

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

EFEITOS DOS FLAVONOIDES NARINGINA E NEOHESPERIDINA
SOBRE CÉLULAS BRIN-BD11 SECRETORAS DE INSULINA
SUBMETIDAS AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO H_2O_2 .

JULIANA SOUSA MAESTRI

PONTA GROSSA

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

EFEITOS DOS FLAVONOIDES NARINGINA E NEOHESPERIDINA
SOBRE CÉLULAS BRIN-BD11 SECRETORAS DE INSULINA
SUBMETIDAS AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO H₂O₂.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro-Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva)

PONTA GROSSA

2011

Ficha catalográfica Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG.

M186e Maestri, Juliana Sousa
 Efeitos dos Flavonoides Naringina e Neohesperidina sobre células
 BRIN-BD11 secretoras de insulina submetidas ao estresse oxidativo
 induzido pelo H₂O₂. / Juliana Sousa Maestri. Ponta Grossa, 2011.
 121 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de
concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta
Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre
Co-orientadora : Profa. Dra. Henriette Emilio

1. Antioxidantes. 2. Estresse oxidativo. 3. Células pancreáticas.
I. Kanunfre, Carla Cristine. II. Emilio, Henriette. III. T.

CDD: 575

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Cristine Kanunfre

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Henriette Rosa de Oliveira Emílio

Há aqueles que perseguem a felicidade eternamente sem nunca alcançá-la;

Há os que ficam inertes esperando que ela apareça;

Alguns se conformam...

... Outros a criam!

Dedicatória:

À minha família querida: *Du, Tatá e Bia.*

Agradecimentos

À Deus, pela generosidade e proteção.

À minha família, por fazer minha vida ter um significado especial.

À minha orientadora, Professora Carla Cristine Kanunfre, pela sabedoria, pela dedicação ao trabalho e por sua amizade.

À minha co-orientadora Henriette Rosa O. Emílio pela alegria em ensinar.

Aos amigos de laboratório, pelas conquistas compartilhadas.

Aos professores do mestrado, pelos ensinamentos.

Aos funcionários pela paciência frente à minha inexperiência.

À Professora Sabrina Grassioli e ao Professor Paulo C.F. Mathias - Laboratório de Biologia Celular da Secreção - UEM, e à Marlene dos Santos Rocha - técnica do Laboratório de Secreção de Insulina e ao Professor Angelo R. Carpinelli - Instituto de Ciências Biomédicas - USP/SP, pelas dosagens das amostras de insulina.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva.

À CAPES.

Abreviações

μM – Micro Molar	EGCG – Epigallocatequina Galato
$\text{NO}^{\cdot}$ – Óxido Nítrico	EPM – Erro Padrão da Média
$^{\cdot}\text{O}_2$ – Superóxido	ER – Espécie Reativa
$^{\cdot}\text{OH}$ – Hidroxil	ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio
Abs – Absorbância	ERO – Espécie Reativa de Oxigênio
AcetilCo-A – Acetil coenzima A	FADH_2 – Flavina Adenina Dinucleotídeo
ADP – Adenosina Difosfato	G-6-P – Glicose 6 Fosfato
AMPC – Adenosina Monofosfato Cíclico	GIP – Peptídeo Inibitório Gástrico
AMPK – Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno	GK – Glicoquinase
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária	GLUT – Proteína Transportadora de Glicose Transmembranar Facilitada
ATP – Adenosina Trifosfato	GPx – Glutathione Peroxidase
BRIN –BD11 – Células Clonais β – pancreáticas	GR – Glutathione Redutase
Ca^{2+} - Cálcio	GSH – Glutathione
CAT – Catalase	GSSG – Glutathione Dissulfido
CAT – Catalase	GST – Glutathione Transferase
CCK – Colecistocinina	H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio
CO_2 – Dióxido de Carbono	HP – Hidroperóxido
COX – Ciclooxigenase	IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas
δ - delta	IC50 – Concentração Inibitória Média
DAG – Diacilglicerol	I κ B – Proteínas Quinases Inibidoras do K κ
DM-I – Diabetes mellitus tipo 1	IKK α e IKK β – Proteínas Quinases Fosforiladoras de Subunidades Inibitórias de NF- κ B
DM-II – Diabetes mellitus tipo 2	iNOS – Enzima Óxido Nítrico Sintetase Induzível
DMSO – Dimetilssulfóxido	IP3 – Inositol Trifosfato
EC – Epicatequina	IRS – Substrato do Receptor de Insulina
ECG – Epicatequina Galato	JNK – Jun N-Terminal Kinase
EGC – Epigallocatequina	K^+ - Potássio

LOX – Lipooxigenase

MafA – Fator de transcrição ativador da transcrição do gene de insulina

MDA – Malondialdeído

mPTP – Poros Transmembrana Mitocondriais

MTT – Clivagem dos anéis tetrazólicos pelas desidrogenases mitocondriais

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NF- κ B – Fator de Transcrição nuclear kappa B

PBS – Tampão Bifosfato

PC12 – Linhagem de Células Neurais

PCL – Fosfolipase C

PDH – Piruvato Desidrogenase

Pdx1 – Pancreático e Duodenal

PG – Prostaglandina

PKA – Proteína Quinase A

PKC – Proteína Quinase C

PM – Peso Molecular

PUFA – Ácidos Graxos Poliinsaturados

REDOX – Regulação de Óxido Redução

RIE – Radioimunoensaio

SAPK – Proteína Quinase Ativada por Estresse

SFB – Soro Fetal Bovino

SGLT – Transporte de Glicose dependente de Sódio

-SH – Grupamentos Sulfidrílicos

SOD – Superóxido Dismutase

SOD – Superóxido Dismutase

-SS – Pontes Dissulfeto

STZ – Estreptozotocina

TBAR – Ácido Tiobarbitúrico

β – beta

Lista de Figuras

Figura 1	Papel da fosforilação da glicose na secreção de Insulina pela célula β pancreática.....	29
Figura 2	Vias de sinalização da insulina na célula β pancreática.....	30
Figura 3	Papel do estresse oxidativo sobre as células β pancreáticas.....	41
Figura 4	Ativação da enzima de membrana NADPH oxidase.....	42
Figura 5	Vias de sinalização na complicação do Diabetes.....	43
Figura 6	Enzimas antioxidantes.....	46
Figura 7	Estrutura comum a todos os flavonoides.....	47
Figura 8	Estrutura molecular naringina.....	54
Figura 9	Estrutura molecular neohesperidina.....	55
Figura 10	Estrutura molecular quercetina.....	55
Figura 11	Vias de sinalização dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1.....	107

CAPÍTULO 1

Figura 1	Efeito da quercetina sobre a viabilidade celular da linhagem BRIN-BD11.....	93
Figura 2	Efeito da naringina sobre a viabilidade celular da linhagem BRIN-BD11.....	94
Figura 3	Efeito da neohesperidina sobre a viabilidade celular da	95

	linhagem BRIN-BD11.....	
Figura 4	Efeito da quercetina sobre a secreção de insulina pela linhagem BRIN-BD11.....	96
Figura 5	Efeito da naringina sobre a secreção de insulina pela linhagem BRIN-BD11.....	97
Figura 6	Efeito da neohesperidina sobre a secreção de insulina pela linhagem BRIN-BD11.....	98
Figura 7	Efeito do H ₂ O ₂ sobre a viabilidade celular da linhagem BRIN-BD11.....	99
Figura 8	Padronização do estresse oxidativo agudo (2h) induzido por H ₂ O ₂	100
Figura 9	Determinação do efeito citoprotetor dos flavonoides contra o estresse oxidativo induzido pelo H ₂ O ₂ – ensaio agudo	101
Figura 10	Determinação do efeito sinérgico citoprotetor dos flavonoides contra o estresse oxidativo induzido pelo H ₂ O ₂ – ensaio agudo...	102
Figura 11	Efeito dos flavonoides sobre a reversão de citotoxicidade do H ₂ O ₂ sobre células BRIN-BD11– Ensaio agudo de pré-tratamento.....	103
Figura 12	Ensaio crônico de reversão de citotoxicidade pelos flavonoides em células BRIN-BD11 submetidas ao estresse oxidativo induzido por H ₂ O ₂	104
Figura 13	Produção e atividade de sequestro de ERO por flavonoides.....	105

Lista de tabelas

Tabela 1	Localizações dos transportadores de glicose no organismo.....	32
Tabela 2	Radicais livres.....	40
Tabela 3	Espécies reativas de oxigênio não-radicalares.....	40
Tabela 4	Alguns representantes das subclasses de flavonoides.....	48

Sumário

I	INTRODUÇÃO	17
	Caracterização das células clonais BRIN-BD11	21
II	OBJETIVOS	22
1.	Objetivo geral	22
1.1	Objetivos específicos	22
III	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1.	Contextualização do DM-II	23
1.1	Fisiopatologia do DM-II	23
1.2	Contexto evolutivo do DM-II	24
2	Insulina	26
2.1	Secreção de insulina	27
2.2	Transportadores de glicose	30
2.3	Transportadores de glicose – GLUT1 e GLUT2	33
2.4	Efeitos metabólicos da insulina	33
3	Estresse oxidativo	36
3.1	O Estresse oxidativo no DM-II	40
3.2	Antioxidantes	44
3.2.1	Enzimas antioxidantes e antioxidantes endógenos	45
3.2.2	Antioxidantes exógenos	46
3.2.2.1	Flavonoides	47
3.2.2.1.a	Papel dos flavonoides no DM-II	49
3.2.2.1.b	Papel dos flavonoides no estresse oxidativo	52
3.2.2.1.c	Flavonoides em estudo	53
	Naringina	53
	Neohesperidina	54
	Quercetina	55
IV	MATERIAL E MÉTODOS	57
1.	Principais reagentes, químicos e enzimas	57
2.	Equipamentos	58
3.	Linhagem celular e condições de cultivo	58
4.	Curva de crescimento e tempo de dobramento das células BRIN-BD11	59
5.	Tratamentos celulares em geral	60
5.1	Padronização do estresse oxidativo agudo e crônico e atividade de sequestro e produção de H ₂ O ₂ pelos flavonóides	60
5.1.1	Estresse oxidativo em células BRIN-BD11 induzido por H ₂ O ₂	60

5.1.2	Estresse oxidativo em células BRIN-BD11 induzido por H ₂ O ₂ associado ao DMSO.....	61
5.1.3	Estresse oxidativo agudo em células BRIN-BD11 induzido por H ₂ O ₂ associado ao DMSO.....	62
5.1.4	Ensaio de reversão da citotoxicidade induzida por estresse oxidativo crônico pelos flavonoides.....	62
5.1.5	Ensaio de reversão da citotoxicidade induzida por estresse oxidativo agudo pelos flavonoides isolados e em associação.....	64
5.1.6	Ensaio de sequestro e/ou produção de H ₂ O ₂ pelos flavonoides em meio de cultura e em tampão PBS.....	64
5.2	Efeito dos flavonoides sobre secreção de insulina.....	65
5.2.1	Efeito insulínico positivo dos flavonoides em células BRIN-BD11 previamente estimuladas por glicose.....	65
6	Técnicas empregadas.....	66
6.1	Redução do MTT – Determinação da Viabilidade Celular.....	66
6.2	Determinação de H ₂ O ₂	67
6.3	Quantificação de insulina – radioimunoensaio.....	67
7.	Estudo Estatístico.....	69
V	RESULTADOS.....	70
	CAPÍTULO 1.....	71
	Resumo.....	71
	Abstract.....	71
	Introdução.....	72
	Material e métodos.....	74
	Resultados e discussão.....	78
	Considerações finais.....	90
	Agradecimentos.....	92
	Referências Bibliográficas.....	92
	Figuras.....	93
VI	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

Resumo

As células β pancreáticas possuem um nível de detoxificação de radicais livres baixo devido à necessidade de um microambiente oxidativo controlado para a realização de suas funções biológicas. Neste sentido, o estresse oxidativo que coexiste com a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, leva a danos celulares com perda de função. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o possível efeito citoprotetor dos flavonoides naringina, neohesperidina e quercetina em células secretoras de insulina submetidas ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 . Para tanto, avaliou-se a citotoxicidade destes flavonoides e seu efeito insulínico em células BRIN-BD11. Os flavonoides mostraram-se seguros para uso nestas células, pois não foram tóxicos nas concentrações de 5 à 80 μM e não alteraram o perfil secretagogo de insulina destas células. O estresse foi padronizado (6,25-600 μM) em ensaio agudo (2h) e crônico (24h) nas células BRIN-BD11. No ensaio crônico, observamos concentração inibitória média (IC₅₀) para o H_2O_2 correspondente a 180 μM e para o H_2O_2 associado ao DMSO de 75 μM , e no ensaio agudo, a IC₅₀ correspondeu a 350 μM . Além de seu papel antioxidante, flavonoides podem influenciar a secreção de insulina por regulação de vias de sinalização intracelulares e expressão de genes. As concentrações de insulina foram mensuradas por RIE. Tratamentos com naringina e quercetina mostraram-se benéficos por aumentarem a atividade secretória celular. A atividade dos flavonoides no sequestro de radicais livres foi avaliada pelo método de Xylenol Orange em tampão PBS. Naringina e neohesperidina (10 μM) em tampão PBS (ensaio agudo) demonstraram significativa atividade sequestrante ($p < 0,05$). Efeito antioxidante sinérgico entre os flavonoides foi observado em ensaio agudo, sendo os resultados obtidos semelhantes aos encontrados quando foi utilizado o α -tocoferol. O pré-

tratamento destas células com os flavonoides (24h) revelou que não existe modulação que confira proteção às células quando expostas ao H_2O_2 por 2 horas.

Abstract

Pancreatic β cells show up lower level of free radicals detoxication then, in present study, assessed the possible cytoprotective effect of flavonoids naringin, neohesperidin and quercetin. The oxidative stress induced by H_2O_2 (6.25-600 μM) was standardized in BRIN-BD11 cells. Measurement of the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of H_2O_2 in chronic oxidative stress (24 hours) resulted in 180 μM . However, when H_2O_2 was incorporated with DMSO, the IC_{50} was 75 μM . In acute oxidative stress (2 hours) assay IC_{50} H_2O_2 was 350 μM . Flavonoids (1.25 - 80 μM) did not show cytotoxic effects after 24 hours. In the same away insulintropic effects were not observed from treatment with the flavonoids (1.25 - 80 μM) for 24 hours. Cytoprotective effects of flavonoids (2.5, 5, 10 μM) on BRIN-BD11 cells were not observed in simultaneous exposure to H_2O_2 (350 μM lethal dose) for 2 hours or for 24 hours (37.5 μM - sub-lethal and 75 μM - lethal dose). Also the flavonoids not conferred cytoprotection to cells in pre-treatment for 24 hours. However the flavonoids present scavenger activity. In fact, naringin and neohesperidin (10 μM) in PBS buffer (acute assay), showed significant scavenger activity. The cytoprotective effects of flavonoids only were observed on BRIN-BD11 cells when using in association, it revealed synergic effects.

I – INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellito* (DM) é um dos mais importantes problemas de saúde mundial, apresentando altos índices de prevalência e mortalidade (ALARCON-AGUILAR *et al.*, 2000; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006; WHO, 2010).

Clinicamente existem duas formas básicas da doença: Tipo I ou Insulino-Dependente e Tipo II ou Não-Insulino-Dependente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD), 2003; WHO, 2010).

O Tipo I é causado pela destruição auto-imune das células β pancreáticas pelas células T CD4+, T CD8+ e por macrófagos infiltrados nas ilhotas, representando aproximadamente 10% de todos os casos de DM (GILLESPIE, 2006). Fatores genéticos, distúrbios auto-imunes, e fatores ambientais atuam de forma conjunta desencadeando a doença que se caracteriza pela ausência de secreção endógena de insulina e reduzida captação periférica da glicose (BEARDSALL *et al.*, 2003; VATS *et al.*, 2005). A forma aguda e progressiva é encontrada comumente em crianças e adolescentes, porém pode ocorrer em adultos (SBD, 2003; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006; WHO, 2010).

O Tipo II é a forma mais comum da doença representando aproximadamente 90% dos casos de DM. Segundo estudos estatísticos, 2,9 milhões de pessoas morreram em 2000 em consequência deste tipo de DM. Aproximadamente 171 milhões de adultos maiores de 20 anos são diabéticos e este número pode chegar a 334 milhões até 2030 (WILD *et al.*, 2004; ROGLIC *et al.*, 2005; LEDUC *et al.*, 2006; WHO, 2010). Este aumento deve-se ao crescimento da população com mais de 65 anos de idade, aos

hábitos de vida sedentários e à obesidade. No Brasil, o quadro não é diferente, a prevalência de pacientes diabéticos em 2000 era de 4,6 milhões e estima-se que até 2030 sejam de 11,30 milhões de diabéticos (WILD *et al.*, 2004; WHO, 2006).

O DM-II é uma desordem metabólica que resulta da interação complexa de múltiplos fatores, dentre os quais: resistência à insulina no tecido muscular e tecido adiposo, diminuição na secreção da insulina pelo pâncreas ou ambos. A resistência periférica à insulina está geralmente presente antes do início do DM-II e é determinada por inúmeros fatores, incluindo hereditariedade, idade e obesidade (CHEN *et al.*, 2005; MALECKI *et al.*, 2005).

O DM-II apresenta um custo elevado ao indivíduo e à sociedade. Estes custos estão relacionados não somente aos gastos com saúde, mas também ao custo indireto causado pela perda de produtividade devido à inabilidade e à mortalidade prematura. Em termos econômicos, nos Estados Unidos, as estimativas de custo total em 2002 foram de US\$ 133 bilhões, no Canadá o custo total se aproximou de US\$ 5 bilhões e na América Latina e Caribe o custo do DM-II foi estimado em US\$ 65 bilhões em 2000 (BARCELÓ *et al.*, 2003; PINENT *et al.*, 2008).

Sabe-se que a alimentação inadequada afeta o organismo podendo levar ao desenvolvimento de doenças coronarianas, hipertensão e DM-II, o que aumentam os riscos de desenvolvimento de problemas cardíacos e acidente vascular cerebral (SBD, 2003; WHO, 2010).

Partindo do pressuposto que é mais fácil modificar as condições ambientais, alterações da dieta dos seres humanos poderiam melhorar sua qualidade de vida e garantir sua longevidade. Por conseguinte, a utilização dos chamados alimentos

funcionais contribuiria para garantir a homeostase dos organismos (PINENT *et al.*, 2008).

Os alimentos funcionais não curam doenças, ao contrário dos medicamentos, mas eles apresentam componentes ativos capazes de reduzir o risco à certas enfermidades. São ingredientes que além das funções nutricionais básicas, produzem efeitos metabólicos benéficos à saúde (PINENT *et al.*, 2008).

Dentre os alimentos funcionais, os *citrus* caracterizam-se como um grupo acessível à todas as camadas sociais e faixas etárias da população brasileira. Segundo dados de 2008, levantados pelo Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF), o Brasil é o terceiro produtor mundial de frutas, porém, o consumo *per capita* corresponde a apenas 57 quilos ao ano.

As alegações funcionais dos compostos fenólicos e vitamina C encontrados nos *citrus* ainda não foram aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Apenas o lecopeno, luteína e a zeaxantina, presentes nos *citrus*, possuem atividades antioxidantes reconhecidas. Sendo assim, maiores estudos são necessários para comprovação do aumento da tolerância ao estresse oxidativo pelas células proporcionada pelos compostos fenólicos encontrados nos *citrus* e dentre eles flavonoides como naringina e neohesperidina, objetos de investigação do presente estudo.

A naringina é um flavanoide encontrado em frutas cítricas como a laranja, tangerina e o suco do limão (PINENT *et al.*, 2008). A neohesperidina é um edulcorante relacionado com uma substância presente na laranja amarga, presente em maior quantidade na *Citrus aurantium*, obtida por modificação química.

Dietas antioxidantes compostas por flavonoides oferecem proteção a pacientes com DM-II em estágios iniciais da doença pela promoção da redução de glicose sanguínea, ação antiinflamatória e redução lipídica sem acarretar efeitos tóxicos ao paciente (ARMSTRONG *et al.*, 2009). De fato, são vários os flavonoides que modulam a proliferação celular em células β pancreáticas tais como: procianidina, quercetina, crisina, catequina e genisteína (ANTON, MELVILLE, RENA, 2006).

Cumprе ressaltar que o pâncreas endócrino adulto possui capacidade de regeneração lenta o que pode acarretar hiperglicemia e DM-II. Células pancreáticas são sensíveis ao estresse oxidativo, fator este que pode contribuir para o funcionamento inadequado das células β em pacientes acometidos pelo DM-II. O estresse oxidativo reduz a proliferação das células β pancreáticas sendo que a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos tende a minimizar estes danos. Neste sentido, evidências mostram que a quercetina, um dos flavonoides mais estudados, tem efeito sobre a proteção de células β pancreáticas em ratos cujo DM foi induzido pela estreptozotocina (STZ) (PINENT *et al.*, 2008).

Uma associação entre uma superprodução de espécies reativas (ER) e uma falha nos mecanismos de defesa intracelular contra estas, leva à injúria celular e até à perda de função. É sabido que, as células β pancreáticas possuem um nível de detoxificação de radicais livres baixo, caracterizando uma atividade antioxidante endógena limitada e consequente acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) em seu interior. Este excesso de ERO desencadeia um processo que culmina com o dano celular muitas vezes irreversível levando à ativação de cascatas que ativam a morte celular programada (apoptose) (NEWSHOLME *et al.*, 2007).

Caracterização das células clonais BRIN-BD11

Para o estudo do DM-II, as células BRIN-BD11 destacam-se como um bom modelo de estudo. Caracterizam-se como células que produzem, armazenam e secretam a insulina de forma regulada. Como estratégia experimental, propusemos a padronização do estresse oxidativo pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sobre estas células de forma a possibilitar a investigação dos prováveis efeitos antioxidantes e/ou pró-oxidantes conferidos pelos flavonoides naringina e neohesperidina, bem como o estudo de seus potenciais efeitos insulíntrópicos. Na sequência apresentaremos no Capítulo 1 os processos e consequentes resultados de nosso trabalho.

II- OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos antioxidantes dos flavonoides naringina e neohesperidina sobre células secretoras de insulina (BRIN-BD11) submetidas ao estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 .

1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer o cultivo de células BRIN-BD11 em nosso laboratório.
- Avaliar a toxicidade dos flavonoides naringina e neohesperidina sobre a linhagem celular BRIN-BD11.
- Determinar a concentração inibitória média (IC50) dos flavonoides naringina e neohesperidina em culturas de BRIN-BD11 no período de 24 horas.
- Avaliar, através da técnica de radioimunoensaio (RIE), o efeito dos flavonoides naringina e neohesperidina sobre a secreção de insulina pelas células BRIN-BD11.
- Padronizar o estresse oxidativo agudo (2 horas) e crônico (24 horas) induzido pelo H_2O_2 sobre a linhagem celular BRIN-BD11.
- Determinar a IC50 do H_2O_2 em culturas de BRIN-BD11 em ensaios agudo e crônico.
- Determinar o efeito citoprotetor dos flavonoides naringina e neohesperidina, “*per se*” e em associação, ao estresse oxidativo agudo e crônico.
- Avaliar o efeito citoprotetor dos flavonoides naringina e neohesperidina conferido por pré-incubação das células BRIN-BD11 por 24 horas, submetidas posteriormente a estresse oxidativo agudo.
- Avaliar efeito de captura de H_2O_2 pelos flavonoides naringina e neohesperidina na ausência de células.

III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Contextualização do Diabetes *mellitus* tipo II

1.1. Fisiopatologia do Diabetes *mellitus* tipo II

Diabetes *mellito* do tipo II (DM-II) é uma condição crônica na qual existe uma deficiência na produção e/ou utilização da insulina. Isso prejudica a homeostase glicêmica, metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídeos (O'BRIEN; GRANNER, 1996; ALARCON-AGUILAR *et al.*, 2000; ISLAS-ANDRADE *et al.*, 2000; HOENIG *et al.*, 2007). Essa alteração na concentração de insulina resulta em aumento nas concentrações de glicose sanguínea, o qual leva a muitos danos nos sistemas biológicos (WHO, 2010).

Excesso de adiposidade visceral, dislipidemia e hipertensão frequentemente acompanham a resistência à insulina. A resistência do tecido muscular e adiposo à insulina pode ocorrer por insuficiência do receptor de insulina, pela inibição das vias de transdução de sinal, pela insuficiência do GLUT e consequente transporte de glicose (DEFRONZO, 1999).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do DM-II incluem as doenças que causam resistência à insulina como o excesso de hormônio do crescimento, excesso de cortisol (doença de Cushing, síndrome dos ovários policísticos e estresse) e excesso do hormônio da tireóide (hipertireoidismo) (RAND *et al.*, 2004), além dos glucagonomas (THORESEN, BREDAL, 1996) e medicamentos que antagonizam a insulina tais como glicocorticóides e progestágenos, uso prolongado de diuréticos tiazídicos, hormônio do crescimento, morfina e fluídos com dextrose (RAND *et al.*, 2004, SLINGERLAND *et al.*, 2009, THORESEN, BREDAL, 1996).

O prejuízo na utilização e armazenamento dos carboidratos leva ao aumento do nível da glicose sanguínea e ao aumento compensatório na secreção de insulina (hiperinsulinemia) frente a uma sensibilidade diminuída dos tecidos-alvo aos efeitos metabólicos da insulina (CHEN *et al.*, 2005).

O diagnóstico é feito geralmente após os 40 anos de idade, embora possa ocorrer mais cedo (SBD, 2003; KOSKI, 2004). Quando descompensado ou não diagnosticado, o DM-II pode estar associado à complicações como: aterosclerose, retinopatia com potencial perda da visão, catarata, nefropatia que pode levar à insuficiência renal, neuropatia periférica e doença cardíaca, diminuindo assim a expectativa de vida do indivíduo. Os pacientes podem apresentar excesso de peso, cetoacidose, fibrinólise alterada, aumento da agregação plaquetária, inflamação vascular e disfunção endotelial (SBD, 2003; MALECKI, KUPLA, 2005; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006; WHO, 2006).

O DM-II prejudica o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, além disso, pode acometer vários sistemas do organismo dentre os quais, o sistema o sistema imune/ sanguíneo e linfático por proporcionar maior propensão ao desenvolvimento de infecções e pelo retardo dos mecanismos de defesa; o sistema neuromuscular (neuropatias); o sistema urinário quando a glicose sérica excede o limiar renal levando à diurese osmótica e os sistemas nervoso/sensorial e oftálmico pelo acúmulo de sorbitol no cristalino que leva ao desenvolvimento de catarata (DICKSON *et al.*, 1996; THORESEN, BREDAL, 1996).

