em virtude de algumas doenças crônicas estarem relacionadas com o processo de mutação, muitos testes têm sido desenvolvidos para aumentar o conhecimento sobre os mecanismos moleculares de ação de agentes mutagênicos (REIFFERSCHIED e HEIL, 1996).

Os agentes mutagênicos que causam danos no DNA podem atuar de maneira direta ou indireta. Os agentes diretos não necessitam de sistema de metabolização, pois por si só causam dano (ex: bleomicina, metilmetanosulfonato, etc). Os agentes indiretos necessitam ser metabolizados para que seus metabolitos danifiquem o DNA (ex: ciclofosfamida, benzo[a]pireno) (BRUSICK, 1987).

Muitas substâncias presentes em nossa dieta alimentar representam riscos para a saúde, uma vez que são mutágenos já reconhecidos e podem atuar como tal em sistemas *in vivo* e *in vitro*. Algumas dessas substâncias são formadas a partir do cozimento de

carnes brancas e vermelhas como as aminas heterocíclicas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e compostos N-nitroso formados pelo processamento de alimentos com altos níveis de nitrato (FERGUSON et al., 2004).

Pesquisas apontam que a maioria dos carcinógenos são mutágenos indicando assim uma grande correlação entre a mutagênese e a carcinogênese (MacGREGOR et al., 2000).

A carcinogênese esta diretamente relacionada com o prolongado acúmulo de agressões em diferentes níveis biológicos, que alteram as células tanto do ponto de vista genético quanto bioquímico. Uma nova estratégia para reduzir a sua incidência relaciona-se a programas de intervenção voltados para a dieta e nutrição, bem como para o desenvolvimento de produtos farmacológicos que poderiam funcionar como quimíopreventivos (ERDTMANN, 2003).

#### 1.4 ASPECTOS DA ANTIMUTAGÊNESE

As doenças crônicas não transmissíveis representam hoje as maiores causas de morte na população, e o controle destas enfermidades torna-se difícil por serem de origem multifatorial. No entanto, mudanças importantes tem ocorrido no cenário epidemiológico no intuito de diminuir a taxa de mortalidade por estas doenças (DE FLORA; FERGUSON, 2005).

Em relação a procura de novos fármacos, pesquisas por agentes que possam reduzir a frequência de alterações no DNA tem se mostrado promissoras e com importantes implicações nas praticas terapêuticas devido a possibilidade da redução da taxa de mutações e consequente diminuição na incidência de câncer. Embora não se possa generalizar, varias doenças crônicas podem partilhar determinantes patogênicos comuns, como por exemplo, danos ao DNA (FERGUSON, 1994).

E considerada antimutagênica qualquer substância capaz de reduzir a frequência de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo de ação (ZEIGER, 2007).

Os mecanismos de antimutagênese podem ser classificados em dois processos principais: bio-antimutagênese e desmutagênese (HARTMAN; SHANKEL, 1990; DE FLORA, 1998;). As substâncias bio-antimutagênicas atuam como moduladoras do reparo

e replicação do DNA; agem em nível celular aumentando a fidelidade na replicação estimulando o reparo livre de erro ou ainda inibindo os sistemas de reparo sujeitos a erro.

As substâncias desmutagênicas são capazes de inativar um agente mutagênico e caracterizam-se pela atuação do composto diretamente no agente mutagênico, ou em seus precursores, inativando-os química ou enzimaticamente (HARTMAN; SHANKEL, 1990).

Dentre os estudos da área de metagênese o potencial quimiopreventivo de uma substância é testado confrontando o suposto antimutagênico com uma substância sabidamente mutagênica e, então, deve-se observar uma redução das lesões produzidas no DNA (LUIZ, 2002).

Muitos compostos antimutagênicos vêm sendo estudados a partir de constituintes encontrados na natureza. A dieta tem sido relacionada a prevenção ou desenvolvimento de certas doenças. Os alimentos contêm compostos mutagênicos e/ou carcinogênicos, assim como, antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos, alguns ocorrem naturalmente e outros podem ser introduzidos durante a preparação dos alimentos para o consumo humano. Estudos epidemiológicos sugerem uma redução na incidência de câncer associada com o consumo de alimentos que contêm fibras, vitaminas e minerais e também frutas frescas e vegetais (FRANCY-GUILFORD; PEZZUTO, 2008).

Pesquisas recentes revelam que a maior parte das frutas e vegetais possuem substâncias com atividade antimutagênica. Essas substâncias tem sido isoladas, identificadas e alguns dos mecanismos de sua atividade estão sendo esclarecidos. A Nacetil- I-cisteína, ácido p-aminobenzóico, isotiocianetos aromáticos, resveratrol, clorofilas e derivados, glutatona, vitamina C, vitamina E, vitamina A, flavonóides, ácidos graxos, fibras são algumas das substâncias antimutagênicas conhecidas e encontradas na dieta (DINKOVA-KOSTOVA, 2008; GESCHER, 2008; JACOB et al., 2008; KHOR et al., 2008; RIMANDO; SUH, 2008).

De acordo com Ferguson et al. (2004) o efeito protetor dos alimentos está relacionado principalmente a alguns tipos de fibras que protegem contra danos no DNA, por aumentarem o volume fecal e diminuírem o tempo de contato do mutágeno com o trato gastrointestinal, além de adsorverem os carcinógenos.

O selênio é indispensável para o funcionamento de enzimas de reparo do DNA. Pesquisas apontam que populações humanas que vivem em solos pobres em selênio e, portanto, ingerem pouco selênio na alimentação são propensas ao câncer (FERGUSON et al., 2004).

Segundo Oliveira et al. (2006), a  $\beta$ - glucana apresentou o efeito quimiopreventivo em células da linhagem HTC (hepatoma de *Rattus norvegicus*) tratadas com o agente alquilante 2AA (2-aminoantraceno) que é convertido a metabólito reativo através de enzimas de fase I. Provavelmente, esta quimioprevenção esteja relacionada com a interferência da  $\beta$ - glucana na expressão de genes que codificam estas enzimas ou na sua atividade.

O flavonóide crisina encontrado em alimentos originados de plantas, apresenta efeito protetor contra a amina aromática heterocíclica PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina), pois induz enzimas envolvidas na sua biotransformação que fazem a detoxificação em células HepG2 (hepatoma humano) (KASSIE et al., 2003).

Recentemente, pesquisas in vitro apontam que a maca e seus derivados possuem atividade antimutagênica. Essa atividade pode estar relacionada com: a ação antioxidante dos flavonóides e das procianidinas presentes na fruta; inativação de enzimas de biotransformação do citocromo P450 (fase I) ou aumento das enzimas de detoxificação (fase II). Os resultados do estudo destacam ainda que a maca contribui no combate de doenças cardiovasculares, asma e deficiência orgânica pulmonar, diabetes *mellitus* e obesidade (GERHAUSER, 2008).

## 1.5 CULTURA DE CÉLULAS NA GENÉTICA TOXICOLÓGICA

Para avaliar substâncias naturais ou sintéticas, vários testes são utilizados, incluindo os sistemas-teste de curta duração, que incluem as culturas de células de mamíferos in vitro na avaliação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos (TAKAHASHI, 2003).

Embora o sistema in vivo reproduza com mais semelhança as condições humanas, por efeito da metabolização, o sistema in vitro tem se mostrado eficaz na detecção de agentes ambientais mutagênicos e antimutagênicos. As vantagens da utilização das células de mamíferos em cultura, se devem a facilidade de padronização das condições experimentais como a densidade populacional, pH, temperatura, composição do meio de cultivo e outras; possibilidade de aplicação do tratamento em qualquer fase do ciclo celular, além de serem ensaios econômicos e de boa reprodutibilidade; o material é relativamente uniforme em seus requisitos metabólicos e em seu comportamento; a organização dos cromossomos e do seu DNA é a mesma das células in vivo (RABELLO-GAY et al., 1991).

Algumas linhagens celulares hepáticas, como HTC, HepG2 e culturas primárias de hepatócitos são de grande utilidade em estudos de genotoxicidade e mutagenicidade, uma vez que o fígado é o principal sítio de metabolização de xenobióticos (MERSHSUNDERMANN et al., 2004). Deste modo, tais células, mesmo em condições de cultura e em níveis de expressão variáveis, apresentam ainda enzimas de fase I e fase II do metabolismo de drogas (CASTELL et al., 1997; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

As enzimas de fase I, representadas pelas enzimas do citocromo P450, catalisam a ativação metabólica de promutágenos e procarcinógenos e, assim, modificam ou criam grupos funcionais na molécula que se ligam covalentemente ao DNA, produzindo mutagenicidade ou carcinogenicidade. Entretanto, as enzimas de fase I também estão envolvidas no processo de detoxificação de xenobióticos, assim como as enzimas de fase II (ex UDP-glucuronil transferase, glutathione S-transferase) que metabolizam muitos carcinógenos a metabolitos inativos (CONNEY, 2003; FERGUSON et al., 2004; MOON et al., 2006).

## 1.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO

### 1.6.1 Ensaio de Citotoxicidade MTT

Para muitos testes biológicos é importante a análise de sobrevivência e proliferação das células sob ação de uma substância como um parâmetro inicial de toxicidade. Isto pode ser determinado através de testes de citotoxicidade, sendo os mais comumente empregados, the neutral red assay, a protein assay, the lactate dehydrogenase leakage assay (LDH) e the methyl tetrazolium (MTT) assay (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

O teste quantitativo in vitro denominado de ensaio MTT foi desenvolvido por Mossmann em 1983. Mas tarde foi reavaliado e otimizado por Hansen ET al. (1989) para estimativa de proliferação e sobrevivência celular. Este método baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs, ativar em mitocôndrias de células vivas a converter o sal tetrazolium (dimetiliazol difenil tetrazolium, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan de coloração roxa. Esses cristais de formazan são solubilizados pelo dimetilsulfoxido (DMSO), permitindo o cálculo da

absorbância. Desse modo, a capacidade que somente as células vivas possuem, indica atividade mitocondrial e conseqüentemente a viabilidade celular (COLLIER e PRITSOS, 2003).

Collier e Pritsos (2003) indicaram que os processos oxidativos, bem como outras cadeias mitocondriais enzimáticas de elétrons possam ser responsáveis pela metabolização do MTT. O aumento da viabilidade celular é inversamente proporcional a quantidade de oxigênio reativo liberado pelas células. Desse modo, o ensaio de citotoxicidade MTT é considerado um método rápido e confiável.

### 1.6.2 Ensaio de Viabilidade e Cinética de Proliferação Celular

Os testes de citotoxicidade são de fundamental importância, pois são capazes de detectar compostos que induzem a morte celular por diversos mecanismos, revelando que inúmeros compostos aos quais estamos expostos, são capazes de induzir a morte celular (LOVELAND ET al., 1992).

De acordo com SHMALZ (1994), o ensaio de viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de Trypan é uma das técnicas mais simples utilizado para avaliar a citotoxicidade de compostos químicos, uma vez que este corante não sendo lipofílico, 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 (Figura 5). A contagem de células é determinada por amostragem, utilizando a câmara de Neubauer e microscópio óptico.

Os testes de viabilidade também auxiliam a avaliação dos testes de mutagenicidade e genotoxicidade, ao revelar: (a) se a população das células estudadas é satisfatória (>80%), (b) se o tratamento com o possível agente genotóxico pode estar causando a morte celular, impedindo a verificação da ação genotóxica; (c) se o agente interfere na velocidade do ciclo celular, interferindo na curva de crescimento por atrasos no ciclo, ou indução de apoptose (EISENBRAND et al., 2002; ALMEIDA e BOAVENTURA, 2005; GANTENBEIN-RITTER et al., 2008).



**Figura 5** – Células HTC inviável (A) e viável (B). Coloração: Azul de Trypan. Microscopia óptica, objetiva de 100x.

**Fonte:** (MARCARINI, 2008).

### 1.6.3 Ensaio de Detecção de Apoptose In situ

Alterações na curva de proliferação e atraso no ciclo celular podem ser causadas por diversos fatores entre eles a capacidade da substancia testada em induzir a morte celular (THOMPSON, 1995).

A resposta da célula a um efeito toxico pode ser reversível ou irreversível. A distinção entre a citotoxicidade e danos celulares reversíveis deve ser apropriadamente avaliada para que a interpretação dos dados de estudos in vivo seja facilitada (VALENTIN et al., 2000). Para isso, a indução de apoptose, por exemplo, pode ser investigada através de diversos parâmetros: alterações na morfologia celular, rearranjos na membrana, fragmentação do DNA, ativação de caspases, liberação do citocromo c da mitocôndria, entre outros (EISENBRAND et al., 2002).

