



**Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-Graduação em Saúde**

JULIANA RASO MARQUES BECHO

**REPRODUÇÃO DE RATOS WISTAR EXPOSTOS AO FLAVONÓIDE
RUTINA**

**Juiz de Fora
2011**

JULIANA RASO MARQUES BECHO

**REPRODUÇÃO DE RATOS WISTAR EXPOSTOS AO FLAVONÓIDE
RUTINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Orientador: Profa. Dra. Martha de Oliveira Guerra

Co-orientador: Profa. Dra. Vera Maria Peters

**Juiz de Fora
2011**

Becho, Juliana Raso Marques
Reprodução de ratos Wistar expostos ao flavonóide Rutina / Juliana
Raso Marques Becho. – 2011.
82f.; il.

Dissertação (Mestrado em Saúde)—Universidade Federal de Juiz de
Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Toxicologia. 2. Reprodução. 3. Rutina. I. Título.

CDU 615.9

JULIANA RASO MARQUES BECHO

**REPRODUÇÃO DE RATOS WISTAR EXPOSTOS AO FLAVONÓIDE
RUTINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Martha de Oliveira Guerra – Presidente da Banca
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Vera Maria Peters
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Beatriz Julião Vieira Aerestrup
Universidade de Juiz de Fora

Profa. Dra. Tânia Toledo de Oliveira
Universidade Federal de Viçosa

AO MEU MARIDO JOSÉ RICARDO, PELO APOIO INCONDICIONAL,
AMOR INCENTIVO E PRINCIPALMENTE POR TORNAR A MINHA VIDA CADA DIA
MELHOR.

À MINHA FILHA ISABELA QUE FAZ MARAVILHAS EM MINHA VIDA
AO MEU PAI, MAIOR INCENTIVADOR DESTE TRABALHO, À MINHA MÃE PELO
CARINHO E APOIO SEMPRE.

AO MEU SOGRO PELAS CONVERSAS E DISPONIBILIDADE EM NOSSAS
VIAGENS, À MINHA SOGRA PELAS PALAVRAS DE APOIO E ORAÇÕES.
AO MEU ANJO DA GUARDA, LEDINHA, POR SEMPRE ME TIRAR DO CAOS E
PELA AJUDA INCONDICIONAL.

Agradecimentos

À Deus por iluminar meus caminhos e me fortalecer em todos momentos difíceis da minha vida.

À minha orientadora Prof. Dra. Martha de Oliveira Guerra, por acreditar no meu trabalho e por me conduzir com seriedade e serenidade, qualidades de uma grande mestre.

À minha co-orientadora Prof. Dra. Vera Maria Peters, pela oportunidade de estar no CBR, e por todos os ensinamentos.

À Professora Dra. Darcília Maria Nagen da Costa, coordenadora de Ensino da Pós-Graduação em Saúde, pela atenção e ajuda sempre.

À Prof. Dra. Beatriz Julião Aarestrup, pela disponibilidade e atenção em todos os momentos.

Aos secretários e técnicos do CBR, especialmente Paulinho, Evelise e Flávia, pelo apoio e disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários do Biotério do CBR, sem eles este trabalho não existiria.

Às minhas grandes amigas Leda, Pollyanna, Marcela e Lorena por tornarem esta jornada bem mais agradável.

Aos meus amigos Renato e Pedro, que não mediram esforços para a conclusão deste trabalho.

Aos colegas do CBR, pessoas fundamentais nesta jornada, pela ajuda, incentivo e pelas deliciosas conversas no café.

Às Redes Mineira de Bioterismo (Rede 172/08) e Mineira de Toxicologia e Farmacologia de Produtos Terapêuticos (Rede 173/08) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Introdução: A rutina é um flavonóide glicosilado pertencente à subclasse dos flavonols, sendo extensamente encontrada na natureza em frutas, vegetais e bebidas como o vinho. Apresenta grande importância terapêutica por melhorar a resistência e permeabilidade dos capilares, atividade antioxidante, antiinflamatória, antimutagênica dentre outras. Hidrolizada como quercetina, promove a inibição da motilidade dos espermatozoides, alterações na próstata, nos níveis de testosterona e de dihidrotestosterona, fatores que interferem com a fertilidade. Entretanto não foram observados estudos para verificar seu efeito sobre o sistema reprodutor de ratos. **Hipótese:** A rutina possui atividade tóxica sobre o sistema reprodutor de ratos. **Objetivo:** Avaliar a toxicidade da rutina sobre testículos, próstata, vesícula seminal, epidídimo e na concentração dos espermatozoides epididimários, assim como no fígado, rins e baço. **Métodos:** Ratos Wistar adultos provenientes da Colônia do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos: Controle que recebeu por via intragástrica 1ml de água destilada; Tratado I, II e III onde os animais receberam, pela mesma via 5, 10 e 20 mg/Kg/dia rutina, diluída em água, respectivamente, durante sete dias consecutivos. Após eutanásia realizada 10, 42 e 60 dias do início do experimento foram retirados: testículos, próstata, vesícula seminal, epidídimo, fígado baço e rins. Obteve-se secreção epididimária para contagem de espermatozoides. No sangue foram feitas dosagens bioquímicas (ALT e creatinina) e hematológicas (hematimetria, hematócrito, hemoglobina, leucometria, CHGM, HGM e VGM). Os epidídimos foram processados histologicamente e a altura do epitélio foi medida através de cortes dos epidídimos. Em cada corte foram selecionados 10 túbulos circulares ao longo do epidídimo nos quais se obtiveram oito medidas ao longo de sua circunferência. A média dos valores foi considerada representativa da altura do epitélio do túbulo. Os dados coletados foram processados por análise de variância – uma via e teste post hoc de Dunnett T3 ($\alpha=0.05$), e teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$). Para análise da altura do epitélio do epidídimo, foi utilizado ANOVA – uma via, seguido de teste post hoc de Dunnett ($\alpha=0.05$). **Resultados:** Animais do grupo T3 tiveram menor peso e menor consumo de ração em relação aos controles ($p<0.05$). O Grupo T1 eutanasiados três dias após o término do tratamento apresentaram hepatomegalia e redução de HGM, que não ocorreu em outras doses e não se manifestou aos 42 e 60 dias. Todos os grupos apresentaram redução do peso do epidídimo ($p<0.05$) após 10 dias do início do experimento, porém essa alteração não persistiu aos 45 e 60 dias. Outras variáveis não apresentaram diferença significativa. **Conclusão:** A rutina não causou efeitos tóxicos gerais persistentes nos exames realizados, mas levou à toxicidade no epidídimo, reduzindo o seu peso entretanto, o mecanismo de tal efeito não foi identificado nesse trabalho.

Palavras-chave: rutina, flavonóide, sistema reprodutor ratos , toxicidade.

ABSTRACT

Introduction: Rutin is a glycosylated flavonoid belonging to the subclass of flavonols and widely found in nature in fruits, vegetables, and beverages such as wine. It has great therapeutic importance since it improves the resistance and permeability of capillaries, as well as the antioxidant, anti-inflammatory and antimutagenic activities, among others. Hydrolyzed as quercetin, it promotes the inhibition of spermatozoa motility, changes in the prostate and in the levels of testosterone and dihydrotestosterone, factors that interfere with fertility. However, no studies were found regarding its effects on the reproductive system of rats. **Hypothesis:** Rutin has toxic activity on the reproductive system of rats. **Objective:** Evaluate the toxicity of rutin on testicles, prostate, seminal vesicles, epididymis, and epididymal spermatozoa concentration, as well as liver, kidneys, and spleen. **Methods:** Adult rats, from the vivarium of the Center for Reproductive Biology of the Federal University of Juiz de Fora, were distributed randomly into four groups: Control, which received intragastrically 1ml of distilled water; Treated I, II and III which received 5, 10 and 20 mg/kg/day of rutin, intragastrically, diluted in water, for seven consecutive days. Once euthanasia was performed, after 10, 42 and 60 days of the beginning of the experiment; testicles, prostate, seminal vesicles, epididymis, liver, spleen, and kidneys were removed. Epididymal secretion was obtained for spermatozoa count. Biochemical (ALT and creatinine) and hematological (hematimetry, hematocrit, hemoglobin, leukocyte counts, MGHC, MGH, and MGV) dosages were performed. The epididymides were processed histologically, and the epithelial height was measured by cutting the epididymis. In each cut, 10 circular tubules along the epididymis were selected and eight measurements along its circumference were obtained. The mean value was considered representative of the epithelial height of the tubule. The collected data were processed by variance analysis - one way and a post-hoc Dunnett T3 test ($\alpha = 0.05$), and Kruskal-Wallis test with significance level $\alpha = 0.05$. To analyse the epididymal epithelium, we used one way - ANOVA followed by Dunnett post hoc test ($\alpha = 0.05$). **Results:** Animals of the TIII group had lower weight and lower feed intake compared to the control ($p < 0.05$). The animals of the T1 group, euthanized three days after the end of treatment, showed hepatomegaly and reduction of MGH, which did not occur in other doses and did not manifest at 42 and 60 days. All groups showed a reduction in the epididymis weight ($p < 0.05$) after 10 days into the experiment, but this change did not endure at 45 and 60 days. Other variables showed no significant difference. **Conclusion:** Rutin did not cause persistent general toxic effects; however, it manifested toxicity to the epididymis, reducing its weight. Nevertheless, the mechanism of this effect was not identified in this study.

Keywords: rutin, flavonoid, reproductive system of rats, toxicity.

Lista de figuras

Figura 1 - Estádios do ciclo do epitélio seminífero de ratos adaptada de França et al., 1998.....	16
Figura 2 - Via biosintética dos hormônios esteróides conforme Speroff (1995).....	22
Figura 3 – Núcleo flavilum.....	26
Figura 4 - Estrutura da Rutina.....	29
Figura 5 – Hidrólise da Rutina.....	30
Figura 6 - Mensurações do epitélio de epidídímário.....	38

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tempo (dias) do transito dos espermatozóides através do epidídimo em diferentes mamíferos.....	18
Tabela 2 - Principais subclasses dos flavonóides.....	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 ESPERMATOGÊNSE: ASPECTOS GERAIS.....	14
2.2 TRÂNSITO EPIDIDIMÁRIO.....	17
2.3 GLÂNDULAS ACESSÓRIAS.....	19
2.4 REGULAÇÃO HORMONAL.....	20
2.5 FLAVONÓIDES.....	25
2.5.1 RUTINA.....	29
3 HIPÓTESE	33
4 OBJETIVOS	34
5 MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1 MODELO BIOLÓGICO E ACONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS.....	35
5.2 FLAVONÓIDE.....	35
5.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	35
5.4 EUTANÁSIA.....	36
5.5 CONTAGEM DOS ESPERMATOZÓIDES.....	37
5.6 ANÁLISE ANÁTOMO-PATOLÓGICA.....	37
5.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	38
5.8 PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO.....	39
5.9 ASPÉCTOS ÉTICOS... ..	39
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1 Artigo I Publicado – Rutina – Estrutura, metabolismo e potencial farmacológico.....	41
6.2 Resumo artigo II enviado à publicação- Toxicological evaluation of the flavonoid rutin on the reproductive system of wistar rats.....	55
7 COMENTÁRIOS FINAIS	57
8 CONCLUSÃO	58
9 REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE	69

Introdução

A saúde reprodutiva masculina tem sido foco dos estudos (PFLIEGER-BRUSS, 2006) em infertilidade após Carlsen e colaboradores, terem demonstrado um declínio de 50% na concentração dos espermatozoides humanos de 1940 até 1990. Parte dos efeitos que podem levar o indivíduo a infertilidade se deve a fatores ambientais como poluentes, pesticidas, disruptores endócrinos (SKAKKEBAEK et al., 2006) ou químicos como a exposição a drogas (D'SOUZA, 2003; BERERHI, 2003). Agentes tóxicos que alterem a interação das células e a produção hormonal afetam a integridade do sistema reprodutor podendo levar o indivíduo à infertilidade (OISHI, 2002; JEDLINSKA-KRAKOWSKA et al., 2006). Alguns fitoterápicos contendo flavonóides têm demonstrado diversas atividades, farmacológicas importantes como antioxidantes, anticarcinogênicas e cardioprotetoras (PATHAK et al., 1991; HOLLMAN et al., 1996; MATÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002).

A rutina é um flavonóide pertencente à subclasse dos flavonóis que apresenta um dissacarídeo (raminose + glicose) ligados a posição 3 do anel pirano. É encontrada em várias fontes alimentares como cebola, uva, trigo serraceno, feijão vermelho, maçãs, tomates e bebidas como vinho tinto e chá preto (THOMPSON et al., 1999; HOLLMAN et al., 1996). Tem sido atribuído à rutina: melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e da permeabilidade da parede destes vasos (PATHAK et al., 1991). Outros sintomas de fragilidade capilar também são melhorados, entre eles, a perda da acuidade visual e alterações do campo visual (PATHAK et al., 1991). Age também como inibidor não competitivo da angiotensina II e prostaglandina E₂ e relaxante de musculatura lisa

(YILDZOGLU-ARI et al.,1991). Também se observou sua eficiência no tratamento da artrite por Cândida albicans e atividade anti-fúngica (HAN, 2009), atividade antihiperlipidêmica (SANTOS, et al., 1999), efeito anticonvulsivante em ratos (NASSIRI-ASL, SHARIATI-RAD, ZAMANSOLTANI, 2008) , supressão da imunidade celular (MIDDLETON et al., 2000), atividade anticarcinogênica (MACHADO, 2005), efeito antiinflamatório (GUARDIA et al., 2001). Reduziu, significativamente, os níveis de colesterol e triacilgliceróis, em ratos Wistar, hiperlipidêmicos (LIMA et al.,2003), parecendo ser um modulador do colesterol (PARK et al 2002).

Hasumura et al. (2004) demonstraram que a administração de rutina incluída na alimentação de ratos, por longo tempo, não causou alterações hematológicas ou indícios clínicos de toxicidade.

Não foram encontrados na literatura pesquisada avaliação da toxicidade reprodutiva da rutina, mas sobre um dos seus metabólitos, a quercetina, são conhecidos efeitos no sistema reprodutor masculino. Tais estudos mostram controvérsias quando analisados “in vitro” e “in vivo”. No primeiro caso foram demonstrados efeitos inibitórios sobre a motilidade e viabilidade dos espermatozóides (NASS-ARDEN, BREITBART, 1990; KHANDUJA et al., 2001), mas estudos “in vivo” indicam efeito protetor da quercetina contra exposição a pesticidas (IZAWA et al., 2008); efeito estimulador da qualidade dos espermatozóides (TAEPONGSORAT et al., 2008); ausência de efeitos sobre a fertilidade (ARAVINDAKSHAN et al.,1985), alterações da próstata aumento dos níveis de testosterona e redução dos de dihidrotestosterona em ratos (MA et al., 2004) .

Diante das observações anteriores, pareceu importante avaliar a toxicidade reprodutiva da Rutina sobre o sistema reprodutor de ratos, sendo esse o propósito dessa dissertação.

2 Revisão da literatura

2.1 Espermatogênese: aspectos gerais

A espermatogênese é o processo no qual células germinativas imaturas passam por sucessivas divisões mitóticas, meiose e diferenciação para formar os espermatozóides (HESS, 1990; O'DONNEL et al., 2001). Esse processo ocorre na parede dos túbulos seminíferos nos testículos, em uma íntima associação com as células de Sertoli (HESS, 1990; O'DONNEL et al., 2001). Quando o desenvolvimento das células germinativas se completa, os espermatozóides são liberados das células de Sertoli para dentro do lume dos túbulos seminíferos e prosseguem através de um sistema de ductos, a rede testicular, antes de atingir o epidídimo via dutos eferentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Durante a passagem pelo epidídimo, os espermatozóides sofrem várias mudanças bioquímicas até se tornarem gametas móveis capazes de fertilizar o ovócito (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A espermatogênese se inicia com as espermatogônias, o tipo celular mais imaturo nos testículos, e incluem a espermatogônia tipo A, intermediária e a espermatogônia do tipo B, a última geração de espermatogônias a ser formada antes do início da meiose (HESS, 1990; GUYTON; HALL, 2006; O'DONNEL et al., 2001). As espermatogônias B, após a última mitose, geram os espermatócitos primários (O'DONNEL et al., 2001). Estes replicam o seu DNA e iniciam a meiose, que ao final da primeira divisão, formam os espermatócitos secundários, que passarão rapidamente pela segunda divisão meiótica formando espermátides arredondadas haplóides (HESS, 1990; GUYTON; HALL, 2006; O'DONNEL et al., 2001). A diferenciação das espermátides arredondadas em alongadas ocorre sem que essas células passem por qualquer divisão, tratando-se de um processo de

diferenciação estrutural que resulta na formação dos espermatozoides que são, posteriormente, liberados no lume dos túbulos seminíferos (HESS, 1990; GUYTON; HALL, 2006; O'DONNELL et al., 2001).