1.2. Contexto evolutivo do DM-II

Como a evolução é um processo genético decorrente de alterações no número ou na estrutura dos genes nas populações através dos tempos, analisar como, quando, onde

e em que situações essas modificações ocorreram permite compreender como surgiram, na espécie humana, traços como o que favorece o surgimento do DM-II. Estudos sob a orientação do geneticista Charles Sing, da Universidade de Michigan revelam que entender o passado evolutivo pode nos ajudar a compreender os fatores de risco atuais. Mas não basta considerar apenas os genes, também é preciso analisar em que contexto determinadas alterações genéticas surgiram e verificar se esse contexto sofreu ou não mudanças. As informações contidas nos genes interagem o tempo todo com o ambiente podendo causar alterações e mudar nossos traços (MORTON, 2003).

Na história da evolução humana, a modificação em uma determinada característica só pode ser considerada de caráter evolutivo se houver alteração genética. Para que isto ocorra são necessários períodos longos de tempo. Sendo assim, características que se alteraram rapidamente são atribuídas ao ambiente a que o indivíduo está exposto. Tratando-se de DM-II, os hábitos alimentares foram alterados drasticamente nos últimos tempos, fato que favorece a obesidade (BASTOS, ROGERO, ARÊAS, 2009).

Segundo Bastos , Rogero e Arêas (2009), o componente genético do homem contemporâneo está otimizado para a dieta de nossos ancestrais Paleolíticos o que, para os autores, leva às “doenças da civilização” tais como aterosclerose, doenças cardiovasculares, resistência à insulina, DM-II, síndrome metabólica, osteoporose, hipertensão e alguns tipos de câncer. No período Paleolítico o homem alimentava-se de carne animal proveniente da caça (carne magra, órgãos internos e medula óssea) e de algumas plantas de ocorrência espontânea não leguminosas. O desenvolvimento da agricultura e do domínio da domesticação de animais ocorreu de uma forma abrupta quando refere-se a tempo evolutivo do gênero *Homo*, não possibilitando que alterações metabólicas e fisiológicas significativas ocorressem para responder às mudanças à nova

dieta introduzida, ou seja, a evolução natural do ser humano não acompanhou as mudanças de dieta introduzidas pela revolução agrícola e industrial (BASTOS, ROGERO, ARÊAS, 2009).

James Neel publicou no *American Journal of Human Genetics* uma hipótese que explica a manutenção pelo homem moderno de genes que reforçariam características como ganho de peso, apesar desta não favorecer a longevidade nos tempos atuais. Ele sugere que genes associados a doenças modernas como DM-II, hipertensão e obesidade teriam sofrido um intenso processo de seleção, tornando algumas formas de genes (alelos) muito frequentes em determinadas populações. A razão por trás dessa seleção teria sido episódios de extrema escassez de alimento. Nessas condições haveria seleção do genótipo poupador: qualquer gene que tornasse os seres humanos mais eficientes no uso das calorias seria favorecido. Assim, os mesmos traços que teriam permitido a sobrevivência em um ambiente sem comida, quando as calorias se tornaram abundantes, facilitariam o desenvolvimento da obesidade e do DM-II (CROW, 2008).

2. Insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas. É composta por 51 aminoácidos dispostos em duas cadeias polipeptídicas, designadas A e B, as quais estão ligadas por pontes dissulfeto. A síntese ocorre a partir de um precursor de 110 aminoácidos (NORMAN, LITWACK, 1997).

Antes de sua secreção pelas células β pancreáticas, o peptídeo C é removido resultando em uma molécula de duas cadeias. As concentrações deste peptídeo C passaram a ser usadas na avaliação da produção de insulina endógena em pacientes submetidos à terapia com insulina (DICKSON, 1996).

A insulina possui ação em todos os tecidos (KAELIN *et al.*, 2004; KOCH *et al.*, 2008), porém sua maior relevância tem sido observada no tecido muscular e adiposo (DICKSON, 1996; RANDALL, 2008).

Trata-se de um hormônio anabólico essencial que regula o metabolismo, o crescimento e a diferenciação celular (NYSTROM, QUON, 1999; SALTIEL, KAHN, 2001; ZIERATH, KAWANO, 2003).

Quando estimulada pela glicose, a secreção de insulina ocorre em duas fases: uma inicial rápida com a liberação dos estoques de insulina, seguida de uma fase prolongada com biossíntese do hormônio. A meia-vida da insulina circulante é de 3 a 5 minutos e o metabolismo ocorre principalmente no fígado e rins por ação das insulinasas (NORMAN, LITWACK, 1997; BEARDSALL *et al.*, 2003; HENQUIN *et al.*, 2006).

2.1. Secreção de Insulina

A secreção de insulina ocorre, principalmente, em função da hiperglicemia (NORMAN *et al.*, 1997; MCGARRY, DOBBINS, 1999).

Após entrar na célula β , a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato (G-6-P) pelas enzimas hexoquinase IV (glicoquinase) e a hexoquinase I. A hexoquinase I é fortemente inibida pela G-6-P e, em menor grau, pela frutose-1-6-difosfato, o que transfere para a glicoquinase o papel de regulação do fluxo glicolítico e, portanto, da secreção de insulina. O destino preferencial da G-6-P na célula β é a glicólise. Menos de 10% da G-6-P vai para a via da pentose fosfato e, além disso, as enzimas da síntese de glicogênio apresentam atividade baixa na célula β . O piruvato formado no citoplasma é transportado à mitocôndria, onde é convertido a acetil-Coenzima A (acetil-CoA) pela piruvato desidrogenase (PDH). Em seguida, acetil-CoA entra no ciclo de Krebs levando

ao aumento de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂). O metabolismo de glicose gera adenosina trifosfato (ATP) e a relação ATP/ADP (adenosina difosfato) aumentada provoca o fechamento dos canais de potássio (K⁺) e a consequente despolarização da membrana celular que abre canais de cálcio (Ca²⁺) sensíveis à voltagem. O aumento do influxo de Ca²⁺ para a célula β resulta em despolarização suplementar da membrana plasmática e desencadeamento do processo excitatório (Figura1) (HABER *et al.*, 2001).

A estimulação das células β pela glicose leva à ativação de isoformas da fosfolipase C (PLC), promovendo a hidrólise de fosfolípidos de membrana, gerando inositol 1-4-5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 ativa os canais de Ca²⁺ localizados na membrana do retículo endoplasmático, com a saída de Ca²⁺ da organela e aumento da concentração desse íon no citossol. A proteína quinase C (PKC) é ativada levando à ativação de proteínas dos grânulos secretórios de insulina que, juntamente com o Ca²⁺, promovem a ativação do sistema de microtúbulos e microfilamentos, responsável pela translocação desses grânulos para as proximidades da membrana plasmática e consequente exocitose. Outra função proposta da PKC é a ativação da adenilato ciclase juntamente com outros mecanismos, durante a glicólise com o consequente aumento do conteúdo intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). A produção de AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), que possui ação nos processos de síntese protéica da célula. A PKA pode ainda, estimular a secreção de insulina pela fosforilação dos canais de Ca²⁺ e de alguns componentes não tão específicos da maquinaria secretória (HABER *et al.*, 2001).

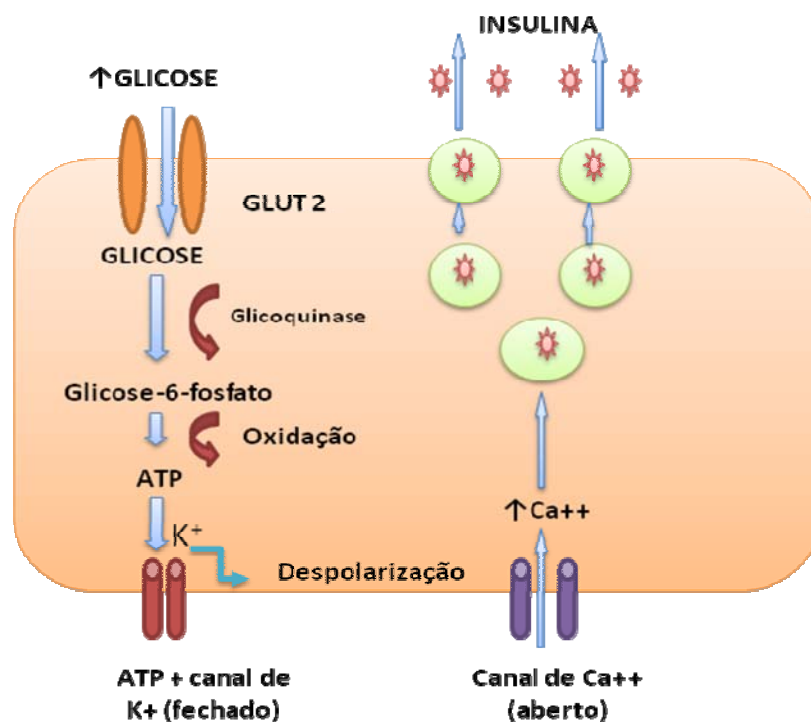


Figura 1: **Papel da fosforilação da glicose na secreção de insulina pela célula β pancreática.**
 Fonte: Adaptado de GUYTON, HALL, 2006.

A secreção de insulina também é regulada pelo sistema nervoso autônomo através das fibras colinérgicas e adrenérgicas que circundam as células das Ilhotas de Langerhans. Ocorre estimulação vagal da secreção de insulina e uma inibição pelos receptores adrenérgicos epinefrina e norepinefrina (como o que ocorre na hiperglicemia de estresse) (DICKSON, 1996).

A secreção de insulina é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pelas células β pancreáticas, sendo a glicose o secretagogo mais importante, como citado anteriormente. Os aminoácidos plasmáticos, o glucagon produzido pelas células α pancreáticas, o glucagon entérico, hormônio do crescimento, hormônios gastrintestinais (gastrina, secretina, colecistocinica - CCK), peptídeo inibitório gástrico (GIP) e adrenalina também potencializam a secreção de insulina pelas células β (DICKSON, 1996; NORMAN, LITWACK, 1997; BEARDSALL *et al.*, 2003; RANDALL, 2008; BERNE, LEVY, 2009).

Sua secreção é inibida pela somatostatina produzida pelas células δ pancreáticas, assim como pela baixa concentração de Ca^{2+} intracelular e pelos metabólitos da glicose (manoheptulose) e análogos não metabolizáveis da glicose (2-desoxiglicose) (RANDALL, 2008).

A própria insulina pode aumentar a sua síntese e secreção, através da ativação de seu receptor (Figura 2) (HABER *et al.*, 2001).

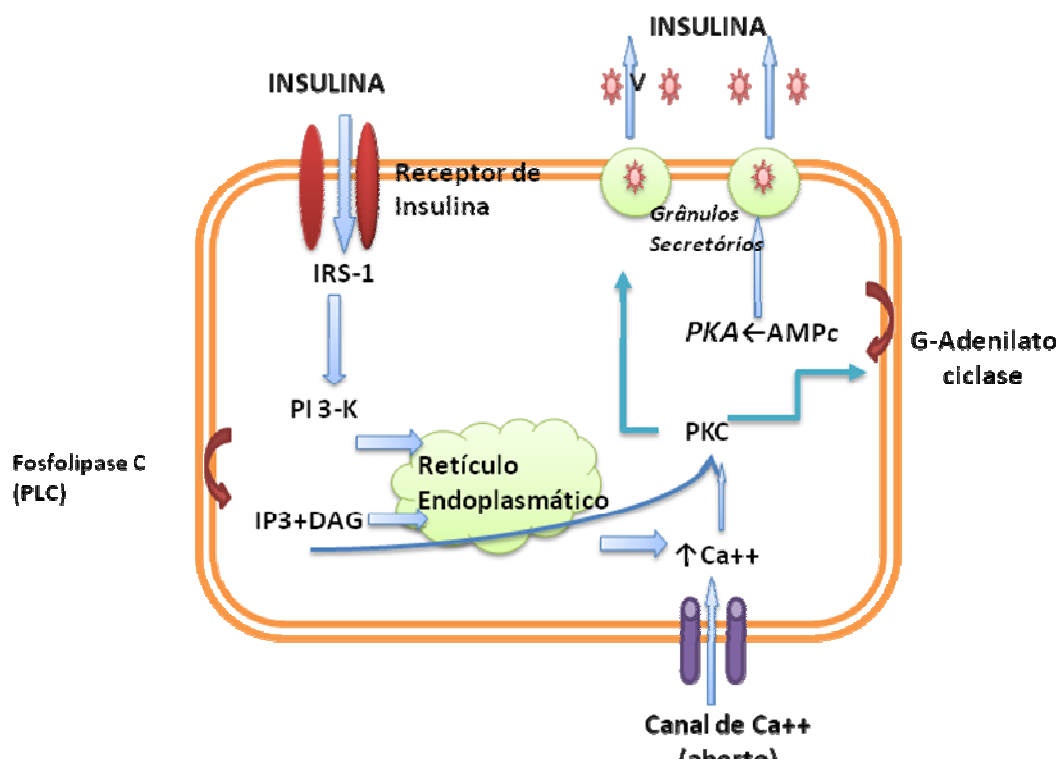


Figura 2: **Vias de Sinalização da Insulina na célula β pancreática.** Eventos no processo de autoregulação da secreção da insulina nas células β (Retroalimentação). A insulina exógena ou liberada dos grânulos secretórios interage com o receptor de insulina que ativa IRS-1/PI 3-K, levando à liberação de Ca^{2+} intracelular do retículo endoplasmático por mecanismo desconhecido. A concentração aumentada de Ca^{2+} intracelular leva à secreção de insulina, intermediada pela PKC. Fonte: Adaptado de HABER *et al.*, 2001.

2.2 Transportadores de glicose

O transporte da glicose através da membrana ocorre por difusão facilitada, um processo que independe de energia e que utiliza carregadores protéicos (KLIP *et al.*, 1994; RICHTER, 1998). Os transportadores de glicose podem ser divididos em dois

grupos: GLUT (transporte de glicose facilitada) e SGLT (transporte de glicose dependente de sódio) (WATSON, PESSIN, 2001; BERNE, LEVY, 2009).

A regulação da homeostasia intra e extracelular da glicose está diretamente relacionada ao controle preciso da expressão dos genes que codificam as diferentes isoformas de proteínas transportadoras de glicose (GLUT1 a 14), as quais se expressam de maneira tecido-específica, em consequência do padrão de ativação dos fatores transcricionais reguladores de cada gene, em cada tipo celular (MACHADO, SCHAAN, SERAPHIM, 2006; RANDALL, 2008).

O GLUT4 é o chamado transportador de glicose insulino-sensível ou insulino-dependente, cujo principal papel é proporcionar a captação de glicose insulino-mediada em tecidos adiposo e muscular. Modificações na expressão deste gene, tanto em tecido adiposo quanto em músculo esquelético, correlacionam-se de maneira direta com aumento ou redução da sensibilidade insulínica. Nas células em repouso, o GLUT4 localiza-se principalmente no compartimento intracelular. O estímulo insulínico determina sua translocação em direção à membrana plasmática aumentando a captação de glicose, e assim, este transportador participa de forma importante no controle da homeostase glicêmica tecidual e plasmática (MACHADO, SCHAAN, SERAPHIM, 2006).

Alterações na expressão de transportadores de glicose em outros tipos celulares podem determinar disfunções locais e/ou sistêmicas. Neste sentido, destaca-se a redução do GLUT2 em célula β pancreática, o que altera a secreção de insulina induzida por glicose (MACHADO, SCHAAN, SERAPHIM, 2006).

Tabela 1: Localizações dos transportadores de glicose no organismo

GLUT1	eritrócitos, células epiteliais das veias cerebrais, células β pancreáticas.
GLUT2	fígado, intestinos, rins e células β pancreáticas
GLUT3	cérebro, tecido muscular e coração
GLUT4	músculo esquelético, adipócitos e coração
GLUT5	intestinos, testículos e rins
GLUT6	cérebro, leucócitos e vesícula biliar
GLUT7	intestinos (principalmente no cólon), testículos e próstata
GLUT8	testículos
GLUT9	rins e fígado
GLUT10	fígado e pâncreas
GLUT11	duas formas (uma curta e outra longa) que são expressas no coração e músculo esquelético
GLUT12	coração e próstata.
GLUT 14	adipócitos e músculo esquelético
HMIT	cérebro

Fonte: WATSON, PESSIN, 2001; WOOD, TRAYHURN, 2003; PERREIRA, LANCHI, 2004; SCHEEPERS, JOOST, SCHÜRMANN, 2004.

2.3. Transportadores de glicose – GLUT1 e GLUT2 na célula β pancreática

A célula β pancreática expressa as isoformas GLUT1 e 2 de transportador de glicose, porém, o GLUT2 possui maior capacidade de transporte, o que permite uma resposta secretória proporcional às variações plasmáticas. Sabe-se que estados de resistência à insulina afetam a capacidade secretória da célula β pela redução na expressão do GLUT2 em ilhotas pancreáticas devido à hipersecreção deste hormônio. Prejuízo na expressão da proteína GLUT2 e consequente redução da secreção de insulina têm sido atribuídos a um efeito lipotóxico, causado especialmente pelos ácidos graxos saturados de cadeia longa (MACHADO, SCHAAAN, SERAPHIM, 2006).

2.4. Efeitos metabólicos da insulina

A homeostase da glicose é mantida por uma rede hormonal em que a insulina e o glucagon são os principais agentes (DESVERGNE, MICHALIK, WAHLI, 2006). A liberação da insulina permite a remoção rápida da glicose circulante estimulando a entrada da glicose nos tecidos periféricos. Portanto, existe um equilíbrio dinâmico que mantém um constante e controlado fornecimento de glicose aos tecidos. A homeostase da glicose depende principalmente da coordenação entre células β pancreáticas, utilização da glicose pelos tecidos periféricos, produção endógena de glicose pelo fígado e metabolismo de gorduras (KLEY *et al.*, 2009).

A glicose é a principal fonte de energia para o organismo animal e, para alguns tipos celulares como o cérebro, representar a única fonte da energia, o que impõe ao organismo um controle perfeito sobre a glicemia (BEARDSALL *et al.*, 2003; DESVERGNE, MICHALIK, WAHLI, 2006, RANDALL, 2008).

A energia derivada da oxidação de glicose é usada para converter ADP em ATP, que é então utilizada nas diversas reações do organismo necessárias para transporte ativo das moléculas através das membranas, contração dos músculos e desempenho do

trabalho mecânico, reações sintéticas para produção de hormônios, membranas celulares e moléculas essenciais, condução do impulso nervoso, divisão celular, crescimento, além das funções necessárias para manter e propagar a vida (GUYTON, HALL, 2006; RANDALL, 2008).

Neste sentido, a insulina desempenha um importante papel no armazenamento do excesso de energia (DICKSON, 1996; NORMAN, LITWACK, 1997; KHAN, PESSIN, 2002; BEARDSALL *et al.*, 2003; DESVERGNE, MICHALIK, WAHLI, 2006).

A insulina no fígado aumenta a atividade das enzimas que são responsáveis pela glicogênese e lipogênese, inibe as enzimas envolvidas na glicogenólise, além de estimular a síntese hepática de ácidos graxos. A insulina também diminui a atividade das enzimas hepáticas fundamentais para a gliconeogênese (LAZZAROTTO, 1999).

A insulina aumenta a utilização da glicose pela maioria dos tecidos do corpo, o que automaticamente reduz a utilização de lipídeos, funcionando assim como um hormônio “poupador”. Além disso, a insulina também promove a síntese de ácidos graxos. Uma vez que os estoques de glicogênio do fígado estejam repletos, a glicose excedente é convertida em ácidos graxos no fígado (através da formação de piruvato pela via glicolítica e subsequente conversão deste em acetil-CoA) que é transportado para as células adiposas por lipoproteínas séricas, onde são estocados na forma de triacilgliceróis (RANDALL, 2008).

O armazenamento de triacilgliceróis no interior das células adiposas é garantido pela insulina por esta inibir a ação da lipase hormônio-sensível e por promover o transporte da glicose através da membrana celular dos adipócitos. Sendo assim, há inibição da hidrólise dos triacilgliceróis para sua liberação para a corrente sanguínea e,

há formação de grande quantidade de α -glicerol fosfato que se associa aos ácidos graxos para formar os triácilgliceróis (WATSON, PESSIN, 2001; GUYTON, HALL, 2006).

Na ausência de insulina as lipoproteínas que transportam ácidos graxos do fígado são bloqueadas. Além disso, a enzima lipase hormônio-sensível torna-se intensamente ativada, levando à lipólise das gorduras armazenadas e liberação de ácidos graxos livres e glicerol para a corrente sanguínea. O uso destes, como fonte de energia, leva à cetose e acidose devido desequilíbrio entre a produção de ácido acetoacético nas células hepáticas e a redução de sua utilização nos tecidos periféricos. Uma parte deste ácido acetoacético é convertida em ácido β -hidroxibutírico e acetona. Assim, uma secreção insuficiente de insulina ao longo prazo aumenta as concentrações de colesterol e fosfolípídeos plasmáticos, provocando aterosclerose que culmina em ataque cardíaco, acidente vascular cerebral e em outros acidentes vasculares (RANDALL, 2008).

A captação de aminoácidos pelas células, sua incorporação em proteínas e a inibição de sua degradação, são resultantes também da ação insulínica. Este hormônio aumenta o transporte de aminoácidos para o interior das células (principalmente aminoácidos como valina, leucina, isoleucina, tirosina e fenilalanina), estimula a síntese de proteínas pelo aumento dos processos de transcrição e tradução, inibe o catabolismo protéico por reduzir a taxa de liberação de aminoácidos a partir de células (especialmente musculares) e deprime a taxa de gliconeogênese no fígado (DICKSON, 1996; RANDALL, 2008).

A ausência de insulina causa depleção de proteínas e aumento de aminoácidos plasmáticos e, a maior parte do excesso destes é utilizada tanto diretamente como energia quanto como substrato para a gliconeogênese. Esta degradação dos aminoácidos também leva a um aumento da excreção da uréia na urina e fraqueza extrema (RANDALL, 2008).

A insulina, além de seus clássicos efeitos na homeostase glicêmica, também apresenta atividades antiinflamatórias, de forma que, um estado de resistência à insulina não apenas reduz a utilização de glicose pelos tecidos insulino-sensíveis, mas também, estimula a sinalização pró-inflamatória (MACHADO, SCHAAAN, SERAPHIM, 2006).

3. Estresse Oxidativo

O desequilíbrio da homeostase no metabolismo oxidativo é denominado estresse oxidativo (McCONKEY, 1998; ALLEN, TRESINI, 2000).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) são moléculas quimicamente instáveis e altamente reativas que promovem reações de redução e de oxidação, prejudicando funções fisiológicas (SIÉS, STAHL, 1997). Radicais livres são espécies cuja reatividade resulta da presença de um ou mais elétrons desemparelhados na sua estrutura atômica (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005; CERQUEIRA, MEDEIRO, AUGUSTO, 2007).

As principais ERO formadas são: o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), que apresenta uma baixa capacidade de oxidação; o radical hidroxil ($\text{OH}^{\cdot}$), que possui uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares e, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é capaz até de atravessar a membrana nuclear e induzir danos ao DNA por meio de reações enzimáticas, além de atuar como precursor de outras ER (Tabelas 2 e 3) (LEITE, SARNI, 2003).

Neste sentido, o H_2O_2 , apesar de não ser um radical e assim, possuir baixa reatividade, pode causar dano celular por induzir liberação do ácido araquidônico (AA) da membrana celular que, a partir da transformação para prostaglandinas (PG) e leucotrienos, gera radicais livres causadores de danos oxidativos. Além deste efeito, o H_2O_2 aumenta a permeabilidade de membrana, reage com metais de transição a partir da

reação de Fenton originando o radical $\cdot\text{OH}$, provoca peroxidação lipídica e consequente elevação de malondialdeído (MDA), reduz a atividade das enzimas antioxidantes, aumenta o influxo de Ca^{2+} e ativa a via da caspase 3 (REN *et al.*, 2010).

As EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) dos fosfolípídeos e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno *bis*-alílico, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxil ($\text{RO}\cdot_2$), que por sua vez podem atacar novas cadeias de PUFAs, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos. Os hidroperóxidos (HPs), formados na peroxidação lipídica, têm vida curta e, quando reagem com metais, formam aldeídos (isto é, MDA, acroleína, crotonaldeído) e epóxidos, os quais são reativos e também causam danos ao DNA (SOUSA *et al.*, 2007).

O H_2O_2 e o $\cdot\text{O}_2^-$ são considerados extremamente tóxicos por causarem lesões celulares principalmente na membrana celular. Sua toxicidade deve-se principalmente à conversão dessas moléculas em radical $\cdot\text{OH}$, o que caracteriza a reação de Fenton (LEITE, SARNI, 2003; BONDAN, 2006). O $\cdot\text{OH}$ leva à quebra e às modificações nas bases do DNA, com consequentes alterações na expressão gênica que resultam em mutação. Ocorrem alterações de cadeias protéicas e peroxidação lipídica com consequente prejuízo do transporte transmembranar (LEITE, SARNI, 2003). Além disso, ele pode inativar várias proteínas ao oxidar seus grupamentos sulfidrílicos ($-\text{SH}$) e as pontes dissulfeto ($-\text{SS}$) (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; NÚÑEZ-SELLÉS, 2005; CERQUEIRA, MEDEIRO, AUGUSTO, 2007).

Enquanto um baixo nível de estresse pode estimular a divisão celular e o crescimento de células tumorais, um elevado ou moderado nível de estresse oxidativo é

potencialmente citotóxico e bloqueia a proliferação por induzir as células a apoptose e até a necrose (DYPBUK *et al.*, 1994; DREHER, JUNOD, 1996).

A produção normal de ER no metabolismo celular *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons decorrentes do metabolismo celular (como na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial) ou pela exposição a fatores exógenos (KATOCH, BEGUM, 2003). São exemplos de fatores endógenos geradores de ER os processos inflamatórios, respiração aeróbica, ação dos peroxissomos, atividade de enzimas do complexo citocromo P450 e NADPH oxidase. Já entre os fatores exógenos que levam à formação de ER estão as moléculas de ozônio, radiações *gamma* e ultravioleta, medicamentos, dieta e cigarro (BIANCHI, ANTUNES, 1999; NÚÑEZ-SELLÉS, 2005; CERQUEIRA, MEDEIRO, AUGUSTO, 2007; BRAATZ, 2010).