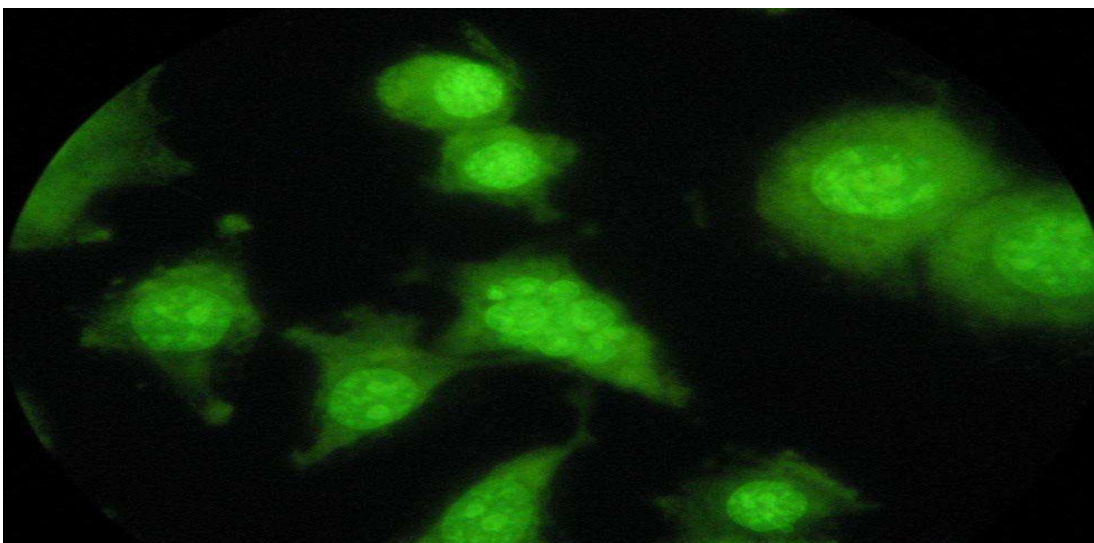
Kerr e seus colaboradores em 1972, foram os primeiros a utilizar o termo apoptose para descrever uma forma de morte celular morfologicamente distinta (ELMORE, 2007). A morte celular por apoptose foi inicialmente identificada com base nas mudanças

fisiológicas reproduzidas com grande fidelidade em diferentes tipos celulares quando expostas a um estímulo de morte. Essas mudanças incluem, condensação do citosol e da cromatina nuclear, fragmentação celular em corpúsculos que são fagocitados pelas células vizinhas e exposição de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática (MATTSON, 2000).

A apoptose possui importante papel durante o processo de desenvolvimento dos organismos. No entanto, se ela não for regulada corretamente pode resultar em patologias associadas ao seu desencadeamento excessivo ou atenuado de: anormalidades no desenvolvimento, doenças auto-imunes, doenças neurodegenerativas e câncer (ELMORE, 2007).

A identificação da apoptose por análise das alterações morfológicas, por exemplo, ainda constitui um procedimento padrão devido a sua simplicidade, baixo custo e precisão (PLENCHETTE et al., 2004). A técnica faz uso de corantes tais como Hoechst 33342 ou Acridina Orange, que penetram na célula e coram seu DNA. Em contraste com as células normais, as células apoptóticas terão a cromatina condensada e fragmentada uniformemente coradas por estes corantes (Figura 6) (WYLLIE, 2008).

Várias técnicas tem sido utilizadas para detecção da apoptose. Alguns métodos são relativamente simples e baratos que utilizam apenas microscopia, outros são mais caros, que fazem uso de kits próprios e aparelhagem mais sofisticada, todos com suas vantagens e desvantagens. Portanto, e de responsabilidade do pesquisador avaliar qual a melhor combinação de testes que será útil a sua pesquisa.



**Figura 6** – Células HTC normais (A), e em apoptose (B). Coloração: Acridina Orange. Microscopia de fluorescência (Aumento de 100x).

**Fonte:** (TSUBOY, 2008).

#### 1.6.4 Ensaio do Cometa (SCGE)

Alem dos testes de citotoxicidade, estudos de genotoxicidade são recomendados por órgãos regulatórios nacionais e internacionais, para avaliar a segurança dos produtos naturais ou sintéticos (OECD, 2001). Entre as técnicas utilizadas, o ensaio do Cometa tornou-se amplamente empregado no biomonitoramento humano, por demonstrar habilidade em detectar danos no DNA em células eucarióticas tratadas *in vitro* ou *in vivo* com agentes genotóxicos e devido a sua fácil aplicabilidade.

O ensaio do Cometa também esta sendo bastante utilizado em estudos nutricionais, especialmente na investigação do efeito protetor de componentes da dieta frente a danos oxidativos, e por isso, e considerado por alguns autores um biomarcador ideal para estudos de efeitos da nutrição sobre o câncer (DUTY et al., 2003; WASSON et al., 2008)

Os primeiros pesquisadores que utilizavam a quantificação direta do DNA em células individuais foram Rydenberg e Johanson em 1978. Posteriormente, Ostling e Johanson (1984) descreveram uma versão modificada para detectar danos em células individuais, com a introdução de eletroforese e sob pH neutro, onde as células com danos (quebras de fita dupla) apresentam aumento na migração de fragmentos do DNA em direção ao anodo. Singh et al. em 1988 introduziram a eletroforese em pH alcalino ( $\text{pH} > 13$ ), o que tornaria a técnica mais sensível e mais utilizada pelos pesquisadores da área (TICE et al., 2000). Nestas condições, a técnica permite detectar o mais amplo espectro de dano de DNA - quebras de fita simples e dupla, danos em sítios alcáli-lábeis e ainda, sob condições crosslink DNA, DNA-proteína que aparecem como uma diminuição da migração do DNA quando comparado aos controles (GAIVAO et al., 2009) A introdução de tratamentos enzimáticos tornou o ensaio ainda mais específico e sensível. Neste caso, e introduzida uma etapa extra de digestão dos nucleotídeos com enzimas que reconhecem tipos particulares de danos e ocasionam uma quebra (COLLINS, 2004). E importante ressaltar, que o ensaio detecta lesões genômicas que apos processadas podem ou não resultar em mutações, isto e, o dano detectado pelo cometa e passível de reparo (PIPERAKIS, 2009).

De acordo com as informações acima, o ensaio do Cometa se tornou um método rápido e sensível para a detecção de danos primários no DNA. Em vista disso, e amplamente utilizado na Genética Toxicológica por ser um teste relativamente barato, simples, flexível, de rápidos resultados, onde um pequeno número de células por amostra e

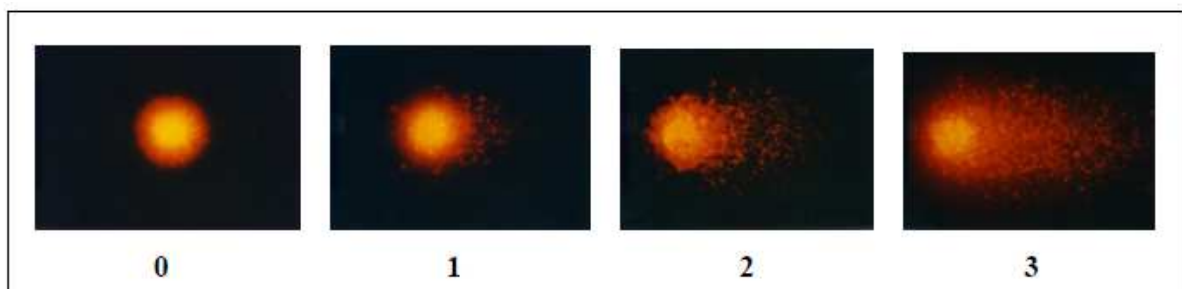
pequenas quantidades da substancia teste são suficientes para conduzir um experimento (TICE et al., 2000).

O ensaio do Cometa pode ser conduzido em qualquer tecido desde que as células possam ser isoladas. E mais comumente aplicado em células animais, entretanto, alguns métodos tem sido desenvolvidos para aplicação do teste em células vegetais (DAHWAN et al., 2009).

Embora o teste seja amplamente aplicado, as técnicas de isolamento celular e condições do experimento variam consideravelmente. Muitas variáveis técnicas podem afetar a sensibilidade do teste, tais como a natureza química e o mecanismo de ação do agente mutagênico, a concentração e quantidade de agarose de baixo ponto de fusão, composição da solução de lise, tempo de lise, tempo de desnaturação alcalina do DNA, composição e temperatura do tampão de eletroforese, as condições de corrida, a coloração do DNA, entre outros (SPEIT; HARTMANN, 1999; SPEIT et al., 1999).

A análise dos cometas gerados pode ser feita visualmente ou de maneira automatizada, com programas computacionais próprios. De acordo com COLLINS (2004), existe grande concordância entre os resultados obtidos pelas duas maneiras de análise.

Os cometas podem ser classificados em: classe 0 – nucleóides não danificados e que não apresentam cauda; classe 1 – nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2 – nucleóides com cauda de tamanho ente 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3 – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide. Nucleóides de células apoptóticas, que se apresentam totalmente fragmentados geralmente não são contabilizados (Figura 7) (SPEIT et al., 1996).



**Figura 7** – Critérios de classificação para análise do Ensaio do Cometa. Classes 0, 1, 2 e 3. Coloração: Brometo de Etídeo. Microscopia de fluorescência, objetiva de 40x.

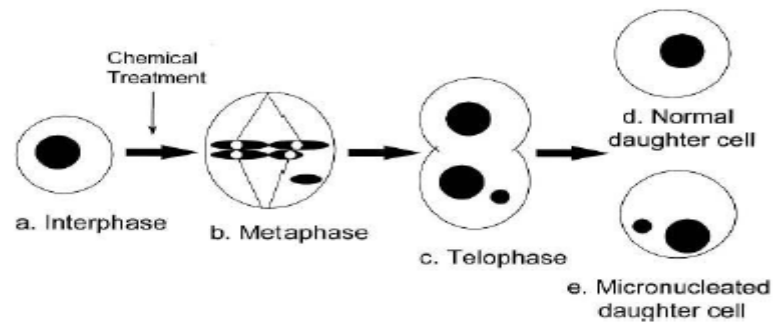
Fonte: (LUIZ, 2002)

### 1.6.5 Teste do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (MNCtB)

O teste do Micronúcleo foi primeiramente desenvolvido por SCHIMID e colaboradores em 1971 e dois anos mais tarde foi modificado por HEDDLE (1973) como alternativa aos ensaios citogenéticos tradicionais. O método apresenta vantagens como simplicidade, rapidez e baixo custo (SCHIMID, 1975). O ensaio foi desenvolvido primeiramente em sistema-teste in vivo, em células de medula óssea de camundongos, porém, atualmente é aplicado em vários tipos celulares, em sistema in vitro, in vivo e ex vivo. A versão in vivo do ensaio é considerado o teste mais largamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos, sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendados para avaliação do potencial mutagênico, para o registro de novos produtos químicos que entram no mercado mundial (CHOY, 2001).

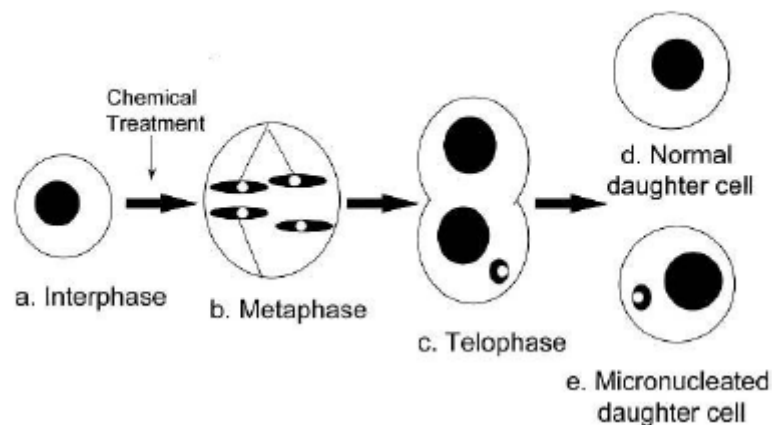
Na epidemiologia molecular a formação do micronúcleo é vastamente usada como um biomarcador de danos cromossômicos e instabilidade genômica (IARMARCOVAI et al., 2008). Além de sua aplicação em estudos de ecotoxicologia, também é empregado na avaliação de novos fármacos, no monitoramento de indivíduos expostos ocupacionalmente a agentes mutagênicos e no estudo dos mecanismos de ação desses agentes (SALVADORI et al., 2003). Diversos laboratórios o utilizam como uma ferramenta para a avaliação de fatores ambientais, genéticos e estilo de vida sobre a estabilidade genômica das populações humanas, com especial atenção na avaliação de risco para o câncer (FENECH et al., 1999).

Os micronúcleos são resultantes de dois fenômenos básicos nas células mitóticas: quebra cromossômica (clastogênese) e a disfunção do aparelho mitótico (aneugênese), sendo formado pelos acêntricos ou fragmentos cromátideos e cromossomos inteiros ou cromátides que se atrasam na anáfase e são excluídos do núcleo-filho na telófase (FENECH, 2000) (Figuras 8 e 9). A distinção do micronúcleo contendo cromossomos inteiros de um contendo fragmentos cromossômicos acêntricos pode ser feita através de hibridação in situ fluorescente (FISH), com sondas de regiões pericentroméricas (MATEUCA et al., 2006).



**Figura 8** – Formação de célula micronucleada por clastogênese, contendo fragmento cromatídeo acêntrico.

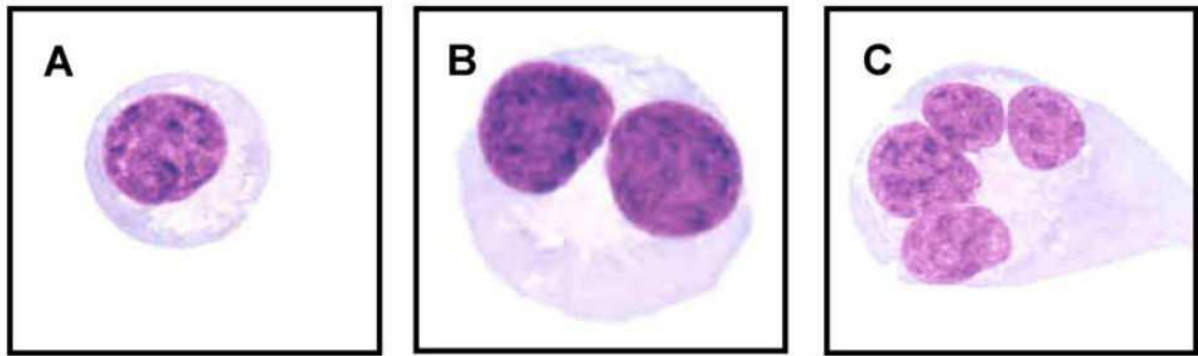
Fonte:(AARDEMA; KIRSCH-VOLDERS, 2001).



