

Avaliação do efeito anticarcinogênico da rutina, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*

Evaluation of anticancer effect of rutin on a test for the detection of clones of epithelial tumors (warts) in Drosophila melanogaster

Cíntia Raquel de Freitas

Graduanda do curso de Ciências Biológicas (UNIPAM).
E-mail: cintia.r.freitas@hotmail.com

Nayane Raquel de Freitas

Bióloga do Laboratório de Citogenética e Mutagênese (UNIPAM).
E-mail: nay.mm@hotmail.com

Júlio César Nepomuceno

Professor orientador (UNIPAM).
E-mail: nepomuceno@ufu.br

Resumo: A rutina é um flavonoide presente em abundância na espécie nativa do cerrado *Dimorphandra mollis*, conhecida popularmente como faveira ou fava-d'anta, e tem sido foco de diversos estudos atuais devido às suas inúmeras propriedades terapêuticas. O objetivo do presente estudo foi o de analisar o efeito anticarcinogênico do flavonoide, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. Os resultados demonstraram que as larvas que foram induzidas à formação de tumores, pela MMC (Mitomicina C), e, posteriormente, tratadas com rutina, apresentaram redução estatisticamente significativa no número de tumores, em relação ao controle positivo. Na concentração de 37,5 µM de rutina, houve redução de 71% na frequência total de tumores induzidos pela MMC; já no tratamento com a concentração de 75 µM, a redução foi de 78%, e a concentração de 150 µM apresentou redução de 64 % nos tumores induzidos na *Drosophila*.

Palavras-chave: *wts*. Propriedades terapêuticas. Flavonoide. Mitomicina C.

Abstract: Rutin is a flavonoid abundantly present in native *Dimorphandra mollis* of the cerrado, popularly known as field bean or bean-d'anta, and has been the focus of many current studies due to its numerous therapeutic properties. The aim of this study was to examine the anticarcinogenic effect of flavonoid, by testing for the detection of clones of epithelial tumors (*warts*) in *Drosophila melanogaster*. The results showed that the larvae which were induced to tumor formation, by MMC (Mitomycin C,) and, subsequently treated with rutin showed a statistically significant reduction in the number of tumors, regarding the positive control. At the concentration of 37.5 mM rutin, there was a reduction of 71% in the overall frequency of tumors induced by MMC; in treatment with a concentration of 75 mM, the reduction was 78%, and the concentration of 150 mM was decreased by 64% in tumors induced in *Drosophila*.

Keywords: *wts*. Therapeutic properties. Flavonoid. Mitomycin C.

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os flavonoides são metabólitos secundários polifenólicos de origem natural, que têm, como parte da sua estrutura molecular, um número variável de grupos hidroxil/fenólicos, que são responsáveis pela sua elevada capacidade antioxidante (MARCARINI *et al.*, 2010).

A rutina foi o primeiro flavonoide a ser descoberto, em 1930, isolado a partir de laranjas. Inicialmente, acreditava-se ser um composto pertencente ao grupo das vitaminas, sendo denominada durante algum tempo de vitamina P (MACHADO, 2006).

As fontes alimentares mais comuns onde pode ser encontrada a rutina incluem as laranjas, cebolas, a uva, o trigo sarraceno e o vinho tinto (OLTHOF *et al.*, 2003), porém sua maior concentração encontra-se na fava d'anta (*Dimorphandra mollis Benth*) (FARIA *et al.*, 2003).

Dimorphandra mollis é uma planta arbórea nativa do cerrado brasileiro podendo atingir até quatorze metros de altitude. Apresenta ampla e contínua dispersão por quase todo o cerrado do Brasil central produzindo anualmente grande quantidade de sementes viáveis (LORENZI, 2002). Seus frutos (favas) contêm rutina na proporção de 8 gramas para cada 100 gramas de pericarpo (BRECHO; MACHADO; GUERRA, 2009).