A espermatogênese acontece ao longo de todo o túbulo seminífero, mas não ao mesmo tempo, assim em determinados segmentos encontram-se grupos de células em uma etapa de diferenciação enquanto que em outro encontram-se outros grupos celulares. Esses grupamentos celulares resultam do processo de diferenciação das células germinativas desde a célula tronco e é cíclico, seguindo passos ordenados de diferenciação das células (FRANÇA et al., 1998).

As associações celulares (estádios) são precisas para cada espécie, sendo esta relação sempre constante (HESS, 1990). Dessa forma, mapas dos estádios podem ser preparados para cada espécie, a fim de se caracterizar as associações celulares presentes nos cortes histológicos dos túbulos seminíferos (Figura 1) (FRANÇA et al., 1998). A duração do processo espermatogênico é diferente entre as espécies. Em ratos Sprague – Dawlaey o recrutamento de células comprometidas, vindas das células tronco, ocorre a cada 12,9 dias (HESS, 1990), que representa o tempo necessário para uma célula ascender um nível acima da célula original no mapa do ciclo espermatogênico, ou seja avançar para o próximo estágio (HESS, 1990; FRANÇA et al, 1998).

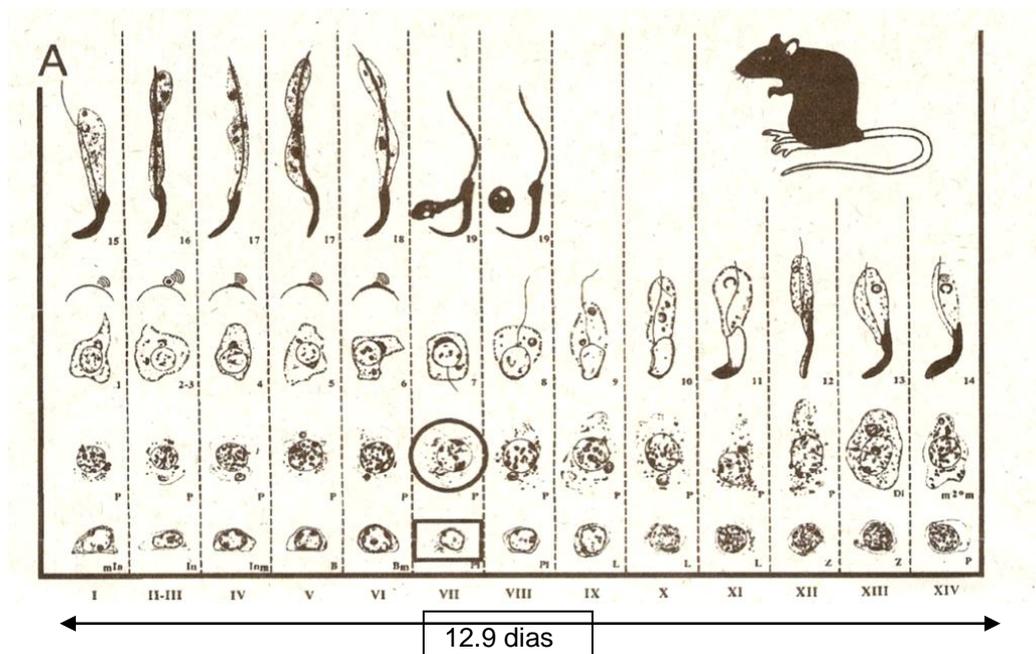


FIGURA 1. Estádios do ciclo do epitélio seminífero de ratos adaptada de França e colaboradores 1998.

A duração total da espermatogênese, baseando-se em 4,5 ciclos espermatogênicos, é de, aproximadamente, 30 – 75 dias nos mamíferos e está sob o controle do genótipo da célula germinativa. Embora possam ser encontradas diferenças entre as raças de algumas espécies, a duração do ciclo espermatogênico é geralmente considerada constante para estas espécies. Em ratos, cada ciclo espermatogênico dura 12,9 dias, enquanto que a duração total da espermatogênese é de 58 dias (FRANÇA et al., 1998).

Os espermatozóides liberados nos túbulos seminíferos são transportados para a rede do testículo através dos ductos eferentes que abandonam o testículo formando o epidídimo (DACHEUX et al., 2005; O'DONNELL et al., 2001) que se continua com o nome de ducto deferente (HERMO; ROBAIRE, 2002). O epidídimo é anatomicamente dividido em três regiões principais: cabeça (com o segmento inicial), corpo e cauda e cada segmento tem função específica relacionada à maturação funcional do gameta (GATTI et al., 2004, FRANÇA et al., 2005).

O epidídimo consiste em um epitélio pseudo-estratificado com vários tipos celulares, incluindo as células principais, basais, claras, finas, apicais e em halo (CORNWALL, 2009). O principal tipo celular encontrado por todo o epitélio, são as células principais, que constituem aproximadamente 80% do epitélio e são responsáveis pela maior parte das proteínas que são secretadas no lume (CORNWALL, 2009).

2.2 Trânsito epididimário

No epidídimo, os espermatozóides vindos dos testículos passam por um processo de maturação, tornando-se capazes de fertilizar o ovócito (GATTI et al., 2004; FRANÇA et al., 2005). Essa maturação envolve várias modificações funcionais incluindo o desenvolvimento da potencialidade para manter a motilidade, a migração distal e a eventual perda da gota citoplasmática (DACHEUX et al., 2005; O'DONNELL et al., 2001). Para adquirirem a habilidade para fertilizar o oócito, os espermatozóides necessitam ficar na cabeça e corpo do epidídimo por um período mínimo de tempo, que é espécie-específico, como mostra a tabela 1 adaptada de França e colaboradores (2005).

Dados da literatura (FRANÇA et al., 2005) mostram que a duração estimada do trânsito dos espermatozóides através do epidídimo, varia de cinco a 16 dias nas várias espécies de mamíferos já investigados (Tabela 1 adaptada de França e colaboradores, 2005). Também, em geral, o tempo requerido para a maturação espermática dentro da cabeça e corpo varia de dois a cinco dias. Já a duração do trânsito dos espermatozóides pela cauda do epidídimo, varia, conforme a espécie, entre quatro a 14 dias em machos com repouso sexual (FRANÇA et al., 2005). Em ratos o tempo para ocorrer a maturação espermática dentro da cabeça e corpo é de

três dias enquanto que na cauda este tempo é de aproximadamente cinco dias. Assim nos ratos o tempo da passagem dos gametas pelo ducto epididimário é de cerca de oito dias (AMANN et al., 1976; FRANÇA et al., 2005). A Tabela 1, apresentada no artigo de França e colaboradores (2005), mostra os dados que os autores compilaram da literatura. Os autores mencionam que “Em alguns dados, somente o trânsito total é citado, enquanto que no restante dos dados, os valores máximo e mínimo encontrados estão mencionados. Os valores totais não representam necessariamente os valores encontrados para o tempo do transito através da cabeça, corpo e cauda do epidídimo”

TABELA 1. Tempo (dias) do transito dos espermatozóides através do epidídimo em diferentes mamíferos*

Espécie	Cabeça e corpo	Cauda	Total**
Cerdo	5.4 – 7.0	6.4	9.0 – 11.8
Touro	2.0 – 3.0	3.6 – 5.2	4.0 – 15.0
Ham	2.1 – 3.6	8.3 – 12.8	10.4 – 16.4
Búfalo	3.2	6.1	9.3
Cavalo	4.0	9.8	4.9 – 13.8
Coioote	-	-	14.0
Coelho	3.0	9.7	6.6 – 12.7
Rato	3.0	5.1	8.0 – 10.0
Camundongo	3.0	2.0	5.0 – 5.8
Hamster	2.0 – 5.0	8.0 – 13.6	15.0 – 15.6
Marsupiais			
<i>M. eugenii</i>	-	-	13.0
<i>T. vulpecula</i>	-	-	11.0
Macaco Rhesus	4.9	5.6	10.5
Humano	1.8	3.4	5.5

(FRANÇA et al., 2005)

2.3 Glândulas acessórias

Além das estruturas descritas, a vesícula seminal e a próstata também são essenciais para os espermatozóides. As vesículas seminais apresentam o epitélio de aparência variada colunar e pseudoestratificada (TAEPONGSORAT et al., 2008). São responsáveis pela secreção de material mucoso contendo frutose, ácido cítrico e outras substâncias nutritivas, assim como fibrinogênio e prostaglandinas (TAEPONGSORAT et al., 2008). Acredita-se que as prostaglandinas auxiliem na fertilização reagindo com o muco cervical feminino, tornando-o mais receptivo ao movimento dos espermatozóides e induzindo contrações peristálticas reversas no útero e nas trompas, movendo os espermatozóides ejaculados em direção aos ovários (GUYTON; HALL., 2006). Shalev e colaboradores (1997) sugeriram que as prostaglandinas em bovinos estariam relacionadas com a reação acrossômica e também que elas seriam fundamentais para o processo metabólico de produção de energia necessária à motilidade dos espermatozóides.

A próstata é composta por um complexo sistema de ramificação constituído por estruturas ductais e túbulo-alveolares (ROY-BURMAN et al., 2004). Anatomicamente é dividida em quatro lobos: lobo ventral, dorsal, lateral e anterior (MARKER et al., 2003).

A porção glandular e dos ductos da próstata são constituídos por diferentes tipos celulares: as células epiteliais luminiais, geralmente cilíndricas altas e diferenciadas (HUDSON et al.,2001), e outro tipo celular, de localização intermediária, as células neuroendócrinas (HUDSON et al.,2001).Este epitélio é sustentado por estroma composto principalmente por células musculares lisas e fibroblastos, além de mastócitos, macrófagos, nervos e vasos sanguíneos (MARKER

et al., 2003). Ao redor das células estromais, existe uma complexa matriz extracelular composta principalmente por fibras colágenas, fibras reticulares, fibras do sistema elástico, proteoglicanos e diversas glicoproteínas (VILAMAIOR et al., 2000). O estroma é bem espesso na próstata humana e mais delgado nos lobos prostáticos dos roedores (NEMETH ; LEE, 1996; MCNEAL,1988).

A função secretora do epitélio prostático é regulada por andrógenos, que participam na diferenciação e na manutenção do estado ativo da glândula (CUNHA et al., 1985; DONJACOUR; CUNHA, 1993). A testosterona (T) é o principal andrógeno atuante na próstata, esse andrógeno é convertido, pela ação da enzima 5 α -redutase, em diidrotestosterona (DHT) . Ambos andrógenos, T e DHT, interagem com o mesmo receptor androgênico, porém a diidrotestosterona tem de 5-10 vezes mais afinidade pelos receptores de andrógenos que a testosterona (PRINS, 1991).

A próstata é responsável por uma secreção leitosa que contém cálcio, íons citrato e fosfato, sabe-se que o pH ideal para que o espermatozóide adquira mobilidade é de aproximadamente 6,0 a 6,5, assim é provável que o líquido prostático, ligeiramente alcalino, ajude a neutralizar a acidez dos outros líquidos seminais durante a ejaculação e assim aumente a mobilidade e fertilidade dos espermatozoides (GUYTON ; HALL., 2006).

2.4 Regulação hormonal

A capacidade funcional de todas as estruturas envolvidas no trato reprodutor masculino é dependente de hormônios esteroidianos sexuais. (HOLDCRAFT; BRAUN, 2004).

Speroff (1998) descreve pormenorizadamente a síntese dos hormônios esteroidianos e o texto que segue representa uma síntese de seu trabalho.

O colesterol é o substrato básico na esteroidogênese. A maior fonte de colesterol é a sanguínea, através da qual ele entra na via biosintética (Figura 2 adaptada de Speroff 1998).

A entrada de colesterol na célula é mediada por um receptor da membrana celular para lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Após uma série de transformações, esquematizadas na Figura 2 abaixo, são produzidos os hormônios sexuais (SPEROFF, 1998).

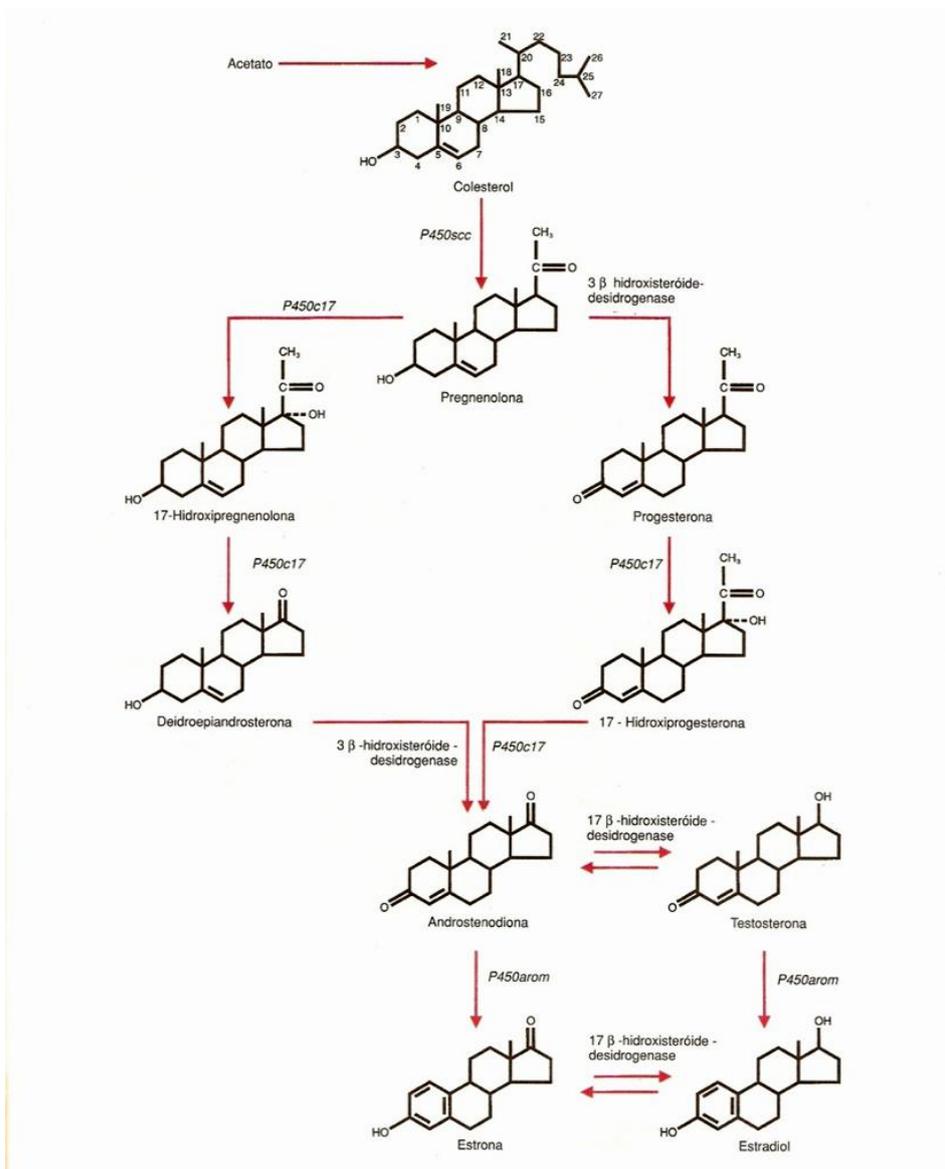


FIGURA 2. Via biosintética dos hormônios esteróides conforme Speroff (1998)

A ação principal dos hormônios esteróides é a regulação da síntese protéica intracelular. Nas células-alvo os hormônios esteróides são rapidamente transportados através da membrana celular por difusão simples e uma vez no interior da célula, estes hormônios ligam-se a receptores individuais dentro do núcleo (SPROFF, 1998). O complexo hormônio-receptor liga-se a sítios específicos do DNA acarretando síntese subsequente de proteínas (MENDIS-HANDAGAMA, 1997).

Não só as células espermatogênicas como também as de Leydig, células de Sertoli e células peritubulares mióides são alvos de um ou mais hormônios cuja ação é de fundamental relevância para a fertilidade masculina (HOLDCRAFT; BRAUN, 2004).

Os hormônios gonadotróficos: hormônio folículo estimulante (FSH), e o hormônio luteinizante exercem efeitos sobre os tecidos alvos nos testículos, o primeiro tem receptores nas células de Sertoli e o segundo em células de Leydig, principalmente, embora também haja receptores nas células espermatogênicas (LEI et al., 2001; EBLEN et al., 2001).