**Figura 9** – Formação de célula micronucleada por aneugênese, contendo cromossomo inteiro.

Fonte: (AARDEMA; KIRSCH-VOLDERS, 2001).

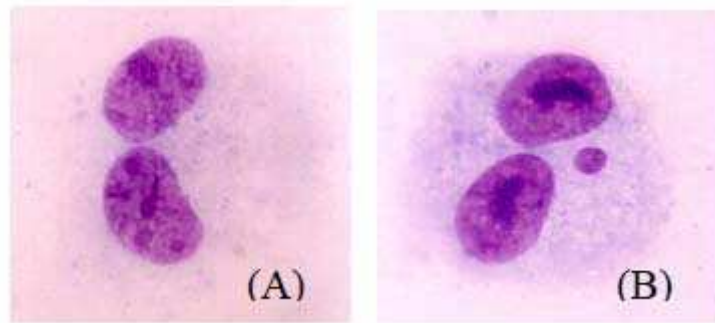
O ensaio do micronúcleo in vitro com bloqueio de citocinese (MNCtB), desenvolvido por FENECH e MORLEY em 1985, tornou-se um dos testes citogenéticos padrão para a análise da frequência de micronúcleos em células humanas (FENECH, 2006) e agências reguladoras já o incorporam na bateria de testes recomendados para o acesso ao potencial mutagênico de novos agentes (OECD, 2007). Além da análise do micronúcleo, outros parâmetros podem ser investigados na mesma cultura e na mesma lamina. A viabilidade celular pode ser mensurada através da análise das células necróticas e apoptóticas; a condição mitótica através da contagem das células mono, bi e multinucleada e posterior cálculo do índice de divisão nuclear (Figura 10); e, finalmente, a instabilidade cromossômica ou extensão do dano, através da análise da presença de micronúcleo e ponte nucleoplasmática (FENECH, 2006a).



**Figura 10** – Célula mononucleada (A), célula binucleada (B) e célula tetranucleada (C). (FENECH, 2006)

O MNCtB permite a análise dos micronúcleos após a primeira divisão celular, certificando que o dano ocorrido e decorrente do tratamento experimental a que as células foram submetidas. A adição de citocalasina-B a cultura permite identificar tais células devido a presença dos dois núcleos (FENECH, 2000). Esta substância inibe os microfilamentos de actina e impede a polimerização dos mesmos na placa equatorial formada no final da telófase; desta forma observa-se uma cariocinese com ausência de citocinese. O uso da citocalasina-B já foi motivo de debate entre os pesquisadores. Alguns já evidenciaram que seu uso pode interferir na indução de micronúcleos por agentes que afetariam o fuso mitótico (AARDEMA; KIRSCH-VOLDERS, 2001), no entanto, os resultados de um estudo interlaboratorial revelaram que o uso de citocalasina-B é a maneira mais eficiente de minimizar resultados falso-negativos (FENECH, 2006b).

A seleção das células binucleadas e a identificação do micronúcleo são feitas de acordo com o descrito por FENECH (2000). As células devem ser binucleadas; os dois núcleos devem ter a membrana intacta e devem estar situados dentro do mesmo limite citoplasmático; os dois núcleos devem ter tamanhos aproximadamente iguais e mesma intensidade de coloração; os micronúcleos devem possuir morfologia idêntica a do núcleo principal e mesma coloração (porem ocasionalmente e mais intensa); os micronúcleos são não-refringentes; não devem estar ligados a um dos núcleos principais; não podem estar sobrepostos a um dos núcleos principais; e o diâmetro deve variar de 1/6 até 1/3 do diâmetro do núcleo principal (Figura 11).



**Figura 11** – Células binucleadas sem micronúcleo (A) e com micronúcleo (B). Coloração: Giemsa 5%. Microscopia óptica, aumento de 400x.

**Fonte:** (LUIZ, 2002).

## 2 JUSTIFICATIVA

Os flavonóides são substancias extensamente encontradas na natureza, em sementes e grãos de várias frutas e vegetais, e também ocorrem em diferentes plantas medicinais. Dentro da classe dos flavonóides, a rutina destaca-se por apresentar um amplo espectro de atividades bioquímicas e farmacológicas incluindo efeito antioxidante, vasodilatadora e estimulante do sistema imunológico.

Nos últimos anos, o objetivo de varias pesquisas tem sido comprovar e determinar a ampla variedade das atividades biológicas dos flavonóides, bem como seus possíveis efeitos tóxicos, uma vez que seus resultados estão interessando constantemente as industrias farmacêuticas.

Considerando que ha poucos estudos sobre o potencial citotóxico e genotóxico do flavonóide rutina, além da controvérsia entre seus resultados, se faz necessário a realização de estudos complementares para avaliar seus possíveis efeitos biológicos, como ação protetora contra agentes genotóxicos, além de contribuir para o uso seguro desta substancia.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e protetores do flavonóide rutina em sistema de cultura de células metabolizadoras HTC (hepatoma de *Rattus norvegicus*).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, através do ensaio de citotoxicidade MTT, o efeito citotóxico e determinar as concentrações que serão utilizadas nos demais experimentos.
- Avaliar a viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de Trypan nos tempos de 24, 48, 72 e 96h.
- Verificar alterações na cinética de proliferação celular nos tempos de 24, 48, 72 e 96h.
- Avaliar o potencial de indução de apoptose após 24 horas de tratamento através da análise do padrão de fragmentação do DNA nuclear após coloração com Acridina Orange.
- Investigar a indução de danos no DNA após 24 de tratamento através do Ensaio do Cometa.
- Avaliar os potenciais genotóxicos e protetores através do Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese após 24 horas de tratamento.

#### **4 ARTIGO**

4.1 INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, INDUÇÃO DE APOPTOSE, EFEITOS GENOTÓXICOS E PROTETORES DO FLAVONOÍDE RUTINA EM CÉLULAS HEPÁTICAS HTC.

**Marcarini, J. C.; Tsuboy, M. S.; Luiz, R. C.; Ribeiro, L. R.; Hoffmann-Campo, C. B.;  
Mantovani, M. S.**

Artigo a ser submetido ao Periódico Archives of Toxicology

INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, INDUÇÃO DE APOPTOSE, EFEITOS GENOTÓXICOS E PROTETORES DO FLAVONOÍDE RUTINA EM CÉLULAS HEPÁTICAS HTC.

**Marcarini, JC<sup>1</sup>; Tsuboy, MS<sup>1</sup>; Luiz, RC<sup>1</sup>; Ribeiro, LR<sup>2</sup>; Hoffmann-Campo<sup>3</sup>, CB;  
Mantovani, MS<sup>1</sup>.**

### **Resumo**

A rutina é um flavonóide com atividades antioxidante, vasodilatadora, antiinflamatória e estimulante do sistema imunológico. Para estudar a toxicidade da rutina e o seu efeito protetor este trabalho investigou os efeitos citotóxicos, indutor de apoptose, genotóxicos e protetores em células HTC. No ensaio MTT a maior concentração (810µM) apresentou efeito citotóxico após 72h de tratamento. A maior concentração de rutina diminuiu a viabilidade e reduziu a proliferação celular após 72h de tratamento. Nenhuma concentração de rutina após 24 horas de tratamento induziu apoptose. A maior concentração de rutina após 24 horas de tratamento induziu danos no DNA no SCGE, porém no MNCTB não foi observado efeito genotóxico. Na avaliação sobre o agente pró-carcinogênico benzo(a)pireno, as concentrações de 90, 270 e 810µM reduziram danos, significativamente. Os dados de efeito protetor, frente ao pró-carcinogênio, sugerem uma importante atividade biológica para esse composto que pode contribuir para a saúde humana através da dieta.

**Palavras-chave:** Flavonóide rutina. HTC. Citotoxicidade. Apoptose. Efeito protetor.

## **1 INTRODUÇÃO**

Os flavonóides são metabolitos secundários polifenólicos de origem natural que contêm em sua estrutura química um número variável de grupos hidroxil-fenólicos responsáveis pela grande capacidade antioxidante. Além de seus efeitos antioxidantes, os flavonóides também apresentam ação antiinflamatória promovida pela supra-regulação de mediadores inflamatórios como IL-8, MCP-1 e ICAM-1 através do TNF- $\alpha$  (Youdim et al., 2002), inibição da expressão de óxido nítrico sintetase reduzindo a formação de óxido nítrico em macrófagos estimulados por LPS (anticorpos) (Autore et al. 2001), inibição in vitro da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pelos macrófagos e redução das LDL

---

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina. P.O. Box 6001, Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86051-990 - e-mail: [biomsm@uel.br](mailto:biomsm@uel.br) - Phone: 55 43 3371-4977 - Fax: 55 43 3371-4207

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro/SP.

<sup>3</sup> Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina/PR.

oxidadas (Hirano et al., 2001), possuem ação antiviral e antialérgica (Flores et al., 2002) e aumento da efetividade de células NK (Bagchi et al., 2002).

Dentro do grupo dos flavonóides muitos estudos tem sido realizados com a rutina, uma vez que esse flavonóide apresenta grande importância terapêutica, pois auxilia na melhora dos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede desses vasos. Outros sintomas de fragilidade capilar também são melhorados, entre eles, estão o da perda da acuidade visual e alterações do campo visual. Esses efeitos podem ser observados por ação da rutina isolada ou associada ao ácido ascórbico, inclusive a absorção deste último composto e melhorada quando administrado junto com a rutina (Pathak et al., 1991).

A rutina promove o aumento da lipase pancreática com consequente redução dos níveis de triacilgliceróis em ratos (Lima et al., 1999) e atividade hepatoprotetora contra o paracetamol e CCL<sub>4</sub> em roedores (Janbaz et al., 2002).

Ela também tem sido descrita em eventos associados ao sistema imunológico como os demais flavonóides. A rutina foi capaz de inibir a neoplasia induzida por imunossupressão com azoximetanol (Deschner et al., 1991) e reduziu o estresse oxidativo em leucócitos na artrite reumatóide (Afanás'ev et al., 2001).

Apesar da rutina apresentar várias propriedades benéficas para a saúde humana, há poucos estudos sobre seu potencial citotóxico e genotóxico, além disso, os estudos apresentam resultados controversos dependendo dos sistemas testes utilizados (Das et al. 1994; Hollman e Katan, 1996;). Pesquisas realizadas in vivo por da Silva et al. (2002), demonstraram ausência de indução de micronúcleos em medula óssea de camundongo pela rutina. No entanto, estudos feitos por Yu et al. (1986) utilizando o Teste de Ames apontaram efeito mutagênico.

Devido às atividades biológicas de interesse apresentadas pela rutina o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e protetores desse flavonóide em sistema de cultura de células metabolizadoras (HTC, hepatoma de *Rattus norvegicus*) através dos ensaios de citotoxicidade MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide], Ensaio de Viabilidade Celular e Ensaio de Cinética de Proliferação, no Teste de Indução de Apoptose in situ, e os Ensaios do Cometa (SCGE) e Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (MNCtB).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 RUTINA

Para uso em cultura a solução de rutina (Sigma Chemical, CAS no 153-18-4) foi dissolvida em DMSO (Dimetilsulfoxido) e diluída em meio DMEM-F12, sendo que a concentração de DMSO não ultrapassou 0,01% em cultura. A solução foi esterilizada utilizando-se uma unidade filtrante descartável de 0,22 $\mu$ m de porosidade (MillexR - Millipore).

As concentrações de rutina testadas no Ensaio do MTT foram as seguintes: 10 $\mu$ M, 30 $\mu$ M, 90 $\mu$ M, 270 $\mu$ M e 810 $\mu$ M.

Para avaliação da atividade proliferativa (ensaio de Cinética de Proliferação e Viabilidade Celular) da genotoxicidade (ensaio do Cometa e ensaio do Micronúcleo) e da indução de apoptose in situ foram utilizadas as cinco concentrações definidas pelo MTT.

### 2.2 AGENTES INDUTORES DE DANOS CELULAR

Os agentes indutores de dano no DNA empregados para controle positivo dos experimentos foram os seguintes: doxorubicina (CAS 25316-40-9; AdriblastinaR - Pharmacia), benzo[a]pireno (CAS 50-32-8; Fluka) e cisplatina (CAS 15663-27-1; Sigma Aldrich). A doxorubicina foi usada como controle no ensaio de citotoxicidade MTT, Cinética de Proliferação Celular e no ensaio de Viabilidade Celular – Azul de Trypan, na concentração final de 18 $\mu$ M. Para a indução de danos nos ensaios do Cometa e MNCTB foi utilizado o benzo[a]pireno, como controle, na concentração final de 80 $\mu$ M de meio de cultura, por 24h. No teste de avaliação da indução de apoptose, a cisplatina foi utilizada como controle na concentração final de 20 $\mu$ M.

### 2.3 LINHAGEM CELULAR HTC

As células HTC, provenientes de hepatoma de *Rattus norvegicus*, foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ). Estas foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM/F12 (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco), e mantidas em estufa BOD a 37°C. Nestas condições, o ciclo celular desta linhagem foi de aproximadamente 24 horas.

## 2.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE MTT

O ensaio de citotoxicidade MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983) com algumas modificações.

Em cada um dos pocos da placa de cultivo celular foram semeadas aproximadamente  $2,5 \times 10^4$  células HTC. Estas foram expostas ao tratamento com a rutina por 24, 48 e 72 horas. Ao final deste período, as células foram incubadas com MTT (0,3mg/mL) por 4h. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de leitor de placas (Uniscience) a 550 nm.

## 2.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – AZUL DE TRYPAN

O ensaio de viabilidade foi realizado em triplicata nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas e para análise foram semeadas aproximadamente  $10^5$  células por frasco de cultura experimental. Foi utilizada a técnica por contagem manual através da câmara de Neubauer e o método de exclusão com o reagente Azul de Trypan. As células foram analisadas após 24h de tratamento. Foram contadas 100 células, distinguindo-as em viáveis e não viáveis, gerando uma porcentagem de viabilidade celular. O Azul de Trypan foi utilizado na concentração de 0,2% em solução salina (PBS).

