

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IMPACTO DO PTEROSTILBENO EM CULTURA DE
CARDIOMIOBLASTOS E TECIDO CARDÍACO SUBMETIDOS AO
ESTRESSE OXIDATIVO**

Gabriela Klein Couto

Porto Alegre, dezembro de 2016

Gabriela Klein Couto

**IMPACTO DO PTEROSTILBENO EM CARDIOMIOBLASTOS E TECIDO
CARDÍACO SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia e Terapêutica.

Orientador: Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Co-orientador: Dr. Rafael Oliveira Fernandes

Porto Alegre 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Klein Couto, Gabriela

Impacto do Pterostilbeno em cultura de cardiomioblastos e tecido cardíaco submetidos ao estresse oxidativo / Gabriela Klein Couto. -- 2016. 58 f.

Orientador: Alex Sander da Rosa Araujo.
Coorientador: Rafael Oliveira Fernandes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Pterostilbeno. 2. Estresse oxidativo. 3. cardiomioblastos. 4. dano oxidativo. 5. antioxidantes. I. da Rosa Araujo, Alex Sander, orient. II. Oliveira Fernandes, Rafael, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Farmacologia e Terapêutica e aprovada, em nível de Mestrado acadêmico do Instituto de
Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre Luz de Castro
Centro Universitário Ritter dos Reis (UNIRITTER)

Dr. Cristina Campos Carraro
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof.^a Dr. Mirna Bainy Leal
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Alex Sander da Rosa Araujo pela excelente orientação e por me incentivar durante a construção deste trabalho.

Ao meu Co-orientador Rafael Oliveira Fernandes por toda a ajuda ao longo deste trabalho. Por todos os ensinamentos com nossas culturas de células. Por todas as manhãs que estavas cedo lá no ICBS me auxiliando. Foste essencial na construção deste trabalho, ao meu lado. Muito obrigada, sempre!

Aos meus pais, Vera e Jeferson, por nunca deixarem eu desistir. Pelos infinitos “vais conseguir” e “vai dar tudo certo”. Por todo o apoio emocional e logístico, para que desse certo e que desse tempo de fazer tudo. Eu amo vocês.

Ao meu irmão, Eduardo, por me incentivar a crescer, profissionalmente, sempre.

À minha amiga Franciele por todo apoio, disposição e ideias para que tudo desse certo. À minha amiga Sheila que mesmo longe esteve presente nos momentos mais angustiantes, sempre com uma palavra positiva, acreditando que tudo sairia perfeitamente. Obrigada por todo o carinho, gurias.

Às minhas chefes Ana Carolina, Joice, Michele e ao meu chefe Rodrigo por todo apoio. Sem a compreensão de vocês eu não teria conseguido conciliar meu crescimento profissional com o intelectual. Obrigada por terem feito parte desta página especial da minha vida.

Ao meu colega e amigo de mestrado Leonardo por todas as angústias divididas desde a seleção do mestrado. Obrigada por todas as trocas que tivemos. Sabes que te admiro demais tanto como pessoa quanto profissional. À Gabriela por toda ajuda e palavra amiga. Vocês foram um presente que o mestrado me deu.

Aos meus colegas de mestrado por todos os bons momentos que vivemos juntos. Foi bom demais conhecer cada um de vocês e poder aprender sobre diferentes assuntos e histórias. Sentirei saudade desta turma boa e querida.

Às colegas de laboratório Cris e Denise pelo auxílio nas técnicas.

À minhas amigas do LEAC Daísa e Juliana pelos pensamentos positivos. Obrigada pelas nossas manhãs alegres e por todo o carinho de sempre.

Aos meus amigos pelotenses: Eraldo, Wal, Bárbara, Tiago, Rafael e Fernanda pela torcida e pensamento positivo. Vocês são especiais.

À minha amiga, vizinha e parceira Dailise pelo carinho, estímulo, caronas a Porto Alegre. Obrigada, sempre!

Ao Gustavo Dias Ferreira, simplesmente, por TUDO. Pela paciência, por toda a ajuda, puxões de orelha, conselhos. Sabes que foste fundamental na construção desta etapa da minha vida. Serei eternamente grata por toda dedicação e cuidado que tens comigo. Sabes da admiração e orgulho que tenho de ti. Eu te amo!

Aos meus professores do programa de pós-graduação em Farmacologia e Terapêutica da UFRGS por todos os ensinamentos. À Ieda e a Kelly por toda a ajuda, nos mais diversos momentos. Tenho muito orgulho de ter feito parte deste programa.

Agradeço, enfim, a todos que de uma forma ou outra auxiliaram e acreditaram em mim. Trabalhar, fazer mestrado e morar em Pelotas foram um desafio. Mas eu gosto de desafios. São eles que tornam conquistas como essa ainda mais especiais. E que venham os novos desafios, afinal - " O céu é o limite!"

“A persistência é o caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

Resumo

Doenças cardiovasculares estão intimamente relacionadas ao estresse oxidativo, o qual leva à produção aumentada de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN), e o acúmulo destas pode representar uma perturbação no estado de equilíbrio entre pró-oxidantes/antioxidantes. Este cenário está relacionado com o desenvolvimento de inúmeras doenças. Por isso, estimular o aumento das defesas antioxidantes é uma estratégia eficaz na redução dano oxidativo. Desta forma, o uso do pterostilbeno, um polifenol encontrado em frutas pretas (tal como mirtilo), pode ser uma relevante estratégia de intervenção terapêutica a ser considerada. Os estilbenos apresentam a capacidade de aumentar as defesas antioxidantes, reduzindo, dessa maneira, ação deletéria das ERO. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito protetor de diferentes concentrações de pterostilbeno em cultura de mioblastos cardíacos (células H9c2) e tecido cardíaco *in vitro* submetidos ao a dano oxidativo.

Mioblastos cardíacos foram submetidas à incubação com diferentes doses de pterostilbeno (curva de dose: 50, 100 e 150 μM), 24 horas antes da indução ao dano oxidativo por peróxido de hidrogênio (H_2O_2 - 6,67 μM), durante 10 min. O estudo foi desenvolvido com três grupos distintos para células em cultura: G1– somente cultura de células H9c2 com meio DMEM; G2 - cultura de células H9c2 submetidas ao dano oxidativo induzido pelo H_2O_2 ; G3 - cultura de células H9c2 somente com incubação de pterostilbeno (50 μM) e dano oxidativo induzido pelo H_2O_2 . Já o tecido cardíaco foi homogeneizado e pré-incubado com pterostilbeno (25 e 50 μM) pelo período de 1 h, e submetido ao dano oxidativo por um sistema gerador de radical hidroxil (solução contendo FeCl_2 , ácido ascórbico e H_2O_2) durante 30 minutos. Os grupos foram alocados em: G1- homogeneizado de tecido sem intervenção (grupo Controle); G2 – homogeneizado de tecido com pterostilbeno (25 μM); G3 - homogeneizado de tecido com pterostilbeno (50 μM); G4 – Grupo submetido apenas

ao dano oxidativo por meio do sistema gerador de radical hidroxil; G5 - grupo com pterostilbeno 25 μM associado ao dano oxidativo; G6 - grupo com pterostilbeno 50 μM associado ao dano oxidativo. A viabilidade celular dos mioblastos em cultura foi avaliada por meio do ensaio de MTT. Os marcadores de estresse oxidativo foram avaliados pela dosagem de carbonilas, lipoperoxidação por TBA-RS e níveis de EROs totais. Atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e níveis totais de sulfidrilas foram mensurados em ambos os experimentos.