Na medicina popular, a rutina é consumida principalmente por meio de chás das folhas da arruda (*Ruta graveolens*), sendo utilizada em especial devido à sua ação analgésica, anti-helmíntica (OLIVEIRA; SCALON FILHO; ROBRE, 2010) e vasodilatadora, auxiliando no tratamento dos sintomas de hemorroidas e varizes (LUCYK, 2012).

A conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *Drosophila* e mamíferos tem estimulado estudos na indução e no desenvolvimento de tumores em *Drosophila*, estudos estes que podem contribuir diretamente para o entendimento de cânceres em seres humanos (POTTER *et al.*, 2000). Em adição, numerosos proto-oncogenes e supressores de tumores de mamíferos são conhecidos nesse organismo teste (EEKEN *et al.*, 2002). O gene *wts* foi identificado baseado na sua habilidade para ação como um supressor de tumor em *Drosophila* (NISCHIYAMA *et al.*, 1999). A deleção desse gene leva à formação de clones de células que são circulares e consideravelmente invasivas, chamadas literalmente de verrugas (*warts* em inglês), que se desenvolvem por todo o corpo da mosca (JUSTICE *et al.*, 1995).

Estudos demonstraram que a rutina é capaz de induzir apoptose e fator de necrose tumoral, em diversos organismos teste (SOUZA, 2007, SILVA *et al.*, 2008; SANTOS, 2011). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito anticarcinogênico da rutina, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AGENTES QUÍMICOS

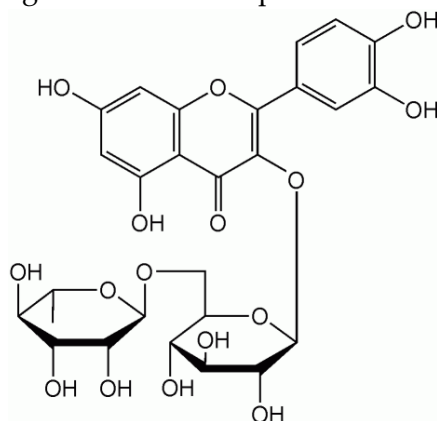
2.1.1 Mitomicina C

Como controle positivo, utilizou-se um agente químico de ação citotóxica: a mitomicina (Mitocin® lote 1G00444 (CAS 50-07-7)), fabricado por Kyowa Hakko Kirin Co. Ltd., Shizuoka, Japão e embalado por Corden Pharma Latina S.p.A., Sermoneta, Latina, Itália. Importado por Bristol-Myers Squibb Farmacêutica S.A. Rua Carlos Gomes, 924 – Santo Amaro, São Paulo. Cada frasco-ampola contém 5 mg de pó liofilizado para solução injetável. A concentração utilizada nesse experimento foi baseada nos estudos feitos por Orsolin *et al.* (2011), utilizando o teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*), em *D. Melanogaster*.

2.1.2 Rutina

A rutina apresenta-se como um pó amarelo esverdeado comercializado de forma fracionada para laboratórios de manipulação de medicamentos. A substância utilizada no presente trabalho foi adquirida em laboratório estabelecido em Patos de Minas-MG, sendo originária da China sob o lote 110301. Importada pela Pharma Nostra sob lote número 11061972A, possuindo CAS 153-18-4. A sede da Pharma Nostra localiza-se à Rua Aquidabã, 1144 – Méier, Rio de Janeiro – RJ. A Figura 1 mostra a estrutura química do composto testado.

Figura 1: Estrutura química da rutina



2.2 TESTE PARA DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORES EPITELIAIS (WARTS), EM *Drosophila melanogaster*

O gene *wts* em *Drosophila* codifica uma proteína serina / treonina quinase, e sua deleção leva à perda de controle sobre a quantidade e direção da proliferação celular, no desenvolvimento de discos imaginários (JUSTICE *et al.*, 1995).