## 2.6 ENSAIO DE CINÉTICA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

O ensaio de cinética foi realizado em triplicata e para análise foi feita uma curva de cinética de proliferação nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas. Foram semeadas  $10^5$  células em tubos de cultura juntamente com seus respectivos tratamentos: A) controle (PBS); B) agente anti-proliferativo (Doxorrubicina  $18\mu\text{M}$ .); e C) tratamentos com a rutina em 5 concentrações. Os tubos foram coletados para contagem celular nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas.

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.

## 2.7 ENSAIO DE INDUÇÃO DE APOPTOSE IN SITU

Neste teste as células (aproximadamente  $2.5 \times 10^5$ ) foram cultivadas em lamínula de 20 x 20 mm de tamanho em tubos de cultura de 10 cm<sup>2</sup> de superfície contendo 3 mL de meio de cultura.

A identificação das células apoptóticas foi feita por análise do padrão de fragmentação do DNA nuclear após coloração com Acridina Orange. Neste ensaio, o tratamento das células foi realizado posteriormente a sua estabilização em cultura (24h), com as concentrações de rutina citadas no item 2.1. Após as 24h de tratamento, a colheita foi feita de acordo com o descrito por Rovozzo, 1973. Brevemente, após lavagem com PBS, a lamínula é retirada do tubo de cultura e fixada em fixador de Carnoy por 5 minutos. A lamínula é então mergulhada rapidamente em cada uma das placas contendo concentrações decrescentes de etanol (95% a 25%), seguida de lavagem com Tampão McIlvaine por 5 minutos, coloração com acridina orange (0.01%, 5 minutos) e nova lavagem com o tampão. Os experimentos foram feitos em triplicata e 1.500 células foram analisadas por tratamento.

## 2.8 ENSAIO DO COMETA (SCGE)

O ensaio do Cometa foi realizado segundo o protocolo de Tice et al., (2000). Foram semeadas aproximadamente  $5 \times 10^5$  células por frasco de cultura experimental. Resumidamente, após 24 horas de tratamento das células HTC com o agente indutor de danos ou com a rutina (concentrações citadas no item 2.1), as células foram tripsinizadas (500 µL de tripsina-EDTA 0,025%; 37°C), a suspensão celular centrifugada (5 minutos, 1000 rpm) e ressuspendida em 500 µL de meio de cultura. Em seguida, esta recebeu 120 µL de agarose baixo ponto de fusão (LMP – 0,5%), sendo este material depositado em laminas 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 alcalinas (25 V, 300 mA, 20 minutos), as laminas foram neutralizadas, fixadas e mantidas sob refrigeração até o momento da análise. A coloração das laminas foi feita com brometo de etídeo e a análise foi feita visualmente (KOBAYASHI, 1995) em microscopia de fluorescência (filtro de excitação de 420-490 nm e filtro de barreira de 520 nm) e aumento de 400x. Os cometas foram classificados em: classe 0 – nucleóides que não apresentam cauda; classe 1 – nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2 – nucleóides com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3 – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o

diâmetro do nucleóide. Os experimentos foram feitos em triplicata, sendo analisadas 300 células por tratamento. Células apoptóticas, que apresentaram nucleóide totalmente fragmentado, não foram contabilizadas. O escore total foi calculado pela somatória dos valores resultantes da multiplicação do total de células observadas em cada classe de lesão, pelo valor da classe.

Juntamente com o Ensaio do Cometa também foi avaliada a viabilidade celular para cada tratamento. Após o período de tratamento e tripsinização das células para a colheita do material, 20 µL da suspensão celular foi recolhida e misturada com 20 µL de azul de trypan (Gibco) em um microtubo de 1,5 mL. A análise foi feita em microscópio óptico usando câmara de Neubauer, onde foram contadas células viáveis (brancas) e não viáveis (azuis). O cálculo do Teste de Viabilidade Celular foi feito pela somatória das células viáveis, dividido pela somatória das células viáveis com as células não viáveis e multiplicando-se tudo por 100.

## 2.9 ENSAIO DO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE (MNCTB)

Para a avaliação da genotoxicidade as células receberam tratamento com cinco concentrações de rutina citadas no item 2.1 por 24h. Para a avaliação da antigenotoxicidade foi realizado tratamento simultâneo simples, sendo que as cinco concentrações de rutina citadas no item 2.1 foram associadas com o benzo[a]pireno. Foram semeadas aproximadamente  $5 \times 10^5$  células por frasco de cultura experimental.

Neste ensaio, após o tratamento de 24 horas com a rutina e benzo[a]pireno as culturas receberam citocalasina-B por mais 26 horas em concentração final de 3 µg/mL para a obtenção das células binucleadas.

A colheita das células foi feita de acordo com o protocolo de Oliveira et al. (2002). Resumidamente, as células foram tripsinizadas (500 µL de tripsina-EDTA 0,025%; 37°C), centrifugadas (5 minutos, 1000 rpm), hipotonizadas (citrato de sódio 1%) e fixadas (3metanol: 1ácido acético). Os experimentos foram feitos em triplicata, 6.000 células binucleadas foram analisadas por tratamento para a frequência de micronúcleo (MN) e 1.500 células pra análise do índice de divisão nuclear (IDN). Os critérios de seleção das células binucleadas, de identificação do micronúcleo e o cálculo do IDN seguiram o descrito por Fenech (2000).

A porcentagem de redução dos danos do agente genotóxico pela rutina foi calculada de acordo com Waters et al. (1990) utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Redução (\%)} = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

onde A é a média do número de células com MN observadas no agente indutor de danos (benzo[a]pireno), B é número de células com MN observadas no tratamento de antigenotoxicidade (rutina + benzo[a]pireno) e C é o número de células com MN do controle do ensaio.

## 2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no teste de citotoxicidade MTT foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey.

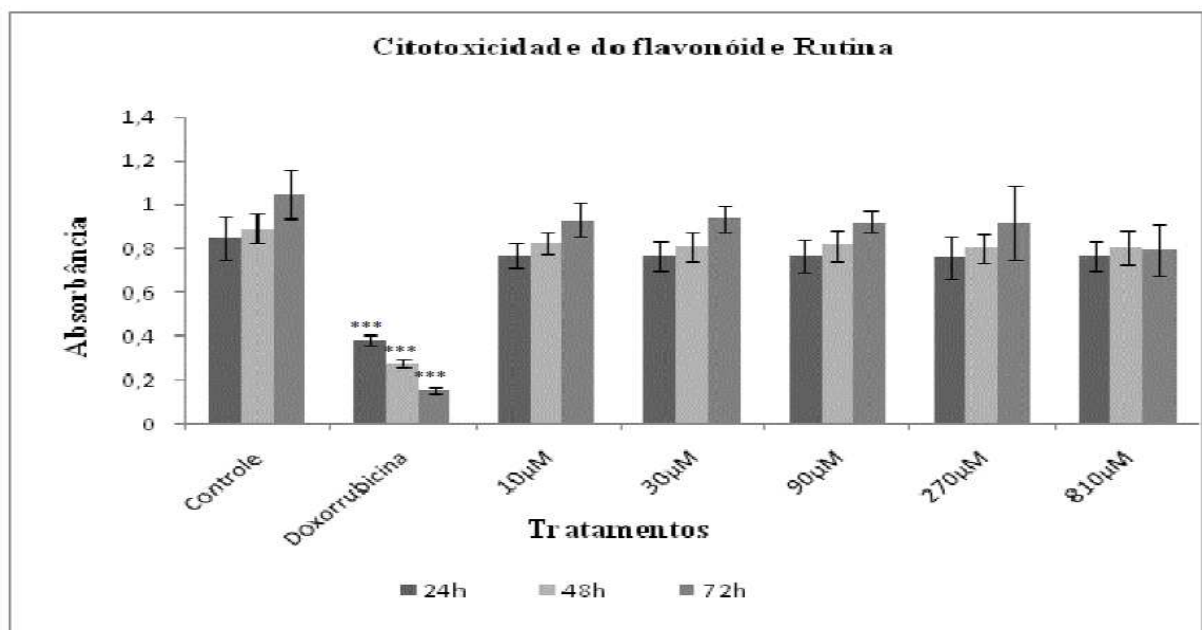
Os dados obtidos nos ensaios de Cinética de Proliferação e Viabilidade Celular foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Dunnet ( $\alpha = 0.05$ ).

Para análise dos escores obtidos no SCGE, frequência de micronúcleos e IDN obtidos no MNCtB e frequência de células apoptose foi utilizado o Teste-t de Student comparando culturas tratadas em relação ao controle. Em todos os testes foi considerado  $\alpha = 0.05$ . As análises foram realizadas com auxílio do programa GrafPad InStatR versão 3.02.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE MTT

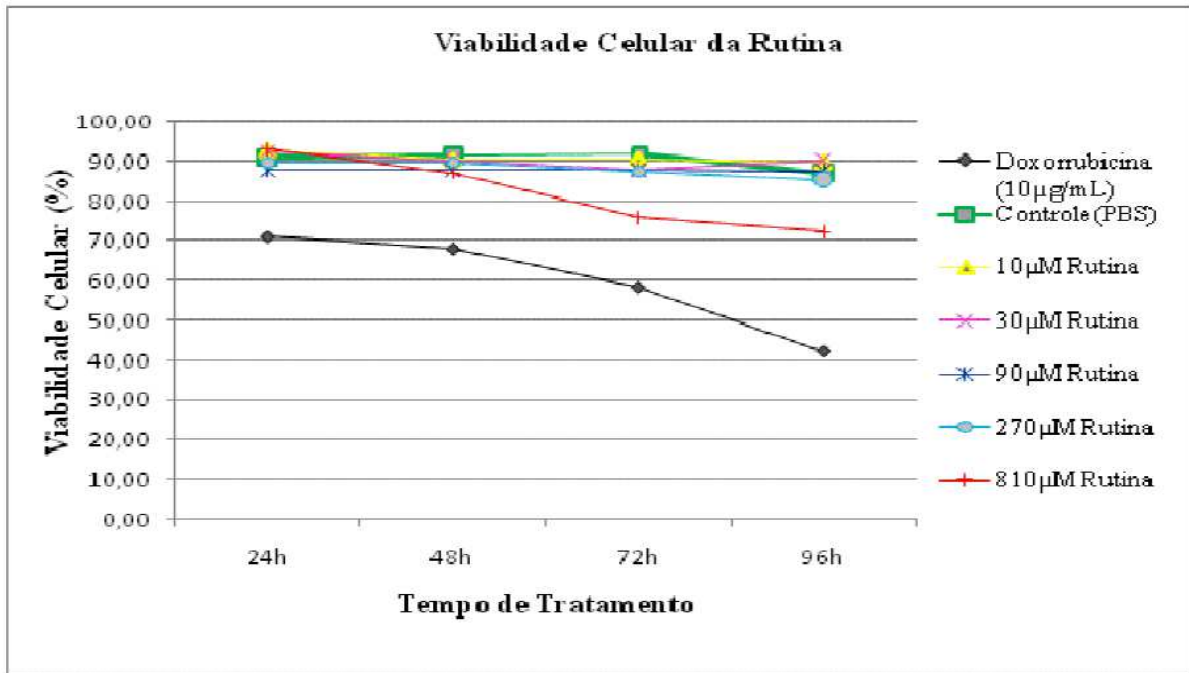
A Figura 1 demonstra os resultados de absorbância obtidos no teste MTT em células HTC tratadas com rutina. O resultado da leitura do ensaio de citotoxicidade medido espectrofotometricamente, mostrou que as concentrações 10 $\mu$ M, 30 $\mu$ M, 90 $\mu$ M, 270 $\mu$ M e 810 $\mu$ M de rutina após 24 e 48h de tratamento, tiveram uma absorbância equivalente com a do controle, ou seja, nenhuma dose foi citotóxica para as células HTC. Deste modo, utilizamos as cinco concentrações de rutina para os demais testes realizados. A atividade citotóxica foi observada apenas na concentração de 810 $\mu$ M de rutina após 72 horas de tratamento.



**Figura 1** – Absorbância média observada no Ensaio MTT após tratamento de 24, 48 e 72 horas com a rutina. \*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0.001$ )

#### 3.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – AZUL DE TRYPAN

Os resultados da viabilidade celular (Figura 2) demonstraram que as concentrações de 10 $\mu$ M, 30 $\mu$ M, 90 $\mu$ M, 270 $\mu$ M de rutina foram maiores que 85% nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas, ou seja, os tratamentos apresentaram a viabilidade semelhante ao controle.