Em roedores a principal função do FSH na espermatogênese seria a estimulação da proliferação das células de Sertoli durante o desenvolvimento prepuberal (HECKERT; GRISWOLD, 2002). Tal proliferação é importante já que o número de células de Sertoli determina o número de células germinativas (SHARPE, 1994). Mutações nos receptores de FSH (FSH-R) e na subunidade β do FSH, em roedores, levam a redução drástica no peso dos testículos e no número de espermatozoides epididimários (KUMAR et al., 1997; DIERICH et al., 1998).

A regulação da síntese de testosterona é feita pelo hormônio luteinizante (LH) via células de Leydig (HOLDCRAFT; BAUN, 2004). Estudos mostraram que camundongos *knockout* para o receptor de LH (LH-R), tratados com testosterona exógena conseguem recuperar a espermatogênese na ausência da função do LH-R (LEI, et al., 2001).

Os estrógenos exercem função chave no desenvolvimento e manutenção das funções reprodutivas e na fertilidade de machos (O'DONNELL et al., 2001; HESS; CARNES, 2004; CARREAU et al., 2008). Eles também exercem importante papel

nos processos patológicos observados nos tecidos do sistema reprodutor (PRINS; KORACH, 2008).

Os estrógenos são sintetizados dos andrógenos pelo complexo aromatase, que contem a enzima P450 codificada pelo gene CYP19 (CARREAU et al., 2002).

A expressão da aromatase foi detectada nas células de Sertoli, células de Leydig, espermatogônias, espermatócitos, espermatides alongadas, espermatozóides e epidídimo de ratos (CARREAU et al., 2008; CARREAU et al., 2002). Estudos com animais *knockout* para os receptores de estrógenos, para enzima aromatase e em animais tratados com antiestrógenos (EDDY et al., 1996) constataram que aqueles animais tiveram a espermatogênese, esteroidogênese e fertilidade alteradas.

Nos testículos de ratos adultos são encontrados as duas isoformas dos receptores de estrógenos (ER α e ER β), que parecem ser funcionais, embora sejam necessárias altas concentrações de estrógeno para sua atividade (HELDLING et al., 2007). No epidídimo, estudos mostraram que a presença do ER α varia com a idade dos roedores, em contraste, o ER β está localizado nas células epiteliais epididimárias e do estroma deste órgão em todas as idades do animal (ATANASSOVA et al., 2001). A diminuição do estrógeno endógeno parece afetar a função do epidídimo, e a exposição de ratos machos adultos a fitoestrógenos na dieta foram responsáveis pela redução na fertilidade (GLOVER; ASSINDER, 2006).

Na próstata estudos mostraram que os estrógenos exercem importante papel na sua função (PRINS; KORACH, 2008). Este órgão apresenta os dois tipos de receptores de estrógeno (ER α e ER β), sendo que o ER α se encontra nas células do

estroma e o ER β nas células epiteliais da próstata de ratos (PRINS; KORACH, 2008).

Os estrogênios têm papel importante na regulação da fertilidade masculina. Agem através de receptores alfa (Er) α e beta (Er) β (HESS et al., 2000). Camundongos sem o (Er) α na rede testicular e no ducto eferente, apresentam disfunção na espermatogênese devido a falta de reabsorção do fluido seminal, que acarreta aumento da pressão nos túbulos seminíferos e conseqüentemente, redução da fertilidade destes animais (HESS et al., 2000). Mutações no (Er) β também induzem redução do número de espermatozoides epididimários e diminuição da fertilidade (COUSE, et al.,1999).

Alguns estudos relatam que a exposição aos estrógenos do meio ambiente contribui para a redução da espermatogênese humana (O'DONNELL et al., 2001) e a administração de estrógeno a animais experimentais, alterou a produção e maturação espermática (DASTON et al., 1997; SONNENSCHNEIN et al.,1998).

2.5 Flavonóides

Em 1930, uma nova substância isolada de laranjas, foi classificada a princípio como uma vitamina – vitamina P, porém estudos posteriores demonstraram se tratar de um flavonoide, a Rutina (NIJVELT et al., 2001). Os flavonóides são polifenóis, metabólitos secundários de plantas e definidos quimicamente como substâncias compostas por um núcleo comum de fenilcromanoma (C6-C3-C6) (Figura 3) com substituição em uma ou mais hidroxilas, incluindo derivados ligados a açúcares (BIRT, 2001).

A estrutura dos flavonoides está baseada no núcleo flavilum o qual consiste de três anéis fenólicos, (Figura 3) (YAO et al., 2004). As atividades bioquímicas dos flavonóides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que pode variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações (BIRT, 2001).

Flavonóides e isoflavonóides ocorrem comumente com ésteres, éteres ou derivados glicosídicos ou ainda uma mistura deles (MIDDLETON et al., 2000). Exceto o grupo das leucoantocianinas, os demais flavonoides ocorrem em plantas sempre acompanhados por glicídios recebendo assim, a denominação de glico-flavonoide ou flavonoide glicosilado, enquanto os que se apresentam isentos de glicídios, a estrutura recebe o nome de aglicoma (AHERNE; O'BRIEN, 2002)

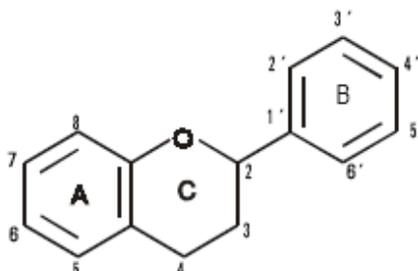


FIGURA 3 – Núcleo flavilum

Fonte: Birt, 2001.

Os flavonóides estão entre os mais importantes grupos do reino vegetal (MIDDLETON et al., 2000). Mais de 7.000 deles já foram identificados em fontes vegetais (MIDDLETON et al., 2000), sendo suas maiores classes os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavona, diidroflavonois, e chalconas (YAO et al., 2004). As principais classes já estudadas estão representadas na tabela 2. São encontrados em frutos, legumes, nozes, sementes, ervas, especiarias, caules e folhas (ACKER et al., 1996)

Tabela 2. Principais subclasses dos flavonóides

Sub-classes	Cor	Flavonóides Representativos	Fontes Alimentares
Antocianidina	Azul, vermelho e violeta	Cianidina	Frutas e flores
Flavanol	Incolor e amarelo	Catequinas, epicatequinas, procianidina	Macãs, chá, cerveja, sucos de uva e vinho
Flavanona	Incolor e amarelo	Hisperidina, Naringenina	Frutas Cítricas
Flavona	Amarelo claro	Apigenina, Luteolina	Cereais, futas, flores, vegetais
Flavonol	Amarelo claro	Miricetina, quercetina e rutina	Cebolas, macãs, chá, tomates, trigo sarraceno
Isoflavona	Incolor	Genisteína, Daidzeína	Legumes (derivados da soja)

FONTE: Acker et al. (1996).

Os flavonóides são encontrados em grandes quantidades na dieta humana (YAO et al., 2004). A estimativa precisa da média de consumo desta substância é difícil em função da grande variedade de flavonóides disponíveis e da extensa distribuição em várias plantas, além da diversidade do consumo humano (TOMAS-BARBERAN; CLIFFORD, 2000).

Os níveis de flavonóides totais e individuais na alimentação são influenciados por fatores genéticos das espécies vegetais e condições ambientais. Fatores abióticos naturais como radiação solar, raios UV, períodos de seca ou chuva, nutrientes e estação do ano influenciam no metabolismo e na produção destes compostos e ainda fatores artificiais, como poluentes podem interferir fazendo com que a planta produza maior quantidade de metabólitos secundários, incluindo flavonóides, como mecanismo de defesa contra patógenos como vírus, bactérias, fungos, insetos. Em períodos de chuva, os compostos mais polares são eliminados da planta por lixiviação (DEGÁSPARI, 2004).

A cinética de absorção dos flavonóides varia consideravelmente entre os alimentos devido a heterogeneidade de açúcares e outros grupos funcionais ligados

ao núcleo de flavonas (WALLE,2004). Os flavonoides são usualmente absorvidos, passando pelos enterócitos, após serem glicosilado e/ou convertidos em agliconas por glicosidases presentes na mucosa gastrointestinal e microflora do cólon (HOLLMAN et al.,1995; MARCHAND, 2002). Após sua absorção eles são conjugados no intestino delgado e no fígado pela glicuronidação, sulfatação ou metilação ou metabolizados a pequenos compostos fenólicos (MARCHAND, 2002; YANG, 2002). Ao sofrerem estas modificações, os flavonoides podem tornar-se metabólitos mais ativos ou serem eliminados do organismo mais facilmente por tornarem-se mais polares, assim, muitos desses produtos metabólicos podem ser detectados na urina e fezes humanas (WALLE, 2004).

Os flavonóides apresentam uma notável série de ações bioquímicas e farmacológicas que podem influenciar nas funções de vários sistemas celulares dos mamíferos (MIDDLETON et al., 2000). A atividade biológica dos flavonóides foi observada pela primeira vez em 1936, por Ruzsnyák e pelo bioquímico húngaro Albert Szent-Gyorgyi, em uma mistura de duas flavonas as quais diminuíram a fragilidade e a permeabilidade capilar em humanos (PEDRIALI, 2005).

As suas principais aplicações na indústria são como corantes, aromatizante e flavorizantes. Além disso, as pesquisas demonstraram o seu envolvimento com propriedades farmacológica importantes como antioxidantes (RICE-EVANS et al.,1995; PATHAK et al.,1991), vasodilatadoras (DUARTE et al.,1993), antiinflamatórias (PATHAK et al.,1991), anticarcinogênica, anti-virais (MIDDLETON et al.,2000), cardioprotetoras (PATHAK et al.,1991; HOLLMAN et al.,1996; MARTINEZ-FLOREZ et al., 2002).

2.5.1 Rutina

A rutina (Figura 4) é um flavonóide pertencente à subclasse dos flavonóis que tem sido intensamente pesquisada com resultados considerados interessantes para as indústrias farmacêuticas (PEDRIALI, 2005).

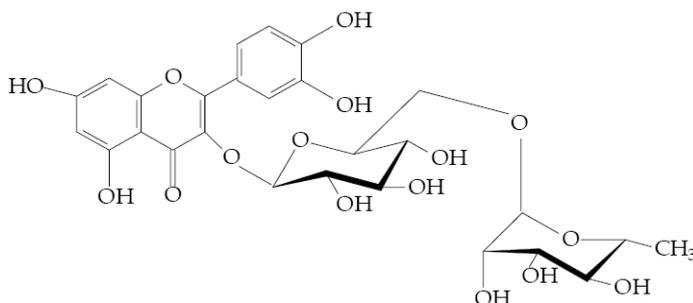


FIGURA 4 – Estrutura da Rutina

Fonte: Pedriali, 2005.

Este flavonóide é encontrado em várias fontes alimentares como cebola, uva, trigo serraceno, feijão vermelho, maçãs, tomates e bebidas como vinho tinto e chá preto (THOMPSON et al.,1999; HOLLMAN et al.,1996). Entre os vegetais, as principais fontes de rutina são:

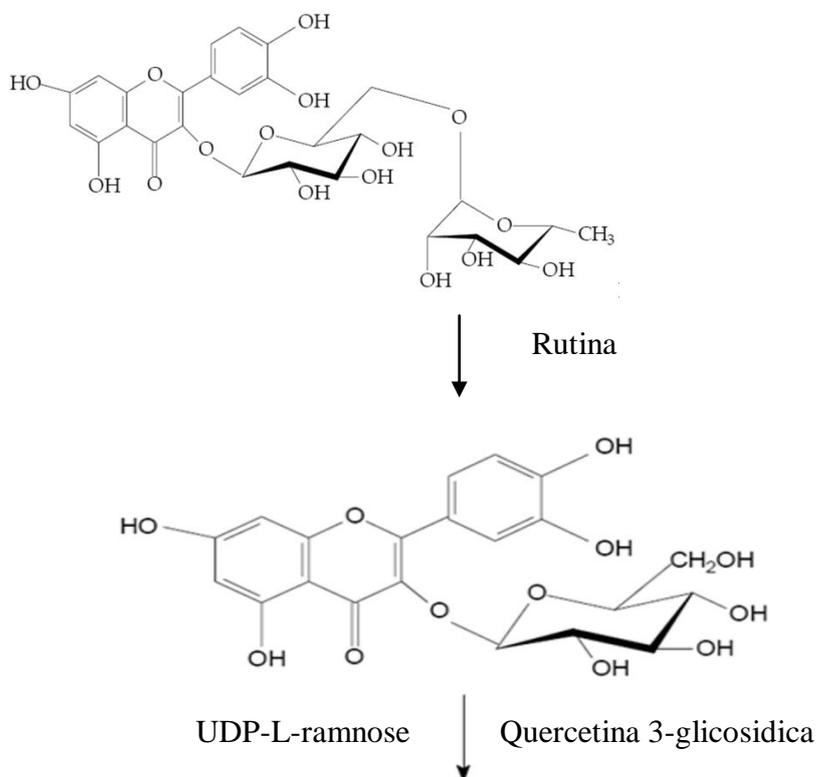
- A árvore japonesa pagoda – *Sophora japonica L., fabaceae*: uma árvore encontrada no norte e centro da China e de seus botões e flores são extraídos de 15 a 20% de rutina (HARBORNE, 1988)
- Trigo sarraceno – *Faopyrum esculentum* Moech, *F. tataricum* (L.) Gaenth., Polygonaceae: é um pseudocereal de origem chinesa, cultivado na Europa, suas folhas contem 2-8% de rutina (COUCH et al.,1946).
- Frutos (favas) do faveiro – *Dimophandra mollis* Benth, Fabaceae. Contem rutina na proporção de 8g para 100g de pericarpo (CHAVES; 2003). É uma espécie arbórea nativa do Brasil pertencente a família Caesalpinaceae, encontrada em

regiões de cerrado nos estados do Para, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e na Caatinga Nordestina (CHAVES; 2003).

A rutina é um flavonol que apresenta um dissacarídeo (raminose + glicose) ligados a posição 3 do anel pirano como se observa na Figura 6 (PEDRIALI, 2005).

A afinidade dos glicosídeos pela membrana das células epiteliais exerce um importante papel na absorção dos compostos lipofílicos. A absorção no intestino delgado é dificultada devido aos açúcares ligados a sua molécula (MUROTA, 2003).

Manach e colaboradores (1997), Walle e colaboradores (2004) demonstraram que a rutina foi completamente hidrolizada por glicosidases produzidas pelas enterobactérias dando origem a Quercetina 3-glicosídica e a Quercetina aglicona como se nota na Figura 5 (BOKKENHEUSER, SHACKLETON, WINTER, 1987).



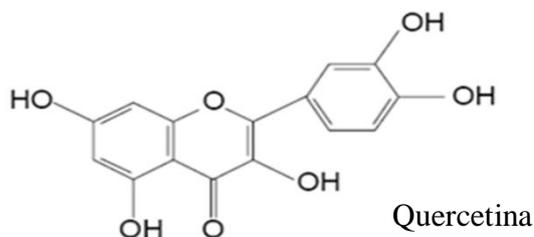


FIGURA 5 – Hidrólise da Rutina

Fonte: Pedriali, 2005.

Após a hidrólise dos açúcares estas moléculas passam a apresentar maior afinidade pelas membranas das células epiteliais do intestino e, portanto, são melhores absorvidas (BOKKENHEUSER, SHACKLETON, WINTER, 1987).

Entretanto Hollman e colaboradores (1995) descrevem que a quercetina glicosilada (Q3G) é melhor absorvida que a quercetina na forma aglicona devido à Q3G ligar-se a transportadores de glicose (SGLT-1) nas células epiteliais intestinais.

Manach e colaboradores (1997) descrevem que Rutina e Quercetina apresentam metabólitos similares, como Diosmetina, Isohanmnetina e Tamariximetina, após 24 horas do início da dieta contendo 0,2% de Quercetina ou 0,4% de Rutina.

A capacidade de biotransformação dos flavonóis por várias transferases como a catecol-O-metiltransferase gera compostos sulfo ou glico-conjugados no fígado, os quais serão eliminados posteriormente durante os processos excretórios (MANACH et al., 1997).

Dentre os flavonóides estudados a rutina tem se destacado em função das suas diversas atividades farmacológicas (PEDRIALI, 2005). Entre as atividades terapêuticas da rutina, está a melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede destes vasos. Outros sintomas de fragilidade capilar também são

melhorados, entre eles, a perda da acuidade visual e alterações do campo visual. Estes efeitos podem ser da rutina isoladamente, ou associada ao ácido ascórbico, cuja absorção melhora quando administrado junto com a rutina (PATHAK et al.,1991).