Foi observado que os modelos de dano oxidativo induzido em ambas as condições experimentais foram efetivos, pois estes causaram redução da viabilidade celular dos mioblastos cardíacos, assim como aumentando os níveis de EROs, carbonilas e lipoperoxidação no tecido cardíaco *in vitro*. Adicionalmente, foi constatado aumento na atividade da catalase, nas células em cultura como resposta contra regulatória ao estresse. Entretanto, no homogeneizado cardíaco houve redução na atividade da catalase e da glutathione peroxidase, nos grupos submetidos ao estresse. Por outro lado, o pterostilbeno foi efetivo na indução da atividade da superóxido dismutase no tecido cardíaco, assim como na redução dos níveis de EROs totais após incubação com o sistema gerador de radical hidroxil.

Tomados em conjunto, os dados sugerem que o pterostilbeno sem associação com estresse, demonstrou ação benéfica. A substância, entretanto, mostrou efeitos distintos em células e tecido submetidos ao estresse oxidativo. Dessa maneira, são necessários mais estudos, como estudos *in vivo*, a fim de aumentar a complexidade do sistema e entender a substância de forma plena, visto que os marcadores antioxidantes que aumentaram no experimento celular e tecidual não foram os mesmos.

ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT – Catalase

ERO – Espécies Reativas do Oxigênio

ERN – Espécies Reativas do Nitrogênio

FeCl₂ – Cloreto de Ferro

GPx – Glutathione Peroxidase

GSH – Glutathione Reduzida

GST – Glutathione Transferase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

NADPH – Nicotinamida adenina fosfato

NADPH oxidase – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase

NADP⁺ - Nicotinamida adenina fosfato oxidado

KFK β – Fator de transcrição nuclear K β (fator nuclear K β)

OH \cdot – Radical hidroxil

OMS – Organização Mundial de Saúde

SOD – Superóxido Dismutase

TLR – 4 – Receptor do tipo toll 4

Sumário

1. Revisão Bibliográfica.....	9
2. Objetivo Geral.....	18
3. Artigo científico: " Impacto do pterostilbeno em cultura celular de cardiomioblastos e tecido cardíaco submetidos ao estresse oxidativo ".	21
4. Discussão.....	47
5. Conclusão.....	51
6. Referências.....	52

1.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são causadas por diferentes distúrbios no coração e vasos sanguíneos. Elas incluem a doença coronariana, a doença cerebrovascular, a hipertensão e a insuficiência cardíaca (1). Atualmente, as enfermidades do sistema cardiovascular encontram-se entre as principais causas de morte e invalidez em todo o mundo (2). Estima-se que, até 2030, o número de pessoas que morrerão em virtude destas doenças seja de 23,3 milhões (1, 3), sendo estas responsáveis pela maioria das mortes atribuídas às doenças não-transmissíveis, ocasionando a perda de 17 milhões de vidas anualmente (1).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem formas viáveis de prevenção para estas doenças que poderiam ser realizadas por intermédio de medidas como: controle antitabaco, promoção de dietas mais saudáveis, atividades físicas e redução da ingestão de álcool (1). Todos estes fatores estão relacionados com a redução do estresse oxidativo (4). O estresse oxidativo leva à produção excessiva de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) e o acúmulo destas espécies pode representar uma perturbação do estado de equilíbrio de reações pró-oxidantes/ antioxidantes no organismo. Esse cenário celular favorece o dano oxidativo a lipídios, proteínas e ao DNA, contribuindo, dessa forma, para o desenvolvimento de inúmeras doenças (6). Sabe-se, também, que o estresse oxidativo está intimamente relacionado às desordens cardiovasculares por exercer um papel fundamental na fisiopatologia destas doenças (5, 6).

1.2 Espécies reativas, antioxidantes e estresse oxidativo

Estudos mostram que a mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres (7), sendo o local onde o oxigênio (O_2) sofre redução tetravalente, aceitando quatro elétrons e formando água. A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase, que tem por função controlar a geração de radicais livres, impedindo, assim, sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, durante esta reação pode acontecer uma redução incompleta do O_2 , devido à transferência univalente de elétrons, dando origem aos radicais livres (8, 9).

Assim, já é sabido que ao longo dos processos metabólicos celulares, ocorrem reações de óxido-redução, sendo que tal processo leva à produção de ERO e ERN, produtos do metabolismo celular (10).

As EROs, com exceção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil (HO^{\cdot}), são muito instáveis e reativas (11). No meio intracelular, o $O_2^{\cdot-}$ sofre dismutação a H_2O_2 por meio da enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 caso não consiga sofrer uma degradação formando água, por meio das enzimas catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx), irá formar HO^{\cdot} ao reagir com o íon ferroso ou cúprico. Na presença de íons divalentes e metais de transição, o radical HO^{\cdot} também pode ser gerado a partir da reação do $O_2^{\cdot-}$ com H_2O_2 (reação de Haber-Weiss) (12). O $O_2^{\cdot-}$ pode, também, reagir com o óxido nítrico (NO) formando o peroxinitrito ($ONOO^-$), um radical altamente deletério (13).

As enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx, entre outras), presentes em nosso organismo, como no tecido cardíaco, funcionam como mecanismos de defesa prevenindo, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres que poderiam levar a danos oxidativo. Essas enzimas têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies

reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (14). Em condições normais, há um equilíbrio entre a produção das espécies reativas e intracelulares atividade dos antioxidantes, deste modo, controlando o ambiente redox. Este equilíbrio é de extrema importância para a sobrevivência dos organismos e sua saúde (10).

As enzimas CAT e GPx agem de forma a impedir o acúmulo de H_2O_2 . Esta ação conjunta é de extrema importância, já que essa espécie reativa pode culminar na geração do OH^* , radical indicado como o de maior potencial reativo e com extrema instabilidade (vida média de 10^{-9} segundos), contra o qual não há sistema enzimático de defesa. Tais características capacitam o OH^* como o radical livre com alta capacidade de produzir danos oxidativo (15).

Tendo conhecimento quanto ao potencial do radical OH^* e sabendo-se que não existe uma defesa enzimática especializada, é importante mantermos o equilíbrio, elevando os níveis quando necessário, entre as defesas antioxidantes, para manter a integridade celular (7). Dessa maneira, deve-se ter um cuidado especial com, por exemplo, a enzima GPx já que sua ação depende da manutenção do ciclo redox da glutathione (7), assim como é considerada uma das mais importantes enzimas antioxidantes no coração (16)

Além dos antioxidantes enzimáticos, nosso organismo dispõe de antioxidantes não-enzimáticos, dentre eles podemos destacar a GSH a qual é um oligopeptídeo endógeno que também exerce a função de cofator da GPx e da glutathione-S-transferase (GST) (17). A GSH exerce funções de sequestrador de radicais livres e conjugação com xenobióticos, bem como, participa da regeneração de antioxidantes como o tocoferol e o ácido ascórbico. Destaca-se, ainda, que sua ação como antioxidante não-enzimático está mais diretamente ligada a atuação sobre o peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos (18). Ela tem a capacidade de modificar o DNA e formar aductos para ligar-se a diferentes xenobióticos como: clorofórmio, nitratos orgânicos, paracetamol, etc.; reação esta que pode acontecer

espontaneamente ou catalisada pela enzima GST, por meio da reação: $RX + GSH \rightarrow RSG + XH$ (12).

As espécies reativas e seus derivados exercem funções fisiológicas importantes no organismo como: a regulação do tônus vascular, a detecção da tensão de oxigênio, a regulação de funções que são controlados pela concentração de oxigênio, o aumento da transdução de sinal a partir de vários receptores de membrana, além de respostas ao estresse oxidativo que irão assegurar a manutenção da homeostase redox (8).