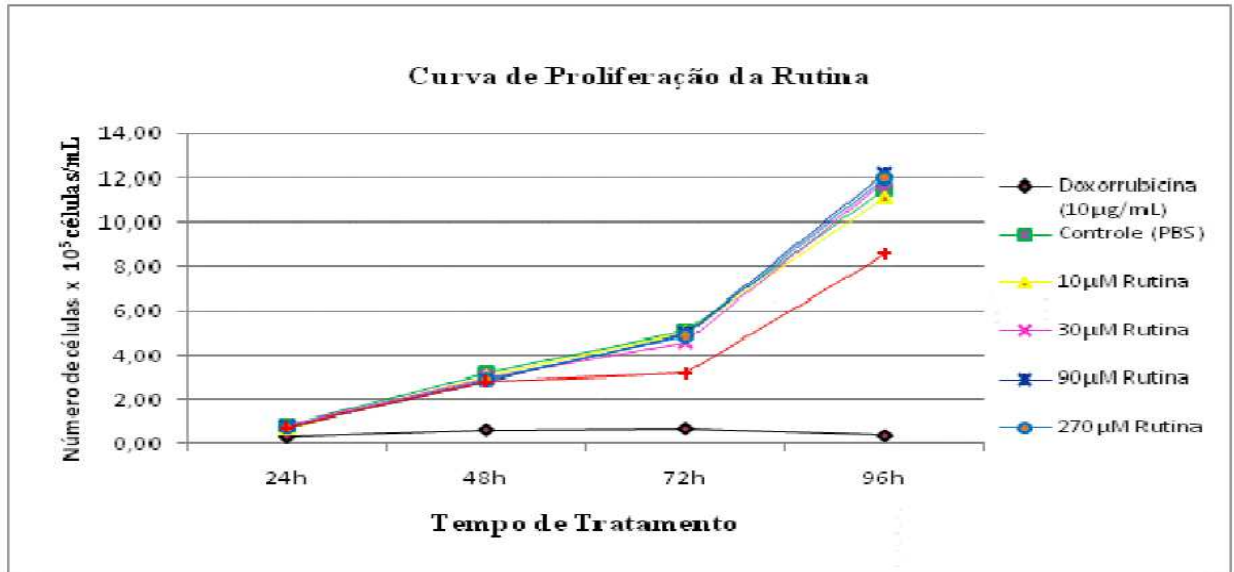


**Figura 2** – Viabilidade celular em células HTC tratadas com rutina nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h.

Contudo, a maior concentração testada da rutina (810µM) demonstrou viabilidade celular semelhante ao controle somente nos tempos de 24 e 48 horas de tratamento, sendo que após 72 e 96 horas houve uma redução significativa na viabilidade. Os resultados mostram também que a doxorrubicina apresentou curva tempo dependente, ou seja, quanto maior o tempo de exposição a droga, menor a viabilidade celular. A curva de tratamento com a maior concentração de rutina (810 µM) apresentou o mesmo padrão, porém com menor intensidade.

### 3.3 ENSAIO DE CINÉTICA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

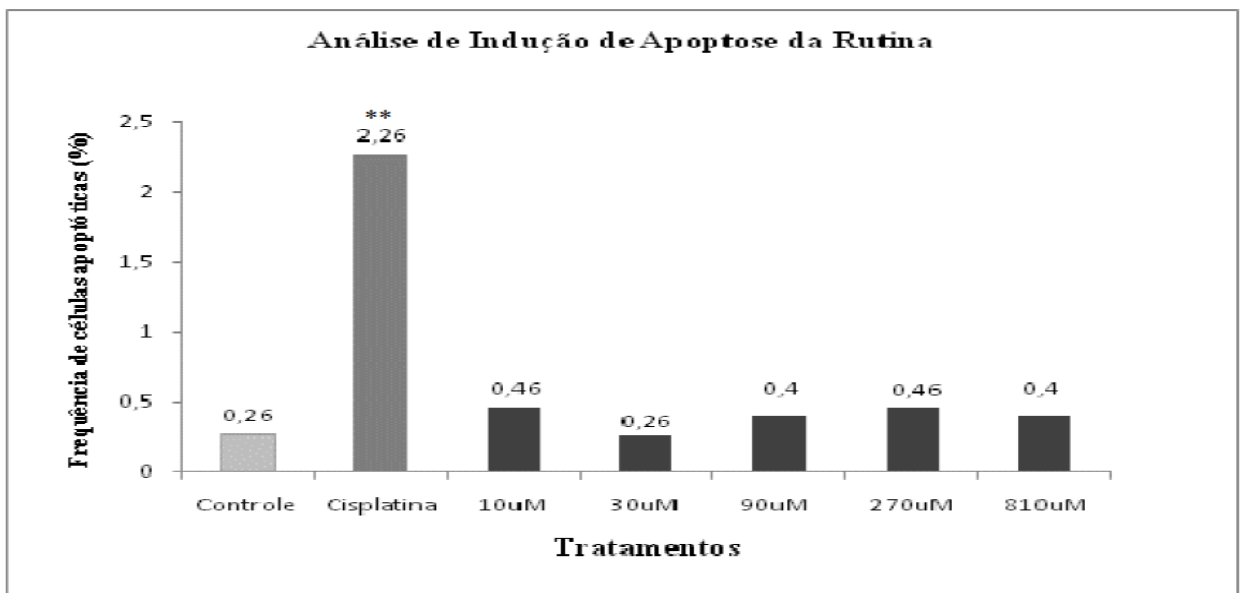
A Figura 3 mostra os resultados da proliferação celular realizados nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Estes resultados demonstraram que as concentrações de 10µM, 30µM, 90µM, 270µM de rutina não alteraram a curva de crescimento das células HTC, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Porém, a maior concentração testada da rutina (810µM) alterou o ciclo celular diminuindo o número de células HTC somente nos tempos de 72 e 96 horas de tratamento, uma vez que os resultados foram estatisticamente diferentes do controle. Essa concentração de rutina apresentou curva tempo dependente como a doxorrubicina, No entanto, a rutina reduziu a proliferação com menor intensidade.



**Figura 3** – Cinética de proliferação em células HTC tratadas com rutina nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h.

### 3.4 ENSAIO DE INDUÇÃO DE APOPTOSE IN SITU

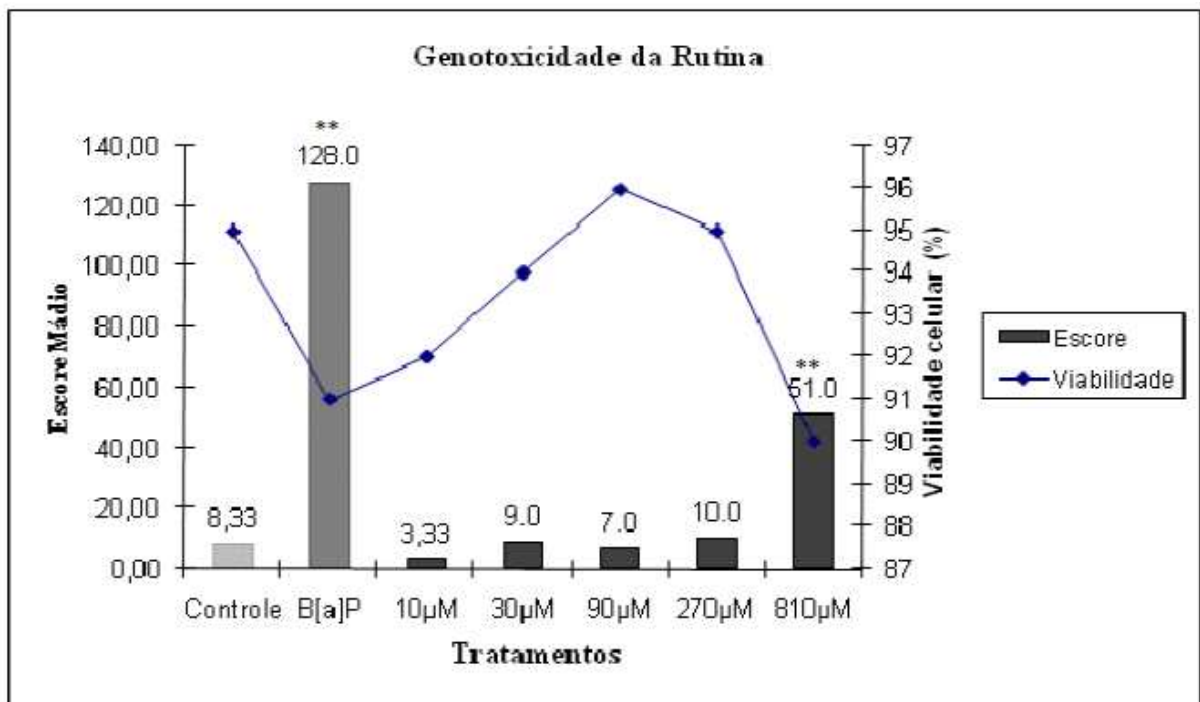
O número de células apoptóticas encontrado em cada tratamento após 24 horas de tratamento com as concentrações 10µM, 30µM, 90µM, 270µM e 810µM de rutina está na Figura 4, na qual podemos observar que nenhuma concentração de rutina testada induziu apoptose, uma vez que os resultados foram semelhantes ao controle.



**Figura 4** – Frequência de células apoptóticas encontradas após tratamento de 24 horas com cinco concentrações diferentes do flavonóide rutina em células HTC. Análise de 1.500 células por tratamento. Controle (PBS); Cisplatina 20µM. \*\*Diferença significativa em relação ao controle.

### 3.5 ENSAIO DO COMETA (SCGE)

Os dados analisados para a avaliação da genotoxicidade da rutina estão na Figura 5 e Tabela 1. A análise estatística demonstrou que as concentrações 10 $\mu$ M, 30 $\mu$ M, 90 $\mu$ M, 270 $\mu$ M após 24 horas de tratamento não apresentaram efeito genotóxico com escores semelhantes ao controle. Entretanto, a maior concentração, 810 $\mu$ M de rutina foi genotóxica, pois apresentou danos primários no DNA exclusivamente de classe I.



**Figura 5** – Escore médio de cometas observados em células HTC (barras) e viabilidade celular (linha) encontrada após o tratamento de 24 horas com cinco concentrações do flavonóide rutina em células HTC. Análise de 300 células por tratamento. Controle (PBS), (B[a]P): Benzo[a]pireno - 80 $\mu$ M \*\*Diferença significativa em relação ao controle.

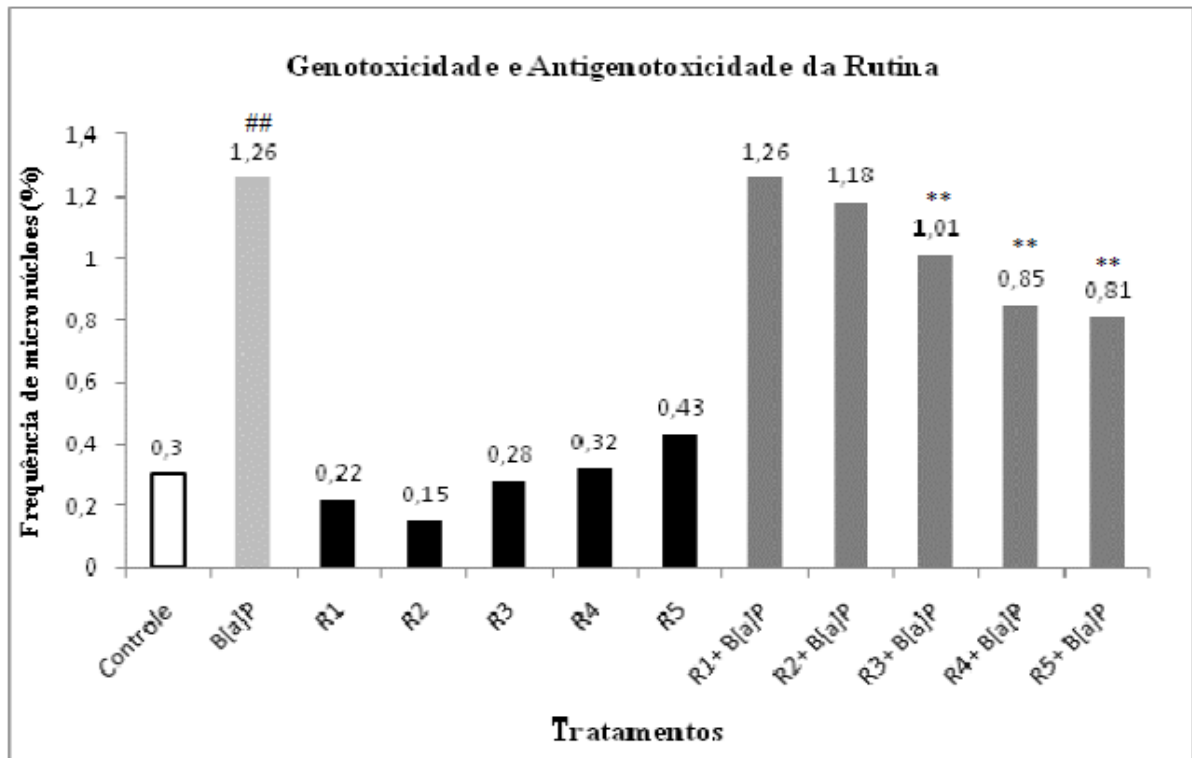
**Tabela 1** – Frequência média de células com dano, distribuição das classes de danos e escore referente ao teste de genotoxicidade em células HTC após tratamento com o flavonóide rutina (Media  $\pm$  Desvio Padrão):

Tratamento	Total de cel. c/ dano	Classes do Cometa				Escore
		0	1	2	3	
Controle	8,33 $\pm$ 1,53	91,66 $\pm$ 1,53	8,33 $\pm$ 1,53	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	8,33 $\pm$ 1,53
B[a]P	95,33 $\pm$ 3,05**	4,66 $\pm$ 3,05	66,33 $\pm$ 11,01	25,33 $\pm$ 5,13	3,66 $\pm$ 3,21	128,00 $\pm$ 8,18**
10 $\mu$ M de rutina	3,33 $\pm$ 2,31	96,66 $\pm$ 2,31	3,33 $\pm$ 2,31	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3,33 $\pm$ 2,31
30 $\mu$ M de rutina	9,00 $\pm$ 2,00	91,00 $\pm$ 2,00	9,00 $\pm$ 2,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	9,00 $\pm$ 2,00
90 $\mu$ M de rutina	7,00 $\pm$ 1,00	93,00 $\pm$ 1,00	7,00 $\pm$ 1,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	7,00 $\pm$ 1,00
270 $\mu$ M de rutina	10,00 $\pm$ 2,64	90,00 $\pm$ 2,64	10,00 $\pm$ 6,64	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	10,00 $\pm$ 2,64
810 $\mu$ M de rutina	51,00 $\pm$ 15,72**	49,00 $\pm$ 15,72	51,00 $\pm$ 15,72	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	51,00 $\pm$ 15,72**

**Legenda:** Controle (PBS), (B[a]P): Benzo[a]pireno - 80 $\mu$ M. 300 células analisadas por tratamento. Análise estatística: Teste de Dunnet ( \*\*diferença estatística significativa em relação ao controle negativo, P < 0.01). Foram analisadas 300 células por tratamento.