Há formação constante de ERO e ERN que interagem em diferentes níveis com o ambiente celular antes de sua eliminação o que, à primeira vista, pode parecer uma falha evolutiva. Porém, essas moléculas reativas, em um primeiro momento, são benéficas para o organismo, pois desempenham inúmeras funções na defesa contra agentes infecciosos, atuam como agentes antitumorais ao induzir a célula à apoptose, interferem em vias de sinalização intracelular relacionadas com expressão gênica através da ativação de fatores de transcrição, favorecem o enovelamento de proteínas nascentes no retículo endoplasmático que só pode ocorrer em um meio mais oxidante que o restante da célula para que haja formação de pontes dissulfeto além de que, muitos genes são transcritos após oxidação transitória (BIANCHI, ANTUNES, 1999). É sabido que baixas concentrações de alguns oxidantes, como o H_2O_2 a $1\mu M$, estimulam a proliferação celular (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005; CERQUEIRA, MEDEIRO, AUGUSTO, 2007).

Porém, a produção de ER pela célula passa a ser prejudicial quando a inflamação torna-se sistêmica, como na *seps*e e nas doenças inflamatórias crônicas, em que a perda de controle da produção de ER pode causar lesões teciduais à distância (LEITE, SARNI, 2003; BRAATZ, 2010).

Além disso, a própria natureza reativa destas espécies leva a modificações em biomoléculas, provocando alterações em suas estruturas e funções. Entre estas alterações encontram-se modificações na ribose e nas bases nitrogenadas do DNA (ligações cruzadas entre bases nitrogenadas, DNA - proteínas e proteína-proteína), nitração e nitrosilação de proteínas e peroxidação de PUFA's que compõem membranas plasmáticas e lipoproteínas (MATES, PEREZ-GOMEZ, 1999; NÚÑEZ-SELLÉS, 2005; VALKO *et al.*, 2006; CERQUEIRA, MEDEIRO, AUGUSTO, 2007; NEWSHOLME *et al.*, 2007).

Há uma relação direta entre ERO e condições de inflamação, degeneração pela idade, desenvolvimento de doenças crônicas, inflamatórias e degenerativas tais como as neoplasias, o DM-II, aterosclerose, injúria isquêmica, artrite reumatóide, colite ulcerativa, pancreatite, doenças neurológicas (doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer), hipertensão, doenças oculares (degeneração macular relacionada ao envelhecimento e catarata), doenças pulmonares (asma e doença pulmonar obstrutiva crônica) (BROWNLEE, 2005; GREENMAN *et al.*, 2007). A persistência do estresse oxidativo em células tumorais pode ativar protooncogenes e fatores de transcrição; levar a uma instabilidade genômica e a uma resistência à quimioterapia e à radioterapia; provocar invasão celular e metástases (NAVARRO, OBRADOR, 1999).

Tabela 2: Radicais livres

$\bullet\text{OH}$	Hidroxil	}	Espécies Reativas de Oxigênio
$\bullet\text{O}_2^-$	Superóxido		
$\text{RO}\bullet$	Alcoxil	}	Outros
$\text{NO}\bullet$	Óxido Nítrico		
$\text{RO}_2\bullet$	Alquiperóxil		

Tabela 3: Espécies Reativas de Oxigênio Não-Radicalares

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
O_3	Ozônio
ONOO^-	Peroxinitrito
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio

3.1. O Estresse Oxidativo no DM-II

Nas células β pancreáticas a geração de ERO ocorre por um mecanismo independente que envolve a ativação da enzima de membrana NADPH oxidase. Trata-se de um complexo enzimático formado pelo agrupamento de diferentes componentes citoplasmáticos e de membrana associados, que produzem grande quantidade de $\bullet\text{O}_2^-$ (Figura 3 e 4) (NEWSHOLME *et al.*, 2007).

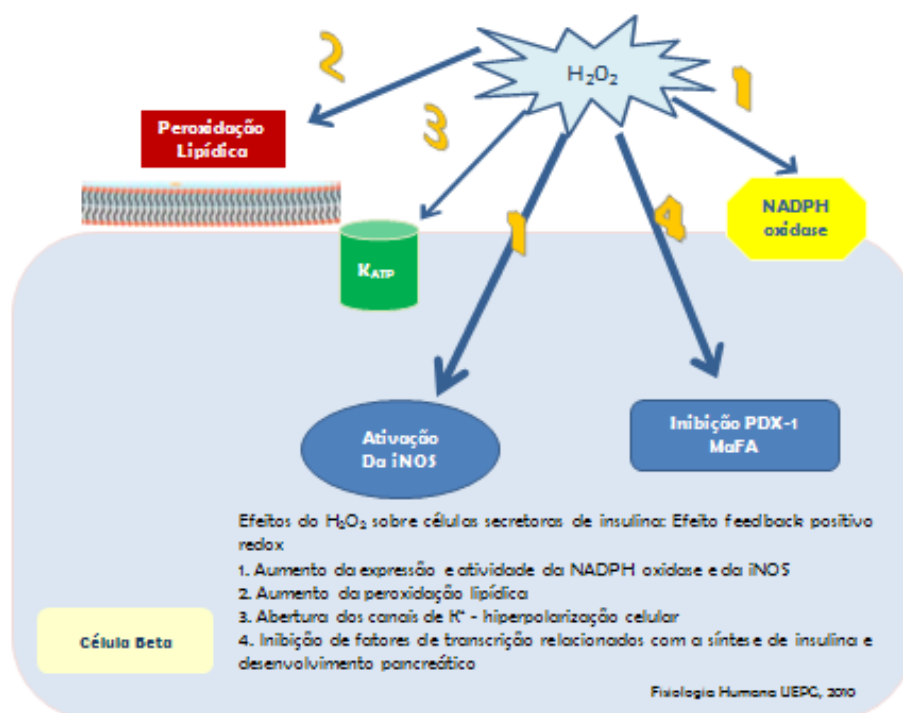


Figura 3: **Papel do Estresse Oxidativo sobre as células β pancreáticas.**

Nas células β pancreáticas, o nível de detoxificação de radicais livres é muito baixo, já que estas células possuem poucas enzimas de regulação de óxido redução (REDOX) (tais como superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT, glutathione peroxidase - GPx) o que caracteriza um sistema limitado de sequestro de ERO (*Scavenger*). Desta forma, uma associação entre uma superprodução de ERO e uma falha nos mecanismos de defesas antioxidantes intracelulares, leva à injúria celular e até a perda de função. Esta limitação confere às células β pancreática um rápido acúmulo de ERO em seu interior desencadeando um processo que culmina com o dano celular muitas vezes irreversível, levando às células à ativação de cascatas que ativam a apoptose (tais como fator de transcrição fator nuclear *kappa* B (NF- κ B), p38, proteínas quinases ativadas por mitógenos (AMPK), Jun N-Terminal quinase (JNK)/ proteína

quinase ativada por estresse (SAPK), hexosaminas entre outras vias) (Figura 5) (NEWSHOLME *et al.*, 2007).

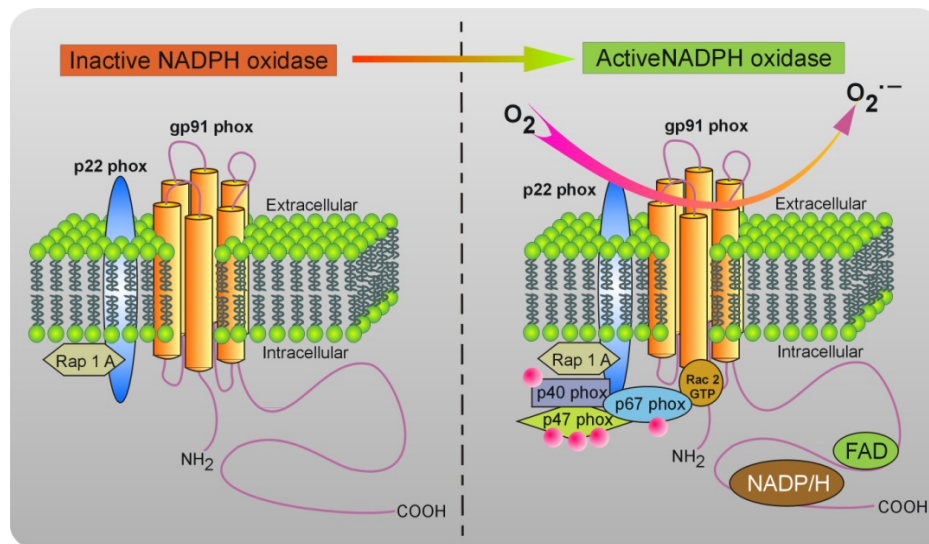


Figura 4: **Ativação da Enzima de Membrana NADPH oxidase.**

Fonte: <http://www.genkyotex.com/>

Esta ativação das vias de sinalização, devido ao desbalanço gerado por ERO, resulta no aumento da expressão de vários produtos gênicos de papel importante na complicação do DM-II, com consequente prejuízo na secreção de insulina. A regulação gênica por ERO pode ser exemplificada pelo aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) em resposta à ativação do NF-κB. O aumento de ERO leva também a um aumento no influxo de Ca^{2+} o que estimula a mitocôndria e o sistema NADPH oxidase (NEWSHOLME *et al.*, 2007). O aumento da geração de ERO e ERN em células β pancreáticas pode estimular as proteínas quinases (PK) IKK α e IKK β , responsáveis pela fosforilação das subunidades inibitórias de NF-κB, denominadas IκBs (quinase inibidora do κB), levando à ativação deste fator nuclear (HO; BRAY, 1999).

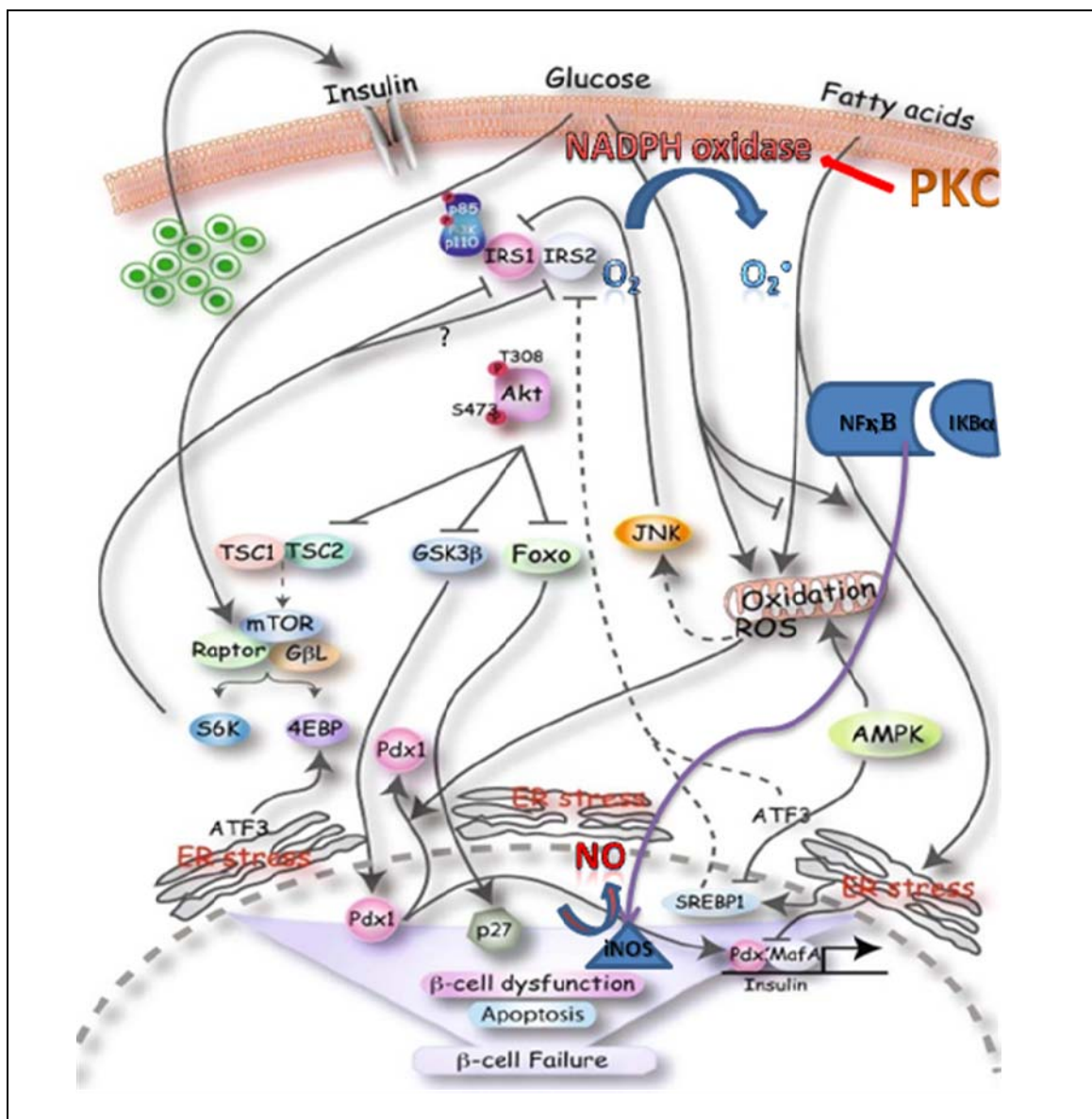


Figura 5. Vias de sinalização na complicação do diabetes.

Fonte: Adaptado de NEWSHOLME *et al.*, 2007.

Em ensaios *in vitro*, o H_2O_2 é um modelo bem estabelecido de indutor de estresse oxidativo por ser uma molécula de oxigênio intermediária no metabolismo celular e por apresentar alta reatividade (TANG, ZHANG, 2000; BRAATZ, 2010). Trata-se de um agente fisiológico presente na maioria dos processos oxidativos independente da causa inicial da oxidação. Neste sentido, células expostas a baixos níveis de H_2O_2 sofrem apoptose (LENNON, MARTIN, COTTER, 1991). Doses de $500\mu M$ de H_2O_2 aumentam significativamente a quantidade de ERO resultando em

danos às células pancreáticas e consequente redução na secreção de insulina (FU-LIANG *et al.*, 2006).

3.2. Antioxidantes

Os efeitos das ER no organismo são equilibrados por mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

Halliwell e Gutteridge (1990) definiram antioxidantes como substâncias presentes em baixas concentrações, comparadas às concentrações do substrato oxidante, que previnem significativamente ou minimizam a oxidação de substratos susceptíveis. Os principais mecanismos de ação de compostos antioxidantes incluem sistemas catalíticos de captadores de radicais e supressores de estados excitados.

A produção de radicais livres é controlada, nos seres vivos, por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (SOD, CAT, GPx), ou alimentar (tocoferóis, ácido ascórbico, polifenóis, selênio, ácido úrico e carotenoides). Lesões oxidativas de caráter cumulativo ocorrem quando há limitação na disponibilidade destes antioxidantes (SIES, STAHL 1997; McCALL, FREI, 1999; MATÉS, 2000; NORDBERG, ARNÉR, 2001; SOUSA *et al.*, 2007).

Os antioxidantes atuam primeiramente impedindo a formação das ER pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Em seguida interceptam as ER impedindo o ataque sobre os lipídeos e os aminoácidos, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Conferem proteção às células por favorecerem o reparo de lesões, a remoção das moléculas de DNA danificadas e a reconstituição das membranas celulares. Também modulam a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes como resposta adaptativa em células submetidas ao estresse oxidativo (SIES, STAHL, 1997; BIANCHI, 1999; LAYBUTT, 2002, BRAATZ, 2010).

3.2.1. Enzimas Antioxidantes e Antioxidantes Endógenos.

Os antioxidantes enzimáticos mais eficientes envolvem a SOD, a CAT, a GPx e a glutathione transferase (GSTs) (VALKO *et al.*, 2006).

A SOD catalisa a dismutação de $\cdot\text{O}_2^-$ e forma espécies menos reativas, como o H_2O_2 (McCORD, FRIDOVICH, 1969). Está presente na mitocôndria e possui papel fundamental devido à formação de $\cdot\text{O}_2^-$ pela cadeia respiratória (McCORD, FRIDOVICH, 1969; NORDBERG, ARNÉR, 2001).

A CAT é encontrada nos peroxissomos da maioria das células de organismos aeróbios onde o H_2O_2 é convertido em H_2O e O_2 . Também previne a formação de $\cdot\text{OH}$, via reação de Fenton, catalisada por $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ (NORDBERG, ARNÉR, 2001).

A glutathione (GSH) integra o mais importante sistema antioxidante que compreende diferentes sistemas enzimáticos, como a GPx, GST e redutase (GR). A GSH é a primeira e a mais importante defesa antioxidante não-enzimática intracelular contra produtos tóxicos de oxigênio (DELEVE, KAPLOWITZ, 1991). A GSH participa de reações de detoxificação, protege a célula contra danos oxidativos e nitrosativos, é importante na metabolização de compostos tóxicos eletrofilicos e quimioterápicos e atua na regulação e manutenção do estado REDOX da célula (WANG, BALLATORI, 1998; BALLATORI, HAMMOND, 2005). Em situações fisiológicas, a maioria das GSHs é mantida em estado reduzido pela GR. Porém, em situações de estresse oxidativo ocorre um prejuízo na regulação dos níveis de GSH e de sua forma oxidada, a glutathione dissulfeto (GSSG) (Figura 6) (WANG, BALLATORI, 1998). A quantidade de GSSG acumula-se dentro da célula, e a relação entre GSH/GSSG pode ser usada como indicador de estresse oxidativo no organismo (HWANG, YEN, 1992). A perda de GSH citoplasmática é um evento característico de morte celular por apoptose, interferindo na

capacidade REDOX da célula, tornando-a intolerante à presença de agentes oxidantes (SLATER, STEFAN, 1995).

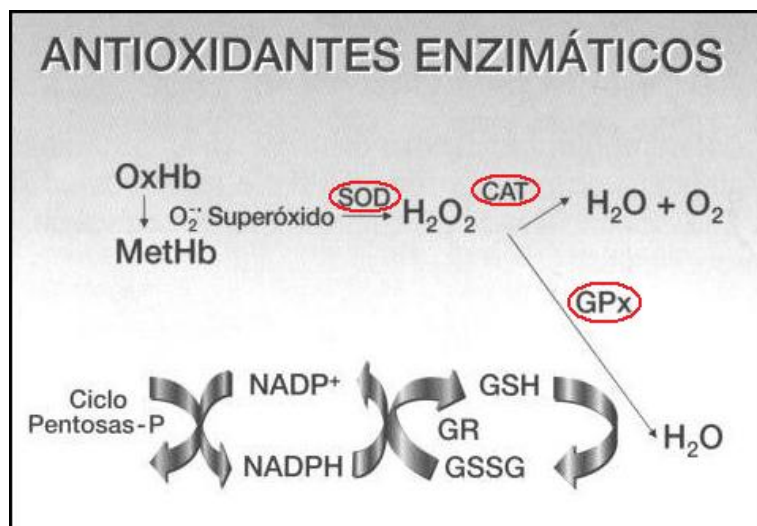


Figura 6: **Enzimas antioxidantes.** SOD = superóxido dismutase, CAT = catalase, GSH = glutathione, GR = glutathione redutase, GSSG = glutathione dissulfido.

Fonte: Adaptado de <http://www.institutobiologico.com>

3.2.2. Antioxidantes Exógenos

As plantas formam a base da medicina tradicional e cerca de 80% da população mundial utilizam-na no cuidado primário à saúde (CHIVIAN, 2002).

Os compostos fenólicos presentes nos frutos e folhas estão dispostos em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumáricos, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos. A atividade antioxidante destes compostos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são

relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUSA *et al.*, 2007; CERQUEIRA, MEDEIRO, AUGUSTO, 2007).

3.2.2.1. Flavonoides

Mais de 8.000 flavonoides já foram identificados, sendo estes formados a partir de um esqueleto básico (Figura 7) e combinações de vários grupos substituintes, como hidroxilas e metoxilas (Tabela 4) (HOLLMAN, KATAN, 1997; HODEK *et al.*, 2002).

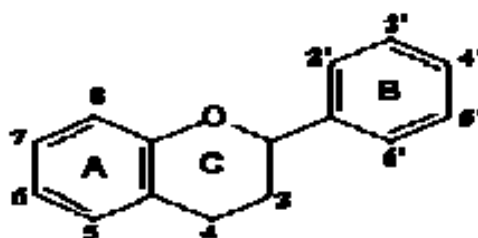


Figura 7: **Estrutura comum a todos os flavonoides.** Estruturalmente, os flavonoides constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos, que possuem nessa estrutura anéis aromáticos A e B. Pode ocorrer facilmente interconversão entre os flavonoides

Fonte: YOKOZAWA *et al.*, 1997.

Nas plantas, os flavonoides estão presentes em folhas, frutos, cascas, raízes e flores e possuem propriedades de proteção contra a peroxidação lipídica e danos causados pelos raios ultravioletas (REYNERTSON, BASILE, KENNEL, 2005; BRAATZ, 2010).

Tabela 4: Alguns representantes das subclasses de flavonóides.

SUBCLASSES FLAVONOIDES	COLORAÇÃO	EXEMPLOS
Antocianidinas	Azul, vermelha e violeta	Cianidina; Delfinidina; Malvidina; Pelargonidina; Peonidina.
Flavanas (mono, bi e triflavanas) ou Flavanóis.	Incolor	Catequina; Epicatequina(EC); Epigalotequina (EGC); Epicatequina -3-galato (ECG); Epigalocatequina-3-galato (EGCG) Luteoforol; Procianidina.
Flavanonas	Incolor para um amarelo pálido	Theaflavina; Taxifolina; Narirutina; Eriodictiol; Homoeriodictiol; Hesperidina; Naringenina; Naringina; Neohesperidina.
Flavonas	Amarelo	Apigenina; Luteolina; Diosmetina; Diosmina; Tangeritina; Nobiletina; Crisina.
Flavonóis	Amarelo	Kaempferol; Quercetina; Rutina; Canferol; Miricetina.
Isoflavonoides ou Isoflavonas	Incolor	Puerarin; Daidzeína; Genisteína; Gliciteínas.
Auronas		Aureusina; Aureusidina.
Chalconas		Florentina; Floridzina.

Adaptado de CANIVENC-LAVIER, VERNEVAUT, 1996; DORNAS *et al.*, 2007.

Diferentes características estruturais são responsáveis por diversas atividades biológicas, e a remoção ou alteração da posição de alguns dos substituintes e quantidade de hidroxilas são fatores que influenciam na atividade do composto (SCHROETER, BOYD, 2002; MENG, ZHENG, 2004).

Sua ação antioxidante depende também, do grau de pureza, das concentrações empregadas e das condições em que são realizados os experimentos com flavonoides (PINENT *et al.*, 2008).

Os flavonoides ingeridos são absorvidos no estômago e intestino delgado, metabolizados principalmente pelo fígado e excretados na urina e nas fezes (ONG, KHOO, 2000; AHERNE, O'BRIEN, 2002). No trato gastrointestinal, os flavonoides podem exercer efeitos diretos tais como a ligação a inibidores de telomerase, regulação de vias de transdução de sinal, inibição de ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX), redução das atividades de xantina oxidase, metaloproteinase de matriz e da enzima conversora de angiotensina, além disso, competem com a glicose por transportadores transmembrana e alteram a função de plaquetas (CERQUEIRA, MEDEIRO, AUGUSTO, 2007).

3.2.2.1.a Papel dos Flavonoides no DM-II

O uso de flavonoides no tratamento do DM-II não é recente. Borges, Bautista e Guiler (2008), realizaram um levantamento etnobotânico do período de 1986 até 2002, e identificaram 65 espécies de vegetais utilizados pelas comunidades tradicionais pelas suas propriedades terapêuticas para o DM-II. Dessas, 5 espécies (*Arctium minus*, *Allium sativum*, *Baccharis trimera*, *Bauhinia forficata* e *Anacardium occidentale*) têm comprovação científica dos seus efeitos hipoglicemiantes e antioxidantes. Tal estudo

demonstra a importância da utilização de fitoterápicos no tratamento auxiliar do paciente com DM-II.

Todavia, existe uma grande diversidade de flavonoides o que torna difícil estabelecer um efeito comum no pâncreas. Relata-se diferentes efeitos na secreção de insulina, na prevenção da apoptose das células β pancreáticas e na modulação da proliferação celular (PINENT *et al.*, 2008).

Há evidências recentes de que alguns flavonoides podem afetar a curva glicêmica. Isso ocorre devido alteração na captação intestinal de glicose por estes compostos, possivelmente devido a interações com os transportadores de glicose. Os flavonoides atuam imediatamente após a absorção de glicose no intestino delgado, podendo interagir com determinados transportadores de glicose, como por exemplo, inibindo o SGLT1 e o GLUT2. Estudos indicam que os polifenóis, ácidos fenólicos, taninos e flavonoides dos morangos, maçãs e frutos cítricos são potentes inibidores dos GLUT2 e SGLT1 e conseqüentemente, alteram a absorção de glicose (JUNG *et al.*, 2006).

É sabido que flavonoides agem como redutores da atividade lipídica em animais, o que por sua vez poderia auxiliar no tratamento do DM-II em face à dislipidemia envolvida nesta síndrome. Em estudos com naringina, rutina, ácido nicotínico e suas associações, comprovou-se pronunciada redução do colesterol, triacilgliceróis e lipoproteínas. A hipercolesterolemia induzida em animais, pela administração intraperitoneal de triton, foi reduzida em todos os tratamentos com os respectivos flavonoides. Isso pode ser explicado pela ação destes compostos em inibir o transporte de carboidratos e aminoácidos no intestino delgado de cães, porquinhos da Índia e ratos. Neste estudo, a naringina obteve maior influência no aumento de alanina por inibir o efluxo de aminoácidos através da membrana celular. Este efeito deve-se às prováveis

alterações metabólicas e inibição do $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase. Sendo assim, a naringina mostrou-se útil no tratamento de desordens lipidêmicas (SANTOS *et al.*, 1999).

O efeito dos flavonoides foi demonstrado, em tratamento crônico de ratos diabéticos, onde houve diminuição dos níveis sanguíneos de glicose (ZARZUELO *et al.*, 1996). Neste sentido, crisina, hesperidina, naringina, quercetina e a epigallocatequina galato (EGCG), apresentam ação hipoglicemiante através da redução da produção de glicose hepática e da inibição de genes que controlam a gliconeogênese (VELUSSI *et al.*, 1997; SHIN *et al.*, 1999; WALTNER-LAW *et al.*, 2002; VESSAL, HEMMATI, VASEI, 2003; SHETTY *et al.*, 2004; JUNG *et al.*, 2004; ANTON, MELVILE, RENA, 2006). A isoflavona genisteína, também possui efeito hipoglicemiante em ratos diabéticos, além de aumentar os níveis de insulina e da enzima glicoquinase (GK) (LEE, 2006). De maneira semelhante, a miricetina exerce ação hipoglicêmica, por mimetizar as ações da insulina, regulando os níveis glicêmicos e influenciando o metabolismo e estoque de glicogênio hepático (ONG, KHOO 2000).