Somado a isso, as espécies reativas podem controlar a atividade de vias de sinalização intracelulares redox sensíveis. Os principais mecanismos redox que controlam a função das proteínas ocorrem por oxidação de aminoácidos como cisteína, tirosina e metionina, os quais apresentam grupos tióis em sua estrutura que são alvos de oxidação e de redução (19). Em geral, os efeitos benéficos das espécies ocorrem quando estas se encontram em baixas/moderadas concentrações, funcionando como sinalizadores intracelulares que promovem a sobrevivência celular (10). Por outro lado, o acúmulo de ERO é um dos principais fatores desencadeantes da apoptose dos cardiomiócitos (20).

Alguns estudos sugerem que agentes com potencial antioxidante podem proteger o organismo contra a atividade indesejável dos ERO e ERN, substâncias tais como os polifenóis (21).

1.3 Polifenóis

Polifenóis são metabólitos secundários produzidos pelas plantas, que estão envolvidos com diversos processos como o crescimento, pigmentação, polinização, resistência contra patógenos. Quimicamente, possuem um ou mais grupos hidroxila ligados ao anel benzeno, podendo ser classificados, ainda, como compostos flavonoides e não-flavonoides (22, 23).

O interesse crescente nos compostos fenólicos é devido ao fato de inúmeros estudos epidemiológicos demonstrarem associação entre o consumo de alimentos ricos em polifenóis e a prevenção de certas doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares (24). Os efeitos benéficos dos diferentes polifenóis dependem não somente de sua farmacodinâmica, mas também de suas propriedades farmacocinéticas, tais como a biodisponibilidade (25).

O efeito protetor dos polifenóis é, principalmente, devido a sua grande variedade de ações biológicas, tais como: capacidade de remover radicais livres, ação quelante de metal, capacidade de modulação enzimática, efeitos sobre vias de sinalização celular e controle da expressão gênica (26, 27). A capacidade antioxidante dos flavonoides é determinada, fundamentalmente, por sua estrutura, uma vez que estas moléculas apresentam o grupamento OH aromático, o qual doa um átomo de hidrogênio ao radical livre, formando o radical fenoxila, que se estabiliza pelo mecanismo de ressonância eletrônica (28).

Os polifenóis, potencializando a ação de enzimas antioxidantes ou inibindo enzimas intracelulares geradoras de espécies reativas, também estão relacionados com redução da lipoperoxidação (23). Além disso, apresentam propriedades antioxidantes indiretas ativando fatores de transcrição como o Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2) (29, 30).

Dentre os polifenóis não flavonoides, os estilbenos chamam a atenção devido às suas ações biológicas benéficas (23), como aquelas observadas no tratamento de algumas doenças (diabetes, dermatites inflamatórias, micoses, prevenção/tratamento de alguns cânceres, melhora da cognição) com pterostilbeno (31, 32).

1.4 Pterostilbeno

Pterostilbeno (trans-3,5-dimetoxi-4'-hidroxi estilbeno) é um polifenol que foi identificado como uma molécula altamente ativa pertencente à família do estilbeno (33). Este polifenol pode ser encontrado em frutas como o mirtilo, amora preta, uva, ameixa, entre outros. Pterostilbeno é um análogo dimetilado do resveratrol, mas é significativamente mais biodisponível quando ingerido (33).

Pterostilbeno e o resveratrol possuem propriedades farmacológicas semelhantes, contudo, pterostilbeno tem algumas vantagens. Quimicamente, estes polifenóis apresentam diferenças estruturais: no pterostilbeno, existem dois grupos metoxi e um grupo hidroxila, em vez disso, o resveratrol apresenta três grupos hidroxila (34). Por possuir dois grupos metoxi, o pterostilbeno demonstra um caráter mais lipofílico, facilitando absorção oral e celular (35).

Dessa forma, o ponto crítico da bioatividade dos estilbenos está na sua melhor biodisponibilidade. Quando se observa a administração por via oral, pterostilbeno mostra 95% de biodisponibilidade, enquanto o resveratrol apresenta 20% (34). Além disso, o tempo de meia-vida do pterostilbeno é, aproximadamente, sete vezes maior do que a do resveratrol (105 minutos e 14 minutos, respectivamente) (36).

Os inúmeros benefícios do pterostilbeno no tratamento e prevenção de doenças são atribuídos à suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, levando a uma melhora da função celular normal e inibição da propagação de células malignas (32). Com relação ao sistema cardiovascular, recentes estudos mostraram que o pterostilbeno apresentou ação anti-inflamatória, por inibir a via do TLR-4/NF-kB, assim como reduziu apoptose celular em modelo de isquemia reperfusão (37).

Embora a administração do pterostilbeno apresente potencial terapêutico cardíaco, seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido. Portanto, faz-se necessário

explorar as possíveis propriedades farmacológicas do pterostilbeno sobre células cardíacas em cultura submetidas ao estresse oxidativo.

1.5 Cultura de células

Estudos em cultura de células têm sido largamente utilizados desde o início do século passado, com o intuito de analisar processos como, por exemplo, a atividade de vírus, propriedade de células cancerosas, envelhecimento celular, terapia gênica, mecanismos de ação, entre outros (38, 39). Uma vantagem fundamental desta técnica é sua simplicidade em comparação aos estudos *in vivo*. Com o modelo de cultura celular é possível determinar, com uma maior precisão, o mecanismo de ação de determinadas patologias, bem como, de determinados fármacos (40).

Os principais tipos de cultivos celulares utilizados são: os primários (obtidos a partir de tecido fresco de um animal morto), secundários ou diploides (gerados a partir dos cultivos primários, por meio da dispersão das células e redistribuição em novos cultivos) e os cultivos de linhagem ou imortalizadas obtidos a partir de tecidos oncogênicos ou modificados com vetores que causem a perda da capacidade de regulação do ciclo (38).

A utilização de culturas de células animais como modelos de doenças humanas é parte integrante da investigação científica, pode fornecer equivalentes taxonômicos que se assemelham à fisiologia humana. O estudo de células também proporciona aos pesquisadores maior compreensão sobre desenvolvimento biológico, expressão de proteínas e evolução genética. Sabe-se que estudos com linhagem celular possuem vantagens como: a possibilidade de formação de um banco de células padronizado e bem caracterizado por um período de tempo infinito, menor exigência com relação ao enriquecimento do meio de cultivo e a concentração do soro do meio, além da diminuída

chance de contaminação, como é o caso da linhagem de cardiomioblastos – células H9c2 (39, 41, 42).

1.6 Modelo H9c2 e Pterostilbeno

Estudos com células cardíacas isoladas são amplamente aceitos como um complemento dos estudos *in vivo* e, também, na análise da cardiotoxicidade, substituindo o uso de animais (43). As vantagens de trabalhar com linhagens contínuas possibilitaram estudos com vários tipos celulares diferentes. Entretanto, o estabelecimento de uma linhagem contínua para células cardíacas foi de grande dificuldade uma vez que cardiomiócitos isolados não proliferam e tumores cardíacos são muito raros. Ao realizar passagens seriadas seletivas de um subclone da linhagem original derivada de tecido cardíaco embrionário de ratos, Kimes e Brandt obtiveram sucesso na imortalização de células cardíacas originando a linhagem celular H9c2 com capacidade proliferativa igual à de células cardíacas já diferenciadas (44).

No que se refere a estudos da ação de pterostilbeno em células foi demonstrado efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anticancerígenas (45). Entretanto, efeitos do tratamento de células H9c2 com pterostilbeno foi muito pouco explorado necessitando de mais estudos para melhor compreensão dos efeitos desta substância em células cardíacas desafiadas pelo estresse oxidativo.

1.7 Geradores de dano oxidativo

Em função de sua configuração eletrônica o oxigênio tende a receber um elétron de cada vez, originando compostos que são extremamente reativos como: radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH\cdot$), sendo o radical hidroxila um dos mais potentes oxidantes, podendo permear a membranas e reagir com lipídios insaturados e DNA. Já o H_2O_2 em função da ausência de elétrons desemparelhados na

última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, pois participa da reação que produz o $\text{OH}\cdot$. Ele, ainda, é capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{++} . Desta maneira é altamente tóxico para as células (12, 46).