Nos zigotos, o *wts* é letal em homozigose. Devido a este fato, o alelo é encontrado na linhagem estoque na presença do balanceador cromossômico *TM3*. As larvas heterozigotas são obtidas através do cruzamento de linhagens *wts/TM3, Sb¹* com *multiple wing hairs (mwh/mwh)*. Porém, as células dos discos imaginais perdem a heterozigose formando clones homozigotos, sendo estes viáveis quando encontram-se na larva em conjuntos de células isoladas. Os clones homozigotos manifestam-se na mosca adulta em forma de tumores (verrugas) (SIDOROV *et al.*, 2001).

Para realização do teste, foram utilizadas duas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* (*wts* e *mwh*) portadores dos marcadores genéticos *warts (wts, 3-100)* e *multiple wing hairs (mwh, 3-0,3)*, que possui o gene marcador *mwh* no cromossomo três posicionado distalmente. As células da asa da *Drosophila* normalmente apresentam apenas um pelo, mas na presença desse alelo mutante (*mwh*) apresentam três ou mais, sendo esta uma mutação viável. Devido a este fato, a linhagem estoque é mantida em homozigose recessiva (GRAF *et al.*, 1984). A linhagem *wts/TM3, Sb¹* foi gentilmente cedida pelo Bloomington *Drosophila* Stock Center, da Universidade de Indiana, USA, com o número de registro: Bloomington/7052. A linhagem *mwh/mwh* foi gentilmente cedida pelo Dr. Ulrich Graf (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland).

Os estoques foram mantidos em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura constituído por 820 mL de água; 25g de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*); 11 g de ágar; 156 g de banana e 1g de nipagin. Foram mantidos em uma temperatura de 25° C e 60% de umidade.

Para realização do experimento, foi efetuado o cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3 Sb¹* com machos *mwh/mwh*. A postura dos ovos dos descendentes do cruzamento ocorreu durante um período de 8 horas. Após 72 ± 4 horas, as larvas foram lavadas com água osmose reversa e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina. Larvas de 3º estágio foram submetidas a um tratamento crônico, por um período de, aproximadamente, 48 horas. Estas larvas foram colocadas em frascos de vidro contendo 1,5g de purê de batatas e 5 mL de rutina nas diferentes concentrações testadas (37,5 µM; 75 µM e 150 µM), controle positivo e controle negativo. Para controle positivo, utilizou-se a mitomicina C (0,1 mM) e, para controle negativo, água osmose reversa. As larvas expostas a mitomicina C, em associação ou não, foram pré-tratadas, por um período de 6 horas. As concentrações do flavonoide foram definidas baseadas em estudos realizados por Silva *et al* (2008).

Após se alimentarem dos meios e finalizarem a metamorfose, os adultos foram coletados e preservados em etanol 70% e, posteriormente, foram separadas para análise das moscas portadoras do genótipo *wts +/- mwh*, quanto à presença de tumor. Essas moscas são identificadas pela presença de pelos selvagens fenotípicos (longos e finos), conforme descrito por Orsolin (2011).

A análise foi realizada com auxílio de lupa estereoscópica e baseou-se na contagem de tumores de acordo com a descrição de Justice (1995). Os resultados foram registrados em um diagrama padrão expressando os números observados em cada seguimento das moscas: nos olhos, cabeça, corpo, asas, pernas e halteres.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