Em estudos realizados em íleos de cobaias a rutina apresentou efeito hipotensor e antiinflamatório e em cólon da mesma espécie foi observado relaxamento do músculo liso, podendo ser esta a razão da melhora da permeabilidade capilar produzida pela rutina (YILDIZOGLU-ARI et al.,1991).

Rutina e quercetina têm ação terapêutica em doenças que envolvem radicais livres, tendo ação antioxidante e não são tóxicos, em especial a rutina (AFANAS'EV et al., 1989).

Outras atividades da rutina abrangem: atividade anti-fúngica (HAN, 2009); antihiperlepdêmica (SANTOS, et al., 1999), anticonvulsivante em ratos (NASSIRI-ASL, SHARIATI-RAD, ZAMANSOLTANI, 2008) , imunossupressora (MIDDLETON et al., 2000), anticarcinogênica (MACHADO, 2005) e antiinflamatória (GUARDIA et al., 2001) .

3 Hipótese

A rutina possui atividade tóxica sobre o sistema reprodutor de ratos.

4 Objetivos

Em ratos Wistar expostos a doses crescentes de rutina:

- a) Avaliar alterações morfológicas de órgãos do sistema reprodutor
- b) Determinar a concentração de espermatozoides epididimários
- c) Avaliar alterações morfológicas dos rins, fígado e baço
- d) Verificar alterações hematológicas e bioquímicas

5 Material e Métodos

5.1 Modelo Biológico e acondicionamento dos animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos (n=180), pesando entre 250 e 300 gramas provenientes da colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade de Juiz de Fora (UFJF).

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalha industrializada, e alimentados com ração do tipo peletizada (Nuvilab/Nuvital®) e água filtrada.

As gaiolas foram mantidas em armários climatizados (Alesco), localizados em ambiente com temperatura e ciclo claro/escuro de 12 horas, controlados automaticamente.

5.2 Flavonóide

O flavonóide utilizado foi o hidrato de rutina, minimum 95% HPLC proveniente da empresa Sigma®, lote 085K0196, referência R5143-50G.

5.3 Desenho Experimental

A metodologia seguida foi a descrita por D`Souza (2003) . Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: controle (C) – receberam 1ml de água destilada (n=45); Tratados T1 (n=45), T2 (n=45) e T3 (n=45)

que receberam 5mg, 10mg e 20mg de Rutina / kg de peso corporal, respectivamente, por via intragástrica, durante sete dias, em dose única, sempre entre as 14 e 15 horas. A DL50 da quercetina para ratos foi calculada em 161mg/kg de peso corporal (SULLIVAN et al., 1951), mas não foi usada para o cálculo das doses a serem administradas, preferindo-se utilizar a correspondente á que foi efetiva em reduzir o número de células neoplásicas em modelo experimental de tumor de Erlich (MACHADO, 2005), seguida da metade e dobro desta dose.

Após 10, 42 e 60 dias do início do tratamento, 15 animais de cada grupo foram eutanasiados. A escolha dos dias deve-se ao fato de lesões de espermatozóides e espermátides, espermátócitos ou espermátogônias, respectivamente, poderem ser identificadas na contagem de espermatozóides (D´SOUZA, 2003). Além disso, poderia se avaliar a reversibilidade dos efeitos. Todos os animais foram observados por 60 minutos após o tratamento e, posteriormente, uma vez ao dia para verificar indícios de toxicidade clínica (ZENIK et al., 1994).

O peso corporal e o consumo de ração foram aferidos no dia do início e no último dia do tratamento; seguindo-se pesagens a cada sete dias até o dia da eutanásia, quando foram pesados novamente. Estimou-se o consumo de ração pela diferença do peso entre gramas de ração colocada na gaiola em um dia e o restante 24 horas depois. A água foi fornecida *ad libitum*.

5.4 Eutanásia

Procedeu-se a eutanásia por asfixia após rotura do diafragma, realizada sob anestesia profunda com Ketamina (via intraperitoneal) e Xilazina (via

intramuscular) nas doses de 90 mg/kg e 10mg/kg de peso corporal, respectivamente. Após a eutanásia foram obtidos por laparotomia os testículos direito e esquerdo, epidídimo direito, vesícula seminal vazia, próstata, rins direito e esquerdo, fígado e baço. retirar pois está descrito abaixo, ainda por laparotomia, o epidídimo direito foi exposto e a cauda puncionada para remoção de secreção e análise da concentração dos espermatozóides (MORAES, 1994; DOSTAL et al., 1996; SEED et al., 1996)

5.5 Contagem dos espermatozóides

Para contagem dos espermatozóides, após a eutanásia o epidídimo direito foi exposto e a cauda puncionada para remoção de secreção e análise da concentração de espermatozóides (MORAES, 1994; DOSTAL et al., 1996; SEED et al., 1996). O material obtido foi imediatamente colocado em uma gota de solução fisiológica (50µl) previamente preparada em placa de Petri apoiada sobre uma placa aquecida (36°C). Em seguida, com auxílio de pipeta automática Ependorf®, foram retirados 20µl da solução presente na gota e diluídos em 6ml de água destilada. Após a diluição uma amostra foi coletada e colocada em câmara de Neubauer® para contagem dos espermatozóides. O número total de espermatozóides foi obtido pela média de duas contagens correspondentes ao campo superior e inferior da câmara de Neubauer.

5.6 Análise Anatomo-patológica

Realizou-se laparotomia em busca de lesões macroscópicas de órgãos internos e, posteriormente, remoção e pesagem dos testículos direito e esquerdo, epidídimo esquerdo, próstata, vesícula seminal vazia, rins direito e esquerdo, fígado e baço.

Foram retiradas amostras dos órgãos, submetidas ao processamento de rotina do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF, para posterior análise microscópica, caso fossem encontradas alterações no peso ou lesões macroscópicas.

5.7 Análise Histomorfométrica

Para análise histomorfométrica do epitélio tubular do epidídimo foram selecionadas cinco amostras por grupo (n=5). Em cada corte, foram selecionados aleatoriamente 10 túbulos circulares e efetuadas 8 medidas ao longo de sua circunferência (Figura 6). A média dos valores foi considerada representativa da altura do túbulo. As imagens foram capturadas pelo programa AxioVision Release 4.7 (Zeiss®)

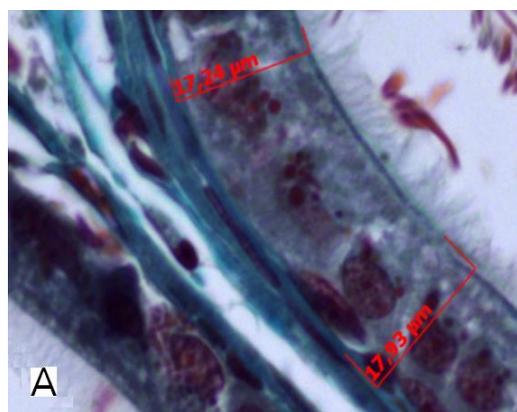


Figura 6. Histomorfometria do epitélio de epidídimo. Fotomicrografia. Coloração Histoquímica: Tricrômico de Gomori.

5.8 Processamento Estatístico

Os dados coletados foram processados por análise de variância – uma via e teste post hoc de Dunnet T3 ($\alpha = 0.05$), e teste de Kruskal-Wallis, com o nível de significância $\alpha = 0.05$. Para análise do epitélio do epidídimo, foi utilizado ANOVA – uma via, seguido do teste post hoc de Dunnet ($\alpha=0,05$).

5.9 Aspéctos Éticos

A metodologia deste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Protocolo n.º. 003/2007 – CEEA, Universidade Federal de Juiz de Fora) o qual segue os princípios éticos internacionais de experimentação animal.

6 Resultados e discussão

Os resultados e discussão serão apresentados sob forma de artigos.

O artigo I, intitulado “Rutina – Estrutura, Metabolismo e Potencial Farmacológico”, foi aceito para publicação no periódico Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais.

O artigo II, intitulado “Toxicological Evaluation of the Flavonoid Rutin on the Reproductive System of Wistar Rats”, foi submetido ao periódico Reproductive Toxicology.

6.1 Artigo I publicado

RUTINA – ESTRUTURA, METABOLISMO E POTENCIAL FARMACOLÓGICO

RUTIN – STRUCTURE, METABOLISM AND PHARMACOLOGICAL POTENCY

Juliana Raso Marques Becho, Hussen Machado*, Marilha de Oliveira Guerra**

RESUMO

Os Flavonóides são substâncias naturais amplamente distribuídas no Reino Vegetal. Há um interesse crescente na investigação dessas substâncias, devido ao volume de evidência dos benefícios que eles proporcionam para a saúde. A Rutina é um flavonol glicosídico pertencente a uma importante classe de Flavonóides, sendo extensamente encontrados na natureza, em frutas, vegetais e bebidas como chá e vinho. Pouco se sabe sobre a farmacocinética e biodisponibilidade da rutina, e estes mecanismos tem sido foco de muita controvérsia. Apesar disso, a Rutina apresenta grande importância terapêutica por melhorar a resistência e permeabilidade dos vasos capilares, atividades antioxidante, antiinflamatória, anticarcinogênica dentre outras, razão que levou à realização da presente revisão.

PALAVRAS-CHAVE

Flavonóide. Rutina. Metabolismo. Terapêutica.

ABSTRACT

Flavonoids are natural products widely distributed in the vegetable kingdom. There has been increasing interest in research of flavonoids, due to growing evidence of the health benefits of them. Rutin is a glycoside flavonol which belongs to an important class of flavonoids, being extensively found in the nature in fruit, vegetable and beverages, such as tea and wine. About the pharmacokinetics and bioavailability of Rutin, little is still known, and its mechanisms have been a matter of much controversy. Despite it, Rutin presents a therapeutic importance due to improve resistance and permeability of capillaries vessels, antioxidant, antiinflammatory, anticarcinogenic and other important activities. Reason that led to the completion of this review.

KEYWORDS

Flavonoid. Rutin. Metabolism. Therapeutic.

RUTINA – ESTRUTURA, METABOLISMO E POTENCIAL
FARMACOLÓGICO

RUTIN – STRUCTURE, METABOLISM AND PHARMACOLOGICAL POTENCY
Juliana Raso Marques Becho, Hussen Machado*, Martha de Oliveira Guerra**

Correspondence Author: Martha de Oliveira Guerra. Adress: Rua São Mateus, 187/801, São Mateus, CEP: 30.025-001, Juiz de Fora, MG, Brazil. Tel.: 55-32-21023251; Fax: 55-32-21023255. E-mail: martha.guerra@ufjf.edu.br

* Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora, Caixa Postal 328, CEP 36001-970, Juiz de Fora, MG – Brasil.

Recebido em: Julho de 2008.

Aceito em: Dezembro de 2008.

RESUMO

Os Flavonóides são substâncias naturais amplamente distribuídas no Reino Vegetal. Há um interesse crescente na investigação dessas substâncias, devido ao volume de evidência dos benefícios que eles proporcionam para a saúde.

A Rutina é um flavonol glicosídico pertencente a uma importante classe de Flavonóides, sendo extensamente encontrados na natureza, em frutas, vegetais e bebidas como chá e vinho. Pouco se sabe sobre a farmacocinética e biodisponibilidade da rutina, e estes mecanismos tem sido foco de muita controvérsia. Apesar disso, a Rutina apresenta grande importância terapêutica por melhorar a resistência e permeabilidade dos vasos capilares, atividades antioxidante, antiinflamatória, anticarcinogênica dentre outras, razão que levou à realização da presente revisão.

Palavras chave: Flavonoide, rutina, metabolismo, uso terapêutico

ABSTRACT

Flavonoids are natural products widely distributed in the vegetable kingdom. There has been increasing interest in research of flavonoids, due to growing evidence of the health benefits of them.

Rutin is a glycoside flavonol which belongs to an important class of flavonoids, being extensively found in the nature in fruit, vegetable and beverages, such as tea and wine. About the pharmacokinetics and bioavailability of Rutin, little is still known, and its mechanisms have been a matter of much controversy. Despite it, Rutin presents a therapeutic importance due to improve resistance and permeability of capillaries vessels, antioxidant, antiinflammatory, anticarcinogenic and other important activities. Reason that led to the completion of this review

Key words: Flavonoid, Rutin, Metabolism, therapeutic use

FLAVONÓIDES

Em 1930, uma nova substância foi isolada de laranjas, foi classificada a princípio como uma vitamina – vitamina P, porém estudos posteriores demonstraram se tratar de um flavonoide, a Rutina (NIJVELT et al., 2001). Desde então há uma intensa tentativa em isolar e estudar este e outros flavonóides (MACHADO, 2005)

Os flavonóides são polifenóis, metabólitos secundários de plantas e definidos quimicamente como substâncias compostas por um núcleo comum de fenilcromanoma (C6-C3-C6) (Figura 1) com substituição em uma ou mais hidroxilas, incluindo derivados ligados a açúcares (BIRT, 2001).

A estrutura dos flavonoides está baseada no núcleo flavilum o qual consiste de três anéis fenólicos, (FIGURA 1) (YAO et al., 2004). As atividades bioquímicas dos flavonóides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que pode variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações (MACHADO, 2005).

Flavonóides e isoflavonóides ocorrem comumente com ésteres, éteres ou derivados glicosídicos ou ainda uma mistura deles (MIDDLETON et al., 2000). Exceto o grupo das leucoantocianinas, os demais flavonoides ocorrem em plantas sempre acompanhados por glicídios recebendo assim, a denominação de glico-flavonoide ou flavonoide glicosilado, enquanto os que se apresentam isentos de glicídios, a estrutura recebe o nome de aglicoma (MACHADO, 2005)

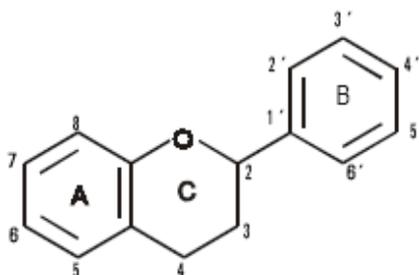


FIGURA 1 – Núcleo flavilum

Fonte: Birt, 2001.

Os flavonoides estão entre os mais importantes grupos do reino vegetal (MIDDLETON et al., 2000). Mais de 4.000 deles já foram identificados em fontes vegetais (MIDDLETON et al., 2000), sendo suas maiores classes os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavona, diidroflavonois, e chalconas (YAO et al., 2004). As principais classes já estudadas estão representadas na tabela 1. São encontrados em frutos, legumes, nozes, sementes, ervas, especiarias, caules e folhas (ACKER et al., 1996)

TABELA 1. Principais subclasses dos flavonóides

Sub-classes	Cor	Flavonóides Representativos	Fontes Alimentares
Antocianidina	Azul, vermelho e violeta	Cianidina	Frutas e flores
Flavanol	Incolor e amarelo	Catequinas, procianidina	epicatequinas Macãs, chá, cerveja, sucos de uva e vinho
Flavanona	Incolor e amarelo	Hisperidina, Naringenina	Frutas Cítricas
Flavona	Amarelo claro	Apigenina, Luteolina	Cereais, frutas, flores, vegetais
Flavonol	Amarelo claro	Miricetina, quercetina e rutina	Cebolas, macãs, chá, tomates, trigo sarraceno
Isoflavona	Incolor	Genisteína, Diiizeína	Legumes (derivados da soja)

FONTE: Acker et al. (1996).

Os flavonóides são encontrados em grandes quantidades na dieta humana (YAO et al., 2004). A estimativa precisa da média de consumo desta substância é difícil em função da grande variedade de flavonoides disponíveis e da extensa distribuição em várias plantas, além da diversidade do consumo humano (TOMAS-BARBERAN; CLIFFORD, 2000).

Os níveis de flavonóides totais e individuais na alimentação são influenciados por fatores genéticos das espécies vegetais e condições ambientais (MACHADO, 2005).

Fatores abióticos naturais como radiação solar, raios UV, períodos de seca ou chuva, nutrientes e estação do ano influenciam no metabolismo e na produção destes compostos e ainda fatores artificiais, como poluentes podem interferir fazendo com que a planta produza maior quantidade de metabólitos secundários, incluindo flavonóides, como mecanismo de defesa contra patógenos como vírus, bactérias, fungos, insetos (MACHADO, 2005). Em períodos de chuva, os compostos mais polares são eliminados da planta por lixiviação (MACHADO, 2005).

A cinética de absorção dos flavonoides varia consideravelmente entre os alimentos devido a heterogeneidade de açúcares e outros grupos funcionais ligados ao núcleo de flavonas (WALLE,2004). Os flavonoides são usualmente absorvidos, passando pelos enterócitos, após serem glicosilado e/ou convertidos em agliconas por glicosidases presentes na mucosa gastrointestinal e microflora do cólon (HOLLMAN et al.,1995; MARCHAND, 2002). Após sua absorção eles são conjugados no intestino delgado e no fígado pela glicuronidação, sulfatação ou metilação ou metabolizados a pequenos compostos fenólicos (MACHADO, 2005). Ao sofrerem estas modificações, os flavonoides podem tornar-se metabólitos mais ativos ou serem eliminados do organismo mais facilmente por tornarem-se mais polares, assim, muitos desses produtos metabólicos podem ser detectados na urina e fezes humanas (WALLE, 2004).