Assim, modelos de indução de estresse oxidativo utilizando peróxido de hidrogênio são descritos, a fim de mimetizar o dano oxidativo a células (43, 47, 48). É essencial, no entanto, que se encontre a concentração ideal de H_2O_2 , pois o dano celular deve ocorrer, mas sem matar todas as células (48). Outro modelo, descrito por Halliwell, que objetiva a geração do radical hidroxil é a incubação de homogeneizados de tecido com cloreto de ferro (FeCl_2), H_2O_2 e ácido ascórbico (49).

Estes danos gerados baseiam-se nas reações de Haber-Weiss e Fenton que origina $\text{OH}\cdot$ a partir de H_2O_2 (49, 50).

Este trabalho teve por objetivo analisar os efeitos do pterostilbeno, administrados previamente à indução de dano oxidativo, por peróxido de hidrogênio, em cultura de mioblastos cardíacos (H9c2) e, sistema gerador de $\text{OH}\cdot$ em tecido cardíaco, sobre o dano oxidativo e o sistema de defesa antioxidante.

Objetivos específicos:

- I. Identificar a viabilidade celular frente incubação com as diferentes concentrações de pterostilbeno.
- II. Quantificar os indicadores de estresse oxidativo pela mensuração das espécies reativas de oxigênio totais, peroxidação lipídica e oxidação proteica. Em cultura de células (ROS total) e em tecido cardíaco (TBARS, Carbonilas, ROS TOTAL e Nitritos).
- III. Mensurar a atividade das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas em cultura de células e em tecido cardíaco.
- IV. Comparar os efeitos do pterostilbeno em tecido cardíaco e cardiomioblastos.

Os experimentos aqui apresentados foram realizados no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Espécies Reativas do Oxigênio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, coordenado pela Profa. Dr.^a Adriane Belló-Klein, sob orientação do Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo e Co-orientação do Dr. Rafael Oliveira Fernandes, pós-doutorando do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e estão apresentados na forma de um artigo científico submetido ao periódico *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.

Pterostilbene impact on cardiac myoblasts culture and heart tissue subjected to oxidative stress

**Gabriela Klein Couto¹, Rafael Oliveira Fernandes¹, Denise Lacerda¹,
Alex Sander da Rosa Araujo¹**

¹ Laboratory of Cardiovascular Physiology, Institute of Basic Health Science (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding Author: **Dr. Alex Sander da Rosa Araujo**

Mailing address: Laboratory de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre/RS, CEP: 90050-170. Brazil. Phone: 0-55-51-33083621. Fax: 0-55-51-33083656.

E-mail: alsanderaraujo@hotmail.com

Pterostilbene impact on cardiac myoblasts culture and heart tissue subjected to oxidative stress

Gabriela Klein Couto¹, Rafael Oliveira Fernandes¹, Denise Lacerda¹,

Alex Sander da Rosa Araujo¹

Abstract

This study was designed in order to analyze the effects of pterostilbene, a natural polyphenol, in culture of cardiac myoblasts (H9c2 cells) and cardiac tissue, with the goal to identify if this molecule can preventively modulate the key components of the intracellular redox control in cardiac cells submitted to oxidative stress. Pretreatment with pterostilbene was administered in H9c2 cells and homogenated cardiac tissue during a period of 24 h and 1 h, respectively, at doses of 25 μM and 50 μM . Immediately after, H9c2 cells were submitted to hydrogen peroxide (H_2O_2 , 6,67 μM , for 10 min), and cardiac tissue to hydroxyl radical generator system (for 30 min). After incubations, cell viability, oxidative biomarkers, and antioxidants components were determined in the cells and homogenated heart. Cell viability increased in the dose of 50 μM pterostilbene ($p < 0.05$). However, it was unable to protect the cellular viability under stress condition. Also, pterostilbene did not modulate ROS production, as well as the antioxidant enzyme activities (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase). Nevertheless, pterostilbene increased sulfhydryl levels (3-fold, $p < 0.05$) in the cells submitted to oxidative damage. In the cardiac tissue, oxidative stress biomarkers were significant increased in the groups submitted to oxidative damage (TBARS, carbonyls, and ROS levels). Pterostilbene was able to reduce ROS levels ($p < 0.05$) in the group submitted to oxidative damage. Additionally, in the non-stressed group, pterostilbene increased SOD activity. On the other hand, it was not able to modulate positively the antioxidant defenses in the damaged tissue, as well as the lipid and protein oxidative damage. This study demonstrated that pterostilbene seems to present a beneficial effect in a non-stressed cardiac cells, but its effect was partial in protecting the cardiac cells and tissue against oxidative damage.

Key words: pterostilbene; oxidative stress; cardiac myoblasts; cardiac tissue; antioxidant enzymes; oxidative damage.

Introduction

Cardiovascular diseases currently are among the major causes of death and disability worldwide (Mathers, 2006). They are responsible for most of the deaths attributed to non-transmissible diseases, and are closely related to oxidative stress (Ribeiro et al., 2012).

Oxidative stress is represented by an increased production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS), which causes oxidative damage to biomolecules. Likewise, the accumulation of these species contributes to a disturbance in the homeostasis of the prooxidant/antioxidant system in the body, contributing to development of many diseases.

Antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase - SOD, catalase - CAT, and glutathione peroxidase – GPx, are present in the heart tissue, being the main responsible for the defense mechanism against ROS and oxidative damage (Barbosa et al., 2010). On the other hand, new antioxidant molecules have been implicated in playing important role antioxidant, such as polyphenols derived from black fruits.

Pterostilbene is a polyphenol that belongs to the stilbene family, a dimethylated analogue of the resveratrol. However, pterostilbene are significantly more bioavailable when ingested, (Chabert et al., 2006). This substance is commonly found in black fruits (ex. Blueberry, grape, plum, blackberry), and it has been considered as an intervention strategy against development of diverse diseases (Estrela et al., 2013). This natural compound has the capacity to increase the antioxidant defenses, as well as reduce the damage induced by reactive species (ROS) (McCormack, 2013; Wu, 2010). In this point of view, the benefits of pterostilbene are attributed to prevention of diseases, since it presents anti-inflammatory and anticancer activity, leading to improvement of normal cellular function (McCormack, 2013). Regarding to cardiovascular system, Wang et al., have shown that pterostilbene

presents anti-inflammatory action by inhibiting the pathway of TLR-4/NF- κ B (Wang et al., 2015).

Then, the proposal of the present study was to examine the pterostilbene effects on the modulation of antioxidant defenses and oxidative stress biomarkers in cardiac myoblast cells and cardiac tissue *in vitro*, pretreated with this natural compound, submitted to oxidative damage.

Materials and methods

The experimental design was divided in experiment I (analyses in cell) and experiment II (analyses in tissue).

Experiment I

Cell culture: Cardiac myoblast lineage (cells H9c2 rat embryonic ventricular; purchased from ATCC company) were cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic-antifungal (penicillin 10,000 U/ml, streptomycin 10,000 μ g/mL, 25 μ g/mL Fungizone®), incubated at 37°C with 5% CO₂, 100% humidity. For experimental protocol, the cells were seeded as follow: 10⁴ cells/well for the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) assay (96 well plate) and 8 x 10⁵ cells/10 cm dish for enzyme assays. After sowing, waited for a period of around 24 hours for the cells to reach the desired adherence and confluency (Fernandes et al., 2014; Mallik et al., 2011; Shewchuk et al., 2010). After the started experimental protocols with the incubation of substances.