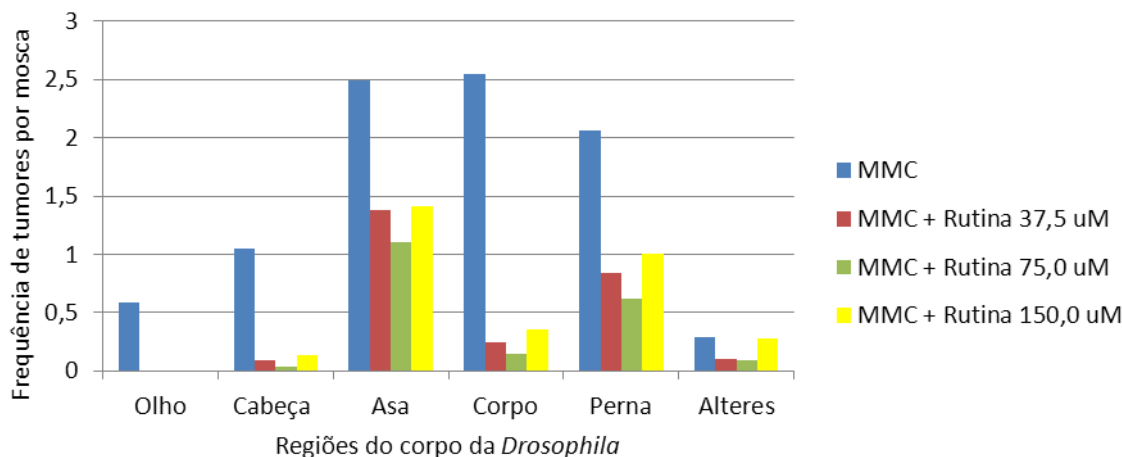
As diferenças estatísticas entre as frequências de tumores das concentrações testadas e os controles foram calculadas usando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, utilizando o nível de significância $< 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os compostos foram testados em dois experimentos diferentes. Os dados foram combinados depois de verificar que os dois experimentos independentes estavam de acordo com reprodutibilidade aceitável.

A mitomicina C (controle positivo) apresentou resultados significativos ($p < 0,05$) quanto à indução de tumores em *Drosophila melanogaster*. Foram encontrados, nos indivíduos tratados com mitomicina C, 1809 tumores (9,05 por indivíduo), distribuídos por toda a mosca, sendo a maioria deles observados no corpo (28%) e nas asas (27%), e o restante observado nos olhos (7%), na cabeça (12%), nas pernas (23%) e nos halteres (3%). Esta maior frequência de tumores, observada principalmente no corpo da mosca, também foi verificada por Sidorov *et al.* (2001). Segundo os autores, estas frequências de tumores são as mais altas, entre todos os órgãos, porque eles têm o maior número de células e maior período de proliferação celular (Figura 2).

Figura 2. Distribuição de tumores em todo corpo da *Drosophila*, após tratamento crônico com diferentes concentrações de rutina associada com MMC.



Os descendentes tratados apenas com as diferentes concentrações de rutina não apresentaram qualquer alteração, estatisticamente significativa, nas frequências de tumores, quando em comparação ao controle negativo. Portanto, nas condições experimentais demonstradas neste estudo, nenhum efeito na indução de tumores foi verificado pela rutina (Tabela 1).

A avaliação do efeito anticarcinogênico da rutina mostra que as larvas que foram induzidas à formação de tumores pela MMC e, posteriormente, tratadas com concentrações do flavonoide, apresentaram redução no número de tumores,

estatisticamente significativa, em relação ao controle positivo. Na concentração de 37,5 μM de rutina, houve redução de 71% na frequência total de tumores induzidos pela MMC; já no tratamento com a concentração de 75 μM , a redução foi de 78%, e a concentração de 150 μM apresentou redução de 64% nos tumores induzidos na *Drosophila* (Tabela 1). Avaliando as diversas partes da mosca, foi possível verificar que a maior redução de tumores ocorreu no corpo (Figura 2), quando comparamos com outras partes (asa, olhos, alteres etc.). É possível que esta redução tenha ocorrido mais nitidamente no corpo, pelo fato de que esta região, na *Drosophila*, tem o maior número de células e maior período de proliferação celular, como explica Sidorov *et al.* (2001).

Os mecanismos pelos quais a rutina reduziu o número de tumores na *Drosophila* não foram diretamente analisados. Contudo, sabe-se que a rutina é um flavonoide antioxidante (PEDRIALI, 2005). Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos: o primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Os compostos antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, as proteínas, os ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os compostos fenólicos agem neutralizando ou sequestrando radicais livres e quelando metais de transição. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias. A capacidade antioxidante destes compostos é atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, que reduz radicais livres reativos (SOARES, 2002).