### 3.6 ENSAIO DO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE (MNCTB)

A Figura 6 e a Tabela 2 apresentam os dados analisados para a avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade da rutina. A análise estatística demonstrou que nenhuma das concentrações testadas da rutina após 24 horas de tratamento foi genotóxica.



**Figura 6** – Freqüência de células binucleadas com micronúcleo encontradas após tratamento de 24 horas com rutina em células HTC. Controle (PBS), B[a]P: Benzo[a]pireno (20µg/ml), R1: 10µM de rutina, R2: 30µM de rutina, R3: 90µM de rutina, R4: 270µM de rutina, R5: 810µM de rutina. Análise de 6.000 células por tratamento. \*\*Diferença estatisticamente significativa em relação ao B[a]P ( $p < 0.01$ ). ## Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0.001$ ).

**Tabela 2** – Avaliação da genotoxicidade e antígenotoxicidade do flavonóide rutina em células HTC. Total de células binucleadas com micronúcleo, valor médio encontrado de células micronucleadas e respectivo nível de significância (p) obtido no Test-t:

Tratamentos	Total céls. c/ MN	Média ± DP	% Redução de danos	p
<b>Genotoxicidade</b>				
Controle	18	6,00 ± 1,00	-	0.0001
B[a]P	76 <sup>a***</sup>	25,33 ± 1,04	-	0.0001
10µM de rutina	13 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,58	-	0.0550
30µM de rutina	9 <sup>a</sup>	6,67 ± 0,58	-	0.6779
90µM de rutina	17 <sup>a</sup>	5,67 ± 2,09	-	0.6779
270µM de rutina	19 <sup>a</sup>	6,33 ± 1,58	-	0.9999
810µM de rutina	26 <sup>a</sup>	8,66 ± 1,53	-	0.102
<b>Antigenotoxicidade</b>				
10µM de rutina + B[a]P	76 <sup>b</sup>	25,33 ± 1,52	-	0.9999
30µM de rutina + B[a]P	71 <sup>b</sup>	23,33 ± 3,21	-	0.4411
90µM de rutina + B[a]P	61 <sup>b**</sup>	20,33 ± 1,5	36,76	0.0094
270µM de rutina + B[a]P	51 <sup>b**</sup>	17,00 ± 2,00	51,47	0.0031
810µM de rutina + B[a]P	49 <sup>b**</sup>	16,33 ± 3,21	54,41	0.0099

**Legenda:** <sup>a</sup> Comparado com o Controle; <sup>b</sup> Comparado com o B[a]P: Benzo[a]pireno - 80µM. Análise de 6.000 células por tratamento. \*\*Diferença estatisticamente significativa em relação ao B[a]P (p < 0,01); \*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p < 0,001).

A avaliação das associações entre a rutina e o benzo[a]pireno demonstraram que a atividade antígenotóxica foi verificada de forma estatisticamente significativa somente nas concentrações de 90µM, 270µM e 810µM de rutina, sendo a porcentagem de redução de danos (%RD) de 36,7%, 51,4% e 54,4%, respectivamente.

A Tabela 3 mostra os resultados do Índice de divisão nuclear (IDN). Os resultados revelam que nenhum tratamento alterou o IDN em relação ao grupo controle.

**Tabela 3** – Valor médio e desvio padrão de 1.500 células analisadas por tratamento referente ao Índice de Divisão Nuclear (IDN) após tratamento de 24h com o flavonóide rutina em células HTC e seu respectivo nível de significância (p) obtido no Test-t:

<b>Tratamentos</b>	<b>IDN Média ± DP</b>	<b>p</b>
Controle	1,907 ± 0,06	--
B[a]P	1,948 ± 0,052	0,4412
10µM de rutina	1,959 ± 0,023	0,7641
30µM de rutina	1,912 ± 0,013	0,3153
90µM de rutina	1,921 ± 0,026	0,4652
270µM de rutina	1,943 ± 0,046	0,9013
810µM de rutina	1,948 ± 0,031	0,9859
10µM de rutina + B[a]P	1,950 ± 0,006	0,1328
30µM de rutina + B[a]P	1,918 ± 0,029	0,3677
90µM de rutina + B[a]P	1,936 ± 0,006	0,9137
270µM de rutina + B[a]P	1,925 ± 0,020	0,2919
810µM de rutina + B[a]P	1,917 ± 0,020	0,2246

**Legenda:** B[a]P : Benzo[a]pireno ( 20µg/ml).

## 4 DISCUSSÃO

Os flavonóides são compostos polifenólicos que ocorrem naturalmente em varias espécies de plantas. Eles são utilizados principalmente como fonte de matéria-prima na industria farmacêutica e alimentícia e apresentam inúmeras atividades biológicas de interesse como, por exemplo: capacidade antioxidante, ação antiinflamatória e estimulante do sistema imunológico (Harborne e Williams, 2000). Estudos complementares de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade apontam que a maioria dos flavonóides (como catequinas, genisteína, daizeína, rutina, entre outros) apresenta resultados negativos para esses testes (Hollman e Katan, 1996; Nijveldt et al., 2001; Birt et al., 2001; Yao et al., 2004). No entanto, outras pesquisas apontam que alguns flavonóides, como a quercetina, possuem efeito tóxico e genotóxico (Silva et al. 2002; Soares et al., 2006). Por haver resultados controversos em relação aos flavonóides, pesquisas sobre o nível de segurança são de extrema importância.

Entre os flavonóides a rutina é considerada um potente antioxidante com amplo espectro de aplicações, cujas atividades biológicas e níveis de segurança devem ser estabelecidos. Nosso trabalho demonstrou que somente a maior concentração de rutina (810 $\mu$ M) apresentou efeito citotóxico sobre as células HTC no ensaio de citotoxicidade MTT, após 72h de tratamento. O mesmo tipo de efeito citotóxico foi evidenciado pelo ensaio de viabilidade celular, onde a concentração de 810 $\mu$ M reduziu significativamente a sobrevivência das células HTC, após 72 e 96 horas. Essa mesma concentração e tempos de tratamento também apontam uma redução na proliferação celular observada através da curva de crescimento.

Jyh-Ming-Chow et al. (2005) avaliaram o potencial citotóxico da rutina em células RAW264.7 (linhagem de medula óssea de camundongos) utilizando o ensaio MTT. Após 12 horas de tratamento, a rutina nas concentrações de 25, 50, e 100 $\mu$ M não apresentou nenhum efeito tóxico para essa linhagem celular. A ausência de efeito citotóxico também foi observada por Iffert et al. (2000) utilizando o ensaio MTT em três linhagens diferentes de células de câncer de mama (MaTu p19, MaTu 0.1 e MaTu 0.25), na concentração de 94,8  $\mu$ M de rutina após 24 horas de tratamento. Esses autores sugerem o consumo de alimentos com o flavonóide rutina, uma vez que ela não apresenta nenhum efeito prejudicial à saúde, além de proteger a célula contra os radicais livres.

Em nossas condições experimentais, concentrações maiores (810  $\mu$ M) e um maior tempo de exposição (72 e 96 horas), revelaram uma capacidade citotóxica dessa substância. Lee et al. (2004), demonstraram que a rutina, em concentração de 50 $\mu$ M por 24 horas de tratamento, já apresentou efeito citotóxico sobre células NCI-H889 (câncer de

pulmão humano), utilizando o ensaio do MTT. Os resultados deste trabalho propõem que o flavonóide rutina pode ser um importante aliado no combate a tumores de pulmão humano.

Romero et al. (2002) demonstraram a capacidade da rutina em inibir a proliferação em células LNCaP (câncer de próstata) nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Os resultados mostraram que a rutina, nas concentrações de 50 e 75  $\mu\text{M}$ , inibiu a proliferação celular a partir de 24 horas de tratamento. Os autores recomendam estudos *in vivo* para elucidar o papel inibidor da rutina em células neoplásicas.

Os dados de citotoxicidade desses trabalhos com a rutina, refletem a suscetibilidade variável (maior ou menor) de cada tipo celular testado, correlacionado com as concentrações testadas. Talvez as especificidades metabólicas de cada tipo celular interfiram diretamente no efeito da rutina, contudo estudos dos mecanismos moleculares devem ser desenvolvidos para um melhor entendimento do papel da rutina na anticarcinogênese.

Kennedy (2002) demonstrou que alguns flavonóides reduzem a viabilidade das células tumorais de Ehrlich. Alguns mecanismos de ação estão relacionados com a redução da atividade da ornitina descarboxilase, glutatona celular e de proteínas que contem o grupo SH (sulfidrílo). Talvez esse mecanismo possa estar envolvido com a redução da viabilidade das células HTC, uma vez que estas proteínas estão relacionadas com a proteção celular.

O resultado observado em nossas células pode estar relacionado as características celulares da HTC como por exemplo, a sua origem celular (hepatoma de *Rattus norvegicus*), o que lhe permite ser exposta a quantidades maiores de rutina, antes de apresentar o efeito citotóxico devido a sua capacidade metabolizadora de drogas.

A redução da proliferação celular e da viabilidade celular em altas concentrações podem estar relacionadas não apenas com o efeito toxico sobre o metabolismo das células ou seu material genético por interação direta com o DNA, mas também com a indução do processo de apoptose. Dessa forma, realizamos a avaliação da capacidade da rutina em induzir a apoptose. Nossos dados apontam que nenhuma concentração de rutina, apos 24 horas de tratamento, induziu a apoptose. Outros estudos mostram que a rutina, não e capaz de induzir a apoptose em: células BV-173 (leucemia) na concentração 200 $\mu\text{M}$  apos 24 horas de tratamento (Matsui et al. 2005); em células musculares de rato na concentração de 30 $\mu\text{M}$ , apos 18 horas de tratamento (Ruiz et al. 2006) e em células HT-29 (câncer de cólon), na concentração de 100 $\mu\text{M}$  apos 24 horas de tratamento (Woo et al., 2005a). Deste modo, parece que a atividade citotóxica da rutina e a redução da viabilidade celular encontradas em nossos experimentos e demonstradas na literatura, acontecem por vias metabólicas que não

envolvem o processo de morte celular programada, contudo efeitos no metabolismo celular podem levar tempos maiores (>72h) para serem visualizados. Portanto, como encontramos efeito tóxico em tempos acima de 48h sugerimos que novos testes deverão ser realizados para avaliar a apoptose com maiores tempos de tratamento.

De acordo com Romero et al. (2002), a rutina induziu a apoptose em células LNCaP (câncer de próstata) nas concentrações de 50 e 75  $\mu\text{M}$  a partir de 24 horas de tratamento, porém o maior índice de células apoptóticas foi após 72 e 96 horas de tratamento com 75  $\mu\text{M}$  de rutina.

Segundo Woo et al. (2005b), alguns flavonóides como quercetina e genisteína inibem a proliferação celular pela modulação da atividade de ciclinas dependentes de quinases, moléculas chave envolvidas na regulação do ciclo celular. Os flavonóides causam paralisação do crescimento de células tumorais por impedirem a progressão da fase G0-G1 do ciclo celular, levando subsequentemente as células a apoptose. A paralisação do ciclo celular é mediada através da indução de fatores nucleares e da baixa modulação da ciclina D1 e E. Essa paralisação também pode estar associada com a inibição de CDK2, CDK4, CDK5 e pela expressão de inibidores de cdk (p21 e p27). Talvez as ciclinas também sejam alvos de ação da rutina semelhante a outros flavonóides.

Devido as atividades biológicas de interesse apresentadas pela rutina, realizamos os testes de genotoxicidade a fim de verificar se o efeito citotóxico encontrado na maior concentração (810 $\mu\text{M}$ ) se deve a danos no material genético.

Os resultados obtidos no Ensaio do Cometa mostraram que somente a maior concentração de rutina (810 $\mu\text{M}$ ) após 24 horas de tratamento apresentou atividade genotóxica, porém com danos no DNA exclusivamente de classe 1, ou seja leves. De acordo com esse resultado, o efeito citotóxico encontrado na maior concentração de rutina pode estar relacionado com os danos no DNA primários detectados no ensaio do Cometa. No entanto, realizamos o Ensaio do Micronúcleo para verificar se as lesões no DNA causadas pela maior concentração de rutina resultaram ou não em mutação cromossômica, uma vez que os danos primários detectados pelo ensaio do Cometa podem ser reparados.

Os resultados obtidos no Ensaio do MNCtB apontam que nenhuma concentração testada de rutina apresentou potencial genotóxico, uma vez que a quantidade de micronúcleo observada nas células HTC tratadas com rutina foi semelhante ao controle. Os resultados demonstraram também que a rutina não altera o IDN. Desse modo, a ausência de micronúcleo pode sugerir que os danos leves encontrados no ensaio do cometa não são convertidos em danos efetivos, ou seja, mutação, sendo portanto reparados pelo eficiente

sistema de reparo de danos no DNA das células. O estudo da cinética celular pelo IDN demonstra também que não houve diferença entre os tratamentos, sugerindo que não ha perda celular ou modificação significativa no ciclo celular que mascarasse a observação de micronúcleos nas células analisadas.

Estudos complementares *in vivo* mostram que camundongos tratados via gavagem com 625, 1250 e 2500mg/kg de rutina por dois dias consecutivos não apresentam danos primários no DNA e nem formação de micronúcleos em célula de medula óssea de camundongos (SILVA et al. 2002).