Em células musculares de ratos saudáveis e diabéticos, a administração de canferol diminuiu a concentração de glicose plasmática e aumentou a captação de glicose em células musculares (HSU *et al.*, 2003; DE SOUSA, 2004; JORGE, 2004).

No diabetes induzido por Aloxano, a administração de polifenóis de chá-verde (*Camellia sinensis*) reduziu a glicose sanguínea, inibiu a peroxidação lipídica e favoreceu a atividade antioxidante da GSH (VELUSSI *et al.*, 1997).

Em paciente com DM-II, observa-se uma ineficiência ou ausência da secreção de insulina, o que inibe a atividade da lipase pancreática. Os efeitos dos flavonoides morina, naringenina, naringina e rutina, reduziram os triacilgliceróis pela ativação desta enzima que por sua vez, liberou ácidos graxos e glicerol para utilização celular (WATSON, PESSIN, 2001).

A floridzina atua reduzindo a glicose sanguínea através da inibição da captação intestinal, reabsorção renal e aumento da captação de glicose pelo tecido adiposo (ZHAO *et al.*, 2004).

Em estudo de Kamalakkannan e Prince (2006), o tratamento com rutina (100mg/kg) a ratos diabéticos (indução por STZ) aumentou os níveis de antioxidantes plasmáticos (GSH, Vitamina C, Vitamina E e Ceruloplasmina).

3.2.2.1.b. Papel dos Flavonoides no Estresse Oxidativo

A capacidade antioxidante de compostos fenólicos é determinada por sua estrutura, em particular por hidroxilas que podem doar elétrons e suportar como resultado a translocação em torno do anel aromático (ressonância). Desta forma, quercetina, miricetina e canferol possuem maior atividade antioxidante que os flavonoides conjugados como o caso da rutina (DORNAS *et al.*, 2007).

Os flavonoides possuem efeito antioxidante mais acentuado que aquele conferido pelas vitaminas (REYNERTSON, BASILE, KENNEL, 2005). Estudos *in vivo* com protoantocianidinas de sementes de uvas (*Vitis sp*) comprovam eficácia deste flavonoide no sequestro de radicais livres, superior ao da vitamina C, E e β caroteno. Neste estudo, constatou-se também a diminuição dos radicais livres pela inibição de sua produção. Isso se deve ao fato dos compostos fenólicos possuírem capacidade de quelatação de metais de transição como ferro e cobre, e assim, estes metais não ficam à disposição para que a reação de Fenton ocorra (DORNAS *et al.*, 2007).

Flavonoides como a quercetina, mirecitina, rutina, proantocianidina e a naringinina podem inibir diversas enzimas tais como a aldose redutase, α -glicosidase, xantina oxidase, monooxigenase, LOX, COX, elastase, collagenase, hialuronidase e β

glicoronidase (MIDDLETON, KANDASWAMI, 1993; YOSHIKAWA *et al.*, 1998; DORNAS *et al.*, 2007; BRAATZ, 2010).

Segundo Hwang e Yen (2008), hesperidina e neohesperidina em concentrações de 0,8, 4, 20 e 50 μM , protegem as células neurais da linhagem PC12 contra o estresse oxidativo provocado por H_2O_2 em concentrações de 400 μM em ensaio de 16 horas. Isso ocorre devido aumento da viabilidade celular, prevenção aos danos de membrana e inibição da atividade da caspase 3.

Em estudos com modelos animais cujo diabetes foi induzido por medicamentos (tais como STZ e Aloxan), a quercetina, rutina e EGCG demonstraram atividade antioxidante eficaz, conferindo proteção às células β pancreáticas quando administrada três dias antes destes fármacos. Nestes estudos, observou-se inibição do NF- κB e consequente diminuição da expressão de iNOS. Neste tipo de modelo animal, os flavonoides provocaram redução de ácido tiobarbitúrico (TBAR) no fígado e consequentemente, minimizaram o risco de peroxidação lipídica, nestes animais houve diminuição de HPs igualando-se aos animais controles (PINENT *et al.*, 2008).

A constatação de que doses baixas de flavonoides ativam vias de sinalização, que resultam no aumento da expressão de genes, os quais codificam proteínas para a proteção celular leva-nos a crer que estes compostos preparam as células para resistirem às condições mais severas de estresse (PINENT *et al.*, 2008; BASTOS *et al.*, 2009).

3.2.2.1.c. Flavonoides em Estudo

Naringina

A naringina é um flavonoide encontrado em frutas cítricas como a laranja, tangerina e o suco do limão (PINENT *et al.*, 2008). Trata-se de um glicosídeo com

importante papel na quelação de metais, relevante atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres e proteção contra a peroxidação lipídica (ALI, EL KADER, 2004).

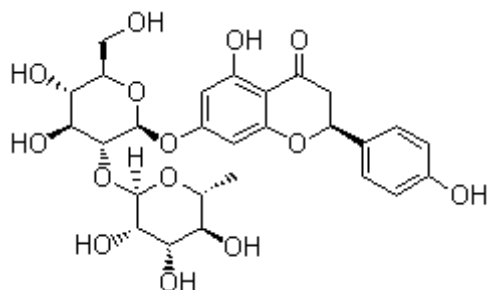


Figura 8: **Estrutura molecular da naringina** - $C_{27}H_{32}O_{14}$, PM= 580.53

(Fonte: site ChemBlink)

Administrações de doses graduais de naringina a ratos com hiperglicemia resultaram em decréscimo nos níveis de H_2O_2 pelo aumento da atividade antioxidante endógena (aumento da atividade de enzimas antioxidantes como CAT, SOD e GPx) (JUNG *et al.*, 2004; JUNG *et al.*, 2006; PINENT *et al.*, 2008).

Em paciente com DM-II, foi observado que a inibição da atividade da lipase pancreática foi revertida pelos flavonoides morina, naringenina, naringina e rutina (LIMA *et al.*, 1999). Sabe-se que, a naringina no DM-II modula a expressão da proteína GLUT2 e favorece a atividade da GK (JUNG *et al.*, 2006). Dentre outros efeitos, a naringina possui uma ampla ação biológica como agente redutor do colesterol, agente antiaterogênico e antimutagênico (ALI, EL KADER, 2004).

Neohesperidina

A neohesperidina é uma flavanona com propriedades antioxidantes importantes. Em estudo com células neurológicas PC12, Hwang e Yen (2008) demonstraram a capacidade deste flavonoide em preservar a viabilidade destas células contra o estresse

oxidativo promovido pelo H_2O_2 . Este flavonoide preveniu os danos de membrana celular, demonstrou capacidade de sequestro de ERO, aumentou a atividade de enzimas antioxidantes, principalmente a CAT.

Nos estudos de Takii e colaboradores (1997), os flavonoides agiram como adjuvantes no tratamento do DM-II visto que, o pico de glicose sanguínea pós-prandial em ratos tratados com neohesperidina decresceu cerca de 50%.

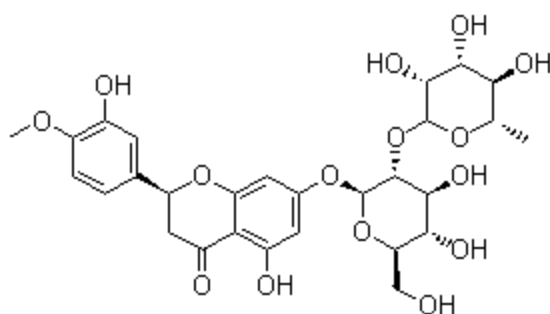


Figura 9: **Estrutura molecular da neohesperidina** - $C_{28}H_{36}O_{15}$, PM =612.58 M
Fonte: site ChemBlink

Quercetina

A quercetina é um flavonol que está presente nas frutas, vegetais e no vinho tinto. É um dos flavonoides mais amplamente estudados, sendo suas propriedades antioxidantes e pró-oxidantes já bem reconhecidas. Possui capacidade de inibir a proliferação celular e induzir a apoptose em diferentes tipos celulares (BARAN *et al.*, 2001).

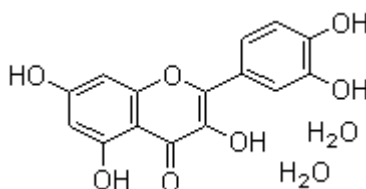


Figura 10: **Estrutura molecular da quercetina** - $C_{15}H_{10}O_7 \cdot xH_2O$, PM =302.24M
Fonte: site ChemBlink.

A quercetina pode ativar a morte celular programada pela elevação dos níveis de Ca^{2+} intracelular, abertura dos mPTP, colapso do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e liberação do citocromo *c* do interior da mitocôndria. (BARAN *et al.*, 2001). Este flavonoide também possui a capacidade de reduzir a enzima iNOS por meio da inibição do NF- κ B. Em células Jurkat a quercetina acumula-se em grande quantidade dentro da mitocôndria, ligando-se às proteínas podendo, desta forma, ativar ou inibir a transição pelos mPTP, dependendo da atividade pró- ou antioxidante, respectivamente (ULLAH *et al.*, 2009).

Em tratamentos crônicos, a quercetina interfere nos sistemas antioxidantes endógenos, principalmente por reduzir níveis da GR (BARAN *et al.*, 2001).

IV - MATERIAL E MÉTODOS

1. Principais Reagentes, Químicos e Enzimas:

- Tripsina, Gibco BRL - Life Technologies.
- Penicilina e estreptomicina, Vitrocell - Embriolife.
- Meio RPMI-1640, Vitrocell.
- Soro fetal bovino, Cultilab e Vitrocell.
- Bicarbonato de sódio, Biotec – LabMaster.
- Glucose Anidra, Biotec- LabMaster.
- Azul de Tripán - Sigma-Aldrich.
- Naringina, Sigma-Aldrich.
- Neohesperidina, Sigma-Aldrich.
- Quercetina, Sigma-Aldrich.
- Peróxido de Hidrogênio, LabSynth.
- Glutathione Redutase, Sigma.
- Nicotinamida Adenina Nucleotídeo Fosfato (NADPH), Biomedical LLC.
- Dimetilsulfóxido, Biotec - LabMaster.
- Insulina radioativa – Hoechst.
- Anticorpo de rato contra insulina.
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich.
- Albumina, Sigma-Aldrich.
- BCIP/NBT- Blue Liquid Substrate, Sigma-Aldrich.
- Xylenol Orange, Sigma-Aldrich.

2. Equipamentos:

- Centrífuga, Bio Eng BE-4004.
- Banho Maria, Logen Scientific.
- Fluxo Laminar, Veco.
- Microscópio Óptico, American Optical Corporation One-Fifty.
- Microscópio Óptico, Nikon Eclipse E200.
- Leitor de Microplacas Elisa, BioTek μ Quant.
- Balança analítica, Marte modelo AS2000C.
- Vórtex, Quimis.
- pHmetro, Quimis Requipal.
- Microscópio invertido, Quimis
- Microscópio invertido, Mediluz.
- Centrífuga Refrigerada, Excelsa 4 Modelo 280R – FANEM.
- Centrífuga Refrigerada Eppendorfs, 5415R.
- Estufa de CO₂, Isotemp– Fisher-Scientific.
- Aparelho de Radioimunoensaio - Contador automático de radiação *gamma*, Perkin Elmer – 2470 / Wizard 2®).
- Freezer Ultra Low (-70^oC), Sanyo.
- Pipetas de precisão, Gibson e LabMATE.
- Pipetas de repetição - Eppendorf.

3. Linhagem Celular e Condições de Cultivo:

Foi utilizada neste trabalho a linhagem celular BRIN-BD11 gentilmente cedida à Professora Doutora Henriette Rosa de Oliveira Emílio pelo Professor Titular Angelo Rafael Carpinelli da Universidade de São Paulo (USP). Trata-se de células híbridas secretoras de insulina produzidas por eletrofusão (células β pancreáticas normais de rato e células RINm5F de insulinoma). Essas são células transformadas que podem ser mantidas em cultura indefinidamente. Para garantir a homogeneidade de suas características morfofisiológicas, as células permaneceram em cultura por períodos nunca superiores a 3 meses conforme metodologia padrão para cultivo celular (FRESHNEY, 1994).

As células foram rotineiramente mantidas em garrafas plásticas de cultura de 75cm², contendo meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB, 24 mM de Bicarbonato de Sódio, 100 U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, pH 7,4, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Os repiques foram feitos de maneira a manter as células em fase *log* de crescimento, entre as concentrações de 1,5 a 10 x 10⁵ células/mL. A viabilidade celular das culturas em todos os experimentos realizados foi sempre superior a 90%. Os flavonoides em estudo, naringina e neohesperidina, assim como o flavonoide controle, quercetina e o H₂O₂, foram adicionados ao meio de cultura solubilizados em DMSO, sendo que este solvente teve sua concentração final de 0,032% em todos os experimentos realizados.

4. Curva de Crescimento e Tempo de Dobramento das Células BRIN-BD11:

Um típico experimento de curva de crescimento foi realizado, onde uma suspensão de células (2 x 10⁵ células/ mL) foi semeada em garrafas 75 cm² com volume final de 20mL de meio de cultura e mantidas em estufa de CO₂.

O número de células foi determinado a cada 24 horas por microscopia óptica utilizando câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi verificada analisando a integridade da membrana por exclusão do azul de Tripán 0,5%. O percentual de células viáveis foi calculado pela relação entre o número de células viáveis (não coradas) e o número de células totais. O tempo de dobramento da população (PDT do inglês *population doubling time*) foi calculado conforme descrito:

$$\text{PDT} = \frac{1}{r}$$

$$r = \frac{3,32 (\log N_H - \log N_I)}{(t_2 - t_1)}$$

Onde: r = taxa de multiplicação celular, N_H = número de células coletadas em um determinado período de tempo (t_2), N_I = é o número de células inoculadas no tempo zero (t_1) e 3,32 uma constante.

5. Tratamentos Celulares:

5.1 PADRONIZAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO AGUDO E CRÔNICO E ATIVIDADE DE SEQUESTRO E PRODUÇÃO DE H_2O_2 PELOS FLAVONOIDES NARINGINA E NEOHESPIRIDINA:

5.1.1 Estresse oxidativo crônico em células BRIN-BD11 induzido por H_2O_2 .

A solução estoque de H_2O_2 (9,8M) foi diluída em meio de cultura RPMI-1640 nas concentrações de 6,25 a 300 μM em fluxo laminar, e preparadas frescas em cada experimento.

As células BRIN-BD11 foram incubadas em placas de 24 poços, na concentração de $1,5 \times 10^5$ células por poço (1mL) sendo mantidas por um período de 18-24 horas em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a 37°C para completa adesão celular à placa, antes de serem submetidas ao estresse oxidativo. Após a retirada do meio de

cultivo e adição do H_2O_2 nas concentrações acima mencionadas, as células retornaram à estufa de CO_2 por um período adicional de 24 horas (tratamento crônico), sendo a viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT conforme descrito no item 6.1.

A concentração inibitória média (IC_{50}) do H_2O_2 para células BRIN-BD11 em 24 horas foi determinada com base na equação da reta obtida pelos valores de viabilidade celular avaliada pela redução do MTT.

5.1.2 Estresse oxidativo crônico em células BRIN-BD11 induzido por H_2O_2 associado ao (DMSO).

A solução estoque de H_2O_2 (9,8M) foi diluída em meio de cultura RPMI-1640 para atingir as mesmas concentrações citadas no item anterior, sendo que neste ensaio adicionou-se DMSO na concentração final de 0,032% em todas as concentrações. A adição de DMSO deve-se ao fato do solvente ser o veículo de solubilização para os flavonoides testados que, segundo Florão e colaboradores (2007), pode aumentar a permeabilidade das membranas celulares.

As células BRIN-BD11 foram incubadas sob as mesmas condições descritas anteriormente (item 5.1.1). Após a retirada do meio de cultivo e adição do H_2O_2 acrescido de DMSO, as células retornaram à estufa de CO_2 durante o período de 24 horas. Foram utilizados neste experimento controles de células sem tratamento e de células cultivada na presença de DMSO (denominado de controle de DMSO). Avaliou-se a viabilidade celular pelo teste de redução do MTT (item 6.1).

A IC₅₀ do H₂O₂ em associação com o solvente DMSO para células BRIN-BD11 em 24 horas foi determinada com base na equação da reta obtida pelos valores de viabilidade celular avaliada pela redução do MTT.

5.1.3 Estresse oxidativo agudo em células BRIN-BD11 induzido por H₂O₂ associado ao (DMSO).

Neste ensaio de indução de estresse oxidativo agudo, utilizou-se também a solução estoque de H₂O₂ (9,8M) diluída em meio de cultura RPMI-1640 para atingir as mesmas concentrações de 100 a 600 µM em associação ao DMSO na concentração final de 0,032% em todos os tratamentos.

As células BRIN-BD11 foram semeadas em placas de cultivo de 24 poços na concentração de 3×10^5 células por poço (1mL) sendo mantidas por um período de 18-24 horas em atmosfera úmida com 5% de CO₂, a 37°C para completa adesão celular à placa, antes de serem submetidas ao estresse oxidativo. Após a retirada do meio de cultivo e adição do H₂O₂ nas concentrações acima mencionadas, as células retornaram à estufa de CO₂ pelo período adicional de 2 horas (tratamento agudo), sendo a viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT conforme descrito no item 6.1.

A IC₅₀ do H₂O₂ para células BRIN-BD11 em 2 horas foi determinada com base na equação da reta obtida pelos valores de viabilidade celular avaliada pela redução do MTT.

5.1.4 Ensaio de reversão da citotoxicidade induzida por estresse oxidativo crônico pelos flavonoides naringina e neohesperidina

Nos ensaios de reversão de citotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo crônico, utilizamos flavonoides comerciais fornecidos pela Sigma-Aldrich Co, Naringina (PM 580,5 g/mol) e Neohesperidina (PM 612,6 g/mol). E ainda utilizamos como flavonoide controle a Quercetina (PM 302,24 g/mol). O DMSO foi escolhido como solvente para os flavonoides seguindo sugestão do próprio fornecedor e de artigos referentes à área (FLORÃO *et al.*, 2007). Em todos os tratamentos, inclusive no controle de DMSO, conforme anteriormente mencionado o solvente apresentou concentração final de 0,032%.

Previamente ao ensaio de reversão da citotoxicidade propriamente dito, foi realizado um ensaio de determinação de citotoxicidade “*per se*” dos flavonoides sobre as células BRIN-BD11. Para tanto uma curva dependente de concentração de flavonoides foi realizada conforme descrito na sequência.

Células BRIN-BD11 foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/poço e incubadas durante 18 horas para adesão celular. Após este período o sobrenadante foi desprezado por inversão da placa de cultura, e adicionou-se 1mL de meio com diferentes concentrações de cada flavonoide em DMSO. As concentrações em estudo foram de 1,25 a 80 μ M. Neste experimento também foi utilizado controle de células sem tratamento e controle de células em solvente (DMSO). Avaliou-se a citotoxicidade dos flavonoides conforme descrito no item 6.1, ou seja, pelo teste de redução do MTT.

Para o ensaio de reversão da citotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo foi realizado um experimento utilizando-se controle de células sem tratamento, controle de células em meio com DMSO (chamado controle do DMSO), controle do H_2O_2 nas duas

concentrações propostas (37,5 e 75 μ M) e os flavonoides (naringina, neohesperidina ou quercetina) em três concentrações não citotóxicas, 2,5; 5 e 10 μ M, na presença ou não de H₂O₂.

Avaliou-se a ação dos flavonoides na reversão da citotoxicidade sobre as células BRIN-BD11 pelo teste de redução do MTT (item 6.1).

5.1.5 Ensaio de reversão da citotoxicidade induzida por estresse oxidativo agudo pelos flavonoides naringina e neohesperidina isolados e em associação

Células BRIN-BD11 foram semeadas em placas de 24 poços na 3 x 10⁵ células/poço e incubadas durante 18-24 horas para adesão celular. Após este período o sobrenadante foi desprezado por inversão da placa de cultura, e adicionou-se 1 mL de meio com 10 μ M de cada flavonoide dissolvido em DMSO na presença ou ausência de H₂O₂ pelo período de 2 horas (efeito agudo). Neste experimento também foi utilizado controle de células sem tratamento, controle de células em solvente (DMSO) e controle de células na presença apenas de H₂O₂. Neste ensaio foi utilizada uma concentração de 350 μ M de H₂O₂. Avaliou-se ainda, o possível efeito sinérgico de citoproteção dos flavonoides (naringina, neohesperidina e quercetina) na concentração final de 10 μ M. A ação aguda dos flavonoides na reversão da citotoxicidade sobre as células BRIN-BD11 foi mensurada pelo teste de redução do MTT (item 6.1).

5.1.6 Ensaio de sequestro e/ou produção de H₂O₂ pelos flavonoides naringina e neohesperidina em meio de cultura e em tampão PBS:

Em placas de 96 poços foi realizado o ensaio de sequestro e/ou produção de H₂O₂ pelos flavonoides naringina e neohesperidina, misturando-se em meio de cultura (RPMI 1640 com 10% de SFB) ou tampão PBS diferentes concentrações de cada

flavonoide (2,5; 5 e 10 μM) dissolvido em DMSO na presença e ausência de H_2O_2 (37,5 e 75 μM) pelo período de 2 horas. Este experimento foi realizado na ausência de células com intuito de avaliarmos apenas o comportamento químico dos flavonoides em solução, efeito denominado por Long, Clement e Halliwell (2000) “Artefato em Cultura dos Flavonoides”. Neste ensaio foi determinado a concentração final de H_2O_2 utilizando-se a técnica que emprega o reagente *Xilenol Orange*, conforme descrito no item 6.2.

5.2 EFEITO DOS FLAVONOIDES NARINGINA E NEOHESPERIDINA SOBRE SECREÇÃO DE INSULINA.

5.2.1 Efeito insulínico positivo dos flavonoides naringina e neohesperidina em células BRIN-BD11 previamente estimuladas por glicose.

Para este ensaio as células foram semeadas na concentração de 5×10^5 células por poço (24 poços) em meio RPMI 1640 com 10% de SFB e incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a 37°C por 24 horas para completa adesão celular. Após este período as células foram tratadas com diferentes concentrações dos flavonoides naringina, neohesperidina ou quercetina diluídos em DMSO. Os tratamentos foram realizados em quadruplicata, sendo as células novamente incubadas sob mesmas condições por 24 horas adicionais.

No terceiro dia o meio foi retirado e adicionou-se tampão de solução de Krebs-Henseleit 0,2%, pH 7,4 (KH) (115 mM NaCl, 24 mM NaHCO_3 , 5 mM KCl, 1mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) contendo 0,2% de albumina sem glicose a cada poço. As placas foram pré-incubadas por 30 minutos em estufa a 37°C , sendo a solução então desprezada e adicionando-se 1mL da solução KH conforme anteriormente descrito

porém com adição de 5,6 mM de glicose. As células foram então incubadas por mais 1 hora.

Ao final do tempo de incubação cerca de 900µl do sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5mL e centrifugados à 1000 rpm durante 5 minutos. Destes, 700µl foram transferidos e congelados a -70°C para posterior quantificação de insulina pela técnica de radioimunoensaio (RIE) conforme descrito no item 6.5.

6. Técnicas Empregadas:

6.1 REDUÇÃO DO MTT – DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Este ensaio é baseado na habilidade da atividade das desidrogenases mitocondriais de células viáveis em clivar o anel tetrazólico, transformando o reagente MTT amarelo em cristais de formazan azul escuro, sendo este impermeável à membrana celular, resultando em seu acúmulo nas células viáveis. A adição de DMSO causa solubilização das células, com liberação dos cristais e sua também solubilização. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de formazan formado (VAN DE LOOSDRECHT, NANNIE, 1991).

Para determinação da viabilidade por redução do MTT, as células foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas em estufa de CO₂, pelo período de 18-24 horas, para completa adesão celular. Após este período, o sobrenadante das culturas foi descartado e posteriormente as células foram tratadas com diferentes concentrações dos flavonoides (naringina, neohesperidina e quercetina) e o H₂O₂ utilizando o DMSO como solvente dos compostos testados. Os ensaios foram realizados em quadruplicatas, e as células foram incubadas em estufa de CO₂ por período de 2 horas (ensaio agudo) ou 24 horas (ensaio crônico). Após o período de tratamento o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 500 µL de uma mistura 1:10 de MTT (5mg/mL) em meio RPMI-

1640 com 10% de SFB a cada poço. As células foram então incubadas durante 60 minutos a 37°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e na sequência adicionou-se 500µL de DMSO ao precipitado de cor púrpura formado (formazan), resultado da redução do MTT. As amostras foram homogeneizadas com pipeta e a absorbância (Abs) medida a 546nm em leitor de microplacas (ELISA). A Abs obtida do grupo controle, ou seja, células sem tratamento, foi considerada como 100% de células viáveis. A viabilidade celular foi calculada pela fórmula abaixo, e expressa nos gráficos em atividade de desidrogenase mitocondrial.

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Abs média da amostra} \times 100}{\text{Abs média do controle}}$$

6.2 DETERMINAÇÃO DE H₂O₂

A determinação da produção de H₂O₂ foi realizada por espectrofotometria usando a técnica de *Xylenol Orange*, conforme descrito por Fabiani e colaboradores (2009). Para realização desta técnica foram adicionados 400µL de solução de cor que continha 1mL do reagente 1 (25mM de sulfato de amônio ferroso e 2,5M de ácido sulfúrico) e 100mL do reagente 2 (100mM de sorbitol e 125µM de *Xylenol Orange*) sobre 20 µL de amostra das diferentes soluções obtidas da mistura do meio de cultura ou do tampão PBS com os flavonoides na presença ou não de H₂O₂. A técnica de *Xylenol Orange* permite detecção e quantificação de H₂O₂ gerado em meio de cultivo ou tampão PBS pelos flavonoides. A reação envolve a oxidação do íon ferroso (Fe²⁺) para íons férricos (Fe³⁺) através do H₂O₂. Após 2 horas de incubação a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, o reagente laranja passa para a coloração púrpura indicando

presença de H_2O_2 , sendo as Abs mensuradas à 560 nm, e os valores de leitura comparados com a curva padrão de H_2O_2 (25 a 250 μM).

6.3 QUANTIFICAÇÃO DE INSULINA - RADIOIMUNOENSAIO

O experimento de mensuração da insulina seguiu o protocolo de Salgado e colaboradores (1999). Parte dos exames de RIE das amostras foram realizados na Universidade Estadual de Maringá (UEM) no Laboratório de Biologia Celular da Secreção – Professor Paulo C. F. Mathias e Professora Sabrina Grassioli e outra parte pelo laboratório da Universidade de São Paulo – Professor Angelo Carpinelli e Marlene Santos.