Tabela 1- Frequência de clones de tumor observada em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, pré-tratada com mitomicina C (6 horas) e posteriormente tratada com Rutina.

Tratamentos			Número de tumores por mosca (total de tumores)													
Rutina (Concentração)	MMC mM	Número de moscas analisadas	Olho		Cabeça		Asa		Corpo		Perna		Halteres		Total	
μM																
0	0	200	0,00	(1)	0,03	(6)	0,06	(13)	0,10	(20)	0,03	(7)	0,00	(1)	0,24	(48)
0	0,1	200	0,59	(119) *	1,05	(211) *	2,49	(499) *	2,55	(510) *	2,06	(412) *	0,29	(58) *	9,05	(1809) *
37,5	0	200	0,00	(0)	0,04	(8)	0,03	(7)	0,02	(4)	0,09	(18)	0,00	(1)	0,19	(38)
75,0	0	200	0,00	(0)	0,02	(5)	0,05	(10)	0,03	(6)	0,04	(9)	0,02	(4)	0,17	(34)
150,0	0	200	0,00	(1)	0,02	(5)	0,05	(11)	0,05	(11)	0,04	(8)	0,01	(2)	0,19	(38)
37,5	0,1	200	0,00	(1) **	0,09	(18) **	1,38	(275) **	0,24	(49) **	0,84	(169) **	0,10	(21) **	2,81	(533) **
75,0	0,1	200	0,00	(0) **	0,04	(8) **	1,10	(220) **	0,15	(30) **	0,62	(124) **	0,09	(19) **	1,99	(398) **
150,0	0,1	200	0,00	(0) **	0,14	(28) **	1,41	(282) **	0,36	(73) **	1,00	(200) **	0,28	(57) **	3,21	(642) **

Diagnóstico estatístico de acordo com Mann-Whitney Teste. Nível de significância P = 0,05

* Valor considerado diferente do controle negativo (P < 0,05).

** Valor considerado diferente do controle positivo (MMC 0,1 mM) (P < 0,05).

MMC, mitomicina C.

Os antioxidantes fenólicos são considerados como primários, agindo como terminais para os radicais livres, promovendo remoção ou inativação destes, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (RAMALHO; JORGE, 2006).

A ação antioxidante dos flavonoides também está relacionada com sua ação antitrombótica, que é atribuída à sua capacidade de ligar-se à membrana de plaquetas e eliminar radicais livres. Através da sua ação antioxidante, os flavonoides restabelecem a biossíntese e ação de prostaciclina endotelial e fator de relaxamento derivado do endotélio, os quais são inibidos pelos radicais livres (LALE, 1996, *apud* SILVA *et al.*, 2002). Portanto, os resultados apresentados no presente trabalho podem estar diretamente relacionados com essa propriedade antioxidante da rutina.

Outro mecanismo importante, que poderia estar relacionado à atividade redutora de tumor, é a indução da apoptose e do fator de necrose tumoral. De acordo com Woo, Jeong e Hawes (2005), os flavonoides inibem a proliferação celular pela modulação da atividade de CDK's através da expressão dos inibidores de CDK, p21 e p27, impedindo a progressão da fase G0-G1 do ciclo, levando as células à apoptose. Souza (2007) verificou a apoptose de células leucêmicas tratadas com flavonoides; atribuindo sua ação à modulação de cascatas de proteínas quinases e fosfatases levando a alterações na atividade de proteínas quinases ativadas por mitógenos, níveis de fosfoproteínas e, também, à inibição de enzimas envolvidas na manutenção do estado redox.