Os flavonóides apresentam uma notável série de ações bioquímicas e farmacológicas que podem influenciar nas funções de vários sistemas celulares dos mamíferos (MIDDLETON et al., 2000). A atividade biológica dos flavonóides foi observada pela primeira vez em 1936 por Rusznyák e pelo bioquímico húngaro Albert Szent-Gyorgyi, em uma mistura de duas flavonas as quais diminuíram a fragilidade e a permeabilidade capilar em humanos (PEDRIALI, 2005)

As suas principais aplicações na indústria são como corantes, aromatizante e flavolizantes. Além disso, as pesquisas demonstraram o seu envolvimento com propriedades farmacológica importantes como antioxidantes (RICE-EVANS et al.,1995), vasodilatadoras (DUARTE et al.,1993), antiinflamatórias (PATHAK et al.,1991), anticarcinogênica, anti-virais (MIDDLETON et al.,2000), cardioprotetoras e antioxidantes (PATHAK et al.,1991; HOLLMAN et al.,1996; MARTINEZ-FLOREZ et al.,2002).

RUTINA

A rutina (FIGURA 2) é um flavonóide pertencente à subclasse dos flavonóis que tem sido intensamente pesquisada e os resultados estão interessando constantemente as indústrias farmacêuticas (PEDRIALI, 2005).

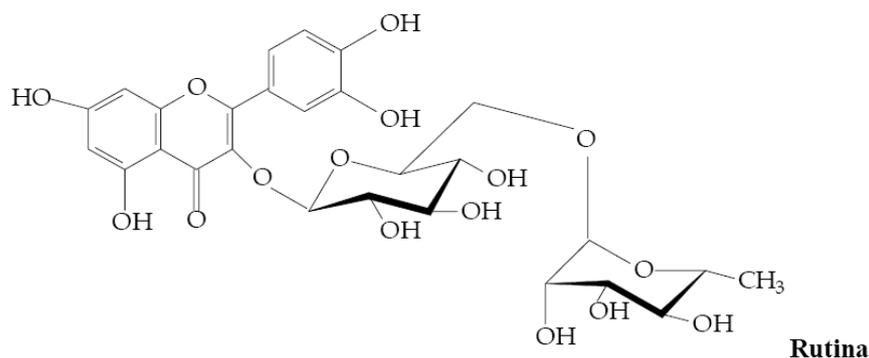


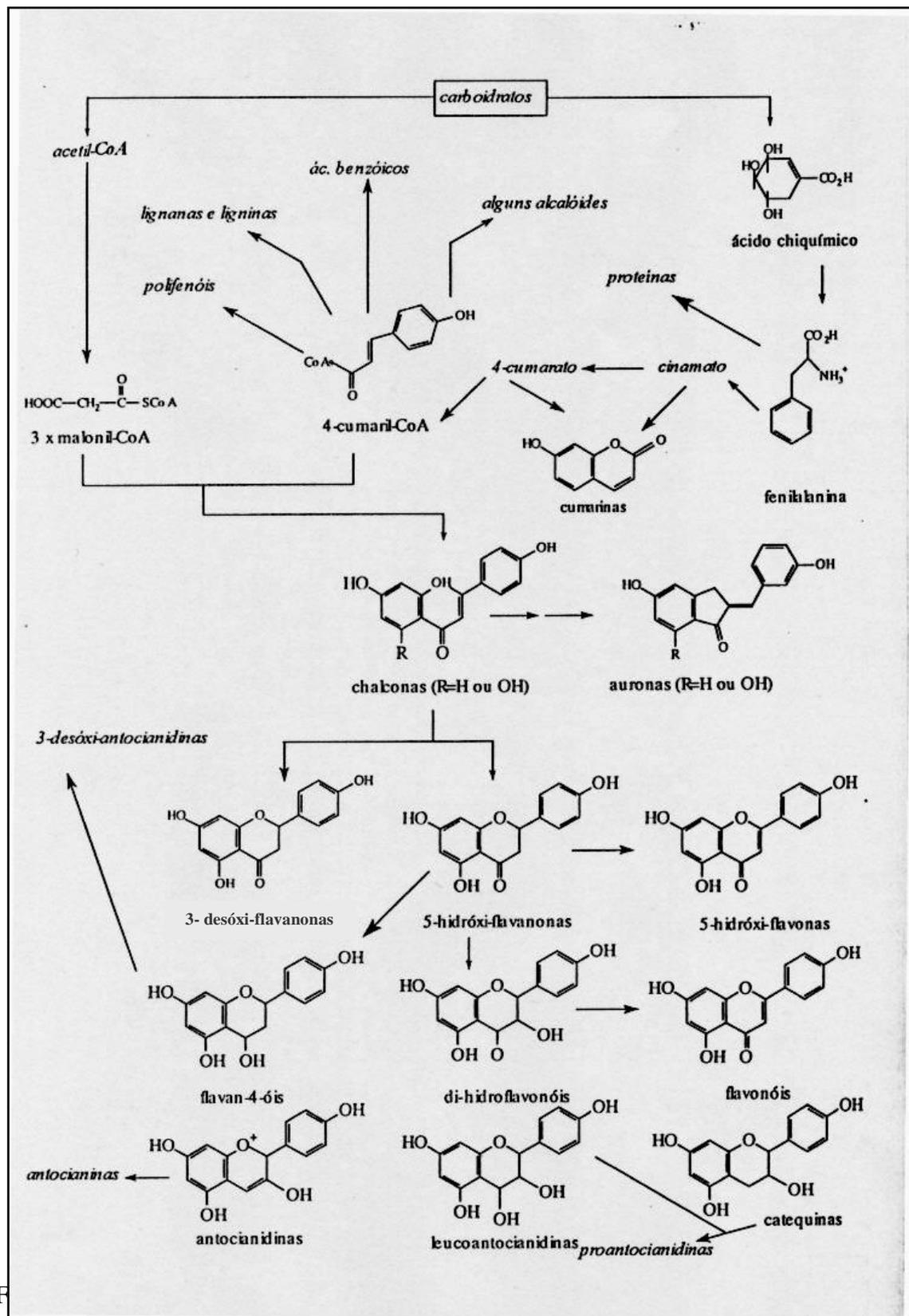
FIGURA 2 – Estrutura da Rutina

Fonte: Pedriali, 2005.

Este flavonóide é encontrado em várias fontes alimentares como cebola, uva, trigo serraceno, feijão vermelho, maçãs, tomates e bebidas como vinho tinto e chá preto Thompson et al.,1999; Hollman et al.,1996). Entre os vegetais as principais fontes de rutina são:

- A árvore japonesa pagoda – *Sophora japonica L., fabaceae*: uma árvore encontrada no norte e centro da China e de seus botões e flores são extraídos de 15 a 20% de rutina (HARBORNE, 1988)
- Trigo sarraceno – *Faopyrum esculentum* Moech, *F. tataricum* (L.) Gaenth., Polygonaceae: é um pseudocereal de origem chinesa, cultivado na Europa, suas folhas contem 2-8% de rutina (COUCH et al.,1946).
- Frutos (favas) do faveiro – *Dimophandra mollis* Benth, Fabaceae. Contem rutina na proporção de 8g para 100g de pericarpo (CHAVES; 2003). É uma espécie arbórea nativa do Brasil pertencente a família Caesalpinaceae, encontrada em regiões de cerrado nos estados do Para, Goiás, Mato Grosso , Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e na Caatinga Nordestina (CHAVES; 2003).

Por ser um flavonóide, a biossíntese da rutina inicia-se a partir da combinação das duas principais vias dos compostos fenólicos a via do shiquimato e a via do acetato conforme se vê na figura 3 (PEDRIALI, 2005)

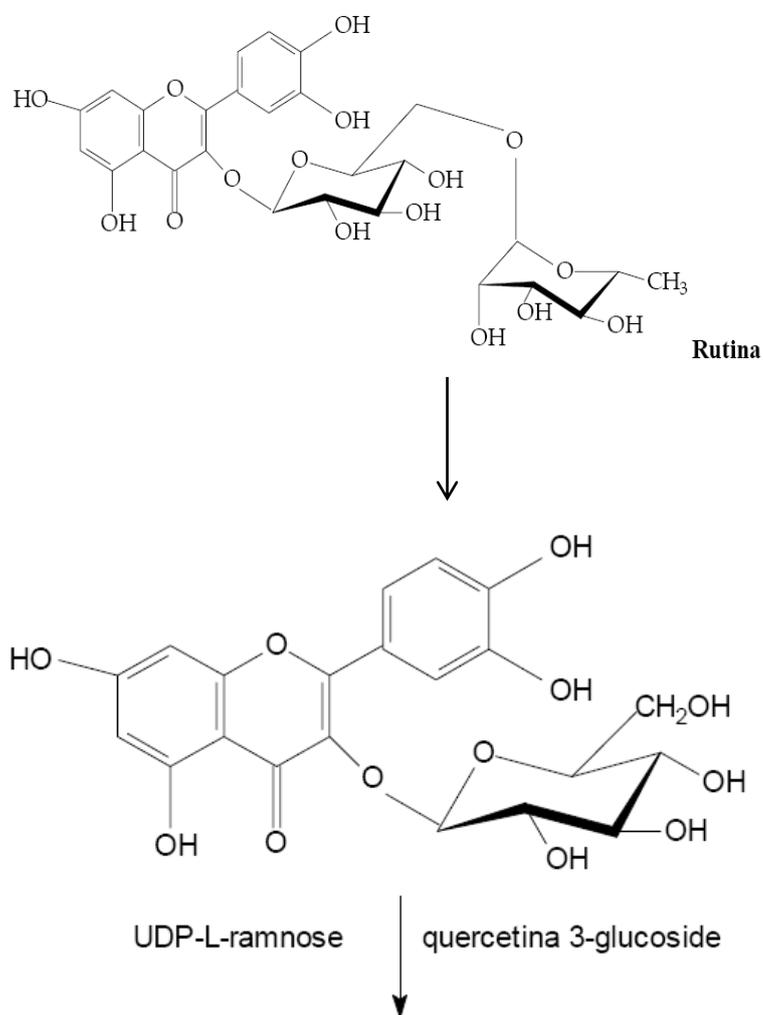


Fonte: Simões, 2000.

A rutina é um flavonol que apresenta um dissacarídeo (raminose + glicose) ligados a posição 3 do anel pirano como se observa na Figura 4 (PEDRIALI, 2005).

A afinidade dos glicosídeos pela membrana das células epiteliais exerce um importante papel na absorção dos compostos lipofílicos. A absorção no intestino delgado é dificultada devido aos açúcares ligados a sua molécula (MUROTA, 2003).

Manach e colaboradores (1997), Walle e colaboradores (2004) demonstraram que a rutina foi completamente hidrolizada por glicosidases produzidas pelas enterobactérias dando origem a Quercetina 3-glicosídica e a Quercetina aglicona como se nota na Figura 4 (BOKKENHEUSER, SHACKLETON, WINTER, 1987).



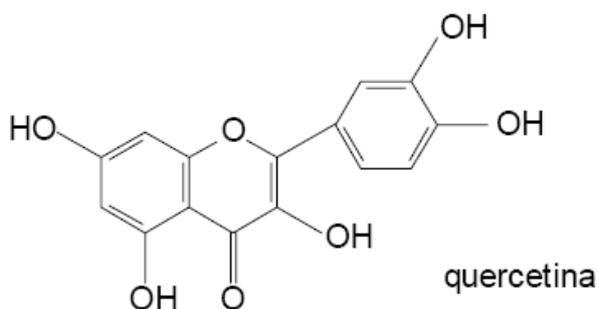


FIGURA 4 – Hidrólise da Rutina

Fonte: Pedriali, 2005

Após a hidrólise dos açúcares estas moléculas passam a apresentar maior afinidade pelas membranas das células epiteliais e, portanto, são melhores absorvidas (BOKKENHEUSER, SHACKLETON, WINTER, 1987).

Entretanto Hollman e colaboradores (1995) descrevem que a quercetina glicosilada (Q3G) é mais bem absorvida que a quercetina na forma aglicona devido à Q3G ligar-se a transportadores de glicose (SGLT-1) nas células epiteliais.

Manach e colaboradores (1997) descrevem que Rutina e Quercetina apresentam metabólitos similares, como Diosmetina, Isohamnetina e Tamariximetina, após 24 horas do início da dieta contendo 0,2% de Quercetina ou 0,4% de Rutina.

A capacidade de biotransformação dos flavonóis por várias transferases como a catecol-O-metiltransferase gera compostos sulfo ou glico-conjugados no fígado, os quais serão eliminados posteriormente durante os processos excretórios (MANACH, 1997).

Dentre os flavonóides estudados a rutina tem se destacado em função das suas diversas atividades farmacológicas (PEDRIALI, 2005). Entre as atividades terapêuticas da rutina, está a melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede destes vasos (PATHAK et al.,1991). Outros sintomas de fragilidade capilar também são melhorados, entre eles, a perda da acuidade visual e alterações do campo visual (PATHAK et al.,1991).

Estes efeitos podem ser da rutina isoladamente, ou associada ao ácido ascórbico, cuja absorção melhora quando administrado junto com a rutina (PATHAK et al.,1991).

Em estudos realizados em íleos de cobaias a rutina atuou como um inibidor não competitivo da angiotensina II e prostaglandina E₂ (YILDIZOGLU et al.,1991).

Há estudos, também, onde foi observada em cólon de cobaia a atividade de relaxamento do músculo liso, podendo ser esta a razão da melhora da permeabilidade capilar produzida pela rutina (YILDIZOGLU et al., 1991).

Segundo os estudos de Afanas`ev e colaboradores (1989) que pesquisaram a atividade antioxidante da rutina e da quercetina, estes flavonóides têm uma ação terapêutica em patologias que envolvam radicais livres, e não são tóxicos, em especial a rutina.

Várias outras atividades da rutina vêm sendo elucidadas como sua eficiência no tratamento da artrite por *Cândida albicans* e atividade anti-candida (HAN, 2009), atividade antihiperlipidêmica (SANTOS, et al., 1999), efeito anticonvulsivante em ratos (NASSIRI-ASL, SHARIATI-RAD, ZAMANSOLTANI, 2008) , supressão da imunidade celular (MIDDLETON et al., 2000), atividade anticarcinogênica (MACHADO, 2005), efeito antiinflamatório (GUARDIA et al., 2001) .

Em resumo: Os Flavonóides, por apresentarem uma grande diversidade de atividades biológicas benéficas para o ser humano têm sido extensamente pesquisados. Dentre eles se destaca a Rutina, um Flavonóide com ampla distribuição no reino vegetal que por apresentar entre outras atividades biológicas a anticarcinogênica tem sido objeto de muito estudo em diversas áreas, podendo contribuir para o futuro tratamento de várias enfermidades entre elas o câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKER, S.A.B.E.V.; BERG, D.J.V.B.; TROMP, M.N.J.L.; GRIFFIOEN, D.H.;
BENNEKOM, W.P.V.; VIJGH, W.J.F.V.D.; BAST, A., Structural aspects of antioxidant
activity of flavonoids. **Free Radical Biology Medicine**, Orlando, v.20, n.3, p.331-342,1996.
- AFANAS'EV, J.B.; DOROZHKO, A.J.; BRODSKILL, A.V.; KOSTYUK, V.A.;
PATAPOVITCH, A.I., Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action
of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, Amsterdam, v.38,
p.1763-1769, 1989.
- BIRT,D.F.; HENDRISCH,S.; WANG,W., Dietary Agents in Cancer Prevention: Flavonoids
and Isoflavonoids. **Pharmacology Therapeut.** V.90, p.157-177, 2001.
- BOKKENHEUSER, V.D.; SHACKLETON, C.H.; WINTER, J., Hydrolisis of dietary
flavonóide glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. **Biochemical Journal**,
v.348, p.953-956, 2987.
- CHAVES, M.M.F.; USBERTI, R.; Prediction of *Dimorphandra mollis* bend (“faveiro”) seed
longevity. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.26,n.4, p.557-564, 2003.
- COUCH, J.F.; NAGHSKI, J.; KREWSON, C.F., Bucwheat as source of rutin. **Science**,
Washington, v.103, p.197-198, 1946.
- DUART, J.; PEREZ-VIZCAINO, F.; ZARZUELO, A. ; JIMENEZ, J.; TANARGO, J.,
Vasodilatator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. **European Journal
Pharmacology**, Amsterdam, v.239, p.1-7, 1993
- FORMICA, J.V., REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related
bioflavonoids. **Food Chemistry Toxicology**, v.33, n.12, p.1061-1080, 1995.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A.E.; JUAREZ, A.Q.; PELZER, L.E., Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hiperidin on adjuvant arthritis in rat. **II Pharmacology**, v.56, p.683-687

HAN, Y., Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, v.9, p.207-211, 2009.