Na avaliação do efeito protetor, as associações entre a rutina e o agente indutor de danos no DNA, o benzo[a]pireno, verificamos que de forma estatisticamente significativa somente nas três maiores concentrações 90, 270 e 810 $\mu$ M foram protetoras, sendo a porcentagem de redução de danos de 36,7%, 51, 4% e 54,4%, respectivamente

Nossos resultados corroboram com os obtidos por Hyun-Jung e seus colaboradores (2000), uma vez que os autores avaliaram vários flavonóides quanto a capacidade de inibir a citotoxicidade em células HepG2 induzida pelo benzo[a]pireno (B[a]P). Neste trabalho as células foram tratadas com 4 $\mu$ M do agente indutor e 131,8 $\mu$ M de rutina por 72 horas. Essa quantidade de rutina foi suficiente para reduzir em 50% a citotoxicidade do B[a]P.

De acordo com Hyun-Jung e seus colaboradores (2000) os possíveis mecanismos que envolvem a proteção das células hepáticas (HepG2, HTC) contra os danos do B[a]P envolve duas categorias: 1) inativação de enzimas de biotransformação do citocromo P450 (fase I) que leva a formação reduzida de metabolitos reativos e aductos de DNA; 2) interação direta com os derivados dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, porem mais estudos são necessários para obter o mecanismo de ação da atividade protetora dos flavonóides.

Diante dos resultados obtidos considera-se que o flavonóide rutina nas condições avaliadas, não diminuiu a viabilidade, não reduziu a proliferação e não induziu a apoptose nas células hepáticas (HTC) apos 24 horas de tratamento, mas pode ter efeito prejudicial em tempos maiores de exposição (72h). Embora o efeito genotóxico evidenciado no Ensaio do Cometa para a maior concentração, a rutina apresentou efeito protetor, alem de não induzir a formação de micronúcleos.

Nossos resultados juntamente com os dados na literatura decorrentes de pesquisas envolvendo a rutina tem permitido o aprofundamento do entendimento dos mecanismos de ação desse flavonóide e sua importância para a saúde, porem são necessários novos estudos moleculares que possam elucidar a interação dessas moléculas na biologia celular e suas conseqüências para a saúde humana.

## REFERÊNCIAS

- Afanas' ev IB (2001) Oxidative stress in rheumathoid arthritis leukocytes: supression by rutin and other antioxidants and chelators. *Bioch Pharmal* 62:743-746
- Autore G, Rastrelli L, Lauro ML, Marzocc P, Sorrentino M, Sorrentino U, Pinto O, Aquino R (2001) Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonols. *Life Sciences* 70:523-534
- Bagchi M, Bagchi SJ, Stohs SD, Ray CK, Sen HG (2002) Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957:260-270
- Birt DF, Hendrich P, Weiqun W (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Plant Foods Hum Nut* 48:112-120
- Das A, Wang JH, Lien EJ (1994) Carcinogenicity, mutagenicity and cancer preventing activities of flavonoids: a structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. *Progress in Drug Res* 42: 133-167
- Deschner J, Ruperto G, Wong HL (1991) Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* 12:1193-1196
- Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutation Res* 455:81-95
- Flores J, Gonzalez-Gallego JM, Culebras P (2002) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hos* 17:271-278
- Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem* 55:481-504
- Hirano R, Tokorozawa S, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K (2001) Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nut Sci Vitam* 475: 57-362
- Hollman PCH, Katan MB (1996) Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem* 57:43-46
- Hyun-Jung K, Hyang-Sook C, Yang R (2000) Inhibition of benzo[a]pyrene-induced cytotoxicity and cytochrome P4501A activity by dietary flavonoids in human liver cell model: structure-activity relationship. *Biotech Letters* 22:1941-1946

- Iffert T, Soldan M, Moeller A, Maser E (2000) Modulation of daunorubicin toxicity by liposomal encapsulation and use of specific inhibitors in vitro. *Toxicology* 144:189–195
- Janbaz A, Sheikh A, Saeedb AH (2002) Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia* 73:557–563
- Jyh-Ming-Chow SC, Shen SK, Huan HY, Lin YC, Chen O (2005) Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via anti-oxidant. *Bioch Pharm* 69:1839–1851
- Kennedy DO, Kojima A, Moffati J (2002) Cellular thiol status-dependent inhibition of tumor cell growth via modulation of retinoblastoma protein phosphorylation by (-)-epigallocatechin. *Cancer Letters* 179:25-32
- Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T (1995) A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun* 3:103-115
- Lee CS, Park SY, Ko HH, Han ES (2004) 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
- Lima LRP, Oliveira TT, Oliveira MGA, Nagem TJ, Pinto ASP, Gomes SM (1999) Determinacao da atividade de lipase na presenca de Morina, Naringenina, Naringina e Rutina. *Cienc Agrotec Lavras* 23:626-631
- Matsui J, Kiyokawa U, Takenouchi, T, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa M, Saito M, Tang W, Katagiri U, Okita H, Fujimoto J (2005) Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Res* 29:573–581
- Mosmann T (1983) Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immun Meth* 65:55-56
- Nijveldt RJ, Nood EV, Hoorn DECV, Boelens PG, Norren KV (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Amer J Clin Nut* 4:418 – 425
- Oliveira JM, Jordao BQ, Ribeiro LR, Ferreira DA, Eira A, Mantovani MS (2002) Antigenotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murril lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. *Food and Chem Toxic* 40: 1775-1780
- Pathak D, Pathak K, Singla AK (1991) Flavonoids as medicinal agents: recent advances. *Fitoterapia* 57:371-389

- Romero A, Pa' ez A, Ferruelo M, Luja N, Berenguer A (2002) Polyphenols in red wine inhibit the proliferation and induce apoptosis of LNCaP cells. *BJU Intern* 89:950–954
- Rovozzo GC, Burke CN (1973) *A manual of basic virological techniques*. New Jersey: Prentice Hall
- Ruiz E, Padilla E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A (2006) Kaempferol inhibits apoptosis in vascular smooth muscle induced by a component of oxidized LDL. *Eur J Pharm* 529:79–83
- Silva J, Hermann SM, Heuser W, Marroni N, Gonzalez-Gallego J, Erdtmann B (2002) Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxic* 40:941–947
- Soares EA, Varanda B, MSG, Raddi B (2006) In vitro basal and metabolism-mediated cytotoxicity of flavonoids. *Food Chem Toxic* 44:835–838
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagenesis* 35: 206–221
- Woo K, Myung H, Banga ES, Kima E, Kyeong C (2005a) Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr Biochem* 6:155–162
- Woo K, Jeong RB, Hawes CM (2005b) Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology. *R Biotech Letters* 27:365–374
- Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta n, Singanusong R, Chen SS (2004) Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* 59:113 - 122
- Youdim Ka (2002) Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *J Nutr Biochem* 13:282 - 288,
- Yu CB, Swaminathan B, Butler LG, Pratt DE (1986) Isolation and identification of rutin as the major mutagenic of red wine. *Mutation Res* 170:103–113

## REFERÊNCIAS

- AARDEMM, M.J.; KIRSCH-VOLDERS, M. The in vitro micronucleos assay. In: CHOY WN (Ed). **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. 1ed. New York: Marcel Dekkerp. 163-186, 2001.
- 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. Strutral aspects of antioxidant activy of flavonoids. **Free Radical Biology Medicine**. v.20, n.3. p.331-342, 1996.
- AFANAS'EV, I.B.; DOROZHKO, A.I.; BRODSKII, A.V.; KOSTYUK, V.A.; POTAPOVITCH, A.I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lip peroxidation. **Biochemical Pharmacology**. v.38, n.11, p.1763-1769, 1989.
- AGNES, M.; RIMANDO, A.M.; SUH, N. Biological/Chemopreventive Activity of Stilbenes and their Effect on Colon Cancer. **Planta Medica**. v. 74, p.1635–1643, 2008.
- ALMEIDA, D.C.G.; BOAVENTURA, M.F.C. Fases do crescimento celular – curva de crescimento. In: PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.35-37. 2005.
- ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology Medicine**. v.24, n.9, p. 1355, 1998.
- 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.
- BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods Enzymol**. v.186, p. 343-355, 1990.
- BRUSICK, D.J. **Principles of genetic toxicology**, New York: Plenum Press; 284 p. 1987
- CASTELL, J. V.; GOMEZ-LECHON, M. J.; PONSODA, X.; BORT, R. The use of cultured hepatocytes to investigate the mechanisms of drug hepatotoxicity. **Cell Biology and Toxicology**. v.13, p. 331-338, 1997.
- CHOY, W. N. Regulatory genetic toxicology tests. In: CHOY WN (Ed). **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. 1ed. New York: Marcel Dekker, p. 93-114. 2001.

- CHUN-LI-YU, B.; SWAMINATHAN, B.; BUTLER, L.G.; PRATT, D.E. Isolation and identification of rutin as the major mutagenic of red wine. **Mutation Research**. v.170, p. 103-113, 1986.
- CLAUS JACOB, C.; ANWAR, A.; BURKHOLZ, T. Perspective on Recent developments on Sulfur-Containing Agents and Hydrogen Sulfide Signaling. **Planta Medica**, v. 74, p.1580–1592, 2008.
- COLLIER, A.C.; PRITSOS, C.A. The mitochondrial uncouple dicumarol disrupts the MTT assay **Biochemistry & Pharmacy**. n.66, p.281-287, 2003.
- COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**, 26: 249-261, 2004.
- CONNAY, A.H. Enzyme induction and dietary chemicals as approaches to cancer chemoprevention: the Seventh DeWitt S. Goodman Lecture. **Cancer Research**, v. 63, p.7005-7031, 2003.
- DAS, A.; WANG, J.H.; LIEN, E.J.; Carcinogenicity, mutagenicity and cancer preventing activities of flavonoids: a structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. **Progress in Drug Research**. v.42, p.133-167, 1994.
- DE FLORA, S.; FERGUNSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 591, p. 8-15, 2005.
- DE FLORA, S.; FERGUSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 591, p. 8-15, 2005.
- DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 402, p. 151-158, 1998.
- 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.
- DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology and Toxicology**. v.25. p.5-32, 2009.
- DINKOVA-KOSTOVA, A.T. Phytochemicals as Protectors Against Ultraviolet Radiation: Versatility of Effects and Mechanisms. **Planta Medica**, v 74, p.: 1548–1559, 2008.
- DUTY, S. ;SINGH, N.; MANORI J.; DANA B. ; BROCK, W. ; RYAN, P.; HERRICK, R.; CHRISTIANI, D.; HAUSER, R. The Relationship between Environmental Exposures to Phthalates and DNA Damage in Human Sperm Using the Neutral Comet Assay. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p. 148-159, 2003.

- EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; 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.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol. Pathol.** v.34, p. 495-516. 2007.
- ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, , cap. 1, p. 23-46. 2003
- FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W. P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The Human Micronucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research** 428: 271-283, 1999.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research** 455: 81-95, 2000.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research** 600: 58-66, 2006a.
- FENECH, M. Commentary on the SFTG international collaborative study on the in vitro micronucleus test: To Cyt-B or not to Cyt-B? **Mutation Research** 607: 9-12, 2006b
- FERGUSON, L. R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation Research**, v. 307, p. 395-410, 1994.
- FERGUSON, L. R.; PHILPOTT, M.; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicology**, v. 198, p. 147-159, 2004.
- FERGUSON, L. R.; PHILPOTT, M.; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicology**, v. 198, p. 147-159, 2004.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171-177, 2006.
- FRANCY-GUILFOR, J.; PEZZUTO, J. M. Mechanisms of Cancer Chemopreventive Agents: A Perspective. **Planta Medica**. v. 74, p.1644–1650, 2008.

- GAIVAO, I.; PIASEK, A.; BREVIK, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A. Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intraindividual variation. **Cell Biol Toxicol**, v. 25, p: 45–52, 2009.
- GALLATI, E.M.; HEINEN, E.; SAEED, S.A. Chemical characterization and biological effects of Sicilin *Opuntia ficus indica*. Mill, fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p.4903-4908, 2003.
- GANTENBEIN-RITTER, B.; POTIER, E.; ZEITER, S.; SPRECHER, C. M.; ITO, K. Accuracy of Three Techniques to Determine Cell Viability in 3D Tissues or Scaffolds. **Tissue Engineering, Part C: Methods**. n.18, 2008.
- GAZZONI, D. L.; HULSMEYER, A.; HOFFMANN-CAMPO, C.B. Efeito de Diferentes Doses de Rutina e de Quercetina na Biologia de *Anticarsia gemmatilis* Hubner, 1818 (Lep., Noctuidae). **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. V.37, N. 7, 1997.
- GERHAUSER, C. Cancer Chemopreventive Potential of Apples, Apple Juice, and Apple Components. **Planta Medica**, v. 74, p. 1608–1624, 2008.
- GESCHER, A. J. Resveratrol from Red Grapes – Pedestrian Polyphenol or Useful Anticancer Agent? **Planta Medica**, v. 74, p.1651–1655, 2008.
- GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**, Canoas: Ulbra, cap. 10, p. 247-271, 2003.
- GUYTON, K.Z.; KYLE, D.K.; AUBRECHT, J.; COGLIANO, V.J.; EASTMOND, D.A.; JACKSON, A.; KESHAVA, N.; SANDY, M.S.; SONAWANE, B.; ZHANG, L.; WATERS, M.D.; SMITH, M.Y. Improving prediction of chemical carcinogenicity by considering multiple mechanisms and applying toxicogenomic approaches. **Reviews in Mutation Research**. doi:10.1016/j.mrrev.2008.10.001, 2008.
- HARTMAN, P. E.; SHANKEL, D. M.. Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. **Envir. Molec. Mutagenesis**, v. 15, p. 145-182, 1990.
- HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research** 18: 187-190, 1973.
- HENRIQUES, A.T. Alcaloides, generalidades e aspectos básicos. In: Simoes C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1a ed., Porto Alegre: Florianopolis. P.641-655. 1999.