Células BRIN-BD11 foram semeadas na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas para completa adesão celular e depois por mais 24 horas, com diferentes tratamentos (H_2O_2 , naringina, neohesperidina, quercetina e suas associações) conforme descritos em detalhes nos itens 5.4.1 e 5.4.2. Após período de incubação o sobrenadante de cada poço foi transferido para microtubos de 1,5 mL que foram centrifugados em centrífuga refrigerada à 1000rpm durante 5 minutos. Decorrido o tempo, 700 μ L deste sobrenadante foram coletados e mantidos a -70°C em criocaixas até sua utilização para mensurar a insulina.

Em resumo, a insulina foi mensurada utilizando-se o método indireto (mensuração de insulina não ligada ao anticorpo). Para isso, adicionou-se 100 μ L de solução contendo tampão NSB, insulina radioativa (com 4.000cpm) e anticorpos de cobaia (*Guinea pig*) contra insulina. Após agitadas, as amostras foram mantidas refrigeradas durante 48 horas protegidas da luz para realização da curva de radioatividade. Após, 200 μ L de carvão ativado foram acrescentados a cada amostra. As

amostras foram homogenizadas em vortex e mantidas em geladeira durante 30 minutos para então serem centrifugadas durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado através de sugador.

O método de RIE baseia-se na competição entre a insulina (humana) marcada com o radioisotopo I^{125} e a insulina não-marcada (insulina secretada pelas células BRIN-BD11) pelo anticorpo anti-insulina (1:200) derivado de cobaia. Uma curva-padrão foi preparada utilizando-se concentrações conhecidas de insulina não-marcada. A partir desses resultados foi possível determinar a concentração de insulina presente nas amostras. O complexo antígeno-anticorpo foi precipitado pela adsorção do hormônio ao polietilenoglicol (PM 6000).

A leitura da radioatividade foi realizada em leitora automatizada de radiação *gamma* seguindo protocolo pré- estabelecido pelo próprio software.

7. Estudo Estatístico

Os resultados obtidos foram analisados pelo programa PRISMA Graph Pad 5.01 através da normalização dos dados obtidos em relação ao controle. Foi realizada análise de variância de uma via (ANOVA) e posteriormente Teste de Tukey. Os dados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de dois ou mais experimentos independentes. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “*p*” igual ou menor que 0,05.

V - RESULTADOS

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico:

Capítulo 1 –

Efeitos dos Flavonoides, naringina e neohesperidina, sobre células BRIN-BD11 secretoras de insulina submetidas a estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio.

Efeitos dos Flavonoides, Naringina e Neohesperidina, sobre Células BRIN-BD11 submetidas a Estresse Oxidativo induzido pelo Peróxido de Hidrogênio.

Maestri, Juliana Sousa¹; Emílio, Henriette Rosa de Oliveira¹; Carpinelli, Angelo Rafael²; Kanunfre, Carla Cristine¹.

¹ Universidade Estadual de Ponta Grossa / Departamento de Biologia Geral – Ponta Grossa – PR; ² Universidade de São Paulo / Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB/USP – São Paulo – SP. E-mail: jusmaestri@hotmail.com

RESUMO: As células β pancreáticas possuem um nível de detoxificação de radicais livres baixo devido à necessidade de um microambiente oxidativo controlado para a realização de suas funções biológicas. Neste sentido, o estresse oxidativo evidenciado no diabetes *mellitus* do tipo II (DM-II), que coexiste com a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, leva a danos celulares com perda de função. Por outro lado, flavonoides possuem atividade antioxidante e poderiam ser empregados como citoprotetores na condição do DM-II. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o possível efeito citoprotetor dos flavonoides naringina, neohesperidina e quercetina em células secretoras de insulina submetidas ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo induzido por H_2O_2 foi padronizado (6,25-600 μ M) em células BRIN-BD11. Para tanto, avaliou-se a citotoxicidade destes flavonoides e seu efeito insulínico em células BRIN-BD11. Os flavonoides mostraram-se seguros para uso nestas células, pois não foram tóxicos nas concentrações de 5 a 80 μ M e não alteraram o perfil secretagógico de insulina destas células. Na sequência, padronizou-se o estresse oxidativo agudo (2h) e crônico (24h) induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (6,25 a 600 μ M). No ensaio crônico, observamos concentração inibitória média (IC₅₀) para o H_2O_2 correspondente a 180 μ M e para o H_2O_2 associado ao DMSO de 75 μ M, e no ensaio agudo, a IC₅₀ correspondeu a 350 μ M. Além de seu papel antioxidante, flavonoides podem influenciar a secreção de insulina por regulação de vias de sinalização intracelulares e expressão de genes. As concentrações de insulina foram mensuradas por RIE. Tratamentos com naringina e quercetina mostraram-se benéficos por aumentarem a atividade secretória celular. A atividade dos flavonoides no sequestro de radicais livres foi avaliada pelo método de Xylenol Orange em tampão PBS. Naringina e neohesperidina (10 μ M) em tampão PBS (ensaio agudo) demonstraram significativa atividade sequestrante ($p < 0,05$). Efeito antioxidante sinérgico entre os flavonoides foi observado em ensaio agudo, sendo os resultados obtidos semelhantes aos encontrados quando foi utilizado o α -tocoferol. O pré-tratamento destas células com os flavonoides (24h) revelou que não existe modulação que confira proteção às células quando expostas ao H_2O_2 por 2 horas. Estes resultados são sugestivos que o uso em associação de antioxidantes seria mais adequado em detrimento a compostos isolados.

Palavras chaves: células pancreáticas clonais, citotoxicidade, antioxidantes.

ABSTRACT: Pancreatic β cells show up lower level of free radicals detoxication then, in present study, assessed the possible cytoprotective effect of flavonoids naringin, neohesperidin and quercetin. The oxidative stress induced by H_2O_2 (6.25 - 600 μ M) was standardized in BRIN-BD11 cells. Measurement of the half maximal inhibitory

concentration (IC₅₀) of H₂O₂ in chronic oxidative stress (24 hours) resulted in 180µM. However, when H₂O₂ was incorporated with DMSO, the IC₅₀ was 75µM. In acute oxidative stress (2 hours) assay IC₅₀ H₂O₂ was 350µM. Flavonoids (1.25 - 80 µM) did not show cytotoxic effects after 24 hours. In the same way insulinotropic effects were not observed from treatment with the flavonoids (1.25 - 80µM) for 24 hours. Cytoprotective effects of flavonoids (2.5, 5, 10µM) on BRIN-BD11 cells were not observed in simultaneous exposure to H₂O₂ (350µM lethal dose) for 2 hours or for 24 hours (37.5µM- sub-lethal and 75µM- lethal dose). Also the flavonoids not conferred cytoprotection to cells in pre-treatment for 24 hours. However the flavonoids present scavenger activity. In fact, naringin and neohesperidin (10µM) in PBS buffer (acute assay), showed significant scavenger activity. The cytoprotective effects of flavonoids only were observed on BRIN-BD11 cells when using in association, it revealed synergic effects.

Key words: clonal pancreatic β cells, citotoxicity, antioxidants

INTRODUÇÃO

Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes, podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo (McCONKEY, 1998; ALLEN, TRESINI, 2000). As espécies reativas de oxigênio (ERO) estão implicadas no desenvolvimento de várias doenças, como inflamação, degeneração pela idade, desenvolvimento de neoplasias e DM-II decorrentes de auto-oxidação e peroxidação lipídica (BROWNLEE, 2005; GREENMAN *et al.*, 2007). As principais estruturas celulares atingidas pelo estresse oxidativo são a membrana celular (inativação de enzimas e alterações do transporte transmembranar), o citoplasma e seus constituintes (proteínas e lipídeos) e principalmente o DNA (mutagênese) (VIEIRA, 2006).

A produção normal de espécies reativas (ER) no metabolismo celular *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons decorrentes do metabolismo celular, como a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou, pela exposição a fatores exógenos (BROWNLEE, 2005; GREENMAN *et al.*, 2007).

Nas células β pancreáticas, a geração de ERO ocorre por um mecanismo independente que envolve a ativação de uma enzima de membrana conhecida como NADPH oxidase. Trata-se de um complexo enzimático formado pelo agrupamento de diferentes componentes citoplasmáticos e de membrana associados, que desempenham importante papel no estresse oxidativo destas células, produzindo grande quantidade de ânions superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) (NEWSHOLME *et al.*, 2007). Em adição, o nível de detoxificação de radicais livres é muito baixo nestas células, devido a baixa expressão de enzimas de regulação de óxido-redução (REDOX), tais como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT), o que caracteriza um sistema limitado de sequestro de ERO (KAMALAKKANNAN, PRINCE, 2006).

Esta limitação confere às células β pancreáticas, um rápido acúmulo de ERO em seu interior, desencadeando um processo que culmina com o dano celular muitas vezes irreversível e a ativação de cascatas intracelulares que ativam a morte celular programada (apoptose). Esta ativação das vias de sinalização resulta no aumento da expressão de vários produtos gênicos de papel importante na complicação do DM-II por causarem prejuízo na secreção deste hormônio concomitante ao quadro de resistência à insulina (KAMALAKKANNAN, PRINCE, 2006).

Os flavonoides atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres, em ambos os compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico, doando átomos de hidrogênio e, portanto, inibindo as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres antes que estes causem danos às células (BIANCHI; ANTUNES, 1999; KATOCH, BEGUM, 2003).

Todavia, existem controvérsias no que diz respeito ao mecanismo de ação dos flavonoides. Embora as evidências sejam claras sobre sua ação antioxidante, eles podem, em algumas circunstâncias, mostrar características pró-oxidantes (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005).

Desta forma, propusemos a padronização do estresse oxidativo pelo H_2O_2 em células BRIN-BD11 de forma a possibilitar a investigação dos prováveis efeitos antioxidantes conferidos pelos flavonoides naringina e neohesperidina “*per se*” e em associações.

MATERIAL E MÉTODOS.

1. Químicos e Reagentes.

Tripsina, Gibco BRL-Life Technologies; Meio RPMI-1640 – Vitrocell; Soro fetal bovino (SFB), Cultilab; Naringina, Neohesperidina e Quercetina, Sigma-Aldrich; Peróxido de Hidrogênio, LabSynth; Dimetilsulfóxido (DMSO), Biotec- LabMaster.

2. Linhagem Celular e Condições de Cultivo.

Foi utilizada linhagem celular híbrida secretora de insulina BRIN-BD11, cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Angelo Carpinelli (ICB/ USP). Em nosso laboratório, estas células apresentaram tempo de dobramento de 28 h, nas condições de cultivo abaixo.

As células foram mantidas em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB, 24mM de Bicarbonato de Sódio, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, pH 7.4, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a 37°C.

Os flavonoides neohesperidina, naringina e quercetina, assim como o H_2O_2 , foram adicionados ao meio de cultura diluídos em DMSO (0,032%).

3. Ensaio de Viabilidade Celular pelo Teste de Redução do MTT.

A viabilidade celular das culturas após os diferentes tratamentos foi realizada através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais determinadas pela técnica de redução de MTT conforme descrito por Van de Loosdrecht e Nennie (1991). Em resumo, após coleta do sobrenadante, foram adicionados 500µL de uma solução diluída 1:10 de MTT (5mg/mL) sobre as células, e estas foram incubadas durante 1h a 37°C. A viabilidade celular foi expressa nos gráficos em atividade de desidrogenase mitocondrial.

4. Efeitos Citotóxicos e Insulinotróficos dos Flavonoides – Neohesperidina, Naringina e Quercetina.

Células BRIN-BD11 foram cultivadas em meio RPMI-1640 com 10% de SFB na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/poço em placas de 24 poços. Após período de 24h de cultivo para adesão celular, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 1mL de meio com diferentes concentrações de cada flavonoide (1,25 - 80µM) e as células foram novamente incubadas por 24 h, procedendo-se após este período a determinação da viabilidade celular (item 3) e secreção de insulina das culturas (item 4.1).

4.1 Determinação da secreção de insulina.

Após período de tratamento conforme descrito no item 4, o sobrenadante de cada poço foi transferido para tubos de 1,5mL e centrifugados a 4°C a 1000rpm durante 5 minutos. Cerca de 700µL do sobrenadante centrifugado foram coletados e mantidos a -70°C até sua utilização.

A concentração de insulina do sobrenadante das culturas foi determinada pela técnica de radioimunoensaio (RIE) conforme protocolo de Salgado e colaboradores

(1999). Para isso, uma curva-padrão de insulina foi simultaneamente preparada empregando anticorpo contra insulina marcado com I^{125} .

A leitura de radioatividade das amostras e da curva foi realizada em leitora automatizada de radiação *gamma* seguindo protocolo pré-estabelecido pelo próprio software.

5. Tratamentos Celular com H_2O_2 .- Estresse Oxidativo.

A solução estoque de H_2O_2 (9,8M) foi diluída em meio de cultura RPMI-1640 para atingir as concentrações de 6,25 - 600 μ M e foram adicionadas ao meio de cultura associados ou não ao DMSO.

As células BRIN-BD11 foram incubadas em placas de 24 poços, sendo semeadas na concentração de 1,5 ou 3 x 10⁵ células/ mL, mantidas por 18h, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 37°C, antes de serem submetidas ao estresse oxidativo agudo (2h) ou crônico (24h). Na sequência os experimentos seguiram o protocolo descrito no item 3.

6. Ensaio de Reversão de Citotoxicidade ao H_2O_2 pelos Flavonoides - Ensaio Agudo.

As células foram incubadas em placas de 24 poços, sendo semeadas na concentração de 3 x 10⁵ células/ mL, mantidas por 18h em estufa, e após este período, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 1 mL de meio com H_2O_2 (350 μ M) e com os flavonoides - naringina, neohesperidina e quercetina, na concentração de 10 μ M. As células receberam tratamento com os compostos de forma isolada, em associações e também foram tratadas com α -tocoferol (10 μ M) pelo período de 2h. A reversão da citotoxicidade nas células foi avaliada pelo teste de redução do MTT (item 3).

7. Ensaio de Reversão de Citotoxicidade ao H₂O₂ pelos Flavonoides - Ensaio Crônico.

As células foram incubadas em placas de 24 poços, sendo semeadas na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/ mL, mantidas por 18h em estufa, e após este período, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 1 mL de meio com H₂O₂ (37,5 ou 75μM) e com flavonoides - naringina, neohesperidina e quercetina, na concentração de 10μM. As células receberam tratamento pelo período de 24h. A reversão da citotoxicidade nas células foi avaliada pelo teste de redução do MTT (item 3).

8. Avaliação da Atividade Sequestrante (*Scavenger*) dos Flavonoides.

Em placas de 96 poços foi realizado o ensaio de sequestro e/ou produção de H₂O₂ pelos flavonoides naringina, neohesperidina e quercetina, misturando-se em meio de cultura (RPMI-1640 com 10% de SFB) ou tampão PBS cada flavonoide (10μM) dissolvido em DMSO na presença e ausência de H₂O₂ (37,5 e 75μM) pelo período de 2h. A determinação do H₂O₂ foi realizada conforme descrito Fabiani e colaboradores (2009) utilizando-se a técnica que emprega o reagente *Xilenol Orange*.

9. Indução de Citoproteção por Flavonoides em Ensaio de Pré-Tratamento seguido de Estresse Oxidativo Agudo.

As células foram incubadas em placas de 24 poços, sendo semeadas na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/ mL, mantidas por 24h em estufa. Após, as células foram tratadas por 24h adicionais na presença dos flavonoides (naringina, neohesperidina e quercetina) na concentração de 10μM. Logo depois, o sobrenadante foi desprezado e uma solução de 350μM do H₂O₂ foi adicionada a cada poço exceto no

controle. Posteriormente ao período de incubação de 2h, a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT (item 3).

10. Estudo Estatístico.

Os resultados, expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), foram analisados pelo programa PRISMA Graph Pad 5.01 após normalização dos dados em relação ao controle. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma via por ANOVA e posteriormente Teste de Tukey. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “*p*” igual ou menor que 0,05 quando comparadas ao grupo controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO.

1. Teste de Citotoxicidade dos Flavonoides em Células BRIN-BD11.

Diferente de outros tipos celulares secretores de insulina, a linhagem BRIN-BD11 parece apresentar menor suscetibilidade a morte quando expostas aos flavonoides. De fato, a quercetina na concentração de 20 μ M reduz a viabilidade de células RIN5mf em aproximadamente 30% (BRAATZ, 2010). Todavia, na Figura 1, pode-se observar que a mesma concentração de quercetina (20 μ M) aumenta a viabilidade celular das células BRIN-BD11.

Estudos têm demonstrado a ausência de citotoxicidade dos flavonoides sobre as células β (JUNG *et al.*, 2006). Todavia, um ensaio de citotoxicidade pelos flavonoides foi realizado para prever a toxicidade destes compostos sobre as células BRIN-BD11 e, concentrações menores que 80 μ M dos flavonoides em estudo (naringina e neohesperidina) e do flavonoide controle (quercetina), não foram citotóxicas (Figura 1-

3). Desta forma, estes podem ser utilizados em ensaios de avaliação da capacidade antioxidante com segurança.

Jung e colaboradores (2004), realizaram exames histológicos e imunohistoquímicos do pâncreas de ratos com DM-II suplementados com dietas contendo hesperidina e naringina e observaram arquitetura normal das ilhotas de Langerhans corroborando com nossos resultados quanto a ausência de citotoxicidade dos flavonoides sobre células pancreáticas.

Para outros tipos celulares, os flavonoides também mostraram-se seguros, como observado em estudos com flavonoides na concentração de até 400 μ M (quercetina) em células renais de bovinos (MIRANDA *et al.*, 2006) e em células HepG2 (KIM, JANG, 2009), e de até 50 μ M em células neurológica PC12 com hesperidina e neohesperidina (HWANG, YEN, 2008).

2. Efeito dos Flavonoides sobre a Secreção de Insulina pelas Células β Pancreáticas.

Os flavonoides podem desempenhar efeitos sobre a secreção de insulina, modulação da proliferação celular e prevenção de apoptose em células β pancreáticas (PINENT *et al.*, 2008).

Sabe-se que a proteção antioxidante é um dos mecanismos possíveis de estimulação da secreção de insulina (PINENT *et al.*, 2008). Desta forma, semelhante a outros flavonoides, naringina e hesperidina poderiam modular positivamente a secreção de insulina pelas células β pancreáticas por neutralizarem o estresse oxidativo induzido por ácidos graxos, pela hiperglicemia e pela infiltração de macrófagos no tecido

adiposo. Neste sentido, atuam melhorando o microambiente celular (JUNG *et al.*, 2004).

De fato, os resultados obtidos neste trabalho indicam ação dos flavonoides sobre a secreção insulínica pelas células β . Quercetina (10 μ M) e naringina (1,25; 5; 40; e 80 μ M), demonstram discreto efeito insulínico positivo sinérgico à glicose presente no meio de cultivo (11,1mM) conforme apresentado nas Figuras 4 e 5, respectivamente. Todavia observa-se redução de 10% na secreção de insulina quando utilizou-se tratamento com neohesperidina na concentração de 40 μ M (Figura 6).

Dos flavonoides testados, a naringina apresentou o melhor efeito insulínico positivo. Além da capacidade antioxidante, este flavonoide estimula a secreção de insulina por induzir a proliferação de células β pancreáticas (LIBERATO, 2001), efeito que pode justificar o aumento de secreção observada principalmente na concentração de 80 μ M onde constatou-se maior viabilidade celular demonstrada na Figura 2.

Os flavonoides podem também modular a secreção de insulina por outros mecanismos, como por exemplo, o papel da genisteína na estimulação da secreção de insulina através do acúmulo intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e ativação da enzima proteína quinase A (PKA) (LIU *et al.*, 2006). Flavonoides derivados do chá verde, como a epigallocatequina-3-galato (EGCG) e epicatequina-3-galato (ECG) atuam como insulínicos positivos por inibirem os canais de K^+ sensíveis a ATP, promovendo a despolarização das células β pancreáticas e consequente exocitose dos grânulos de insulina (PINENT *et al.*, 2008).

Em estudos *in vivo*, Vessal, Hemmati e Vasei (2003) demonstraram que a suplementação da dieta de ratos com quercetina reduziu a glicose sanguínea devido favorecimento da secreção de insulina por este flavonoide.

Em outro estudo, a administração de rutina (flavonol glicosídico derivado da quercetina) à ratos diabéticos, diminuiu os níveis de glicose sanguínea e aumentou os níveis de insulina e do peptídeo C (KAMALAKKANNA, PRINCE, 2006). Neste estudo, o DM foi induzido por estreptozotocina (STZ) e os animais foram tratados com rutina (100 mg/kg).

Estudos *in vitro* demonstram que alguns compostos fenólicos como resveratrol, genisteína e EGCG modificam a capacidade secretória de insulina em células, e por conseguinte, podem ser empregados na prevenção e melhora do DM-II (BEARDSALL *et al.*, 2003, LIU, CHANG, FANG, 2006, PINENT *et al.*, 2008).

Neste sentido, Pinent e colaboradores (2008) descreveram em seu trabalho os efeitos dos flavanoides sobre a funcionalidade pancreática por sua interferência na secreção de insulina. Segundo os autores, os flavonoides podem modular funções protéicas, expressão gênica e ainda vias de sinalização em outros tipos celulares além das células β pancreáticas, como o observado em células cardíacas, onde os flavonoides inibem a expressão e atividade da NADPH oxidase (AKHLAGI, BANDY, 2009) e em células neurológicas PC12, onde estes compostos modulam atividade de enzimas antioxidantes (HWANG, YEN, 2008).

3. Padronização do Estresse Oxidativo Crônico e Determinação da IC₅₀ H₂O₂.

Em ensaios *in vitro*, o H₂O₂ demonstrou ser um modelo bem estabelecido de indutor de estresse oxidativo (LENNON, MARTIN, COTTER, 1991; TANG; ZHANG,

2000; BRAATZ, 2010). O H_2O_2 pode causar dano à célula mesmo possuindo baixa reatividade já que este ativa a sinalização extracelular recrutando neutrófilos e macrófagos residentes que produzem citocinas pró-inflamatórias (NEWSHOLME *et al.*, 2007) além de induzir liberação do ácido araquidônico da membrana celular que, a partir de rotas oxidativas enzimáticas via ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX), geram prostaglandinas (PG) e leucotrienos respectivamente, responsáveis pela formação de radicais livres causadores de danos oxidativos. Adicionalmente, o H_2O_2 aumenta a permeabilidade de membrana, reage com metais de transição a partir da reação de Fenton originando o radical hidroxil ($\cdot OH$) que é muito reativo, provoca peroxidação lipídica e consequente elevação de malondialdeído (MDA), reduz a atividade das enzimas antioxidantes, aumenta o influxo de Ca^{2+} e ativa a via da caspase 3 (REN *et al.*, 2010).

A padronização do estresse oxidativo em células BRIN-BD11, foi realizada pelo tratamento destas células com H_2O_2 , nas concentrações de 6,25 - 300 μM . A concentração inibitória (IC50) para o H_2O_2 foi calculada através das curvas doses resposta (Figura 7A), por regressão linear da equação da reta ($y = -0,306x + 106,790$), cujo valor correspondeu a 180 μM . Neste ensaio, observou-se queda da viabilidade celular a partir da concentração de 120 μM . E, na concentração de 300 μM de H_2O_2 , observou-se uma queda de 80% na viabilidade celular.

A adição do DMSO à solução de H_2O_2 potencializou os efeitos oxidativos para a célula, sendo que a IC50 encontrada correspondente a 75 μM , também determinada através de equação da reta ($y = -0,287x + 94,009$). Conforme mostra a Figura 7B, houve um aumento significativo da morte celular nas concentrações de 80-300 μM de H_2O_2

quando associado ao DMSO, com perda de 60% de viabilidade em relação ao controle para a concentração de 100 μ M.

O DMSO é comumente utilizado em experimentos *in vitro* quando deseja-se qualificar e quantificar a ação de compostos (FLORÃO *et al.*, 2007). Todavia, é sabido que o DMSO é um solvente que altera a permeabilidade celular, potencializando os efeitos oxidantes do H₂O₂ testado, por facilitar sua entrada na célula. Constatamos claramente que o emprego do DMSO (0,032%) como solvente de solubilização dos flavonoides, mesmo que em menor concentração que a sugerida pela literatura (que é de até 0,1%), altera a permeabilidade da membrana ao H₂O₂, potencializando seus efeitos deletéricos sobre as células em estudo como o observado também por Florão e colaboradores (2007).

Segundo Dreher e Junod (1996), um baixo nível de estresse pode estimular a divisão e crescimento celular, porém, um elevado ou moderado nível de estresse oxidativo é potencialmente citotóxico e bloqueia a proliferação por induzir as células à apoptose ou necrose. De fato, nossos resultados corroboram os achados destes pesquisadores.

Sabe-se que células expostas a altos níveis de H₂O₂ sofrem apoptose, independente da causa e alvo inicial da oxidação (LENNON, MARTIN, COTTER, 1991). Especificamente para células pancreáticas, altas doses (500 μ M) de H₂O₂ aumentam significativamente a quantidade de ERO, resultando em danos celulares e redução na secreção de insulina independente de glicose via aumento do influxo de Ca intracelular (FU-LIANG *et al.*, 2006).

4. Padronização do Estresse Oxidativo Agudo e Determinação da IC₅₀ H₂O₂.

A padronização do estresse oxidativo agudo (2h) em células BRIN-BD11, foi realizada pelo tratamento destas células com H₂O₂, nas concentrações de 100 - 600μM. A IC₅₀ para o H₂O₂ foi calculada através das curvas doses resposta (Figura 8), por regressão linear da equação da reta ($y = -0,157x + 109,450$), cujo valor correspondeu a 350μM. Neste ensaio, observou-se queda da viabilidade celular a partir da concentração de 200μM. E, na concentração de 500μM de H₂O₂, observou-se uma queda de 75% na viabilidade das células.

5. Efeito Citoprotetor dos Flavonoides – Neohesperidina, Naringina, e Quercetina *per se* e em associação - Ensaio Agudo.

Conforme evidenciado na Figura 9, observou-se queda de cerca de 40% na viabilidade celular nos tratamentos com H₂O₂ na concentração de 350μM, confirmando o ensaio de padronização do estresse oxidativo. Os flavonoides em estudo (10μM) reverteram 20% da citotoxicidade induzida pelo H₂O₂, porém não houve diferença significativa em relação ao controle. Entretanto, quando empregados em associação, os flavonoides revelaram ação sinérgica revertendo 40% da citotoxicidade do H₂O₂, resultado semelhante ao obtido com o α-tocoferol (10μM).