HARBORNE, J.B., The flavonoids. In: __, eds. The flavonoids: advances in research since 1980. New York: Chapman and Hall, 1988.

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

HOLLMAN, P.C.H.; HERTOOG, M.G.L.; KATAK, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**., Amsterdam, v.57. n.1, p.43-46, 1996.

MACHADO, H. **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich "in vivo"**. 2006. 125f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Vicoso, Vicoso, Minas Gerais, 2005.

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

MARTÍNEZ-FLOREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Revisión: Los Flavonoids: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición hospitalaria: órgano oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral**, Madrid, v.17, n.6, p.271-278, 2002.

MIDDLETON, E.JR.; KANDASWAM, C.; THEOHARIDES, T.C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v.53, p.673-751,2000.

MUROTA, K.; TERAQ, J., Antioxidative flavonoid quercetin: implication of it's intestinal absorption and metabolism. **Archives of Biochemistre and Biophysics**, v.417,p.12-17, 2003.

NASSIRI-ALS, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTAN, F., Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.32, p.989-993, 2008

NIJVELDT,R.J.;NOOD,E.;HOORN,D.E.C.;BOELENS,P.G.,;NORREM,K.;LEEUVEN,P.A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, USA, v.74, p.418-25, 2001

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

PEDRIALI, C.A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas.Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; BOLWELL, G.B.; BRAMLEY, P.M.; PRIDHAM, J.B., The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, Basingstoke, v.22,n.4,p.375-383, 1995.

SANTOS, K.F.R.; OLIVEIRA, T.T; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; OLIVEIRA, M.G.A., Hypolipidaemic effects of neringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. **Pharmacology Research**, v.40, n.6, p.493-496, 1999.

THOMSON, C.; BLOCH, A.; HASLER,C.M., **Position of the American Dietetic Association**, Orlando, v.99, n.10, p.1280-1281, 1999.

6.2 Resumo artigo II enviado à publicação

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF THE FLAVONOID RUTIN ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF WISTAR RATS

Juliana Marques Raso Becho ^{a*}, Vera Maria Peters^a, Renato Marques Macedo^a, Martha de Oliveira Guerra^a

^a Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Rua Jose Lourenço Kelmer s/n, Bairro Martelos, CEP: 36036330

* Corresponding author. Tel: +553221022351 Fax: +553221023255

E-mail address: <mailto:martha.guerra@ufjf.edu.br> julianabecho@gmail.com

ABSTRACT

Rutin, a flavonoid commonly found in nature, has anti-mitotic, vasoprotective, and antihyperlipidemic activity. When hydrolyzed as quercetin, it promotes inhibition of spermatozoa motility, alterations in the prostate, and in the levels of testosterone and dihydrotestosterone. This study aimed to evaluate the toxicity of rutin in Wistar rats. Animals were divided into Control (1 ml of distilled water), Treated I, II and III, respectively receiving 5, 10 and 20 mg/kg/day of rutin for seven consecutive days. When euthanasia was performed after 10, 42 and 60 days into the experiment, a laparotomy was performed and the testicles, prostate, seminal vesicles, epididymis, epididymal spermatozoa to be counted, as well as the liver, spleen and kidneys were removed. Hematological and biochemical tests were performed. Hepatomegaly was observed and in the reproductive system, the weight of the epididymis was reduced, not affecting any other organ examined.

Keywords: Flavonoids, Rutin, Rats, Epididymis, Toxicity

Submission Confirmation for TOXICOLOGICAL EVALUATION OF THE FLAVONOID RUTIN ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF WISTAR RATS

Entrada | X

★ **Reproductive Toxicology** para [mostrar detalhes](#) 11 fev (2 dias atrás) [Responder](#)

inglês ▾ > português ▾ [Traduzir mensagem](#) [Desativar para: inglês](#)

Dear Mrs becho,

Your submission entitled "TOXICOLOGICAL EVALUATION OF THE FLAVONOID RUTIN ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF WISTAR RATS" has been received by Reproductive Toxicology.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/rtx/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your manuscript to Reproductive Toxicology.

Warmest Regards,

Reproductive Toxicology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

7 Comentários finais

No presente estudo avaliamos os efeitos da Rutina em órgãos do sistema reprodutor masculino, na concentração dos espermatozoides epididimários e órgãos como fígado, baço e rins, assim como parâmetros hematológicos e bioquímicos. Alterações quanto ao peso corporal e consumo de ração foram pontuais e desacompanhadas de outros indícios indicativos de toxicidade, o que sugere que o tratamento com Rutina não deve ter alterado o estado geral do organismo animal. Notou-se hepatomegalia nos animais do grupo tratado com a menor dose de rutina, porém esse foi um achado que parece ser desprovido de significado biológico visto que não se observaram alterações na concentração de ALT, além de não ter se manifestado em doses, superiores e, tampouco ter se mantido aos 42 e 60 dias. A avaliação de órgãos do sistema reprodutor mostrou que houve redução do peso do epidídimo de animais de todos os grupos tratados com rutina e eutanasiados aos 10 dias, isto é, três dias após o último dia de tratamento. Entretanto, essa alteração não parece ser causada por déficit de andrógenos ou por alteração na produção de espermatozoides pois foi reversível, nos animais eutanasiados aos 42 e 60 dias, necessitando de mais estudos para ser explicada. Em conclusão, exceto pela redução do peso do epidídimo, reversível já aos 42 dias do término do tratamento, não foram encontrados dados sugestivos de toxicidade da Rutina sobre o sistema reprodutor de ratos adultos.

8 Conclusão

O flavonóide Rutina não apresentou efeitos tóxicos importantes sobre o organismo, entretanto, reduziu o peso do epidídimo, verificado três dias após o término do tratamento. O efeito não persistiu após esse período e o mecanismo de ação necessita ser melhor estudado, não tendo sido identificado no presente trabalho.

9 Referências

ACKER, S.A.B.E.V. et al. Structural aspects of antioxidant of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, Orlando, v.20, n.3, p.331-342, 1996.

AFANASÉV, J.B. et al. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, Amsterdam, v.38, n.11, p.1763-1769, 1989.

AHERNE, S.A., O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. **Nutrition**. New York: v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.

AMANN, R.P. *Sperm production rates*. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R., VAN DERMAACK, N.L. (Ed.). **The testis**. New York Academic Press, 1970.

ARAVINDAKSHAN, M.; CHAUHAN, P.S.; SUNDARAM, K. Studies on germinal effects of quercetin, a naturally occurring flavonoid. **Mutation Research**, Amsterdam, v.144, n.2, p.99-106, 1985.

ATANASSOVA, N. et al. Age-, Cell- and Region-Specific Immunoexpression of Estrogen Receptor a (But Not Estrogen Receptor b) during Postnatal Development of the Epididymis and Vas Deferens of the Rat and Disruption of This Pattern by Neonatal Treatment with Diethylstilbestrol. **Endocrinology**, Baltimore, v.142, 2001

BERERHI, L. et al. Rapamycin-induced oligospermia. **Transplantation**, Baltimore, v.15, n.76, p.885-886, 2003.

BIRT, D. F., HENDRISCH, S., WANG,W. Dietary Agents in Cancer Prevention: Flavonoids and Isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, Kansas City. v. 90, p. 157-177, 2001.

BOKKENHEUSER, V. D., SHACKLETON, C. H., WINTER, J. Hydrolysis of dietary flavonóide glycosides by strais of intestinal bacteroides from humans. **Biochemical Journal**, London, v. 348, p. 953-956, 1987.

CARLSEN, E. et al. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **British Medical Journal**, London, v. 305, n.6854, p.609-613,1992.

CARPINO, F., ROMEO, F., RAGO, F.V. Aromatase immunolocalization in human ductuli efferentes and proximal ductus epididymis. **Journal of Anatomy**, London, v.204, n. 3, p.217-220, 2004.

CARREAU, S. et al. Reproductive system: aromatase and estrogens. **Molecular and cellular endocrinology**, Limerick, v. 193, n.1-2, p. 137-14, 2002.

CARREAU, S., DE VIENNE C., GALERAUD-DENIS. Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advance. **Advances in Medical Sciences** . Bialystok, v.55, n.2, p.139-144, 2008

CHAVES, M. M. F.; USBERTI, R., Prediction of *Dimorphandra mollis* bend ("faveiro") seed longevity. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 557-564, 2003.

CORNIWALL, G.A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction**, Oxford, v.15, n.2, p.213-227, 2009.

COUCH, J. F.; NAGHSKI, J.; KREWSON, C. F., Buckwheat as source of rutin. **Science**, Washington, v. 103, p. 197-198, 1946.

COUSE, J.F, KORACH, K.S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us. **Endocrinology review**, Maryland, v.20, p.358 – 417, 1999.

CUNHA, G.R. Et al. Stromal-epithelial interactions in adult organs. **Cell differentiation**, Amsterdam, v.17, n.3, p.137-48, 1985.

DASTON, G.P. et al. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. **Reproductive and toxicology**, Elmsford, v.11, n.4, p. 465-481, 1997

DAUCHEUX, J.L. et al. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, Stoneham, v.63, n.3, p.319-341, 2005.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DIERICH, A. et al. Impairing follicle- stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 95, n.23, p. 13612–13617, 1998.

DONJACOUR, A.A., CUNHA, G.R. Assessment of protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgenintensive mice. **Endocrinology**, Baltimore, v.132, n.6, p.2342-50, 1993.

DOSTAL LA, FABER CK, ZANDEE J. Sperm motion parameters in vas deferens and cauda epididymal rat sperm. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v.10, p. 231–235, 1996

D'SOUZA, U.J.A. Toxic Effects of 5-fluorouracil on sperm count in wistar rats. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, Kubang Kerian, v.10, n.1, p.43-45, 2003.

DUARTE, J. et al. Vasodilatador effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v.239, p. 1-7, 1993.

EBLEN, A. et al. The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Philadelphia, v.86, p.2643–2648, 2001

EDDY, E.M. et al. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. **Endocrinology**, Baltimore, v.137, n.11, p.4796–4805, 1996

FRANÇA, L.R. et al. Germ genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. **Biology of Reproduction**, New York, v.59, p.1371-1377, 1998.

FRANÇA, L.R., AVELAR, G.F., ALMEIDA, F.F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, Stoneham, v.63, n.2, p.300-318, 2005.

GATTI, J.L.; DRUART X.; GUERIN Y.; DACHEUX J.L. A 105 to 94 Kda protein in the epididymal fluids of domestic mammals in angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. **Biology of Reproduction**, New York, v.60, n.4, p.937-945, 1999.

GLOVER, A., ASSINDER, S.J. Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogens reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. **Journal of Endocrinology**, London, v.189, 565–573, 2006.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. Q.; PELZER, L. E., Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hiperidin on adjuvant arthritis in rat. **II Pharmacology**, Amsterdam v. 56, p. 683-687, 2001.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006

HAN, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **Internatonal Immunopharmacology**, Amsterdam, v.9, p.207-211,2009.

HARBORNE, J.B., The flavonoids. In: __, eds. *The flavonoids: advances in research since 1980*. New York: Chapman and Hall, 1988.

HASSAMURA. M. et al. Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-weeks dietary administration to Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, p.439-444, 2004

HECKERT, L. L. & GRISWOLD, M. D. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. **Recent Progress in Hormone Research**, New York, v.57, p.129–148, 2002

HELDRING, N. et al. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. **Physiological reviews**, Bethesda, v. 87, p. 905–931, 2007.

HERMO, L.; ROBAIRE, B. *The epididymis from molecular to clinical practice. A comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens*. In: Robert B, Hinton BT, editors. *Epididymal cell types and their functions*. New York: Klumwer Academic/Plenum Publishers. 2002, p.81-102.

HESS, R.A. Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopie observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. **Biology of Reproduction**, New York, v.43, n.3, p.525-542, 1990.

HESS, R.A. et al. Morphological changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor- α knockout mice. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v.21, p.107–121, 2000

HESS, R.A., CARNES, K. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v.1, n.1, p.5-30, 2004.

HOLDCRAFT R. W. and BRAUN R. E.. Hormonal regulation of spermatogenesis. **International journal of andrology**, Copenhagen, v.27, n.6, p.335–342, 2004.

HOLLMAN, P. C. et al. Relative Bioavailability of the flavonóide quercetin from various foods in man. **Federation of European Biochemical Societies letters**, Amsterdam, n. 418, p. 152-156, 1995.

HOLLMAN, P. C. H.; HERTOOG, M. G. L.; KATAK, M. B., Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**, Barking, v. 57. n. 1, p. 43-46, 1996.

HUDSON, D.L. et al. Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate: Identification of intermediate phenotypes by keratin expression. **Journal of histochemistry and cytochemistry**, Baltimore, v.49, n.2, p.271-78, 2001.

IZAWA, H. et al. Alleviative effects of quercetin and onion on male reproductive toxicity induced by diesel exhaust particles. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Tokyo, v.72, n.5, p.1235–1241, 2008.

JEDLISKA-KRAKOWSK, M. et al. A impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morfology rats. **Journal of reproduction and development**, Tokyo, v.52, n.2, p.203-209, 2006.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KHANDUJA, K.L.; VERMA, A.; BHARDWAJ, A. Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. **Andrologia**, Berlin, v.33, n.5, p.277-281, 2001.

KUMAR, T. R et al. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. **Nature Genetics**, New york, v.15, p.201–204, 1997.

LEI, Z. M. et al. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. **Molecular Endocrinology**, Bethesda, v.15, p.184–200, 2001.

LIMA, L.R.P. et al. Toxicidade aguda de Rutina e Bixina de Bixa orellana. **Acta Farmaceutica bonaerense**, Buenos Aires, v.22, n.1, p.21-26, 2003.

MA, Z. et al. Reduction of rat prostate weight by combined quercetin-finasteride treatment is associated with cell cycle deregulation. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v.181, n.3, p.493-507, 2004.

MACHADO HUSSEN. **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich “in vivo”**. 2006. 125f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola)-Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, 2005.

MANACH, C et al. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 409, p. 12-16, 1997.

MARCHAND, L. L. Cancer preventive effects of flavonóides – a review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Paris, v. 56, p. 296-301, 2002.

MARKER, P.C.; DONJACOUR, A.A.; DAHIYA, R. et al. Hormonal, cellular and molecular control of prostate developmental. **Developmental biology**, Orlando, v.253, n.2, p.165-74, 2003.

MARTÍNEZ-FLOREZ, S. et al. Revisión: Los Flavonoids: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v.17, n.6, p.271-278, 2002.

MCNEAL JE. Normal histology of the prostate. **American journal of surgical pathology**, New York, v. 12, n. 8, p.619-33, 1988.

MENDIS-HANDAGAMA, S. M. Luteinizing hormone on Leydig cell structure and function. **Histology and Histopathology**, Murcia, v.12, n.3, p.869-882, 1997.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAM, C.; THEOHARIDES, T. C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 53, p. 673-751, 2000.

MORAES GES. *Espermocitograma*. Porto Alegre: Médica Missau, 1994, p.61-93.

MUROTA, K.; TERAQ, J., Antioxidative flavonóide quercetin: implication of it's intestinal absortion and metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New york, v. 417, 0.12-17, 2003.

NASS-ARDEN, L.; BREITBART, H. Modulation of mammalian sperm motility by quercetin. **Molecular reproduction and development**, New York, v.25, n.4, p.3369-3373,1990.

NASSIRI-ALS, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTAN, F. Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, Oxford, v.32, p.989-993, 2008.

NEMETH JA, Lee C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. **Prostate**, New York,v.28, n.2, p.124-128, 1996.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mecanisms action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 74, p. 418-25, 2001.

O'DONNELL,L.; ROBERTSON, K.M.; JONES, M.E.; SIMPSON, E.R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 22, n.3, p.289-318, 2001.

OISHI, S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.40, p. 1807–1813, 2002.

PARK, S.Y. et al. Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. **Nutrition Research**, New York, v.22, n.3, p.283-295, 2002.

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

PEDRIALI, C.A.Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. 2005. 127f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas.Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PFLIEGER-BRUS, S.; SCHUPE, H. -C.; SCHILL W. B. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. **Andrologia**, Berlin, v.36, n.6, p.337–345, 2004.

PRINS CG, BIRCH L, GREENE GL. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. **Endocrinology**, Baltimore, v.129, n.6, p. 3187-99, 1991.