Silva *et al* (2008) demonstraram que a rutina, nas concentrações de 50 e 100 μM , ativa fatores de necrose tumoral em células gliais de neonatos de ratos Wistar, *in vitro*. Os resultados indicam uma ação direta da rutina sobre as células gliais, induzindo ativação celular, caracterizada por alterações morfológicas e mudanças nos níveis de expressão de fatores pró-inflamatórios e de neuromediadores.

Concentrações de 50 e 100 μM de rutina também foram testadas em uma linhagem celular derivada de glioblastoma multiforme humano altamente proliferativa (GL-15). Os resultados demonstraram que a rutina, em ambas concentrações, reduziu a proliferação e a viabilidade de células GL-15, bem como os níveis de expressão de sinais extracelulares reguladores de proteínas quinases, e acúmulo das células na fase G2 do ciclo celular. Observou-se ainda que 87,4% das células GL-15 expostas a 100 μM de rutina entraram em apoptose, ocorrendo condensação nuclear e fragmentação de DNA. Devido a sua capacidade de induzir diferenciação e apoptose em cultura de células de glioblastoma humano, o estudo indica que a rutina pode ser considerada um candidato em potencial para o tratamento de gliomas malignos (SANTOS, 2011).

Os resultados obtidos por Santos (2011) vão de encontro aos obtidos por Roseghine (2005), que comprovou, por meio de experimentos *in vitro* em células do baço e do timo de ratos Wistar, que a rutina apresenta-se como indutora de apoptose em células induzidas.

Estudos *in vivo*, realizados por Machado (2006), utilizando ratos Wistar como organismo teste, verificaram o efeito protetor da rutina. A pesquisa foi conduzida alimentando-se camundongos com ração associada ao flavonoide e, posteriormente, feita a inoculação de células do tumor ascítico de Ehrlich. Os resultados apresentados

pelos grupos que ingeriram a rutina demonstraram aumento no tempo de sobrevivência, assim como diminuição da viabilidade das células tumorais.

De acordo com Federico (2006), grande parte dos efeitos anticarcinogênicos dos flavonoides pode ser explicada pela interferência na estereoidogênese, assim como pela inibição da enzima aromatase, que tem seu sítio ativo bloqueado, ocasionando a transformação periférica de hormônios esteróides. Rodrigues *et al.* (2003) demonstraram que os efeitos benéficos da rutina, como elevação do colesterol HDL e diminuição dos fatores de risco para aterosclerose e doenças cardiovasculares, estão associados à atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase, ficando evidente, de acordo com os resultados, a atuação da rutina como ativadora da enzima.

Oliveira *et al.* (2010) concluíram em seus estudos que o uso de flavonoides diminui a circulação de colesterol LDL e a oxidação lipídica de membrana, reduzindo as consequências nas células endoteliais e proporcionando a melhoria da função endotelial, inibindo a angiogênese e migração celular.

Sendo assim, no presente trabalho pode-se concluir que a rutina, em todas as concentrações testadas, demonstrou atividade antitumoral, apresentando redução no número de tumores no tecido epitelial da *D. melanogaster*. Novas investigações devem ser feitas para analisar a atividade antitumoral desse e de outros flavonoides, para obtenção de resultados positivos tanto em *Drosophila* como em mamíferos.

REFERÊNCIAS

- BIANCHI, M. L.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*. Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio 1999.
- BRECHO, J. R.; MACHADO, H.; GUERRA, M. Rutina: estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, v. 1, n. 1, p. 21-25, 2009.
- EEKEN, J. C. J.; KLINK, I.; VEEN, B. L. V.; FERRO, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene wts. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 40, p. 277-282, 2002.
- FARIA, R. R.; PACHECO, M. A. F.; LEIGUEZ JÚNIOR, E.; RESENDE, U. M.; CUNHA-LAURA, A. L.; LAURA, V. A. *Fenologia de fava-de-anta em área remanescente do cerrado da UFMS – Campus de Campo Grande (MS)*. 2003. Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/pubmed5005c.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2012.
- FEDERICO, M. H.. In: WAITZBERG, D. L. *Dieta, Nutrição e Câncer*. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 174-178.
- GRAF, U.; WURGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, v. 6, p. 153-188, 1984.