É sabido que o H₂O₂ é capaz de causar lesões celulares principalmente na membrana celular. Sua toxicidade deve-se principalmente à sua conversão em radical $\cdot\text{OH}$, o que caracteriza a reação de Fenton (LEITE, SARNI, 2003; BONDAN, 2006). O $\cdot\text{OH}$ leva à quebra e às modificações nas bases do DNA, com consequentes alterações na expressão gênica que resultam em mutação. Ocorrem alterações de cadeias protéicas e peroxidação lipídica levando à perda de integridade de membrana e prejuízo do

transporte transmembranar (LEITE, SARNI, 2003). Além disso, ele pode inativar várias proteínas ao oxidar seus grupamentos sulfidrílicos (-SH) e as pontes dissulfeto (-SS) e desta maneira, prejudica a funcionabilidade celular (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; NÚÑEZ-SELLÉS, 2005; CERQUEIRA MEDEIRO, AUGUSTO, 2007).

Os efeitos de ERO no organismo são equilibrados por mecanismos de defesa antioxidante, enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os antioxidantes não-enzimáticos, encontram-se: melanina, glutatona (GSH), estrogênios, ácido úrico, vitamina C, vitamina E, carotenoides e flavonoides naturais. (SIES, STAHL, 1997; McCALL, FREI, 1999; MATÉS, 2000; NORDBERG, ARNÉR, 2001).

Este tipo de ensaio revela a ação dos flavonoides tal qual ocorre fisiologicamente quando absorvidos no trato gastrointestinal, onde agem diretamente em vias de transdução de sinal modulando expressão e atividades enzimáticas para, posteriormente, atuarem como agentes redutores de radicais livres reativos produzindo o radical fenoxila estabilizado por ressonância (CERQUEIRA *et al.*, 2007).

6. Efeito Citoprotetor dos Flavonoides - Neohesperidina, Naringina e Quercetina – Ensaio Crônico.

Conforme mostra a Figura 12B, observou-se redução de 40% na viabilidade celular nos tratamentos com H₂O₂ na concentração de 75µM, confirmando o ensaio de padronização do estresse oxidativo. Todavia, diferente do esperado (JUNG *et al.*, 2006; MASOUMEH, BANDY, 2009), naringina e neohesperidina não reverteram a citotoxicidade induzida pelo H₂O₂ (Figura 10 B e C).

A quercetina, um dos flavonoides mais amplamente estudados como antioxidante, também não reverteu a citotoxicidade induzida pelo H_2O_2 ($75\mu\text{M}$) (Figura 10A). Segundo Baran (2001), a quercetina apresenta propriedades tanto antioxidantes quanto pró-oxidantes. Em tratamentos crônicos (24h), este flavonoide induziu a apoptose celular. De fato, flavonoides em solução (meio de cultura) podem gerar H_2O_2 espontaneamente (LONG, CLEMENT, HALLIWELL, 2000). Ao contrário, em exposições agudas (1h), este flavonoide ofereceu proteção contra a apoptose induzida por H_2O_2 (BARAN *et al.*, 2001). Ainda segundo Baran e colaboradores (2001), em células Jurkat, a quercetina acumula-se no interior da mitocôndria, ligando-se às proteínas, podendo assim, ativar ou inibir a transição pelos poros mitocondriais (mPTP), dependendo da atividade pró- ou antioxidante, respectivamente. Altas doses de quercetina aumentam a produção de H_2O_2 e $\cdot\text{O}_2^-$. O $\cdot\text{O}_2^-$ é posteriormente dismutado à H_2O_2 pela SOD mitocondrial ou citossólica, e adicional $\cdot\text{OH}$ pode ser produzido a partir de H_2O_2 através da reação de Fenton dependente de $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ (BARAN *et al.*, 2001).

Todavia, os resultados obtidos no ensaio agudo, leva-nos a supor que o efeito sinérgico dos flavonoides poderia ser citoprotetor também se empregado em ensaio crônico. De fato, conforme mostrou o trabalho de Ren e colaboradores (2010) em células cardíacas H9C2, o extrato da planta *Allium chines*, mostrou efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido por H_2O_2 .

Também observou-se sinergismo entre antioxidantes de origens variadas como as enzimas SOD e CAT, a N-acetilcisteína, o inibidor da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), a apocina inibidora da NADPH oxidase, quando utilizados de forma conjunta em trabalho de Michalska e colaboradores (2010) revelando que compostos antioxidantes empregados simultaneamente devem interagir entre si realizando funções

complementares, agindo sinergicamente na promoção de um microambiente celular favorável.

7. Ensaio de Pré-tratamento.

Um antioxidante ideal é aquele que estimula os mecanismos preventivos na formação de ERO, potencializa os mecanismos de reparação de danos oxidativos e maximiza a atividade sequestrante de radicais livres. Neste sentido, o emprego de flavonoides em ensaios de pré-tratamento proporciona esclarecimento principalmente quanto aos possíveis efeitos dos flavonoides na modulação prévia de mecanismos antioxidantes endógenos e na antecipação da atividade de sequestro de radicais livres.

A pré-incubação com flavonoides na concentração de 10 μ M por 24h conferiu proteção parcial, mas não significativa, às células BRIN-BD11 contra a toxicidade induzida pelo H₂O₂ (Figura 11). Todavia nossos resultados não corroboram com o trabalho de Fu-Liang e colaboradores (2006) que testaram a citoproteção em ilhotas pancreáticas conferida pelo flavonoide puerarin nas concentrações de 10, 50 e 100 μ M em ensaio de pré-tratamento (48h) e posterior indução de estresse oxidativo por 500 μ M H₂O₂. Segundo estes autores, 50 e 100 μ M de puerarin inibem significativamente a apoptose induzida pelo H₂O₂. Também na concentração de 100 μ M este flavonoide restaurou a capacidade secretória de insulina e aumentou a atividade das enzimas SOD e CAT.

Em células neurológicas PC12, a pré modulação de enzimas antioxidantes garantiu citoproteção destas células contra danos oxidativos causados pelo H₂O₂. Neste estudo Hwang e Yen (2008) realizaram um pré-tratamento das células com

neohesperidina e hesperidina (0.8, 4, 20 e 50 μ M) por 6h e após, acrescentaram o H₂O₂ por mais 16h.

8. Efeito dos Flavonoides - Naringina, Neohesperidina e Quercetina – na Produção e Sequestro de ERO - H₂O₂.

Dentre as estratégias de proteção, as células possuem sistemas antioxidantes que podem atuar em uma linha detoxificadora do agente antes que ele cause lesão (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

A atividade antioxidante dos flavonoides deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química (DORNAS *et al.*, 2007). Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelatação de metais de transição através, do sequestro de íons como ferro e cobre, agindo tanto na etapa de iniciação, como na propagação do processo oxidativo (SOUSA *et al.*, 2007; DORNAS *et al.*, 2007). Os intermediários formados pela ação destes antioxidantes são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUSA *et al.*, 2007).

Evidenciamos que o meio de cultivo (RPMI-1640) possui capacidade tamponante de ERO, o que impossibilitou a visualização da atividade sequestrante pela naringina e neohesperidina. Esta capacidade de captura de ERO pelos flavonoides só pôde ser comprovada quando foi realizado experimento em PBS, sob mesmas condições (Figura 13). Neste caso, observamos sequestro de H₂O₂ pelos biocompostos na concentração de 10 μ M, em ensaios de 2h na presença de H₂O₂ nas concentrações de 37,5 μ M e 75 μ M. A quercetina demonstrou potencial sequestrante de 43%, enquanto

naringina um potencial de 29% e neohesperidina em torno de 33%. Quando empregamos alta concentração do H_2O_2 , os flavonoides apresentaram menor atividade de sequestro, onde a naringina destacou-se entre os demais testados, sequestrando 17% do H_2O_2 .

Em contrapartida, na concentração de $250\mu M$, apenas a quercetina (flavonoide controle) apresentou efeito pró-oxidante gerando espontaneamente H_2O_2 neste tampão. A produção de H_2O_2 por flavonoides tem sido evidenciada por outros autores, todavia, estes relatam que a produção se dá em ambiente com alta concentração do flavonoide em meio de cultura (LONG, CLEMENT, HALLIWELL, 2000; NÚÑEZ-SELLÉS, 2005).

A quercetina quando age como pró-oxidante, pode ativar a morte celular programada por promover a elevação dos níveis de Ca^{2+} intracelular, abertura dos mPTP, colapso do potencial da membrana mitocondrial e liberação do citocromo c do interior da mitocôndria. A apoptose ou a necrose ocorrem dependendo se o bloqueio da produção de ATP e a abertura dos mPTP é transitório ou prolongado, respectivamente (BARAN *et al.*, 2001).

Como antioxidante, em tratamentos agudos, a quercetina reduz o conteúdo celular de H_2O_2 . De fato, este flavonoide promoveu a regeneração de células β pancreáticas em ratos cuja diabetes foi induzida pela STZ (PINENT *et al.*, 2008). Contudo, em tratamentos crônicos com este flavonoide, ocorre a depleção de antioxidantes endógenos, tais como a glutathione redutase (GR), levando ao acúmulo de ERO e metabólitos tóxicos. Este fato pode ser explicado, em tratamentos agudos, pela capacidade deste flavonoide em sequestrar ER já formadas e impedir a formação de

novas pelo bloqueio da reação de Fenton, já que a quercetina age como quelante de metais de transição como o cobre e também, por ser um agente redutor do radical $\cdot\text{OH}$, tornando-o um intermediário menos reativo. Já em tratamentos crônicos, a quercetina induz depleção de GSH e, desta forma, reduz o potencial antioxidante da célula (BARAN *et al.*, 2001; KIM, JANG, 2009).

Segundo Vieira (2006), para uma detecção quantitativa do radical $\cdot\text{HO}$, a concentração do produto final deveria ser proporcional à quantidade de $\cdot\text{HO}$ formado, a seletividade da sonda em relação ao $\cdot\text{HO}$ deveria ser tão elevada quanto possível, de modo a excluir ou minimizar reações com outras ER, e por último, o produto final deveria ser estável química e fotoquimicamente, de modo a poder ser observado sem alterações durante o período de tempo exigido pela técnica analítica utilizada para a sua detecção. Sendo assim, supomos que o método de *Xylenol Orange* utilizado neste trabalho não atingiu adequadamente estes requisitos. Também segundo Vieira (2006), a detecção direta por Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) seria o método mais adequado uma vez que esta técnica possui maior especificidade para a detecção de elétrons desemparelhados e pelo fato de ser possível seu emprego em meio heterogêneo e complexo como o de meio de cultivo celular.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Trabalhos recentes demonstram ausência de citotoxicidade dos flavonoides sobre as células β (JUNG *et al.*, 2006). Todavia, para células BRIN-BD11 não encontramos nenhuma citação de toxicidade por flavonoides. Neste sentido, foi determinado a citotoxicidade da naringina, neohesperidina e quercetina para esta linhagem. As concentrações testadas (1,25 - 80 μM) dos flavonoides em estudo não

foram citotóxicas conforme visualizado nas Figuras 1, 2 e 3. Desta forma, estes podem ser utilizados com segurança para avaliar a atividade secretória destas células.

É importante ressaltar que a ação insulínica dos flavonoides não se restringe a sua ação antioxidante, podendo, mesmo em baixa concentração, estar relacionado à secreção de insulina por mecanismos como modulação de proteínas, cascatas intracelulares e expressão gênica (PINENT *et al.*, 2008). No presente trabalho, identificamos que a naringina e a neohesperidina, não interferiram na secreção de insulina em células BRIN-BD11. E neste sentido, tais flavonoides podem ser empregados em ensaios como antioxidantes por promoverem um microambiente favorável à secreção de insulina pelas células β pancreáticas. Todavia são necessários outros estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* para comprovação dos resultados, bem como elucidação dos mecanismos envolvidos.

Vale destacar que o desempenho antioxidante de um flavonoide depende principalmente de doses ideais e tempo de exposição para se obter proteção, pois, é possível que um composto atue como protetor em um determinado sistema e falhe na proteção ou até mesmo, aumente as lesões induzidas às células tornando-se assim, um agente pró-oxidante (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1995; BRAATZ, 2010).

Naringina e neohesperidina na concentração de 10 μ M foram citoprotetores em ensaios agudos somente quando empregados em associações, ou seja, devido efeito sinérgico. De forma, nossos resultados sugerem que os flavonoides naringinina e neohesperidina podem ser potenciais candidatos à prevenção do DM-II desde que adequadamente estudados quanto as condições de administração, dose e tempo. No emprego dos flavonoides previamente ao estresse oxidativo (Ensaio de Pré-tratamento)

não foi observada proteção esperada conforme relatado por Fu-Ling e colaboradores (2006) que destacaram proteção devido aumento da atividade de SOD e CAT e inibição de glicação de proteínas.

Em resumo, segundo a literatura, flavonoides em geral podem conferir proteção às células β pancreáticas contra injúrias provocadas por H_2O_2 devido sua capacidade de sequestro de radicais livres, aumento da atividade de enzimas antioxidantes e estímulo secretório, porém destacamos que talvez o sinergismo de compostos bioativos pareça ser o responsável pela proteção à saúde mais do que o efeito de um único composto em particular.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

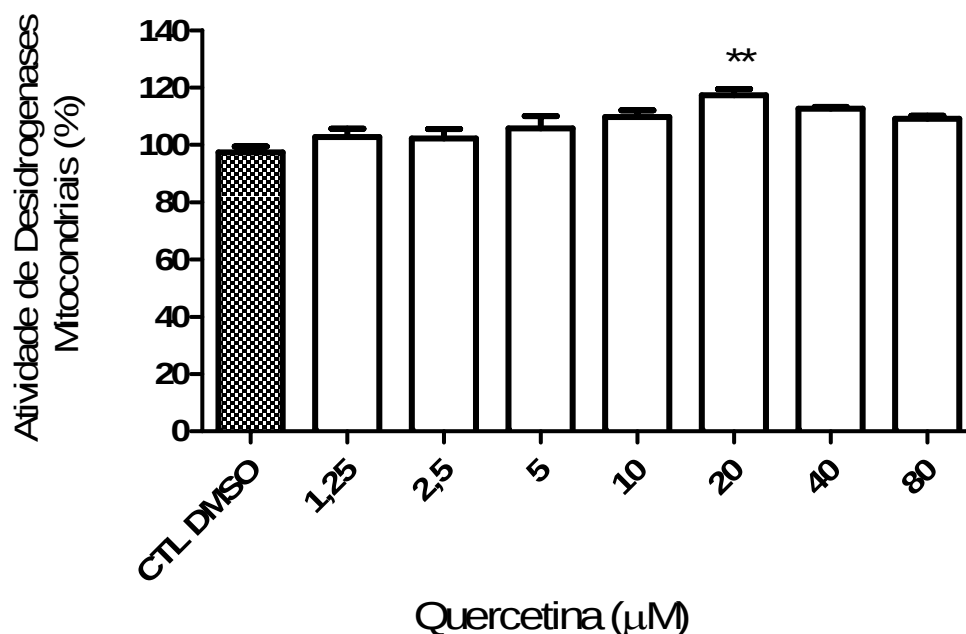


Figura 1: **Efeito da quercetina sobre a viabilidade celular da linhagem BRIN-BD11.**

Células BRIN-BD11 foram cultivadas na presença do flavonoide (1,25 - 80μM) por 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT. Os resultados são expressos como média ± EPM e correspondem a quatro experimentos representativos (n=16). ** $p < 0,01$ em relação ao controle (CTL DMSO) conforme ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

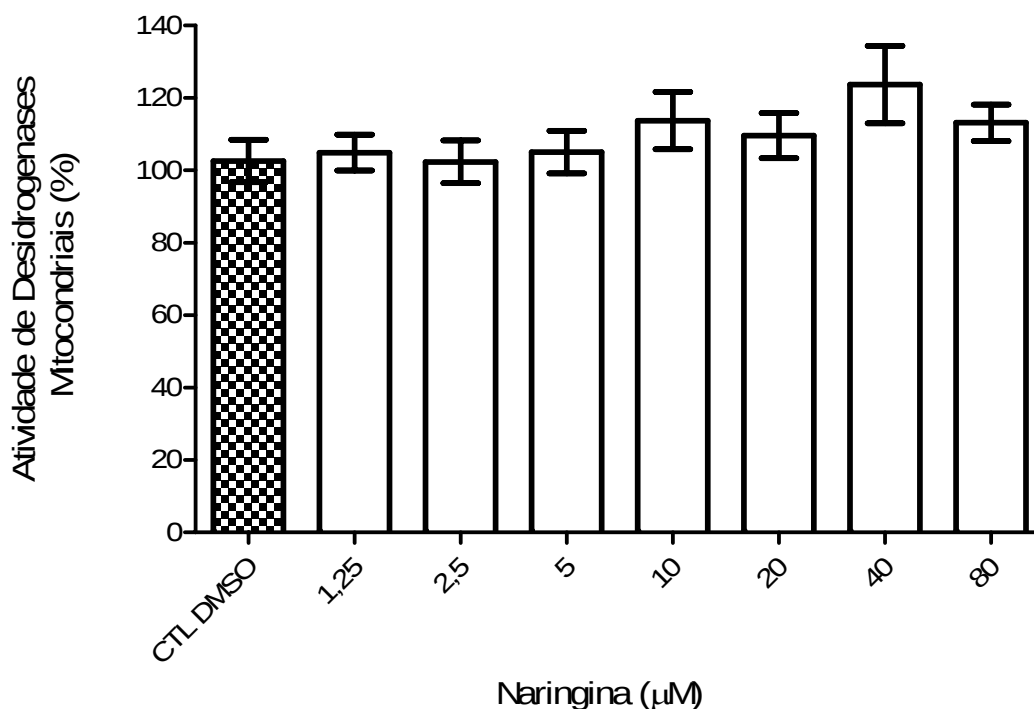


Figura 2: **Efeito da naringina sobre a viabilidade celular da linhagem BRIN-BD11.** Células BRIN-BD11 foram cultivadas na presença de diferentes concentrações do flavonoide (1,25 - 80μM) por 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT. Os resultados são expressos como média ± EPM e correspondem a quatro experimentos representativos (n=16). Os tratamentos não demonstraram diferença significativa em relação ao grupo controle (CTL DMSO) conforme ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

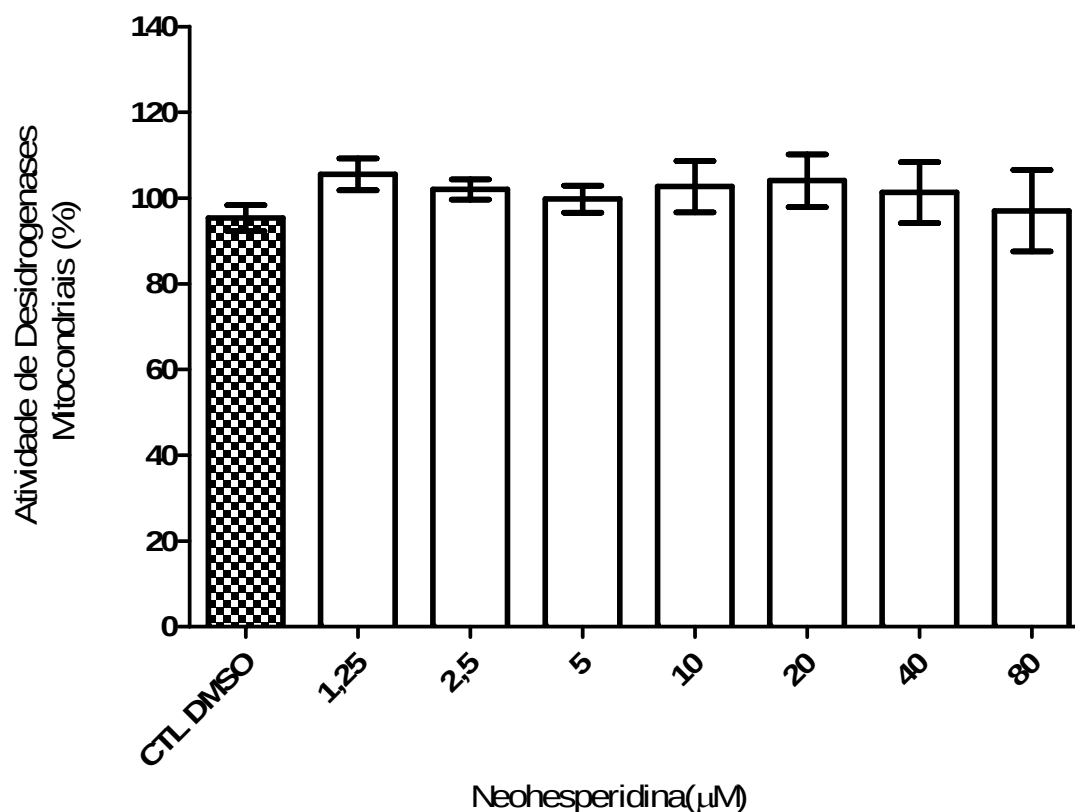


Figura 3: **Efeito da neohesperidina sobre a viabilidade celular da linhagem BRIN-BD11.** Células BRIN-BD11 foram cultivadas na presença de diferentes concentrações do flavonoide (1,25 - 80μM) por 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT. Os resultados são expressos como média ± EPM e correspondem a quatro experimentos representativos (n=16). Os tratamentos não mostraram diferença significativa em relação ao grupo controle (CTL DMSO) conforme ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

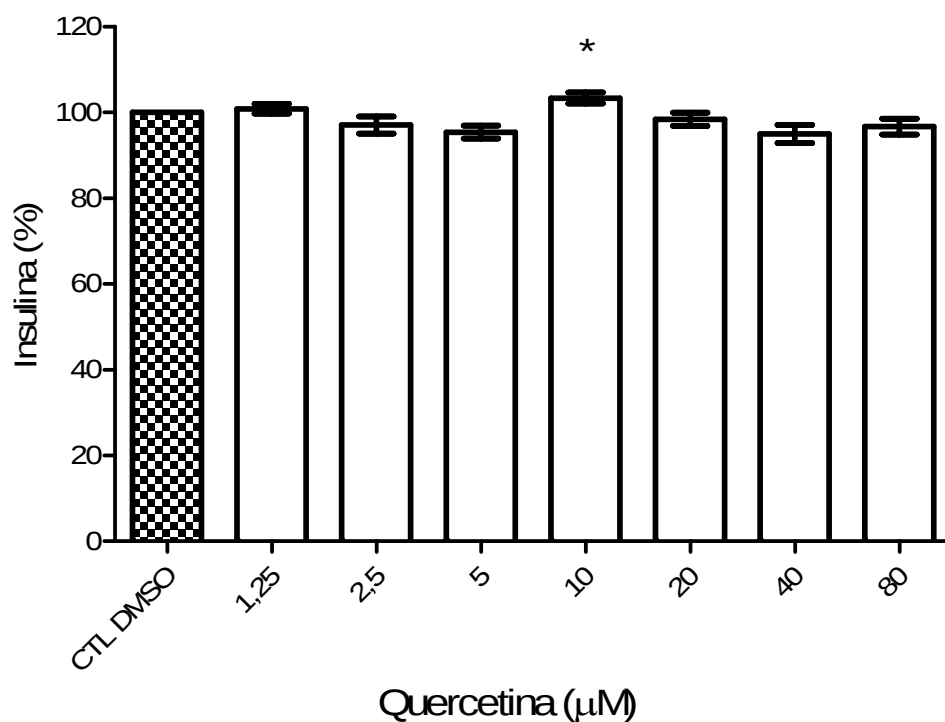


Figura 4: **Efeito da quercetina sobre a secreção de insulina pela linhagem BRIN-BD11.** Células BRIN-BD11 foram cultivadas na presença do flavonoide (1,25 - 80μM) por 24h. A secreção de insulina foi mensurada pelo método de RIE e os resultados foram expressos como média ± EPM e correspondem a dois experimentos representativos (n=12). * p<0,05 em relação ao controle (CTL DMSO) conforme ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

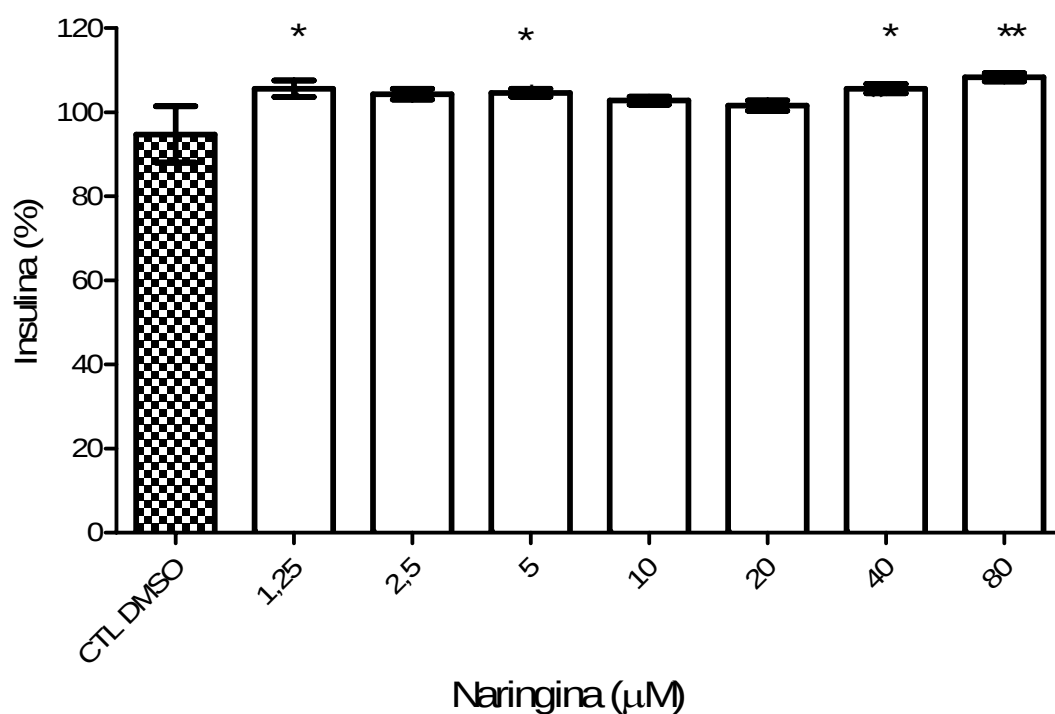


Figura 5: **Efeito da naringina sobre a secreção de insulina pela linhagem BRIN-BD11.** Células BRIN-BD11 foram cultivadas na presença do flavonoide (1,25 - 80 μM) por 24h. A secreção de insulina foi mensurada pelo método de RIE. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM e correspondem a dois experimentos representativos (n=12). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao controle (CTL DMSO) conforme ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