Cell viability: It was determined the viability of the cardiomyocytes by the MTT assay (3- (4,5-dimethylthiazol- 2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide). After the adherence cells, treatment was initiated the experimental groups. After 24 hours of incubation with different doses the Pterostilbene was withdrawn and for 10 minutes and added H₂O₂ solution (6.66 μM). After this time pulled out the stress solution and added to the new medium, MTT solution in each well (final concentration of MTT 10% (v/v)) which was incubated in contact with the cells for a further 4 hours. At the end of incubation, the solution was aspirated. Was added 0.05 mL DMSO per well in order to dissolve the crystals formed by the reaction. After 10 min of incubation, the absorbance was measured at 570 nm (650 nm wavelength correction) in Zenyth reader 200rt (Biochrom Inc, UK) (Bryan et al., 2011)

Experimental groups: After analysis of cell viability, the experimental groups were defined. Group 1 - DMEM: H9c2 cells in DMEM culture. Group 2 - H₂O₂: H9c2 cells with oxidative stress induced by hydrogen peroxide (6,66 μM/L/10 min). Group 3 - P50 + H₂O₂: H9c2 cells with treatment Pterostilbene (50 μM/L/24 h) and oxidative stress induced by hydrogen peroxide (6,66 μM/10 min - previously determined in the standardization of culture).

The concentration of 50 μM of pterostilbene was determined by cell viability analysis, where cells were exposed to changes the concentration of 50, 100, 150 μM. As the dose of 50 had greater cellular viability, this was the dose chosen for the other tests. For this experiment, we use an N = 3 and the tests were: ROS, SOD, CAT, GPx, and sulfhydryl.

Experiment II

Homogenized preparation of heart *in vitro* tests: Right and left ventricles of adult (the project was submitted and approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul: registered by protocol number 29835). Wistar rats (n=5) were homogenized for 40 seconds at Ultra-Turrax in the presence of RIPA 1:10 (5 ml/g of tissue) and fluoride phenyl-methyl-sulfonyl (PMSF). Then, this homogenate was centrifuged for 10 minutes at 1000 g in the refrigerated centrifuge (4 °C) (Sorvall RC 5 B – Rotor SM 24) and the supernatant removed to the treatment proposed (Llesuy et al., 1985).

Homogenized plus Pterostilbene and hydroxyl radical generation: Initially, incubated with 500 µL of the supernatant homogenate of heart with 500 µL pterostilbene at doses of 25 and 50 µM, for 1 hour at 37°C. Groups that did not have pterostilbene were treated with distilled water in the same volume. After, it was induced the generation of hydroxyl radical in order to stress the sample. Thus, groups of interest were added 10 µL of FeCl₂, 10 µL of H₂O₂ and 100 µL ascorbic acids. Subsequently incubated for 30 minutes at 37°C according to protocol Halliwell et al (Halliwell, 1990).

Experimental groups: Group Control: heart tissue homogenate. Group P25: heart tissue incubated with 25 µM of pterostilbene. Group P50: heart tissue incubated with 50 µM of pterostilbene. Group Stress: heart tissue submitted to oxidative stress. Group - P25 + Stress: heart tissue incubated with 25 µM of pterostilbene and submitted to oxidative stress. Group - P50 + Stress: heart tissue incubated with 50 µM of pterostilbene and submitted to oxidative stress. For this experiment, used an N = 5 and analyzed the following tests: Carbonyls, TBARS, Nitrites, ROS, CAT, GPx, SOD, and sulfhydryl.

Pterostilbene preparation: The pterostilbene phytochemical (98%) was acquired from Gamma (SP-Brazil). For better dissolution of the substance, developed a complex: pterostilbene - cyclodextrin (Lacerda et al.- Unpublished data).

After was solubilized in culture medium (DMEM) and administered through the treatment at the doses of 50, 100, 150 μ M for cells. For tissue was solubilized the complex distilled water and administered through the treatment at the doses 25 e 50 μ M (Dewi et al., 2014).

Biochemical analysis

Determination of levels of total free radicals (ROS): The concentrations of free radicals in the heart tissue and H9c2 cells were detected by Lebel protocol (1992) which uses the reagent 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence spectrophotometer (Perkin Imer) (McMullen et al., 2004).

The Dosage of reactive substances to thiobarbituric acid (TBA-RS): The thiobarbituric acid reacts with lipid peroxidation products, among which we can mention the malondialdehyde and other aldehydes. Therefore, we heat the homogenate in the presence of thiobarbituric acid and measured by spectrophotometer forming a colored compound. Results were expressed as μ mol de TBA-RS/mg protein (Buege, 1978).

Carbonyl Dosage: This technique is based on the reaction of oxidized proteins with 2,4-dinitro-phenyl hydrazine (DNPH) in acidic medium and a final incubation with guanidine. Therefore, the absorbance of carbonyl was measured in a spectrophotometer at 360 nm. The results were expressed as mg/protein (Reznick, 1994).

Nitrite analysis: Measured nitrite levels in cardiac tissue by Griess reaction (sulfanilamide 1%, 0.1% naphthylethylenediamine, 2.3 mL 85% phosphoric acid) according to the procedure described by Granger et al 1999. Total tissue nitrite was estimated at 540 nm from a standard curve of sodium nitrite (10^8 to 10^{-3} mol/L). Results were expressed in mmol/L (Granger, 1999).

Measure of the activity of antioxidant enzymes: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase.

- i. **Superoxide dismutase (SOD):** This assay is based on the ability to inhibit the autoxidation of pyrogallol by SOD present in the sample. It was used a buffer solution (Tris base at a concentration of 50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L, and HCl to achieve pH 8.2), pyrogallol 24 mmol/L (in 10 mM hydrochloric acid) and the catalase 30 mmol/L. The result was expressed as SOD unit per mg of protein (Marklund, 1985).
- ii. **Catalase (CAT):** According to Aebi technique (1984), the cellular lysate was added hydrogen peroxide and read it immediately in a spectrophotometer at 240 nm. The activity of the enzyme CAT is directly proportional to the rate of decomposition of hydrogen peroxide, according to a kinetic of pseudo-first order. The results were expressed as UCAT per mg/dL protein (Aebi, 1984).
- iii. **Glutathione Peroxidase (GPx):** GPx enzyme catalyzes the reaction of hydroperoxides with reduced glutathione (GSH). The GPx activity was determined by measuring the consumption of NADPH in the oxidation reaction of GSH. The decrease of absorbance of NADPH at 340 nm was observed. The results were expressed in nmol per minute per mg/ protein (Flohé, 1984).

Determination of sulfhydryl: The sulfhydryl groups were dosed by spectrophotometry according to the method of Ellman (Ellman, 1959), modified by Hu (1993). The concentration of sulfhydryl groups was determined using the molar extinction coefficient of the TNB. Results were expressed as $\mu\text{mol/L}$.

Dosage protein by the method described by Lowry: Proteins are quantitated by the method described by Lowry et al. (1951), which defaults to a bovine albumin solution at a concentration of 1 mg/ml. The measure will be realized in a spectrophotometer at 625 nm and the results expressed in mg/mL (Lowry, 1951).

Animals and ethical approval

Male Wistar rats (200 ± 50 g) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. The rats were housed in plastic cages and received pelleted food and water ad libitum. They were kept under standard laboratory conditions (12-h light/dark cycle, controlled temperature of 22 C).

This project was submitted and approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul: registered by protocol number 29835).

Statistic analysis

Parameters were expressed as mean \pm SD for all groups. It realized analysis of variance (one-way ANOVA) followed by post hoc Bonferroni to verify differences between groups. The analyzes were performed using GraphPad Prism 6.0. It was considered significant differences those with $p < 0.05$.