PRINS, G. S., KORACH, K. S. The role of Estrogens and Estrogen Receptors in Normal Prostate Growth and Disease. **Steroids**, San Francisco, v.73, n.3, p. 233-244, 2008.

RICE-EVANS, C.C. et al. The relative antioxidant activities of plantderived polyphenolic flavonoids. **Free radical research**, Yverdon, v.22, n.4, p.375-383, 1995.

ROY-BURMAN, P et al. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocrine- related Cancer**, Woodlands, v.11, n.2, p225-254, 2004.

SANTOS, K.F.R. et al. Hypolipidaemic effects of neringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. **Pharmacological Research**, London, v.40, n.6, p.493-496, 1999.

SEED, J. et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v.10, p. 237–244, 1996

SHAHIDI, F. 1996. *Natural antioxidants: an overview*. In: *SHAHIDI, F. (Ed) Natural antioxidants – Chemistry, health effects and applications*. Champaign: AOCS Press, p. 1-11.

SHALEV, Y. et al. Localization of cicloxygenase and production of prostaglandins in bovine spermatozoa. **Journal of reproduction and fertility**, Cambridge, v.101, n.2, p. 405-413, 1994.

SHARPE, R. M. *Regulation of Spermatogenesis*. In: *The Physiology of Reproduction* (eds E. Knobil & J. D. Neill), Raven Press, Ltd, New York, NY, 1994.

- SKAKKEBAEK, N. E. et al. Is human fecundity declining? **International journal of andrology**, Copenhagen, v. 29, p. 2–11, 2006.
- SONNENSCHNEIN, C., SOTO, AM. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 65, n.1-6, p.143-150, 1998.
- SPEROFF, LGLASS, R.H.; KASE, N.G. **Male Infertility**. In: Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility, 4.ed. U.S.A.:Ed. WILLIAMS & WILKINS, 1988. p.565-566.
- SULLIVAN M, FOLLIS RH, J.R. HILGARTNER M. Toxicology of podophyllin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden,v.77, p.269–272, 1951
- TAEPONGSORAT, L. et al. Stimulating effects of quercetin on sperm quality and reproductive organs in adult male rats. **Asian journal of andrology**, Beijing, v.10, n.2, p.249-258, 2008.
- THOMSON, C.; BLOCH, A.; HASLER, C.M. Position of the American Dietetic Association: functional foods. **Journal of the American Diet Association**, Chicago, v. 99, n.10, p. 1280-1281, 1999.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A., CLIFFORD, M. N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden . **Journal of the Science of Food and Agriculture** , Oxford, V.80, n.7, p.1073–1080, 2000.
- VILAMAIOR, P.S.; FELISBINO, S.L.; TABOGA, S.R.; CARVALHO, H.F. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. **Prostate**, New York,v. 45,n.3, p.253-8, 2000.
- WALLE, T. Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism and bioactivity. **Free radical biology and Medicine**, Orlando, v. 36, n. 7, p. 829-837, 2004.
- YANG, C. S. et al. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 13, n.1, p. 572-584, 2002.
- YAO, L.H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.59, n.3, p.113-122, 2004.

YILDZOGLU-ARI, N.; ALTAN, V.M.; ALTINKUT, O.; OZTURK, Y. Pharmacological effects of rutin. **Phytotherapy Research**, London, v.5, n.1, p.19-23,1991.

ZENIK H et al. Assessment of Male Reproductive Toxicity. In Hayes, A.W. **Principle and methods of toxicology**, New York: Raven Press, 1994, p.937-980.

Apêndice

ARTIGO II

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF THE FLAVONOID RUTIN ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF WISTAR RATS

Juliana Marques Raso Becho ^{a*}, Vera Maria Peters^a, Renato Marques Macedo^a, Martha de
Oliveira Guerra^a

^aCentro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus
Universitário, Rua Jose Lourenço Kelmer s/n, Bairro Martelos, CEP: 36036330

* Corresponding author. Tel: +553221022351 Fax: +553221023255

E-mail address: <mailto:martha.guerra@ufjf.edu.br> julianabecho@gmail.com

ABSTRACT

Rutin, a flavonoid commonly found in nature, has anti-mitotic, vasoprotective, and antihyperlipidemic activity. When hydrolyzed as quercetin, it promotes inhibition of spermatozoa motility, alterations in the prostate, and in the levels of testosterone and dihydrotestosterone. This study aimed to evaluate the toxicity of rutin in Wistar rats. Animals were divided into Control (1 ml of distilled water), Treated I, II and III, respectively receiving 5, 10 and 20 mg/kg/day of rutin for seven consecutive days. When euthanasia was performed after 10, 42 and 60 days into the experiment, a laparotomy was performed and the testicles, prostate, seminal vesicles, epididymis, epididymal spermatozoa to be counted, as well as the liver, spleen and kidneys were removed. Hematological and biochemical tests were performed. Hepatomegaly was observed and in the reproductive system, the weight of the epididymis was reduced, not affecting any other organ examined.

Keywords: Flavonoids, Rutin, Rats, Epididymis, Toxicity

1. Introduction

Rutin is a flavonoid belonging to the subclass of flavonols that have a disaccharide (glucose + rhamnose) linked to position 3 of the pyran ring (Figure 1). It is found in numerous dietary sources such as onions, grapes, buckwheat, red beans, apples, tomatoes, and beverages such as red wine and black tea [1,2].

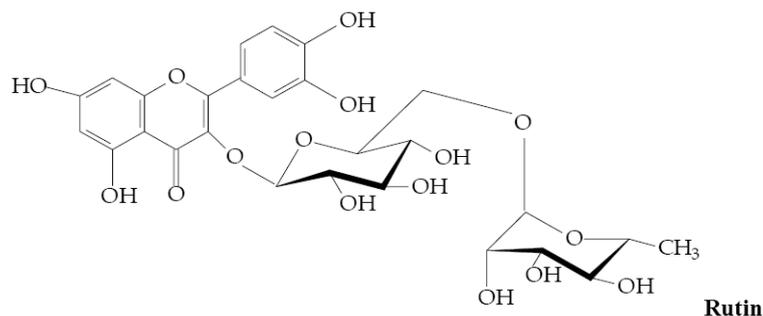


Figure 1 . Chemical structure of rutin

Source: Pedriali, 2005 [3].

It has been attributed to rutin an improvement in the symptoms of the lymphatic and venous vessels insufficiency, associated with some bleeding disorders or hypertension by promoting the standardization of resistance and permeability of the wall of these vessels [4]. Other symptoms of capillary fragility are also improved, including the reduction in the loss of visual acuity and visual field changes [4]. It also acts as a noncompetitive inhibitor of angiotensin II and prostaglandin E₂ and as a smooth muscle relaxant [5]. We also observed its efficiency in treating arthritis by *Candida albicans* and anti-*Candida* activity [6], antihyperlipidemic activity [7], anticonvulsant effect in rats [8], cellular immunity suppression [9], anticarcinogenic activity [10], and anti-inflammatory effect [11]. It significantly reduced levels of cholesterol and triacylglycerols in hyperlipidemic Wistar rats and it also appears to be a cholesterol modulator [13].

Rutin needs to be hydrolyzed and converted to quercetin by the enterobacteriaceae of the intestine, before it can be absorbed, both in humans and mice [14], since the absorption in the small intestine is hampered due to the sugars attached to its molecule [15].

Manach and colleagues (1997) [16] as well as Walle and colleagues (2004) [14] showed that rutin is completely hydrolyzed by glycosidases produced by enterobacteriaceae, resulting in quercetin-3-glucoside and aglycone quercetin as shown in Figure 2 [17].

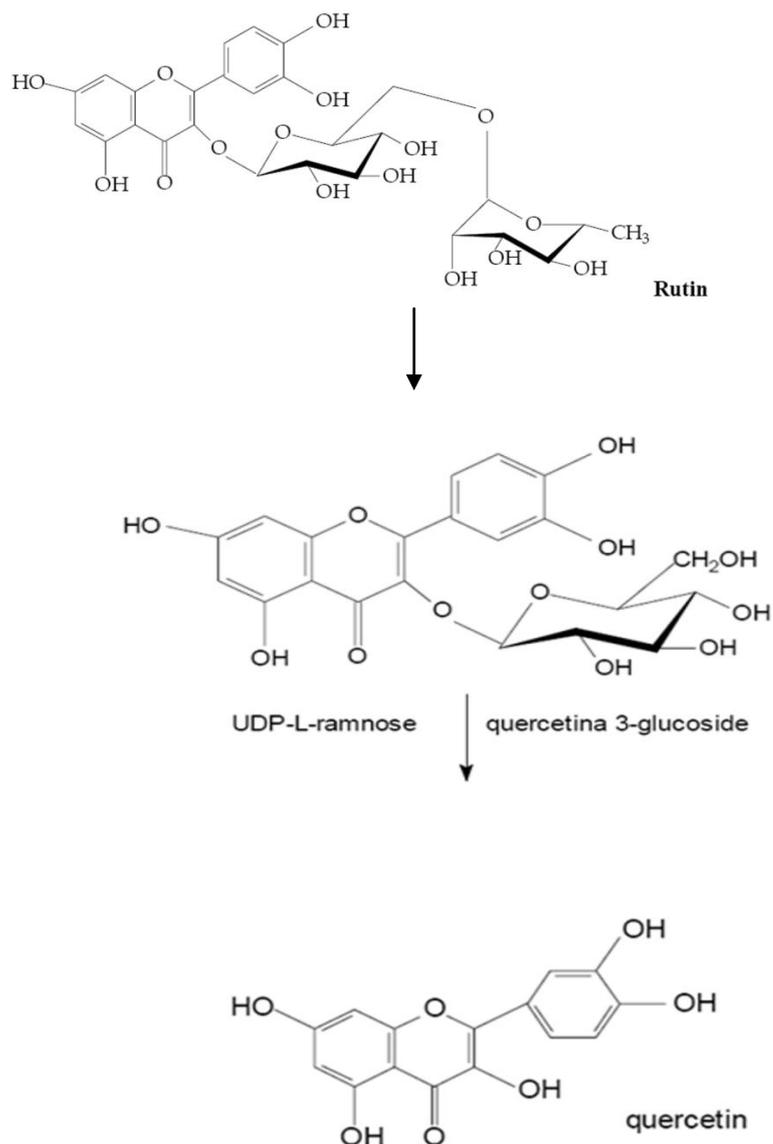


Figure 2 . Hydrolysis of rutin

Source: Pedriali, 2005 [3].

After the hydrolysis of sugars, these molecules begin to present greater affinity for membranes of epithelial cells and, therefore, are better absorbed [17]. However, Hollman et al. (1995) [18] described that quercetin glycosylated (Q3G) is better absorbed than quercetin in the aglycone form since Q3G binds to glucose transporters (SGLT-1) in epithelial cells.

Hasumura et al. (2004) [19] demonstrated that a prolonged use of rutin in the diet of rats did not cause hematological alterations or clinical signs of toxicity.

Evaluations of reproductive toxicity of rutin were not found in the researched literature. However, the effects of quercetin, one of its metabolites, on the male reproductive system are well known. Such studies show controversy when analyzed "in vitro" and "in vivo". In the first case, inhibitory effects on spermatozoa motility and viability were demonstrated [20, 21], but in vivo studies indicate a protective effect of quercetin against exposure to pesticides [22], and a stimulating effect on spermatozoa quality [23]. At higher doses (300mg/body weight of quercetin) there was an initial reduction of the fertility rates of rats during the first two matings with females, which was recovered in subsequent matings [24], as well as changes in the prostate [25]. Quercetin may increase testosterone and decrease dihydrotestosterone levels in rats [25].

Given these observations, we decided to conduct this study in order to determine the reproductive toxicity of rutin administered to adult rats for seven consecutive days.

2. Materials and Methods

2.1. Biological Model

180 adult male Wistar rats, weighing between 250 and 300 grams from the vivarium of the Center for Reproductive Biology (CBR) of the Federal University of Juiz de Fora (UFJF), were used. The animals were kept in polypropylene cages, lined with industrialized wood shavings, and fed with pelletized (Nuvilab/Nuvital®) feed and filtered water. The cages were kept in climatized cabinets (Alesco), located in an environment with temperature and 12-hour light/dark cycle automatically controlled.

Flavonoid

The flavonoid used was rutin hydrate, minimum 95% HPLC from the company Sigma®, lot 085K0196, reference R5143-50G.

2.2. Experimental Design

The methodology used was described by D'Souza (2003) [26]. The animals were randomly divided into four experimental groups: Control (C) - received 1 ml of distilled water

(n = 45); Treated T1 (n = 45), T2 (n = 45) and T3 (n = 45) which received 5, 10 and 20mg rutin/kg of body weight respectively, intragastrically for seven days, in a single dose, always between 2 and 3 pm. The LD50 of quercetin for rats was calculated in 161mg/kg of body weight [27]; however, it was not used to calculate the doses to be administered, preferring to use the corresponding dose which was effective in reducing the number of neoplastic cells in the experimental model of Ehrlich tumor [10], followed by half and twice this dose.

After 10, 42 and 60 days of the beginning of treatment, 15 animals from each group were euthanized. The choice of days is due to the fact that lesions in spermatozoa, spermatids, spermatocytes or spermatogonial can be identified in spermatozoa counts [26]. Moreover, one could assess the reversibility of effects. All animals were observed for 60 minutes after treatment and thereafter once a day to check signs of clinical toxicity [28].

Body weight and feed intake were measured in the first and last day of treatment, followed by weighing every seven days until the day of euthanasia, when they were weighed again. Feed intake was estimated by the difference in weight between what was provided in one day and what remained 24 hours later. Water was provided *ad libitum*.

2.3. Euthanasia

The animals were euthanized by asphyxiation after having their diaphragms ruptured, which was performed under deep anesthesia with ketamine (intraperitoneal) and xylazine (intramuscular) at doses of 90mg/kg and 10mg/kg of body weight, respectively. Once euthanasia was performed, the right epididymal was exposed and the tail punctured for removal of secretions and analysis of spermatozoa concentration [29,30,31].

2.4. Evaluation of Spermatozoa

To count the spermatozoa, small incisions in the right epididymis tail were made with the aid of scissors. The material was immediately placed in a drop of saline (50 μ l) previously prepared in a Petri dish placed on a heated plate (36° C). Then, with the aid of an automatic pipette (Eppendorf®), 20 μ l of this solution found in this drop were withdrawn and dissolved in 6ml of distilled water. After dilution, a sample was collected and placed in a Neubauer® chamber to count the spermatozoa. The total number of spermatozoa is obtained

by the average of two countings which correspond to the upper and lower field of the Neubauer® chamber.

Afterwards, a laparotomy was performed in search of macroscopic damage to internal organs followed by removal and weighing of left testicles, left epididymis, prostate, empty seminal vesicles, right and left kidney, liver, and spleen.

2.5. Histopathological analysis

The organs were fixed in Baker's calcium formaldehyde, embedded in paraffin, cut in microtome (5µm) and stained with hematoxylin and eosin; except the epididymis, which was stained with Gomori trichrome following the procedures of the Center for Biology of Reproduction of the Federal University of Juiz de Fora, for future analysis under light microscopy, in case alterations in weight or macroscopic lesions were found.

2.6. Histomorphometric Analysis of the Epididymis

The height of the tubular epithelium of the epididymis was measured through digital measurements in images captured by the AxioVision Release 4.7 (Zeiss®) program. Five epididymis per experimental group were used for histomorphometry. In each section, 10 circular tubules along the epididymis were randomly selected in which eight measurements along its circumference were obtained (Figure 3). The mean value was considered representative of the height of the tubule.

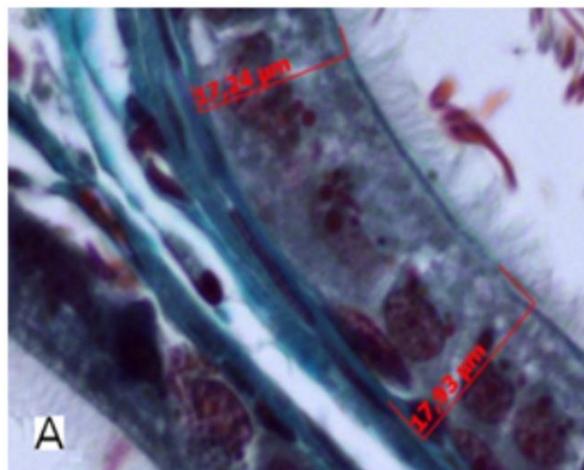


Figure 3. Epithelium Measurements of epididymis.