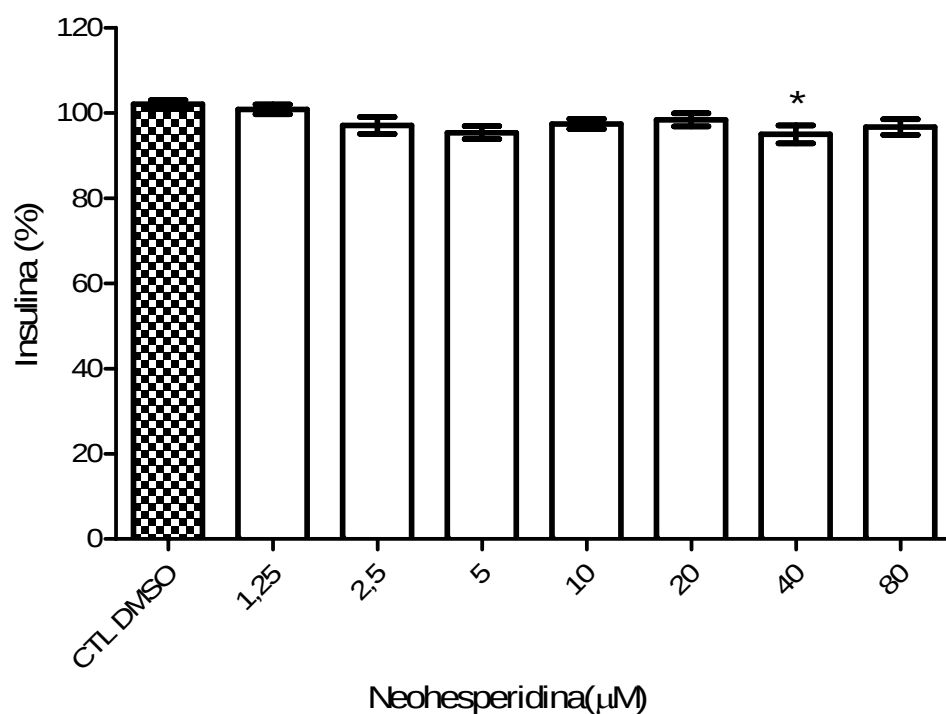


Figura 6: **Efeito da neohesperidina sobre a secreção de insulina pela linhagem BRIN-BD11.** Células BRIN-BD11 foram cultivadas na presença de diferentes concentrações do flavonoide (1,25 - 80μM) por 24h. A secreção de insulina foi mensurada pelo método de RIE. Os resultados são expressos como média ± EPM e correspondem a dois experimentos representativos (n=12). * $p < 0,05$ em relação ao controle (CTL DMSO) conforme ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

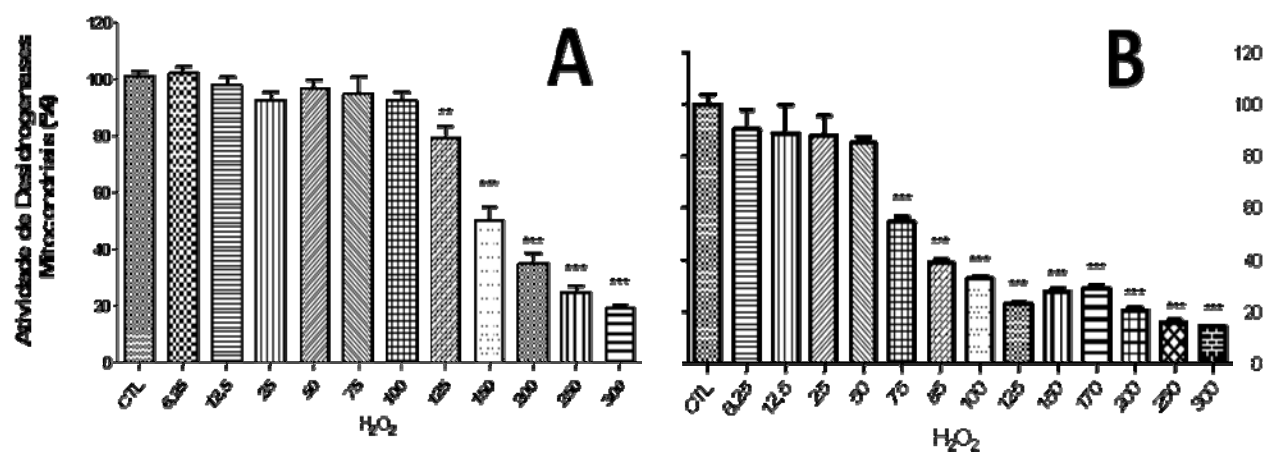


Figura 7: Efeito do H_2O_2 sobre a viabilidade celular da linhagem BRIN-BD11 – **Estresse oxidativo crônico**. Células BRIN-BD11 foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de H_2O_2 (6,25 - 300 μM) por 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT. Os resultados correspondem à média $\pm$ EPM e correspondem a quatro experimentos representativos (n=16). **A:** efeito do H_2O_2 “*per se*” e **B:** efeito do H_2O_2 associado ao DMSO. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle (CTL) conforme ANOVA seguido pelo teste de Tukey

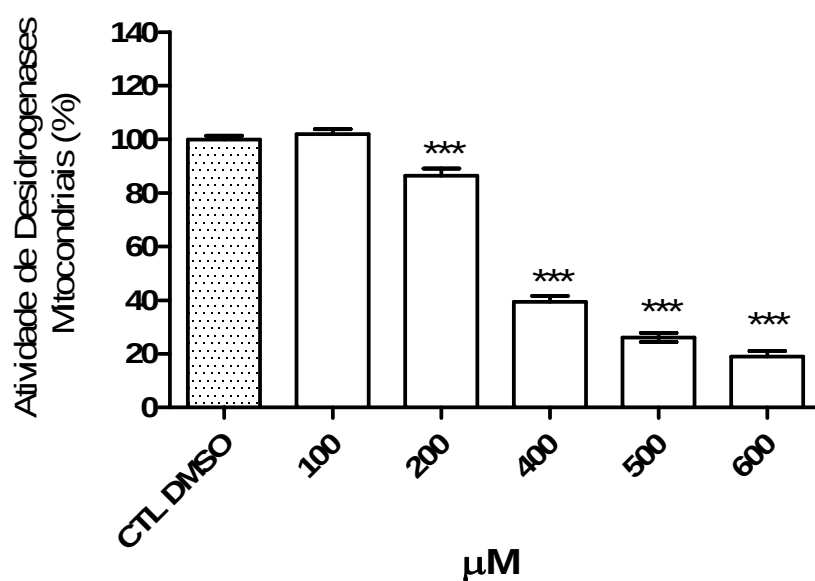


Figura 8: **Padronização do estresse oxidativo agudo (2h) induzido por H₂O₂.** Células BRIN-BD11 submetidas ao estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂ (100-600μM) pelo período de 2h. Os resultados são expressos como média ± EPM e correspondem a dois experimentos representativos (n=12). * p<0,05; ** p<0,001; *** p<0,0001 em relação ao Controle (CTL DMSO) conforme ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

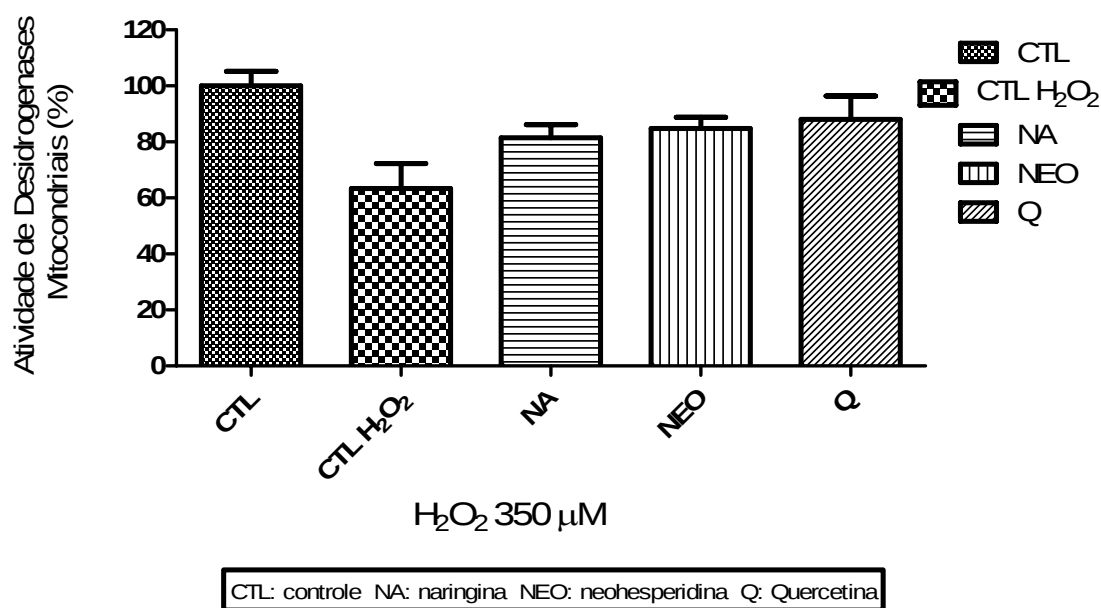


Figura 9: Avaliação do efeito citoprotetor dos flavonoides, naringina, neohesperidina e quercetina, contra o estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂ – ensaio agudo de 2h. Células BRIN-BD11 submetidas ao estresse oxidativo pelo H₂O₂ (350μM) foram tratadas com os flavonoides (10μM). Os resultados são expressos como média ± EPM e correspondem a dois experimentos representativos (n=12). Não houve diferença significativa entre os tratamentos conforme ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

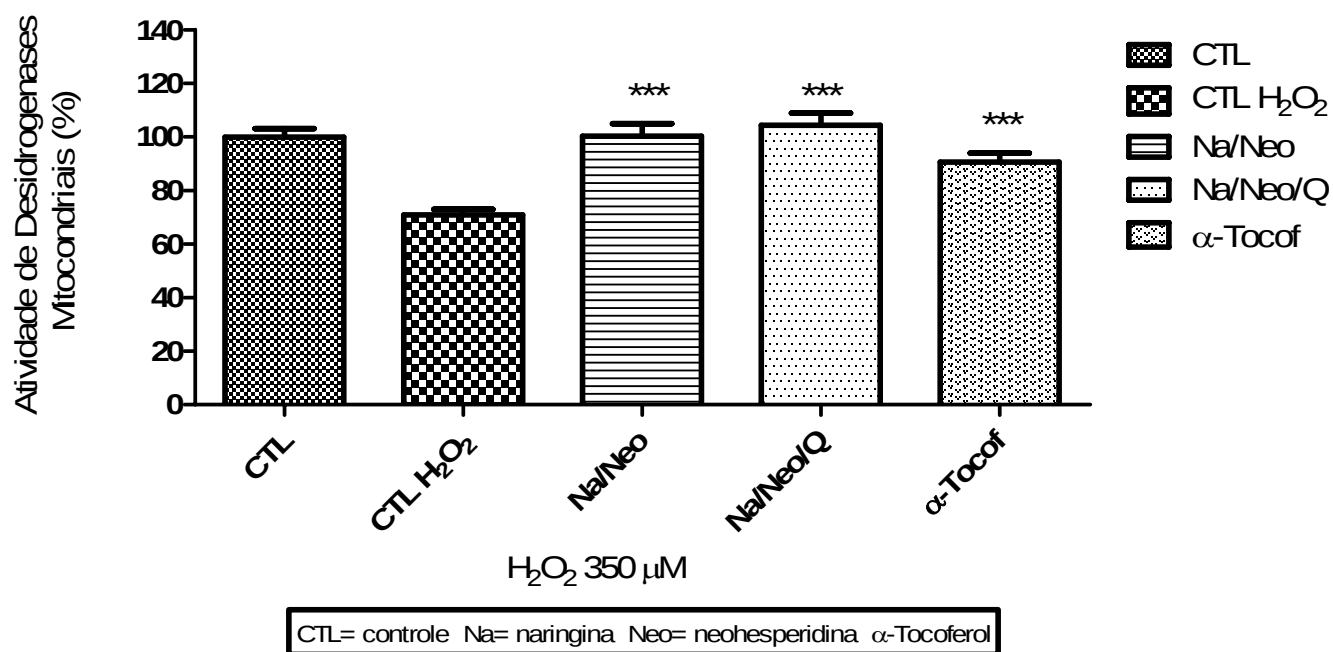


Figura 10: Avaliação do efeito sinérgico citoprotetor dos flavonoides- naringina, neohesperidina e quercetina - contra o estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂ – ensaio agudo de 2h. Células BRIN-BD11 submetidas ao estresse oxidativo pelo H₂O₂ (350μM) foram tratadas com os flavonoides em associações (concentração final de 10μM). Os resultados são expressos como média ± EPM e correspondem a dois experimentos representativos (n=12). Observa-se significativa citoproteção conferida pelos tratamentos contra o estresse induzido pelo H₂O₂ . *** p<0,0001 para os tratamentos em relação ao controle (CTL H₂O₂) conforme ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

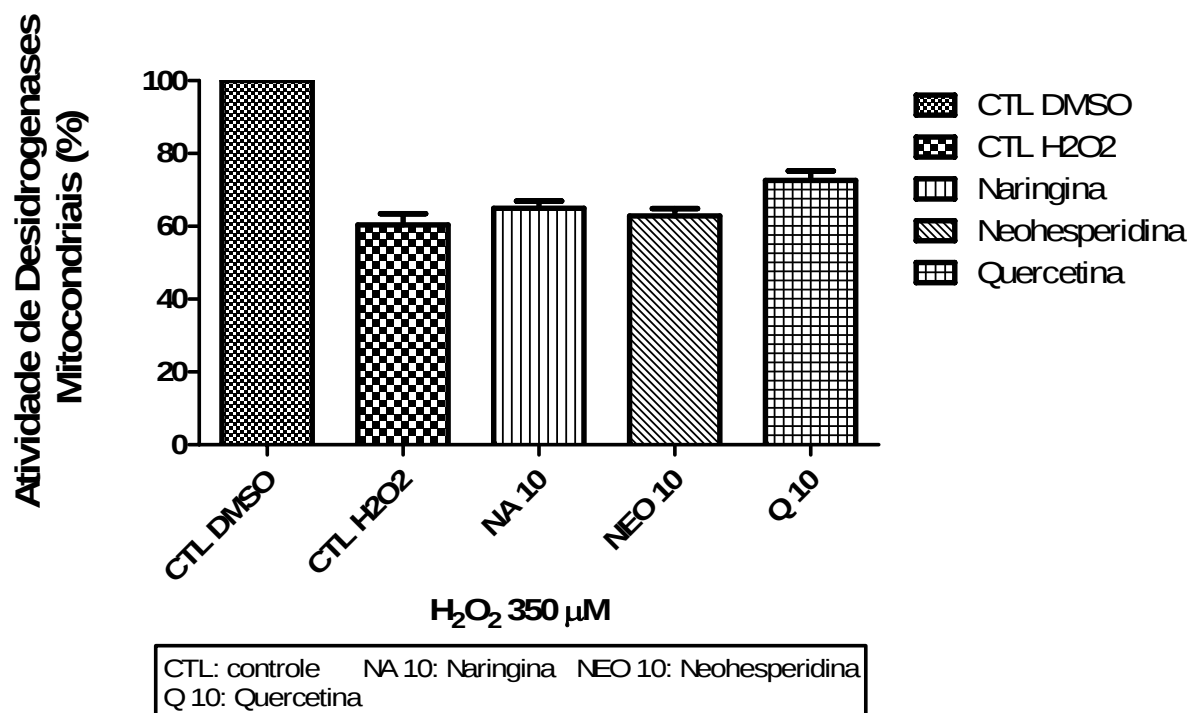


Figura 11: **Avaliação do efeito dos flavonoides – naringina, neohesperidina e quercetina - sobre a reversão de citotoxicidade do H₂O₂ sobre células BRIN-BD11 em ensaios de pré-tratamento.** Células BRIN-BD11 foram pré-incubadas com flavonoides na concentração de 10μM por 24h. Após período de incubação adicionou-se 350μM de H₂O₂ em ensaio agudo de 2h exceto no grupo controle (CTL DMSO). A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT. Os resultados foram expressos como média ± EPM e correspondem a dois experimentos representativos (n=12). Não houve diferença significativa entre os tratamentos conforme ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

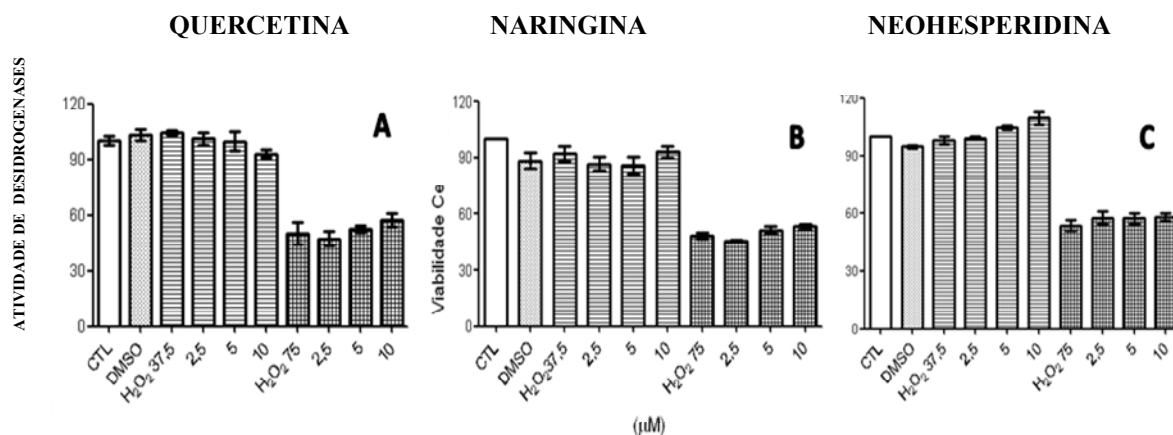


Figura 12: **Avaliação do efeito citoprotetor dos flavonoides em células BRIN-BD11 submetidas ao estresse oxidativo crônico induzido por H₂O₂.** Células BRIN-BD11 submetidas a estresse oxidativo (H₂O₂ 37,5 e 75µM) foram cultivadas em meio RPMI-1640 com DMSO (0,032%) na presença de 3 concentrações do flavonoide (2,5; 5; 10µM) por 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT. Os resultados são expressos como média ± EPM e correspondem a três experimentos representativos (n=12). Não houve diferença significativa entre os tratamentos conforme ANOVA seguido pelo teste de Tukey. DMSO= controle, **A**= Quercetina, **B**= Naringina, **C**= Neohesperidina.

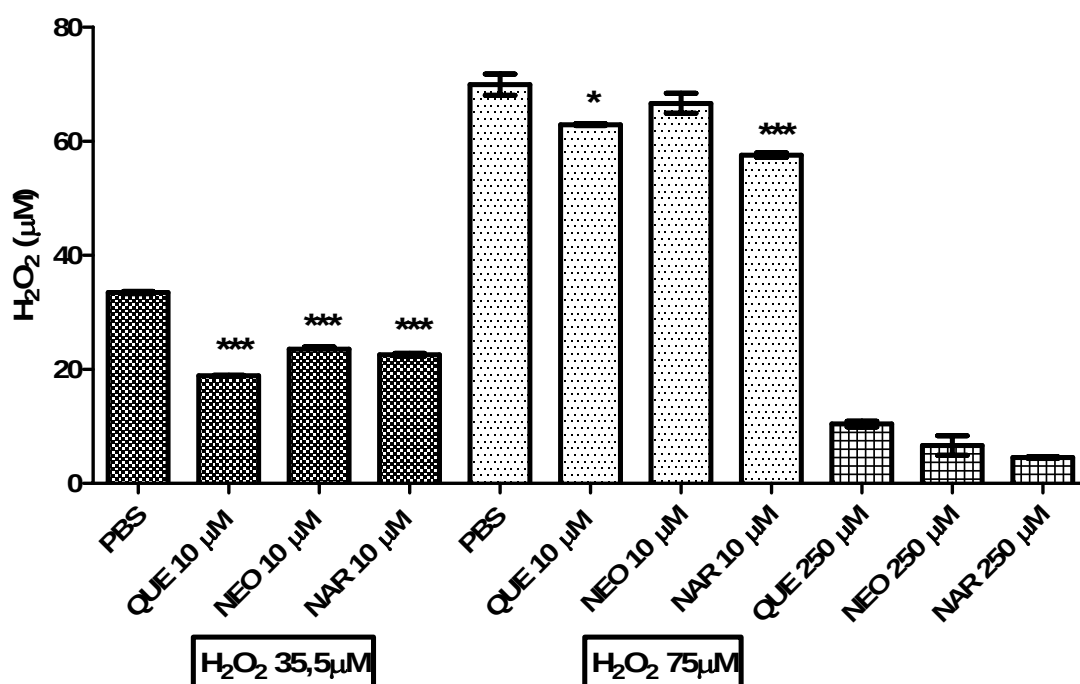


Figura 13: **Atividade de sequestro de ERO por flavonoides.** Atividade de sequestro de H₂O₂ por quercetina, naringina, e neohesperidina em meio de cultivo (RPMI-1640) e tampão PBS. O H₂O₂ foi adicionado ao sistema de reação nas concentrações de 37,5 e 75 μM e os flavonoides na concentração de 10 μM. O sistema de reação para a produção espontânea de H₂O₂ pelos flavonoides continha alta concentração (250 μM) destes em PBS. * p<0,05; ** p<0,001; *** p<0,0001 em relação ao controle (PBS) conforme ANOVA seguido pelo teste de Tukey. QUE = Quercetina, NEO = Neohesperidina, NAR = Naringina.

VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Os antioxidantes são capazes de estabilizar os radicais livres antes que estes ataquem os alvos biológicos nas células (PINENT *et al.*, 2008). Todavia neste trabalho, os antioxidantes naringina e neohesperidina, testados em separado, não foram citoprotetores quando realizados ensaios de estresse oxidativo agudo e crônico, e somente conferiram proteção às células BRIN-BD11 quando em associações no ensaio agudo, evidenciando possível efeito sinérgico na captura de ERO ou na modulação de vias metabólicas (PINENT *et al.*, 2008). Também em ensaio agudo, os flavonoides em associações preveniram danos em células RINm5f submetidas ao estresse oxidativo pelo H₂O₂ (BRAATZ, 2010).

Propõem-se assim que o sinergismo de compostos bioativos é responsável pela proteção à saúde mais do que o efeito de um único composto em particular e, a partir disto, reconhecemos que os antioxidantes podem atuar de forma cooperativa. Neste contexto, o uso de associações de flavonoides seria preferível ao uso de compostos isolados. Sabe-se que estes biocompostos agem em sinergia, sendo reciclados por outros antioxidantes no organismo. Por conseguinte, a presença de várias classes de antioxidantes no plasma, na bicamada lipídica e no meio intracelular é importante (CERQUEIRA, MEDEIRO, AUGUSTO, 2007).

Estudos demonstram que 2h (ensaio agudo) são suficientes para que os flavonoides penetrem nas células conferindo-lhes citoproteção, além da possível ação direta de sequestro de ERO *in vitro*. Conforme observamos no ensaio da atividade de sequestro de ERO (Figura 13 do capítulo 1).

O desbalanço gerado por ER leva à ativação de vias de sinalização intracelular como a do NF- κ B, que contribui para as complicações do DM-II. Em células β pancreáticas, a ativação do NF- κ B leva ao aumento na expressão da enzima iNOS, levando ao acúmulo de NO[•] e consequente morte celular por apoptose ou necrose (HO; BRAY, 1999). Embora estes mecanismos não estejam ainda completamente elucidados, flavonoides são descritos por inibirem a ativação do NF- κ B, através do bloqueio da degradação de suas proteínas inibitórias (I κ Bs). Esta inibição ocorre através do bloqueio da translocação do NF- κ B para o núcleo celular e pela inibição da degradação das I κ B α . Neste sentido, a quercetina é capaz de reduzir o estresse oxidativo e a ativação do NF- κ B, por meio da inibição de IKK α e IKK β , PK fosforiladoras das I κ Bs (Figura 11 abaixo) (KIM *et al.*, 2007).

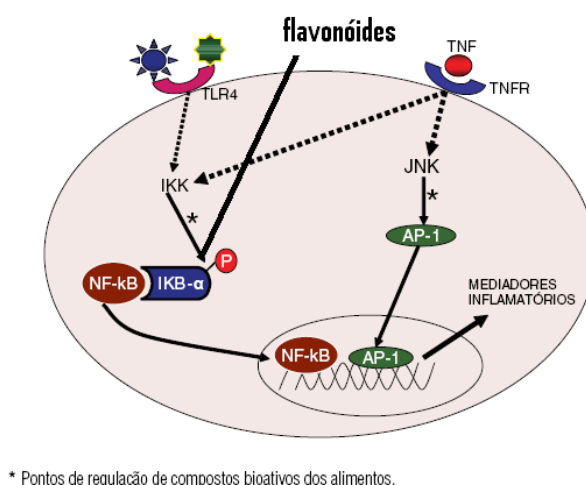


Figura 11: **Vias de sinalização dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1.** A presença de flavonoides inibe a via de sinalização do fator de transcrição NF- κ B por inibição da fosforilação das proteínas inibitórias (I κ B- α) do NF- κ B. A inibição desta via confere a proteção ao estresse oxidativo.

Adaptado de Bastos, Rogero, Arêas (2009).

Valen e colaboradores (1999), ao utilizarem o H_2O_2 na indução do estresse oxidativo, observaram alterações morfológicas drásticas nas células. Estas alterações são percebidas pela perda de adesão intercelular e alteração no formato da célula tornando-a mais arredondada, o que sugere provável alteração nos elementos estruturais (polímeros de actina), levando a um aumento de permeabilidade de membrana e consequente redução da seletividade desta. No exame microscópico observam-se células com aspectos irregulares, devido desestruturação do retículo endoplasmático, e núcleos mais evidentes, devido perda de conteúdo citoplasmático. Evidências apontam que as perturbações nas proteínas do citoesqueleto são o passo inicial aos danos induzidos pelos oxidantes.

Sabe-se que a proteção antioxidante é um dos mecanismos possíveis de estimulação da secreção de insulina. Porém, esta ação insulínica positiva dos flavonoides não se restringe a sua ação antioxidante, podendo estar, mesmo que em baixa concentração, relacionada à secreção de insulina a partir da modulação de proteínas, de cascatas intracelulares e da expressão gênica (PINENT *et al.*, 2008). Em linhagens de células secretoras de insulina, a genisteína estimula a secreção deste hormônio, através do acúmulo intracelular de AMPc e ativação da enzima PKA (LIU *et al.*, 2006; PINENT *et al.*, 2008). Tal efeito insulínico não foi observado nos tratamentos com naringina, neohesperidina e quercetina.