Results

Determination Cell viability

Cell viability was increased in the P50 group compared to other groups (control, P100, and P150) (Figure 1). When H₂O₂ associate to the culture medium after 24 h pretreatment with pterostilbene, had no significant difference in cell viability in P50 + H₂O₂ group compared to the H₂O₂ group. In contrast, the viability of P50 + H₂O₂ group was decreased as compared to the P50 group (Figure 1). Already P100 + H₂O₂ group had decreased viability when compared with the H₂O₂ group, P50 + H₂O₂, and P50 (Figure 1) (p <0.05).

Parameter analysis of damage and oxidative stress

I. Determination of levels of total free radicals (ROS)

In the experiment with cell culture, we did not obtain significant differences in the groups (DMEM, H₂O₂, and P50 + H₂O₂) (Figure 2A). In homogenized cardiac tissue on the other hand, ROS levels were increased in stress, P25 + stress, P50 + stress groups (7 fold, 14 fold and 10 fold) as compared: to control, P25 and P50, respectively. In addition, P25 + Stress showed a decreased ROS levels (51% and 31%) as compared to Stress and P50 + Stress groups, respectively, figure 2B (p<0,05).

II. Reactive substances to thiobarbituric acid (TBA-RS) concentration

By analyzing TBARS, in the experiment with tissue homogenized groups with induced stress (stress, P50 + stress and P25 + stress) showed an increase in TBARS levels when compared to the groups: control (57%) and P50 (98%), which may be seen in figure 3 (p<0.05).

III. Carbonyl concentration measure

Carbonyls were measured in the tissue homogenate. There was an increase 3 fold in the stress group compared to the control group, which may be seen in figure 4 ($p < 0.05$).

IV. Nitrite analysis

Stress groups and P50 + stress behaved in order to increase the amount of nitrite in the samples analyzed by 75% and 89% when compared to the groups: control and P50, respectively (Figure 5) ($p < 0.05$).

Analysis of antioxidants

I. Measure of the activity of antioxidant enzymes: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase

The measurements of enzymatic antioxidant agents, we observed that in the experiment with cell culture activity of SOD showed no significant difference between the proposed groups. However, in the experimental analysis with tissue homogenized, groups P25, P50, Stress showed an increased SOD activity of 93%, 84% and 98%, respectively, as compared to the control group (Figure 6A and 6B) ($p < 0.05$). Regarding to catalase levels, in cells culture experiment, we observed an increase in groups H_2O_2 and P50 + H_2O_2 of 29% and 51%, respectively, as compared to controls (Figure 6C). CAT activity, in tissue homogenate, showed 4 fold decreased the stress group when compared to the control group. CAT levels increased 2 fold in P50 group as compared to group P50 + stress and P25 + stress group, and 3 fold as compared to the Stress group (Figure 6D) ($p < 0,05$). Treatment with pterostilbene showed no difference in glutathione peroxidase (GPx) in cells culture, as shown in figure 6E ($p < 0.05$). When analyzing the effect on homogenized heart, GPx showed decreased by 24% and 68% in groups: Stress and P25, when compared to

control. However, we achieved an increase of GPx of 60% in P50 group compared to the group, P50 + Stress, which we observe in figure 6F ($p < 0.05$).

II. Determination of sulfhydryl

Analysis of non-enzymatic antioxidant, sulfhydryl showed that the cell experiment was increased 2 fold in P50 + H₂O₂ group when compared to the H₂O₂ group. (Figure 7A). When we analyze the experiment with homogenized cardiac tissue, we observed that the groups: P25 +stress and P50 + Stress that sulfhydryl had a 60% and 63% when compared to the groups: P25 and P50, respectively ($p < 0.05$) (Figure 7B).

Discussion

This study aimed to investigate the role of pterostilbene in cardiac cells *in vitro* and in cardiac tissue *in situ* submitted to oxidative stress. It was observed that pterostilbene was able to increase cellular viability and sulphhydriles in cardiac cells. In the cardiac tissue, pterostilbene decreases levels of ROS and increased SOD and CAT. However, this natural compound was not able to modulated antioxidant enzymes on the similar form in both experimental models (Figure 8).

This substance has been well studied in diseases such as cancer, diabetes, fungal infections, among others and has shown significant and satisfactory effects, especially the as antioxidant and anti-inflammatory (Estrela et al., 2013; Kosuru, 2016; Manickam et al., 1997). However, the role of pterostilbene in cardiac has not been investigated in an oxidative stress condition (cardiac cells and cardiac tissue homogenate *in vitro*).

The oxidative stress environment was induced through H₂O₂ incubation on culture cells of cardiomyoblast. In this same sense, the stressed environment was induced in cardiac tissue by hydroxyl radical generation (Halliwell, 1990). The present condition was

able to cause oxidative stress as observed by the increase of ROS, TBA-RS and carbonilas, especially, in the cardiac tissue.

Analyzing cellular viability, we found that the substance increased viability in the lower dose (50 μM), tending the pterostilbene be dose-dependent. Nevertheless, dose of 100 μM did not induce significant elevation in viability. In addition, when H_2O_2 was added to cell culture, the viability of 100 μM + H_2O_2 group was reduced when compared to 50 μM + H_2O_2 and the H_2O_2 groups. Previous studies have also shown that the beneficial action of pterostilbene in cells may be dose-dependent. Pan et al (2014) analyzed pterostilbene in breast cancer cells and found that cell viability decreased with increasing the concentration of the substance. However, such study used doses lower than those applied in this paper (2 μM , 3.75 μM , 7.5 μM , 15 μM , 30 μM and 60 μM) (Pan, 2014). Differently of our study whose main focus was study the role of pterostilbene on healthy cells cardiac. Possibly, breast cells and heart may react differently in relation to substance.

Our results also showed that the pterostilbene is not associated to cellular damage in the cardiomyoblast and heart tissue on low doses. We analyzed markers of lipid damage as TBA-RS that is generated during oxidative stress. Although we have not observed reduction in the TBARS in our experiments, in groups subjected to stress, Lameiro et. Al (2012) found a significant decrease in TBARS in experiments with Wistar rats, showing action pterostilbene. Moreover, we observed a reduction of the nitrites in the cardiac tissue analysis in P25 + stress group pterostilbene meaning that at low doses, protected heart tissue.

In contrast, the groups that were treated with pterostilbene at doses of 25 μM and 50 μM , in both cases - cells and tissue - observed that the oxidative damage markers, as TBA-RS and ROS, were stable and did not undergo change. Moreover, it is important to note that the group treated with 25 μM of pterostilbene and stress induced (P25 + Stress)

showed diminished ROS levels, implying that, in low doses, pterostilbene can be cardioprotective.

Heart tissue cells have a great number of enzymatic antioxidant agent, being elevation of the activity of these markers can be an interesting strategy for maintaining the redox balance in situations of increased oxidative stress (Halliwell, 2012). SOD is responsible for an important defense against superoxide anions. The experiment with cells did not show difference in the SOD. However, our results showed a significant increase in SOD in cardiac tissue groups pterostilbene-treated. It is possible that pterostilbene has action a protective antioxidant by modulation of SOD in cardiac cells. Chiou et al. demonstrated increased SOD activity, in colon cancer cells treated with pterostilbene (Chiou, 2011), the same profile of SOD levels was observed by Wu (2010), in rat liver tissue (Wu, 2010). On the other hand, Wang et al. observed a reduction in SOD in renal tissue by action pterostilbene (Wang et al., 2015).