- HERTOG, M. G. L.; HOLLAND, P.C.H. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 50, p. 63–71, 1996.
- HOLLMAN, P.C.H.; HERTOG, M.G.L.; KATAN, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**. v.57, n.1, p.43-46, 1996.
- IARMARCOVAI, G.; BONASSI, A.; BOTTA, R. A.; ORSIERE, B. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. **Mutation Research**. v.3, p.:215-33, 2008.
- KASSIE, F.; SUNDERMANN, V. M.; EDENHARDER, R.; PLATT, K. L.; DARROUDI, F.; LHOSTE, E.; HUMBOLT, C.; MUCKEL, E.; UHL, M.; KUNDI, M.; KNASMULLER, S. Development and application of test methods for the detection of dietary constituents which protect against heterocyclic aromatic amines. **Mutation Research**, v. 523-524, p. 183-192, 2003.
- 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.
- KHOR, O.; SIWANG, Y.; AH-NG, K. Dietary Cancer Chemopreventive Agents – Targeting Inflammation and Nrf2 Signaling Pathway. **Planta Medica**, v. 74, p.1540–1547, 2008.
- LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonoides. **Revista de Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.17, p.18-22, 2000.
- LOVELAND, B.E.; JOHNS, T.G.; MACKAY, I. R.; VAILLANT, F.; WANG, Z. X.; HERTZOG, P. J. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. **Biochemistry International**. v.27, n.3, p.501-10, 1992.
- LUIZ, R. C. **Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos do Agaricus blazei Murill (Cogumelo do Sol) linhagem AB97/11, in vitro**. Dissertação [Mestrado] – Instituto Agrônomo do Paraná, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2002.
- MACGREGOR, J.; CASCIANO, D.; MULLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutation Research**, v. 455; p: 3–20, 2000.

- MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDIER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie** 88: 1515-1531, 2006.
- MATSURA, R.; SIAED, J.; MORAS, P. Chemical characterization and biological effects of *Petasites japonicus* **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.48, p.1245-1251, 2002.
- MATTSON, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nature Reviews**. v.1, p. 120-129. 2000.
- MERSH-SUNDERMANN, V.; KNASMULLER, S.; WU, X.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. Use of human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology** 198, 329-340. 2004.
- MOON, Y. J.; WANG, X.; MORRIS, M.E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 187-210, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v.65, p.55-63, 1983.
- 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.
- NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.V.; HOORN, D.E.C.V.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.V.; LEEUWEN, P.A.M.V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American journal of clinical Nutrition**. v.4, p.418-25. 2001
- OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Harmonized integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures, 2001. Disponivel em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/48/51/37182285.pdf>> Acesso em: 10/09/2008
- OLIVEIRA, R. J.; RIBEIRO, L. R.; DA SILVA, A. F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of  $\beta$ -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in vitro**, v. 20, p. 1225-1233, 2006 .

- OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 123(1): 291-298, 1984.
- PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**. v.57. n.5, p.371-389, 1991.
- PEDRIALI, A.C. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. Dissertação, Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. USP. 127p. 2005.
- PIPERAKIS, S.M. Comet assay: A brief history. **Cell Biol Toxicol**, v. 25, p:1–3, 2009.
- PLENCHETTE S, FILOMENO R, LOGETTE E, SOLIER S, BURON N, CATHELIN S, SOLARY E. Analyzing markers of apoptosis in vitro. In: SCHONTALL AH (Ed.). **Checkpoints control and cancer. Activation and Regulation Protocols**, 1ed. New Jersey: Humana Press, , p. 313-332. 2004
- RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. La R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação**. Soc. Bras. de Gen./ Rev. Bras. de Gen., 1991, 67p.
- RIMANDO, A. M.; SUH, m. Biological/Chemopreventive Activity of Stilbenes and their Effect on Colon Cancer. **Planta Medica**, v. 74, p. 1635–1643
- REIFFERSCHIED, G.; HEIL, J. Validation of SOS/umu test using results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. **Mutation Research**, n. 369, p. 129-145, 1996.
- RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagenese ambiental na carcinogenese humana. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**, Canoas: Ulbra, 2003, cap. 1, p. 21-26.
- 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, n.3, p. 315-320, 2003.
- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: RIBEIRO LR, SALVADORI DMF, MARQUES EK (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. 1a ed. Canoas: Editora da ULBRA, 2003, p. 201-219.
- 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.

- SCHMALZ, G. Use of cells cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. **Journal Dentist**. v.22, p.6-11, 1994.
- SCHMID, W.; ARAKAKI, D. T.; BRESLAU, N. A.; CULBERTSON, J.C. Chemical mutagenesis. The chinese hamster bone marrow as an in vivo test system, I. Cytogenetic results on basic aspects of the methodology, obtained with alkylating agents. **Humangenetik**, II: 103-118, 1971.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research** 31: 9-15, 1975.
- SILVA, J.; HERMANN, S. M.; HEUSER, W.; PERES, MARRONI, N. GONZALEZ-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**. v.40, p.941-947, 2002.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test), A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. In: HENDERSON, D. S. **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols – Eukaryotic Systems**. Totowa: Humana Press, v. 113, p. 203-211, 1999.
- SPEIT, G.; TRENZ, K.; SCHUTZ, P.; ROTHFUB, A.; MERK, O. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. **Toxicology Letters**, v. 110, p. 73-78, 1999.
- SPEIT, G.; HANELT, S.; HELBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicology Letters**, v. 88, p. 91-98, 1996.
- TAKAHASHI, C. S. Testes citogeneticos in vitro e aneuploidias. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. & MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, cap. 6, p. 151-168.
- THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v.267, p.1456-62, 1995.
- 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.
- VALENTIN, I.; LHUGUENOT, J. C.; CHAGNON, M. C. Uridine uptake inhibition as a cytotoxicity test for human hepatoma cell line (HepG2 cells): comparison with the neutral red assay. **Biochimica et Biophysica Acta**, 794: 373-380, 2000.
- VALENTIN-SEVERIN I, L.E.; HEGARAT, L.; LHUGUENOT, J. C. BON, A.M.; CHAGNON, M.C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, n. 536, p. 79-90, 2003.

- WANG, G.; ZHAO, J.; VASQUEZ, K. M. Methods to determine DNA structural alterations and genetic instability. **Methods**. 2009.
- WASSON, G. R.; MCKELVEY-MARTIN, V. J.; DOWNES, C. S. The use of comet assay in the study of human nutrition and cancer. **Mutagenesis**, v.23, p. 153-162, 2008.
- WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; EVANS, C. R. Flavonoids: antioxidant or signaling molecules? **Free Radical Biology Medicine**. v.36, n.7, p. 838-849, 2004.
- WYLLIE, A. H. Apoptosis, cell death and cell proliferation. 3rd ed. Roche Applied Science manual, 2008.
- YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**. v.59, p.113-122, 2004.
- YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods Hum. Nutr.** Dordrecht, v.59, p. 113-122, 2004.
- YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z.W. SHIMIZU, M. Antioxidant activity of flavones and flavonols in vitro. **Phytotherapy**. v.11. p.446-449. 1997.
- YUAN, Z. Constituents of the underground parts of *Glehnia littoralis*. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**. v.50, n.1, p.73-77, 2002
- ZEIGER, E. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript? **Mutation Research**, 626: 1-3, 2007.

**ANEXOS**

**Tabela 1** – Valores médios  $\pm$  desvio padrão da absorbância obtida no teste de citotoxicidade MTT, após 24 horas de tratamento:

Parâmetros	Absorbância
	Média $\pm$ Desvio Padrão
C. negativo	0,849 $\pm$ 0,094
C. positivo	0,380 $\pm$ 0,021***
10uM	0,769 $\pm$ 0,053
30uM	0,766 $\pm$ 0,063
90uM	0,762 $\pm$ 0,073
270uM	0,759 $\pm$ 0,096
810uM	0,768 $\pm$ 0,067

C. positivo: Doxorubicina 10  $\mu$ g/mL. ANOVA seguida de Teste de Tukey;  $\alpha = 0.05$  \*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0.001$ )

**Tabela 2** – Valores médios  $\pm$  desvio padrão da absorbância obtida no teste de citotoxicidade MTT, após 48 horas de tratamento:

Parâmetros	Absorbância
	Média $\pm$ Desvio Padrão
C. negativo	0,889 $\pm$ 0,067
C. positivo	0,275 $\pm$ 0,021***
10uM	0,823 $\pm$ 0,052
30uM	0,809 $\pm$ 0,068
90uM	0,815 $\pm$ 0,071
270uM	0,804 $\pm$ 0,067
810uM	0,806 $\pm$ 0,078

C. positivo: Doxorubicina 10  $\mu$ g/mL. ANOVA seguida de Teste de Tukey;  $\alpha = 0.05$  \*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0.001$ )

**Tabela 3** – Valores médios  $\pm$  desvio padrão da absorbância obtida no teste de citotoxicidade MTT, após 72 horas de tratamento:

Parâmetros	Absorbância
	Média $\pm$ Desvio Padrão
C. negativo	1,046 $\pm$ 0,110
C. positivo	0,151 $\pm$ 0,015 ***
10uM	0,930 $\pm$ 0,079
30uM	0,934 $\pm$ 0,058
90uM	0,924 $\pm$ 0,047
270uM	0,921 $\pm$ 0,135
810uM	0,791 $\pm$ 0,130 ***

C. positivo: Doxorubicina 10  $\mu$ g/mL. ANOVA seguida de Teste de Tukey;  $\alpha = 0.05$  \*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0.05$ )

**Tabela 4** – Freqüência media e desvio padrão ( $n^\circ$  de células  $\times 10^5$ /mL) referente ao Ensaio de Cinética de Proliferação em células HTC apos tratamento com o flavonóide rutina nos tempos 24, 48, 72 e 96h:

Tratamentos	Tempo de Tratamento (Média $\pm$ Desvio Padrão)			
	24h	48h	72h	96h
Controle (PBS)	0,841 $\pm$ 0.1465	0,658 $\pm$ 0.225	0,716 $\pm$ 0.113	11,516 $\pm$ 1.034
Doxorrubicina	0,333 $\pm$ 0.0144**	3.192 $\pm$ 0.080**	5,133 $\pm$ 0.210**	0,391 $\pm$ 0.080**
10 $\mu$ M	0,675 $\pm$ 0.1803	3.050 $\pm$ 0.225	5,025 $\pm$ 0.198	11,141 $\pm$ 0.427
30 $\mu$ M	0,858 $\pm$ 0.1258	3.000 $\pm$ 0.218	4,591 $\pm$ 0.166	11,833 $\pm$ 1.019
90 $\mu$ M	0,800 $\pm$ 0.1500	2.867 $\pm$ 0.132	4,991 $\pm$ 0.063	12,200 $\pm$ 0.606
270 $\mu$ M	0,750 $\pm$ 0.1521	2.883 $\pm$ 0.063	4,850 $\pm$ 0.066	11,991 $\pm$ 0.582
810 $\mu$ M	0,750 $\pm$ 0.1803	2.792 $\pm$ 0.270	3,175 $\pm$ 0.657**	8,533 $\pm$ 1.238**

C. positivo: Doxorubicina 10  $\mu$ g/mL. ANOVA seguida de Teste de Dunnet  $\alpha = 0.05$  \*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0.01$ )

**Tabela 5** – Frequência média e desvio padrão (n° de células x 10<sup>5</sup>/mL) referente ao Ensaio de Viabilidade Celular em células HTC após tratamento com o flavonóide rutina nos tempos 24, 48, 72 e 96h:

Tratamentos	Tempo de Tratamento (Média ± Desvio Padrão)			
	24h	48h	72h	96h
Controle (PBS)	91.00 ± 7.506	91.33 ± 1.528	92.00 ± 3.464	87.00 ± 2.000
Doxorrubicina 10µM	71.00 ± 1.000**	68.00 ± 1.000**	58.33 ± 7.095***	42.33 ± 2.517***
30µM	92.67 ± 1.155	90.33 ± 3.512	90.67 ± 1.528	89.67 ± 1.528
90µM	92.33 ± 1.155	90.33 ± 3.055	88.00 ± 1.000	90.00 ± 1.732
270µM	87.67 ± 3.202	87.67 ± 1.528	87.67 ± 1.528	87.33 ± 2.517
810µM	89.67 ± 4.041	89.67 ± 2.517	87.33 ± 1.155	85.33 ± 3.512
	93.00 ± 5.196	87.00 ± 3.464	76.00 ± 1.000**	72.33 ± 2.517**

C. positivo: Doxorrubicina 10 µg/mL. ANOVA seguida de Teste de Dunnet  $\alpha = 0.05$  \*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0.01$ ) \*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0.001$ )

**Tabela 6** – Avaliação da indução de apoptose após tratamento das células HTC por 24 horas com o flavonóide rutina. Número total de células analisadas, número de células apoptóticas encontradas, média ± desvio padrão de células apoptóticas e frequência de células apoptóticas:

Tratamentos	Total de cêls. analisadas	Total cêls. Apoptóticas	$X \pm S$	$p^+$	fi (%) <sup>***</sup>
C. negativo	1.500	4	1,33 ± 0,57	-	0,26
Cisplatina 20µM	1.500	34**	11,33 ± 2,08	0,0013	2,26
10µM	1.500	7	2,33 ± 0,57	0,1012	0,46
30µM	1.500	4	1,33 ± 0,57	0,9999	0,26
90µM	1.500	6	2,00 ± 1,00	0,3739	0,40
270µM	1.500	7	2,33 ± 0,57	0,1012	0,46
810µM	1.500	6	2,00 ± 1,00	0,3739	0,40

\*Teste-t de Student em relação ao controle negativo.

\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0.01$ )

\*\*\*( $A/T \times 100$ ), onde A= total de células apoptóticas; T = total de células analisadas.