2.7. Statistical Processing

The collected data were processed by variance analysis - one way and a post-hoc Dunnet T3 test ($\alpha = 0.05$), and Kruskal-Wallis test with significance level $\alpha = 0.05$. To analyse the epididymal epithelium, we used one way- ANOVA followed by Dunnet post hoc test ($\alpha = 0.05$).

The methodology used in this study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (Protocol n° 058/2006 - CEEA, Federal University of Juiz de Fora), which follows the international ethical principles for animal experimentation.

3. Results

No signs or symptoms of clinical toxicity were found in any animal of any of the experimental groups.

The animals' body weight in the beginning and end of treatment as well as in the day of their euthanasia is shown in Table 1.

Table 1 - Comparison of initial, final and euthanasia weights among animals in the groups treated with rutin TI (5 mg/kg/day), TII (10 mg/kg/day), and TIII (20 mg/kg/day) and control group (1ml distilled water) that were euthanized at 10, 42 and 60 days after the beginning of treatment.

Groups		Control	TI	TII	TIII
10 days	Initial W.	281.33±23.38	286.78±26.64	264.73±30.98	260.81±26.85
	Final W.	280.03±26.36	282.81±25.50	262.09±27.22	257.63±21.96
	Euthanasia W.	267.07±20.16	274.22±18.72	261.59±15.82	260.53±13.20
42 days	Initial W.	274.62±26.33	272.26±34.76	261.90±31.24	255.56±27.88
	Final W.	262.98±25.39	258.03±27.01	259.47±31.54	252.13±27.88
	Euthanasia W.	274.99±13.40	263.05±24.00	256.03±30.82	244.85±29.07*
60 days	Initial W.	263.81±24.36	260.05±31.85	267.15±27.82	255.05±21.07
	Final W.	255.96±25.90	256.19±32.07	261.10±21.22	249.99±18.12
	Euthanasia W.	268.87±28.71	258.13±28.27	261.45±29.20	268.73±35.54

Initial W., Final W., Euthanasia W. = Initial, Final and Euthanasia W. weight. The results are expressed in mean standard deviation \pm .

* $p < 0.05$. Dunnett T3 test. A reduction in body weight of Group TIII rats in the day of euthanasia (42 days) was observed.

Table 2. Absolute weights of liver, left and right kidney, and spleen of animals in groups treated with rutin TI (5 mg/kg/day), TII (10mg/kg/day), TIII (20mg/kg/day) and control group (1ml distilled water). Euthanasia at 10, 42 and 60 days after the beginning of treatment.

Variables		Liver Weight	R. Kidney Weight	L. Kidney Weight	Spleen Weight
10 Days	Control	8.87±0.57	1.00±0.10	1.00±0.09	0.50±0.07
	TI	9.51±0.54*	1.04±0.05	1.01±0.06	0.51±0.06
	TII	8.79±0.53	0.99±0.06	0.94±0.03	0.46±0.04
	TIII	8.89±0.58	0.96±0.06	0.95±0.06	0.49±0.08
42 days	Control	8.94±1.03	0.98±0.11	0.96±0.08	0.46±0.06
	TI	8.90±1.38	0.91±0.12	0.88±0.12	0.45±0.07
	TII	8.95±1.15	0.91±0.11	0.90±0.12	0.47±0.08
	TIII	8.32±1.47	0.91±0.09	0.89±0.10	0.45±0.05
60 days	Control	8.61±1.51	0.94±0.13	0.93±0.13	0.47±0.08
	TI	8.12±1.69	0.99±0.14	0.94±0.14	0.45±0.08
	TII	7.55±1.43	0.90±0.13	0.88±0.10	0.44±0.05
	TIII	8.90±0.96	0.94±0.10	0.92±0.11	0.43±0.05

The results are expressed in mean standard deviation. * p<0.05. Dunnett T3 test.

Note the increase in liver weight between the animals in group T1 - 10 days, compared to the control.

Table 3. Absolute weights of right and left testicles, epididymis, seminal vesicles, and prostate of animals in groups treated with rutin TI (5 mg/kg/day), TII (10mg/kg/day), TIII (20mg/kg/day) and control group (1ml distilled water). Euthanasia at 10, 42 and 60 days after the beginning of treatment.

Variables		R. Testicle Weight	L. Testicle weight.	S V Weight	Prostate Weight	Epididymis weight
10 days	Control	1.39±0.13	1.36±0.11	0.54±0.07	0.42±0.12	0.54±0.04
	TI	1.32±0.08	1.33±0.06	0.51±0.11	0.43±0.11	0.49±0.03*
	TII	1.32±0.07	1.32±0.06	0.47±0.07	0.36±0.06	0.50±0.02*
	TIII	1.36±0.08	1.35±0.07	0.43±0.03	0.35±0.07	0.48±0.03*
42 days	Control	1.39±0.12	1.36±0.11	0.41±0.05	0.45±0.09	0.50±0.03
	TI	1.32±0.13	1.34±0.13	0.37±0.08	0.38±0.12	0.47±0.05
	TII	1.39±0.10	1.34±0.13	0.39±0.05	0.44±0.09	0.51±0.04
	TIII	1.31±0.09	1.29±0.08	0.37±0.11	0.39±0.10	0.48±0.03
60 days	Control	1.42±0.10	1.39±0.11	0.41±0.07	0.45±0.11	0.52±0.04
	TI	1.32±0.30	1.42±0.13	0.39±0.08	0.45±0.11	0.53±0.05
	TII	1.37±0.09	1.35±0.10	0.40±0.11	0.42±0.14	0.51±0.05
	TIII	1.34±0.11	1.31±0.09	0.42±0.08	0.47±0.12	0.51±0.04

RT = right testicle; LT = left testicle, SV = seminal vesicle. The results are expressed in mean standard deviation. * p<0.05.

Dunnett T3 test. It is observed that the weight of the epididymis of animals euthanized at 10 days was lower than in the control group.

The height of the seminiferous epithelium (μm) was 14.42 ± 1.83 (Control); 15.01 ± 1.84 (TI); 14.84 ± 2.07 (TII); and 14.43 ± 1.65 (TIII). Each average represents 50 tubules.

Regarding the number of spermatozoa observed in the tail of the epididymis, there was no significant statistical alteration among the groups compared to control.

Table 4. Biochemical and hematological parameters in animals treated with rutin TI (5 mg/kg/day), TII (10 mg/kg rutin) and TIII (20 mg/kg rutin) and control group (1ml of distilled water). Euthanasia at 10 after the beginning of treatment.

Variables	Control	TI	TII	TIII
ALT	58 \pm 8.28	66.8 \pm 8.11	66 \pm 5.57	58 \pm 8.28
Creatinine	0.57 \pm 0.04	0.51 \pm 0.04	0.60 \pm 0.04	0.57 \pm 0.04
MGV	51.9 \pm 0.7	50.92 \pm 0.8	51.5 \pm 1.13	51.9 \pm 0.7
MGH	19.38 \pm 0.34	18.5 \pm 0.46*	18.88 \pm 0.39	19.38 \pm 0.34
Hemoglobin	16 \pm 0.52	15.18 \pm 0.82	15.42 \pm 0.90	16 \pm 0.52
Hematocrit	43.3 \pm 1:40	41.78 \pm 2.15	42.04 \pm 2.56	43.3 \pm 1:40
MGHC	36.96 \pm 0.46	36.34 \pm 0.40	36.68 \pm 0.22	36.96 \pm 0.46
Leuk.counts	8120 \pm 2152.21	6040 \pm 1507.65	7640 \pm 2306.08	8120 \pm 2152.21
Hematimetry	8348000 \pm 264140.1	8208000 \pm 434073.7	8158000 \pm 327826.2	8348000 \pm 264140.1

ALT = alanine aminotransferase, MGV = mean globular volume, MGH = mean globular hemoglobin, MGHC = mean globular hemoglobin concentration, Luek. counts = Leukocyte counts. The results are expressed in mean standard deviation \pm . * $p < 0.05$. Dunnett T3 test. The values of MGH were significantly lower among the animals in group T1, compared to control.

4. Discussion

In the experimental model used, the animal was exposed to rutin for seven days, covering the entire period of epididymal transit. Upon the proceeding of the euthanasia on subsequent days, it can be assessed, through spermatozoa count in the secretion of the tail of the epididymis, toxic effects on epididymal spermatozoa (euthanasia at 10 days), primary spermatocytes (euthanasia at 42 days), secondary spermatocytes and spermatogonia (euthanasia at 60 days) - considering a cycle of 12.9 days and the total duration of 58 days of spermatogenesis in mice [32]. The same model was used by D'Souza (2003) [26]. Furthermore, it is possible to observe the possible reversal of acute toxic effects.

Systemic toxicity can be diagnosed by clinical signs of toxicity such as piloerection, ambulation changes, diarrhea or increased diuresis; data that indicate the general health condition of animals. Another indication of toxicity is obtained by the increase or decrease of body mass of the organs of the animals as well as the emergence of behavioral alterations [33]. The changes observed for body weight and feed intake were specific and not

accompanied by other indicative signs of toxicity, which suggest that treatment with rutin may not have changed the general state of the animal's body, data that concur with the findings of Hasumura et al. (2004) [19].

Although it is known that rutin metabolizes into quercetin and that the latter causes prostate changes, increase of testosterone and decrease of dihydrotestosterone levels in rats [25], in this study no changes in prostate weight were observed and the morphological data do not suggest hormonal changes.

Hepatomegaly was noted in the group of animals treated with the lowest dose of rutin, but this was a finding that appears to lack biological significance since there were no changes in concentrations of ALT, besides it was not manifested in higher doses, as well as it did not remain at 42 and 60 days.

Assessment of reproductive organs showed that there was a reduction in the weight of the epididymis of animals in all groups treated with rutin and euthanized at 10 days (three days after the last day of treatment). Epididymis is an androgen-dependent organ essential for spermatozoa maturation thus, the reduction of its weight could be attributed to the decrease of testosterone concentration [34]. However, the seminal vesicles and prostate, which are also androgen-dependent organs, were not affected. The height of the epithelium of the epididymis did not change with treatment, which also suggests the absence of reduced levels of testosterone and, furthermore, spermatozoa concentration did not differ among the groups. The disruption of spermatogenesis due to the blocking the exit of the testicle or to a decrease in its production would also be a cause of weight reduction of the epididymis [35]; however, as aforementioned, the concentration of spermatozoa in the tail of the epididymis showed no significant difference between the experimental groups together with the fact that testicle weight was not changed.

In conclusion, except by the reduction of the weight of the epididymis, which is reversible at 42 days of completion of treatment, no suggestive data of the toxicity of rutin on the reproductive system of adult rats were found. The change in epididymis weight does not seem to be caused by lack of androgens or changes in spermatozoa production; therefore, more studies need to be conducted to explain this change.

Acknowledgements

We would like to thank Redes Mineira de Bioterismo (Rede 172/08) and Mineira de Toxicologia e Farmacologia de Produtos Terapêuticos (Rede 173/08) for the financial support.

REFERENCES

- [1] Thomson C, Bloch A, Hasler C.M. Position of the American Dietetic Association: functional foods. *J Am Diet Assoc* 1999; 99(10):1280-1281.
- [2] Hollman PCH, Hertog MGL, Katak MB. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry* 1996; 57(1): 43-46.
- [3] PEDRIALI, C.A. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. In: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9135/tde-19072005-003023/pt-br.php>
- [4] Pathak D, Pathak K, Singla AK. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. *Fitoterapia* 1991; 57(5):371-389.
- [5] Yildzogke-Ar N, Altan VM, Altinkut O, Ozturk Y. Pharmacological effects of rutin. *Phytother Res* 1991; 5(1):19-23.
- [6] Han Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Internatonal Immunopharmacology* 2009; 9:207-211.
- [7] Santos KFR, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS, Oliveira MGA. Hypolipidaemic effects of neringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. *Pharmacology Research* 1999; 40(6): 493-496.
- [8] Nassiri-Als M, Shariati-Rad S, ZAMANSOLTAN F. Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2008; 32:989-993.
- [9] Middleton EJR, Kandaswam C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews* 2000; 53:673-751.
- [10] Machado H. Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich “in vivo”. 2006. 125f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, Minas Gerais, 2005.

- [11] Guardia T, Rotelli AE, Juarez AQ, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hypericin on adjuvant arthritis in rat. II Pharmacology; 56:683-687.
- [12] Lima LRP, Oliveira TT, NAGEM TJ, Pinto AS, Lima EQ, Silva JF. Toxicidade aguda de Rutina e Bixina de *Bixa orellana*. Acta Farm. Bonaerense 2003; 22 (1):21-26.
- [13] Park SY, Bok SH, Jeon SM, Park YB, Lee SJ, Jeong TS, Choi MS. Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. Nutr Res 2002; 22: 283-295.
- [14] Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. Free Radical Biol Med 2004; 36(7): 829-837.
- [15] Murota K, Terao J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. Archives of Biochemistry and Biophysics 2003;417:12-17.
- [16] Manach C, Morand C, Demigne C, Tesier O, Regeat F, Remesy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. Federation of European Biochemical Societies 1997; 409:12-16.
- [17] Bokkenheuser VD, Shackleton CH, Winter J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. Biochemical Journal 1987; 348:953-956.
- [18] Hollman PC, Van Tripp J, Buysman MN, Van Der Gaag MS, Mengelers MB. Relative Bioavailability of the flavonoid quercetin from various foods in man. Federation of European Biochemical Societies letters 1995; 418:152-156.
- [19] Hassamura M, Yasuhara H, Tamura T, Imai T, Mitsumori K, Hirose M. Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-weeks dietary administration to Wistar rats. Food and Chemical Toxicology 2004; 42:439-444.
- [20] Nass-Arden L, Breitbart H. Modulation of mammalian sperm motility by quercetin. Mol Reprod Dev 1990; 25:3369-73.
- [21] Khanduja KL, Verma A, Bhardwaj A. Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. Andrologia 2001; 33:277-81.
- [22] Izawa H, Kohara M, Aizawa K, Suganuma H, Inakuma T, Watanabe G, et al. Alleviative effects of quercetin and onion on male reproductive toxicity induced by diesel exhaust particles. Biosci Biotechnol Biochem 2008; 72:1235-1241.
- [23] Taepongsorat L, Tangpraputgul P, Kitana N, Malaivijitnond S. Stimulating effects of quercetin on sperm quality and reproductive organs in adult male rats. Asian J Androl 2008; 10(2):249-258.
- [24] Aravindakshan M, Chauhan PS, Sundaram K. Studies on germinal effects of quercetin, a naturally occurring flavonoid. Mutat Res 1985; 144:99-106.

- [25] Ma Z, Nguyen TH, Huynh TH, Do PT, Huynh H. Reduction of rat prostate weight by combined quercetin-finasteride treatment is associated with cell cycle deregulation. *Journal of Endocrinology* 2004; 181:493-507.
- [26] D'Souza UJA. Toxic Effects of 5-Fluorouracil on sperm count in Wistar rats. *Malaysian Journal of Medical Sciences* 2003; 10:43-45.
- [27] Sullivan M, Follis RH, Jr & Hilgartner M. Toxicology of podophyllin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1951; 77:269-272.
- [28] Zenik H, Clegg ED, Perreault SD, Klinefelter GR, Gray LE. Assessment of Male Reproductive Toxicity. In Hayes, A.W. *Principle and methods of toxicology*, New York: Raven Press, 1994, p.937-980.
- [29] Moraes GES. *Espemocitograma*. Porto Alegre: Médica Missau, 1994, p.61-93.
- [30] Dostal LA, Faber CK, Zandee J. Sperm motion parameters in vas deferens and cauda epididymal rat sperm. *Reprod Toxicol* 1996; 10:231-235.
- [31] Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, Klinefelter GR, Makris SL, Perreault SD, Schrader S, Seyler D, Sprando R, Treinen KA, Veeramachaneni DNR, Wise LD. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod Toxicol* 1996; 10:237-244.
- [32] França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brisnter RL; Russel LD. Germ genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of Reproduction* 1998; 59:1371-1377.
- [33] Mello F.B. 2001. Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos. 120f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- [34] Corniwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update* 2009; 15(2):213-227.
- [35] Lanning LL, Creasy DM, Chapin RE, Mann PC, Barlow NJ, Regan KS, Goodman DG. Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicologic pathology* 2002; 30(4): 507-520.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUÍZ DE FORA

INSTITUTO DE PESQUISA EM ZOOBIOTICIA

COMITÊ DE ETICA EM PESQUISA COM ANIMAIS

12. DECISÃO DA CEEA / UFJF

Data da Reunião: 06/02/2007

Aprovado Aprovado com recomendação Com pendências Reprovado

PROCOLO003/2007 - JULIANA RASO MARQUES

Após analisar o presente protocolo, o Comitê solicita à pesquisadora que explique as datas diferentes de sacrifício dos animais.

Presidente da CEEA

Secretário(a) da CEEA