Catalase and glutathione peroxidase are also important antioxidant enzymatic agents in order to protect organism against oxidative stress. Our findings demonstrate increased CAT activity in the P50 and P25 + stress groups, in cardiac tissue model. The pterostilbene played relevant role on CAT activity, since this molecule has precluded the stress-induced reduction of this enzyme, according our model. Likewise, in the cells culture the P50 + H₂O₂ group showed increased levels. Pari and Satheesh also found a significant increase in CAT in liver of diabetic rats treated with pterostilbene. This is an important result, since diabetes tends to decrease antioxidant enzymes (Pari, 2006). The increase in the CAT seems interesting, especially because our results showed a decrease of GPx in the stressed tissue groups. It is known that GPx acts as an antioxidant defense in low-stress levels and, on the other hand, CAT is stimulate high levels of stress (Skarbek, 2014; Wassmann, 2006).

Catalase is directly involved in the defense of cells and tissue, participating with an important role in the development of tolerance to oxidative stress.

Regarding to non-enzymatic defenses dosage the sulfhydryl, our results showed a decrease in the stressed groups in tissue with pterostilbene (P25 + P50 + stress and stress), which may indicate that non-enzymatic defenses may be affected. Moreover, sulfhydryl, cell experiment, increased significantly in the treatment group and H₂O₂ (P50 + H₂O₂), this result could suggest that the pterostilbene in cells, would be acting to lead to an increase of endogenous stress in order to increase the threshold cells. Thus, we observe a more rapid response in cells when compared to experiment with tissue.

Conclusion

Taken together, our results point that pretreatment with pterostilbene seems to be promising, since there is a positive redox response, not only of healthy cardiomyoblast, but also healthy cardiac tissue. Not with standing, in oxidative environment, the pterostilbene induced antioxidant effect was different between cardiomyoblast and cardiac tissue. According to our results, pretreatment with this polyphenol led to better antioxidant response on heart homogenate than on cell culture. Therefore, in this way, more studies are need, such as in vivo studies, in order to further increase the system complexity and understand the substance fully, since the antioxidant markers increased in the cell experiment and tissue were not the same.

References

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. C. G., Paula, S. O., Minim, V. P. R., J., B. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição*, 23, 629-643.
- Bryan, S., Yang, G., Wang, R., & Khaper, N. (2011). Cystathionine gamma-lyase-deficient smooth muscle cells exhibit redox imbalance and apoptosis under hypoxic stress conditions. *Exp Clin Cardiol*, 16(4), e 36-41.
- Buege, J. A., Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52, 302-310.
- Chabert, P., Fougerousse, A., & Brouillard, R. (2006). Anti-mitotic properties of resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene., 27, 37-46.
- Chiou, Y. S., Tsai, L. M., Nagabhushanam, K., Wang, J. Y., Wu, H. C., Ho, T. C., Pan, H. M. (2011). Pterostilbene Is More Potent than Resveratrol in Preventing Azoxymethane (AOM)-Induced Colon Tumorigenesis via Activation of the NF-E2-Related Factor 2 (Nrf2)-Mediated Antioxidant Signaling Pathway. *J. Agric. Food Chem* 59, 2725-2733.
- Dewi, N. I., Yagasaki, K., & Miura, Y. (2014). Anti-proliferative effect of pterostilbene on rat hepatoma cells in culture. *Cytotechnology*. 67(4):671-80.
- Estrela, J. M., Ortega, A., Mena, S., Rodriguez, M. L., Asensi, M. (2013). Pterostilbene: Biomedical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 50 (3), 65-78.
- Fernandes, R. O., Bonetto, J. H., Baregza, B., de Castro A.L., Puukila, S., Forsyth, H., et al. (2014). Modulation of apoptosis by sulforaphane is associated with PGC-1 α stimulation and decreased oxidative stress in cardiac cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 401(1-2) 61-70

- Flohé, L., Gunzler, W. A. (1984). Assay of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 14-121.
- Granger, D. L., Anstey, N. M., Miller, W. C., Weinberg, J. B. (1999). Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol*, 301, 49-61.
- Gutteridge, J. M. (1999). Does redox regulation of cell function explain why antioxidants perform so poorly as therapeutic agents? *Redox Rep*, 4(3), 129-131.
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*, 70(5), 257-265.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186, 1-85.
- Kosuru, R., Rai. U., Prakash, S., Singh, A., Singh, S. (2016). Promising therapeutic potential of pterostilbene and its mechanistic insight based on preclinical evidence. *European Journal of Pharmacology*, 789, 229-43.
- Lameiro, M. G. S. (2012). Fitoquímicos e atividade metabólica de extratos de amorapreta (*Rubus sp.*) e mirtilo (*Vaccinium sp.*) em ratos Wistar. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Llesuy, S. F., Milei, J., Molina, H., Boveris, A., & Milei, S. (1985). Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori*, 71(3), 241-249.
- Lowry, O. H., Rosebrough, A. L, Farr, A. L., Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biomol. Chem.*, 193, 265-275.
- Mallik, A., Bryan, S., Puukila, S., Chen, A., & Khaper, N. (2011). Efficacy of Pt-modified TiO₂ nanoparticles in cardiac cells. *Exp Clin Cardiol Res Pract*, 16, 6-10.

Manickam, M., Ramanathan, M., Jahromi, M. A., Chansouria, J. P., & Ray, A. B. (1997). Antihyperglycemic activity of phenolics from *Pterocarpus marsupium*. *J Nat Prod*, 60(6), 609-610.

Marklund, S. L. (1985). Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 148, 129–134.

Mathers, C. D., Loncar, D. (2006). Projeções da mortalidade mundial e carga da doença 2002-2030. *Plos Med*, 11, 442.

McCormack, D., McFadden, D. (2013). A Review of Pterostilbene Antioxidant Activity and Disease Modification. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-15.

McMullen, J. R., Shioi, T., Huang, W. Y., Zhang, L., Tarnavski, O., Bisping, E., et al. (2004). The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) pathway. *J Biol Chem*, 279(6), 4782-4793.

Pan, C., Hu, Y., Li, J., Wang, Z., Huang, J., Zhang, S., Ding, L. (2014). Estrogen Receptor- α 36 Is Involved in Pterostilbene Induced Apoptosis and Anti-Proliferation in In Vitro and In Vivo Breast Cancer *PLoS ONE* 9, 15;9(8) e104459.

Pari, L., Satheesh, M. A. (2006). Effect of pterostilbene on hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin- and nicotinamide-induced diabetic rats. *Life Sci*, 79(7), 641-645.

Reznick, A. Z., Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*, 233, 357-363.

Ribeiro, G. A., Cotta, M. M. R., & Ribeiro, R. M. S. (2012). A promoção da saúde e a prevenção integrada dos fatores de risco para doenças cardiovasculares. *saúde coletiva*, 17, 7-17.

Shewchuk, L. J., Bryan, S., Ulanova, M., & Khaper, N. (2010). Integrin b3 prevents apoptosis of HL-1 cardiomyocytes under conditions of oxidative stress. *J Physiol Pharmacol*, 88, 324-330.

Skarbek A. G., C. J., Kostka J., Nowak D., Drygas W., Jegier A., and Kostka T. (2014). Cardiovascular Risk Factors and Total Serum Antioxidant Capacity in Healthy Men and in Men with Coronary Heart Disease. *BioMed Research International*, 2014, 1-8.

Wang, C., Sun, H., Song, Y., Ma, Z., Zhang, G., Gu, X., et al. (2015). Pterostilbene attenuates inflammation in rat heart subjected to ischemia-reperfusion: role of TLR4/NF-kappaB signaling pathway. *Int J Clin Exp Med*, 8(2), 1737-1746.

Wassmann, S., Wassmann, K., Nickenig, G. (2006). Regulation of Antioxidant and Oxidant Enzymes in Vascular Cells and Implications for Vascular Disease *Current Hypertension Reports* 8, 69-78.

Wu, X., Kang, J., Xie, C., Burris, R., Ferguson, E. M., Badger, M. T., Nagarajan, S. (2010). Dietary Blueberries Attenuate Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice by Upregulating Antioxidant Enzyme Expression *The Journal of Nutrition* Nutrition and Disease (1628 - 1632).