JUSTICE, R. W. ZILIAN, O.; WOODAS, D. F.; NOLL, M.; BRYANT, P. J. The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes & Development*, v. 9, p. 534-546, 1995

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 4. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LUCYK, Joana. *Atividades biológicas da rutina*. 2012. Disponível em: <<http://boaspraticasfarmaceuticas.blogspot.com.br/2012/01/rutina.html>>. Acesso em: 11 fev. 2012.

MACHADO, H. *Atividade dos flavonoides rutina e naringina sobre o tumor ascístico de Ehrlich "in vivo"*. 2006. 122 f. Dissertação (Magister Scientiae em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MARCARINI C. J.; TSUBOY, M. S. F.; LUIZ, R. C.; RIBEIRO, L. R.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MANTOVANI, M. S. *Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells*. *Exp Toxicol Pathol* (2010), doi:10.1016/j.etp.2010.03.005

NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IADA, S.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H. A human homolog of *Drosophila* warts suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *FEBS Letters*, 1999; 459: 159-165.

OLIVEIRA, T. T.; SILVA, R. R.; DORNAS, W. C.; NAGEM, T. T. Flavonóides e aterosclerose. *RBAC*, v. 42, n. 1, 2010. p. 49-54.

ORSOLIN, P. C. *Avaliação do potencial mutagênico, recombinogênico e carcinogênico do Orlistat em células somáticas de *Drosophila melanogaster**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, O. C. H.; BUIJMAN, M. N. C. P.; HOJAN, M. N. V. A.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinosidase and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *The American Society for Nutritional Sciences Journal*, v. 133, n. 6, jun. 2003.

PEDRIALI, C. A. *Síntese química dos derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes*. 2005. 127 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

- POTTER, C. J.; TURENCHALK, G. S.; XU, T. *Drosophila* in cancer research, an expanding role. *Trends in Genetics*, v. 16, p. 33-39, 2000.
- RAMALHO, V.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINEL, L. A.; ALMEIDA, J. A.; FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol – HDL. *Revista de Nutrição*. Campinas, v. 16, n. 3, jul. 2003.
- ROSEGHINI, R. *Efeitos do alcaloide arborinina e do flavonóide rutina, extraídos de plantas nativas da Bahia, sobre funcionalidade e viabilidade de células de baço e timo murinho in vitro*. 2005. 94 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.
- SANTOS, B. L. *Avaliação do potencial antitumoral de flavonóides polihidroxilados sobre células de glioblastoma humano*. 2011. 145 f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.
- SIDOROV, R. A. UGNIVENKO, E. G.; KHOVANOVAE, E. M.; BELISTSKY, G. A. Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogeneses. *Mutation Research*, v. 498, p. 181 – 191, 2001.
- SILVA, A. R. PINHEIRO, A. M.; SOUZA, C. S.; FREITAS, S. R. V. B.; VACONCELOS, V.; FREIRE, S. M.; VELOZO, E. S.; TARDY, M. B.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, M. F. D.; COSTA, S. L. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF – alpha and NO release in primary glial cell cultures. *Cell Biology and Toxicology*, v. 24, p. 75 – 86, 2008.
- SILVA, R.R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; LEÃO, M. A. Efeito de flavonoides no metabolismo do ácido araquidônico. *Medicina Ribeirão Preto*, n. 35, p. 127-133, abr. 2002.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- SOUZA, A. C. S. *Mecanismo de ação antineoplásica de substâncias bioativas e alvos moleculares estratégicos para a indução de morte de células tumorais*. 2007. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular), Universidade de Campinas, Campinas, 2007.
- WOO, H.; JEONG, R.B.; HAWES, C. M. Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology. *Review Biotechnology Letters*, p. 365 – 374, 2005.