Os compostos fenólicos podem apresentar efeito pró-oxidante, normalmente quando empregados em concentrações elevadas. Em estudo com o flavonoide miricetina, todas as concentrações testadas potencializaram o efeito do H_2O_2 . Os autores sugerem que este flavonoide sofre auto-oxidação em tampão aquoso, de forma a produzir H_2O_2 e $\cdot O_2^-$. Além disso, quando incubada com Fe^{2+} , na presença e ausência de H_2O_2 , a miricetina é

capaz de aumentar a produção de $\cdot\text{OH}$. A auto-oxidação da miricetina produz H_2O_2 que reage com o Fe^{2+} gerando $\cdot\text{OH}$, mesmo em ensaios com ausência de H_2O_2 (LONG *et al.*, 2000, BRAATZ, 2010).

Apesar dos muitos estudos *in vitro* referentes ao uso de flavonoides como antioxidantes e insulinoatrópicos, faz-se necessário maior investigação de tais efeitos *in vivo*, para possível aplicação no tratamento e prevenção das disfunções pancreáticas (PINENT *et al.*, 2008).

Além disso, resultados *in vitro* devem ser interpretados com cautela visto que, ocorrem mudanças na composição do flavonoide após sua ingestão pelos indivíduos, como reações enzimáticas na boca; interações químicas enzimáticas e microbiológicas no trato digestório, absorção através da parede do trato gastrointestinal com transformação nos enterócitos, formação de metabólitos e produtos de óxido-redução com propriedades variadas (ANZUATEGUI, 2009).

Sendo assim, a padronização do emprego dos flavonoides enfrenta alguns entraves já que, há grande diversidade de compostos fenólicos na dieta, faltam dados na composição e consumo destas, desconhecemos ao certo o grau de absorção e a rota metabólica de cada composto além da possível ação sinérgica ou antagonista entre eles. Sabe-se também que compostos fenólicos diferentes podem originar um mesmo metabólito, e que o estabelecimento de biomarcadores específicos ainda não foram bem estabelecidos (BASTOS, ROGERO, ARÊAS, 2009).

Neste contexto, nosso trabalho chama a atenção para o uso indiscriminado de suplementos tão em moda atualmente. O uso de flavonoides deveria ser direcionado à

prevenção de doenças crônicas associadas ao estresse oxidativo e a grupos que apresentem deficiência nos mecanismos antioxidantes endógenos. Pois questiona-se até que ponto as estratégias de aumento de defesas antioxidantes por meio de nutrientes seriam benéficas, considerando-se que o excesso consumido poderá, ao longo da evolução, remover a pressão que modela sistemas endógenos, levando à uma sub-regulação ou não expressão de genes envolvidos com as defesas antioxidantes endógenas (CERQUEIRA, MEDEIRO, AUGUSTO, 2007).

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHERNE, S. A., O'BRIEN, N. M. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. **Nutrition**, v. 18, p. 75-81, 2002.

AKHLAGHI, M., BANDY, B. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v.46, p.309-317, 2009.

ALARCON-AGUILAR, F. J., JIMÉNEZ-ESTRADA, M., REYES-CHILPA, R., ROMANRAMOS, R. Hypoglycaemic effect of extracts and fractions from *Psicalium decompositum* in healthy and alloxan-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 21-27, 2000.

ALI, M. M., EL KADER, M. A. A. The influence of Naringina on the oxidative state of rats with streptozotocin- induced acute hyperglycaemia. **Zeitschrift für Naturforsch**, v.56, p.726-733, 2004.

ALLEN, R. G., TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology**, v. 28, n. 3, p. 463-499, 2000.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. All About Diabetes. Disponível em: <<http://www.diabetes.org/about-diabetes.jsp>>. Acesso em: 02 ago. de 2010.

ANZUATEGUI, L. S. Y. Análise in vitro da atividade antioxidante do suco e extrato de maçã em células RINm5f submetidas a diferentes condições de estresse oxidativo. 2009, 98f. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Evolutiva) Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Ponta Grossa - PR. 2009.

ANTON, S., MELVILLE, L., RENA, G. Epigallocatechin gallate (EGCG) mimics insulin action on the transcription factor FOXO1a and elicits cellular responses in the presence and absence of insulin. **Cellular Signalling**, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>>. Acesso em: 20 ago. 2010.

ARMSTRONG, P. J; YAMKA, R. M. O Elo Perdido da Obesidade: Relação entre Metabolismo, Genoma e Doença. In: www.HillsVet.com, julho,2009.

BALLATORI, N.; HAMMOND, C. L. *et al.* Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, p. 238– 255, 2005.

BARAN, I., GANEA, C., SCORDINO, A., MUSUMECI, F., BARRESI, V., TUDISCO, S., PRIVITERA, S., GRASSO, R., CONDORELLI, D. F., URSU, I., BARAN, V., KATONA, E., MOCANU, M. M., GULINO, M., UNGUREANU, R., SURCEL, M., URSACIUC, C. Effects of Menadione, Hydrogen Peroxide, and Quercetin on Apoptosis and Delayed

Luminescence of Human Leukemia Jurkat T-Cells. **Cellular Biochemistry Biophysics**. v. 58, p.169–179, 2001.

BARCELÓ, A., AEDO, C., RAJPATHAK, S., ROBLES, S. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, p. 19-28, 2003.

BASTOS, D. H. M., ROGERO, M. M., ARÊAS, J. A. G. Mecanismo de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.53, n. 5, p.646-656, 2009.

BEARDSALL, K., YUEN, K., WILLIAMS, R., DUNGER, D. Applied physiology of glucose control. **Current Paediatrics**, v. 13, p. 543-548, 2003.

BERNE, R. M., LEVY, M. N. **Berne & Levy: Fisiologia**. In: Regulação Hormonal do Metabolismo Energético, WHITE, B. A. Elsevier, Rio de Janeiro, p.657-700, 2009.

BIANCHI, M. L. P., ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BONDAN, C. Perfil oxidativo de eritrócitos de bovinos intoxicados por Senecio sp. 2006, 65f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria –RS, 2006.

BORGES, K. B., BAUTISTA, H. B., GUILERA, S. Diabetes – utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.2, p. 12 - 20, 2008.

BRAATZ, S. M., Avaliação do Efeito Citoprotetor do Extrato Bruto das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) e de Compostos Bioativos Isolados em Células Secretoras de Insulina. 2010, 130f. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Evolutiva) Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Ponta Grossa - PR. 2010.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v.54, p.1615-1625, 2005.

CANIVENC-LAVIER, M. C., VERNEVAUT, M. F. *et al.* Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. **Toxicology**, v. 114, p. 19-27, 1996.

CERQUEIRA, F. M., MEDEIROS, M. H. G., AUGUSTO, O. Antioxidantes Dietéticos: Controvérsias e Perspectivas. **Química Nova**, v.30, n. 2, p.441-449, 2007.

CHEN, D.; DANIEL, K. *et al.* Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 1421-1432, 2005.

CHIVIAN, E. Biodiversity: Its Importance to Human Health. **Center for Health and the Global Environment Harvard Medical School**, 2002.

CROW, J. F. Mid-century controversies in population genetics. **Annual Review of Genetics**, v.42, p.1-16, 2008.

DE SOUSA, E., ZANATTA, L., SEIFRIZ, I., CRECZYNSKI-PASA, T. B., PIZZOLATTI, M. G., SZPOGANICZ, B., SILVA, F. R. M. B. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 829-832, 2004.

DEFRONZO, R.A. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Annals of Internal Medicine**, v. 131, p. 281-303, 1999.

DELEVE, L. D., KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 52, n. 3, p. 287-305, 1991.

DESVERGNE, B., MICHALIK, L., WAHLI, W. Transcriptional regulation of metabolism. **Physiological Reviews**, v. 86, p. 465-514, 2006.

DICKSON, W. Endocrinologia, Reprodução e Lactação. In: **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**. SWENSON, M. J., REECE, W. O. Guanabara Koogan 11^a edição. p. 590-591, 1996.

DORNAS, W. C., OLIVEIRA, T. T., RODRIGUES-DAS-DORES, R. G., SANTOS, A. F., NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

DREHER, D., JUNOD, A. F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **European Journal of Cancer**. v. 32 (A), p. 30-38, 1996.

DYPBURKT, J. M. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells – The role of intracellular polyamines. **Journal Biological Chemistry**, v.269, p.30.553-30.560, 1994.

FABIANI, R., FUCCELLI, R., PIERAVANTI, F., BARTOLOMEO, A., MOROZZI, G. Production of hydrogen peroxide is responsible for the induction of apoptosis by hydroxytyrosol on HL60 cells. **Molecular Nutrition Food Research**. v.53, p.887 - 896, 2009.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação de Medicina do Brasil**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FLORÃO, A., MATTANA, F. V. R., ROCHA, F. H., NARDIN, J. M., MACHADO JUNIOR, J. C., WEFFORT-SANTOS, A. M. Efeitos do Dimetilsulfóxido sobre a proliferação de linfócitos humanos *in vitro*. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.26, n.2, p. 215-223, 2007.

FRESHNEY, R. I. Culture of animals cells: **A Manual of Basic Technique**. 3.ed Wiley-Liss, 486p, 1994.

FU – LIANG, X., XIAO-HUI, S., LU, G., XIANG-LIANG, Y., HUI-BI, X. Puerarin protects rat pancreatic islets from damage by hydrogen peroxide. **European Journal of Pharmacology**, v.529, p.1-7, 2006.

<http://www.genkyotex.com/acesso> 16 de abril de 2010.

GILLESPIE, K.M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. **Canadian Medical Association Journal**, v. 175, p. 165-170, 2006.

GREENMAN, I. C. Distinct glucose-dependent stress responses revealed by translational profiling in pancreatic β -cells. **Journal of Endocrinology**, v.192, p.179-187, 2007.

GUYTON, A. C., HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Elsevier, 11^a.ed, 2006.

HABER, E. P., CURI, R., CARVALHO, C. R. O., CARPINELLI, A. R. Secreção da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**. v.45, n. 3, p.219-227, 2001.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press, 2000.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, M. C. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HENQUIN, J. C., NENQUIN, M., STIERNET, P., AHREN B. *In vivo* and *in vitro* glucoseinduced biphasic insulin secretion in the mouse pattern and role of cytoplasmic Ca^{2+} and amplification signals in β -cells. **Diabetes**, v. 55, p. 441-451, 2006.

HO, E., BRAY, T. M. Antioxidants, NF κ B Activation, and Diabetogenesis. **Experimental Biology and Medicine**, v.222, p.205-213, 1999.

HODEK, P. TREFIL, P. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, v. 139, p. 1-21, 2002.

HOENIG, M., THOMASETH, K., WALDRON, M., FERGUSON, D. C. Insulin Sensitivity, Fat Distribution, and Adipocytokine Response to Different Diets in Lean and Obese Cats Before and After Weight Loss. **American Journal Physiology - Regulatory Integrative and Comprative Physiology**. 292, 227-234, 2007.

HOLLMAN, P. C., KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 51, p. 305-310,1997.

HSU, F. L., LIU, I. M., KUO, D. H., CHEN, W. C., SU, H. C., CHENG, J. T. Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Natural Products**, v.66, p. 788-792, 2003.

HWANG, S., L., YEN, G. C. Neuroprotective Effects of the Citrus Flavanones against H_2O_2 -Induced Cytotoxicity in PC12 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.56, n.3, p.859-864, 2008.

ISLAS-ANDRADE, S., MONSALVE, M. C. R., DE LA PEÑA, J. E., POLANCO, A. C., PAMOLINO, M. A., VELASCO, A. F. Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: comparison of the two models in rats. **Acta Histochemistry Citochemistry**, v. 33, p. 201-208, 2000.

JORGE, A. P., HORST, H., DE SOUSA, E., PIZZOLATTI, M. G., SILVA, F. R. M. B. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v. 149, p. 9-96, 2004.

JUNG, U. J., LEE, M. K., JEONG, K. S., CHOI, M. S. The Hypoglycemic Effects of Hesperidin and Narigin are Partly Mediated by Hepatic Glucose regulating Enzymes in C57BL/KsJ-db/db Mice. Biochemical and Molecular Actions of Nutrients. **The Journal of Nutrition**. v.134, p.2499-2503, 2004.

JUNG, U. J., LEE, M. K., PARK, Y. B., KANG, M. A., CHOI, M. S. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme m RNA levels in type-2 diabetic mice. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.38, p.1134-1145, 2006.

KAELIN, C. B., XU, A. W., LU, X. Y., BARSH, G. S. Transcriptional Regulation of Agouti-Related Protein (AgRP) in Transgenic Mice. **Endocrinology**. v.145, n. 12, p. 5798-5806, 2004.

KAMALAKKANNAN, N., PRINCE, P.S.M. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 97-103, 2006.

KATOCHI, B., BEGUM, R. Biochemical basis of the high resistance to oxidative stress in *Dictyostelium discoideum*. **Journal of Bioscience**, v.28, p.581, 2003.

KHAN, A. H., PESSIN, J. E. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signaling pathways. **Diabetologia**, v. 45, p. 1475-1483, 2002.

KIM, E. K. et al. *Coptidis rhizoma* extract protects against cytokine-induced death of pancreatic β - cells through suppression of NF- κ B activation. **Experiment Molecular Medicine**, v.38, n.2, p.149-159, 2007.

KIM, G. N., JANG, H. D. Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on H₂O₂- induced oxidative stress in HepG2 cells. **Annual New York Academic Science**. v.1171, p.530-537, 2009.

KLEY, S., HOENING, M., GLUSKA, J. JIN, E. S., BURGESS, S. C., WALDRON, M., JORDAN, E. T., PRESTEGARD, J. H., FERGUSON, D. C., WU, S., OLSON, D. E. The Impact of Obesity, Sex, and Diet on Hepatic Glucose Production in Cats. **American Journal of Physiology**. v. 296, n.4, p. 936-943, 2009.

KLIP, A., TSAKIRIDIS, T., MARETTE, A., ORTIZ, P. A. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies *in vivo* and in cell cultures. **The FASEB Journal**, v. 8, p. 43-53, 1994.

KOCH, F. L., WUNDERLICH, T., SEIBLER, A. J., KÖNNER, A.C., HAMPEL, B., IRLBUSCH, S., BRABAND, G., KAHN, C. R., SCHWENK, F., BRÜNING, J.C. Central Insulin Action Regulates Peripheral Glucose and Fat Metabolism in Mice. The **Journal of Clinical Investigation**. v. 118, n. 6, p 2132-2147, 2008.

LAYBUTT, D. R. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. **Diabetologia**, v.50, p.752-763, 2007.

LAZZAROTTO, J. J. Obesidade em Cães e Principais Alterações Metabólicas Relacionadas. **Revista Universidade de Alfenas**. v. 5, p.33-35, 1999.

LEDUC, C., COONISHISH, J., HADDAD, P., CUERRIER, A. Plants used by the Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 55-63, 2006.

LEE, J.S. Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 79, p. 1578-1584, 2006.

LENNON, S. V., MARTIN, S. J., COTTER, T. G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Proliferation**, v.24, n.2, p.203-214, 1991.

LIBERATO, S. C. Efeito da Naringinina e do amido da fruta-do-lobo em animais diabéticos. 2001, 160f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, 2001.

LIU, X. J., HE, A. B., CHANG, Y. S., FANG, F. D. Atypical protein kinase C in glucose metabolism. **Cellular Signalling**, v. 18, p. 2071-2076, 2006.

LONG, L. H., CLEMENT, M. V., HALLIWELL, B. Artifacts in cell culture : Rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-) – epigallocatechin, (-)- epigallocatechin gallate, (+) – catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v.273, p.50-53, 2000.

MACHADO, U. F., SCHAAN, B. D., SERAPHIM, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 177-189, 2006.

MALECKI, M. T., KLUPA, T. Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 20-32, 2005. Suplemento.

MASOUMEH, A., BANDY, B. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v.46, p.309-317, 2009.

MATES, J. M., PEREZ-GOMEZ, C. *et al.* Antioxidante enzymes e human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, p. 595-603, 1999.

MATÉS, N. Effects antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, n. 153, p. 83-104, 2000.

McCALL, M. R., FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1034-1053, 1999.

McCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, v. 99, p. 157-168, 1998.

McCORD, J. M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 60409-60455, 1969.

MCGARRY, J. D., DOBBINS, R. L. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. **Diabetologia**, v. 42, p. 128-138, 1999.

MENG, C. Q., ZHENG, X. S. *et al.* Discovery of novel heteroaryl-substituted chalcones as inhibitors of TNF- α -induced VCAM-1 expression. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 6, p. 1513-1517, 2004.

MICHALSKA, M., WOLF, G., WALTHER, R., NEWSHOLME, P. The effects of pharmacologic inhibition of NADPH oxidase or iNOS on pro-inflammatory cytokine, palmitic acid or H₂O₂- induced mouse islet or clonal pancreatic beta cell dysfunction. **Bioscience Reports Immediate Publication**. Manuscrito. 23 fevereiro, 2010.

MIDDLETON, E., KANDASWAMI, S. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. p.619-652. In: **The Flavonoids: Advances in Research Since 1986**. Editor: J. B. Harborne. Chapman and Hall, London, 1993.

MIRANDA, M.A., OKAMOTO, A. K., FERREIRA, C.V., SILVA, T.L., GRANJEIRO, J. M., AOYAMA, H. Differential effects of flavonoids on bovine kidney low molecular mass protein tyrosine phosphatase. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v.21, n.4, p.419-425, 2006.

MORTON, N. E. Recollections of James Neel. **Mutation Research**. n.543, v.2, p.97-104, 2003.

NAVARRO, J.; OBRADOR, E. *et al.* Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumor growth in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, n. 3-4, p. 410-418, 1999.

NEWSHOLME, P., HABER, E. P., REBELATO, E. L. O., PROCOPIO, J., MORGAN, D., OLIVEIRA-EMILIO, H. R., CARPINELLI, A. R., CURI, R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS producyion and activity. **Journal of Physiology**, v.583, n.1, p.9-24, 2007.

NORDBERG, J., ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287- 1312, 2001.

- NORMAN, A. W., LITWACK, G. **Hormones**. Second edition. Academic Press, 1997.
- NYSTROM, F. H., QUON, M. J. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. **Cellular Signalling**, v. 11, p. 563-574, 1999.
- NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Antioxidant Therapy: Myth or Reality? **Journal Brazilian Chemistry Society**, v.16, n.4, p.699-710, 2005.
- O'BRIEN, R. M., GRANNER, D. K. Regulation of gene expression by insulin. **Physiological Reviews**, v. 76, p. 1109-1161, 1996.
- ONG, K. C., KHOO, H. E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. **Life Sciences**, v. 67, p. 1695-1705, 2000.
- PASTORE, A., FEDERICI, E. *et al.* Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, p. 19-39, 2003.
- PERREIRA, L. O., LANCHI JR., A. H. Effect of insulin and contraction up on glucose transport in skeletal muscle. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 84, p. 1-27, 2004.
- PINENT, M., CASTELL, A., BAIGES, I., MONTAGUT, G., AROLA, L., ARDÉVO, A. Bioactivity of Flavonoids on Insulin-Secreting Cells. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 7, 2008.
- PINENT, M., BLAY, M., BLADE, M. C., SALVADO, M. J., AROLA, L., ARDEVOL, A. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. **Endocrinology**, v. 145, p. 4985-4990, 2004.
- RAND, J. S., FLEEMAN, L. M., FARROW, H. A., APPLETON, D. J., LEDERER, R. Canine and Feline Diabetes Mellitus: Nature or Nurture? **The Journal of Nutrition**. Supplement, p. 2072-2080, 2004.
- RANDALL, D. J. **Eckert, Fisiologia Animal: Mecanismos e adaptações**. 4ª. edição. Guanabara Koogan. p. 304, 307-308, 2008.
- REN, G., QIAO, H. X., YANG, J., ZHOU, C. X. Protective Effects of Steroids from *Allium Chinese* against H₂O₂ -induced Oxidative Stress in rat Cardiac H9C2 Cells. **Phytotherapy Research**. V.24, p. 404-409, 2010
- REYNERTSON, K. A., BASILE, M. J., KENNELY, E. J. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v.3, p.25-35, 2005.
- RICHTER, E.A. Glucose metabolism in skeletal muscle. **Pathophysiology**, v. 5, p. 119, 1998.
- ROGLIC, G., UNWIN, N., BENNETT, P.H., MATHERS, C., TUOMILEHTO, J., NAG, S., CONNOLLY, M., KING, H. The burden of mortality attributable to diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, p. 2130-2135, 2005.

SALTIEL, A. R., KAHN, C. R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799-806, 2001.

SANTOS, K. F. R., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J., PINTO, A. S., OLIVEIRA, M. G. A. Hypolipidaemic Effects of Naringenin, Rutin, Nicotinic Acid and their Associations. **Pharmacological Research**. v.6, n. 40, p.493-496, 1999.

SCHEEPERS, A., JOOST, H.G., SCHÜRMANN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **The Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 28, p. 364-371, 2004.

SCHROETER, H., BOYD, J. P. E. *et al.* MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiology of Aging**, v. 23, p. 861-880, 2002.

SHEN, S., CHEN, Y. *et al.* Differential apoptosis-inducing effect of quercetin and its glycosides in human promyeloleukemic HL-60 cells by alternative activation of the caspase 3 cascade. **Journal of Cellular and Biochemistry**, v. 89, p. 1044-1055, 2003.

SHIN, J. S., KIM, K. S., KIM, M. B., JEONG, J. H., KIM, B. K. Synthesis and hypoglycemic effect of chrysin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, p. 869-874, 1999.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, n.6, p.1315-1321, 1997.

SLATER, A. F. G., STEFAN, C. *et al.* Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 82-83, p. 149-153, 1995.

SLINGERLAND, L. I., FAZILOVA, V. V., PLANTINGA, E. A., KOOISTRA, H. S., BEYNEN, A. C. Indoor Confinement and Physical Inactivity Rather than the Proportion of Dry Food are Risk Factors in the Development of Feline Type II Diabetes mellitus. **The Veterinary Journal**. Elsevier, v. 179, p. 247-253, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002**. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2003. 72 p.

SOUSA, C. M. M., ROCHA E SILVA, H., VIEIRA-JR., G. M., AYRES, M. C., COSTA, C. L. S., ARAÚJO, D. S., CAVALCANTE, L. C. D., BARROS, E. D. S., ARAÚJO, P. B. M., BRANDÃO, M. S., CHAVES, M. H. Fenóis Totais E Atividade Antioxidante De Cinco Plantas Medicinais. **Química. Nova**. v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

TAKII, H., MATSUMOTO, K., KOMETANI, T., OKADA, S., FUSHIKI, T. Lowering effect of phenolic glycosides on the rise in postprandial glucose in mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v.61, n.9, pp1531-1535, 1997.

TANG, J. P., ZHANG, J. H. Mechanisms of $[Ca^{2+}]_i$ elevation by H_2O_2 in islets of rats. **Life Science**, v.68, p. 475-481, 2000.

TEMPLETON, A. A gordura, o cérebro e o coração. In: Ciência, embates e Debates. **Revista Pesquisa Fapesp**. Ed.147, abr-set 2008. (consulta agosto/2009 www.revistapesquisa.fapesp.br Revolução Genômica Edição On Line).

THORESEN, S. I., BREDAL, W. P. Clinical Usefulness of fructosamine in Diagnosing and Monitoring Feline Diabetes Mellitus. **Journal of Small Animal Practice**, v. 37, p.64-68, 1996.

ULLAH, M. F., SHAMIM, U., HANIF, S., AZMI, A. S., HADI, S. M. Cellular DNA breakage by soy isoflavone genistein and its methylated structural analogue biochanin A. **Molecular Nutrition Food Research**. v. 53, p. 1376–1385, 2009.

VALEN, G. et al. Hydrogen peroxide induces endothelial cell atypia and cytoskeleton depolymerization. **Free Radical Biology & Medicine**, v.12, n.26, p.1480-1888, 1999.

VALKO, M., RHODES, C. J. *et al.* Free radicals and antioxidants in physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**. v. 39, p.44-84, 2007.

VAN DE LOOSDRECHT, A. A., NENNIE, E. *et al.* Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **Journal of Immunological Methods**, v. 141, n.1,p.15-22, 1991.

VATS, R. K., KUMAR, V., KOTHARI, A., MITAL, A., RAMACHANDRAN, U. Emerging targets for diabetes. **Current Science**, v. 88, p. 241-249, 2005.

VELUSSI, M., CERNIGOI, A. M., DE MONTE, A., DAPAS, F., CAFFAU, C., ZILLI, M. Long-term (12 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. **Journal of Hepatology**, v. 26, p. 871-879, 1997.

VESSAL, M., HEMMATI, M., VASEI, M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocininduced diabetic rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 135, p. 357– 364, 2003.

VIEIRA, A. J. S. C. Radicais oxidantes: da química à biologia. **Química** 100. Jan/mar p.66-71, 2006.

WALTNER-LAW, M. E., WANG, X. L., LAW, B. K., HALL, R. K., NAWANO, M., GRANNER, D. K. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 34933-34940, 2002.

WANG, W., BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 335-355, 1998.

WATSON, R. T., PESSIN, J. E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT 4 translocation. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 56, p. 175-194, 2001.

WHO, World Health Organization. Diabetes. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/print.html>>. Acesso em: 05 ago. 2010.

WILD, S., ROGLIC, G., GREEN, A., SICREE, R., KING, H. Global prevalence of diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1047-1056, 2004.

WOOD, I. S., TRAYHURN, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **British Journal of Nutrition**, v. 89, p. 3-9, 2003.

YOSHIKAWA, M. Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and α -glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (*Myrtaceae*): Structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.46, p.113-119, 1998.

ZARZUELO, A., JIMENEZ, I., GAMEZ, M. J., UTRILLA, P., FERNADES, I., TORRES, M. I., OSUNA, I. Effects of luteolin 5-0- β -rutinoside in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 58, p. 2311-2316, 1996.

ZHAO, H., YAKAR, S., GAVRILOVA, O., SUN, H., ZHANG, Y., KIM, H., SETSER, J., JOU, W., LEROITH, D. Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 2901-2909, 2004.

ZHAO, Y., DAVIS, H. W. Hydrogen peroxide-induced cytoskeletal rearrangement in cultured pulmonary endothelial cells. **Journal Cell Physiol**, v.174, p.370-379, 1998.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2009.