FIGURE 1:

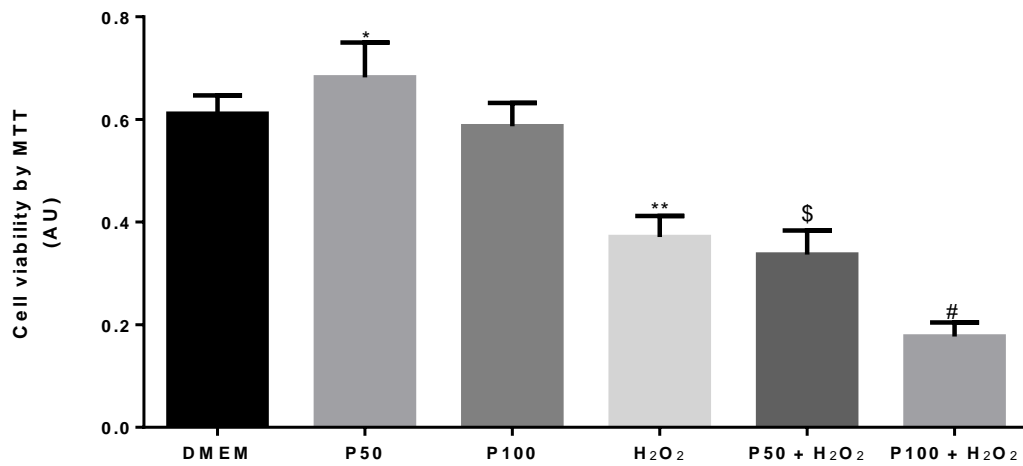


Fig. 1. Cell viability analyses. Colorimetric MTT assay in H9c2 cardiac cells pretreated with pterostilbene (50 μ M – P50, 100 μ M - P100) before incubation with hydrogen peroxide (H_2O_2). AU on the “y” axis means Arbitrary Units. Values are expressed as mean \pm SD.; 8 independent experiments. One-way ANOVA. DMEM = control H9c2 cells without interventions. Comparisons between groups were made using the Bonferroni test. Where * vs. all other groups, # vs. H_2O_2 , P50 + H_2O_2 groups, ** vs. DMEM and P100 groups, \$ vs. P100 group, $p < 0.05$.

FIGURE 2

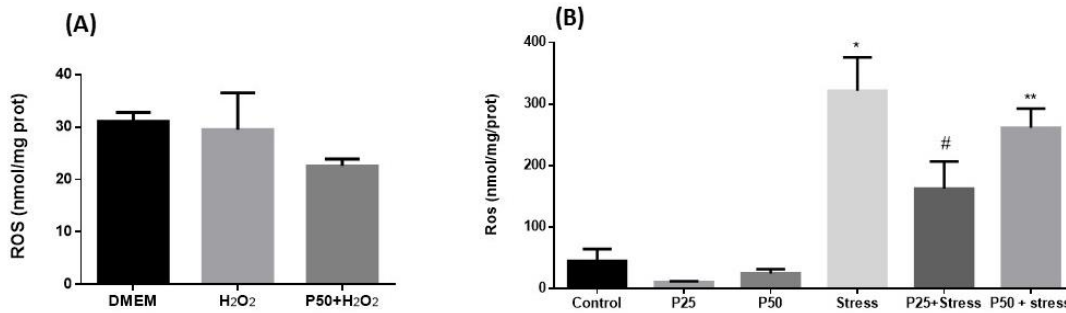


Fig. 2. Oxidative stress determined by total ROS levels. **(A)** In H9c2 cardiac cells pretreated with pterostilbene (50 μ M – P50) before incubation with hydrogen peroxide (H₂O₂). Values are expressed as mean \pm SD; 3 independent experiments. **(B)** Cardiac tissue in vitro pretreated with pterostilbene (25 e 50 μ M) during a period of 1 hour, before oxidative damage induced by hydroxyl radical generator system. Values are expressed as mean \pm SD; 5 independent experiments. One-way ANOVA. Comparisons between groups were made using the Bonferroni test. Where * vs. Control, P25 and P50 group, # vs. Stress, P50+Stress, P25 and P50 groups, ** vs. P25 and P50 groups ($p < 0,05$).

FIGURE 3

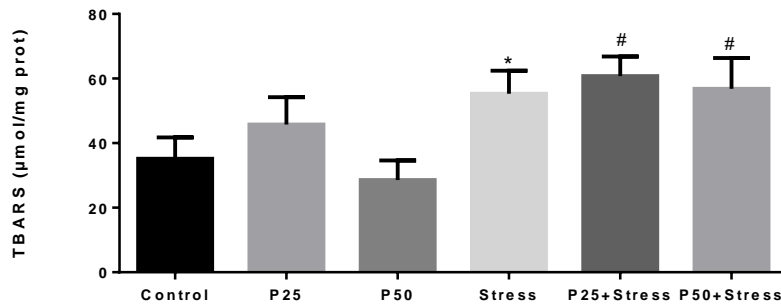


Fig. 3. Lipid peroxidation measured by determination of TBARS in homogenates of right and left ventricle rat, submitted treated with pterostilbene (25 µM – P25 e 50 µM – P50) during a period of 1 hours, before oxidative damage induced by hydroxyl radical generator system. Values are expressed as mean ± SD; 5 independent experiments. One-way ANOVA. Comparisons between groups were made using the Bonferroni test. Where * vs. Control and P50 groups, # vs. P50 group (p <0.05).

FIGURE 4

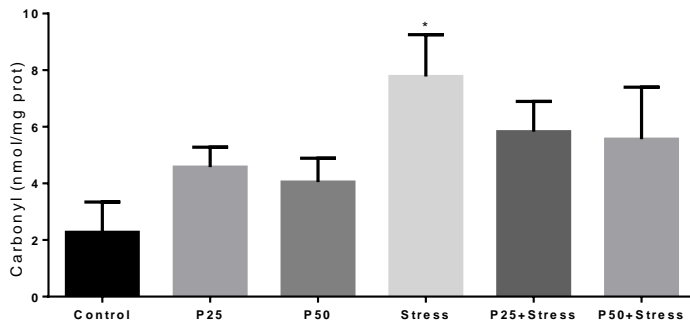


Fig. 4. Protein oxidative damage determined by Carbonyls groups in homogenates of ventricle rat, submitted treated with pterostilbene (25 μ M – P25 e 50 μ M – P50) during a period of 1 hours, before oxidative damage induced by hydroxyl radical generator system. Values are expressed as mean \pm SD; 5 independent experiments. One-way ANOVA. Comparisons between groups were made using the Bonferroni test. Where * vs. Control group ($p < 0.05$).

FIGURE 5

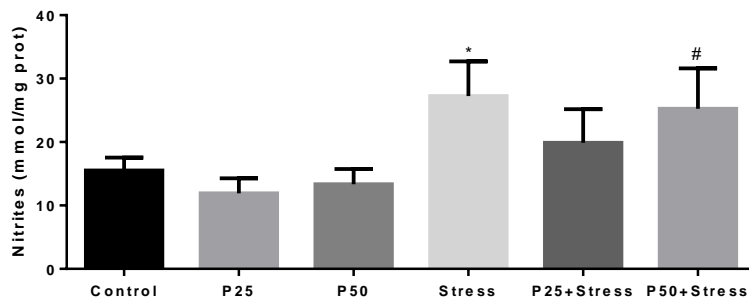


Fig. 5. Analysis of Nitrites by determination in homogenates of right and left ventricle rat, submitted treated with pterostilbene (25 μM – P25 e 50 μM – P50) during a period of 1 hours, before oxidative damage induced by hydroxyl radical generator system. Values are expressed as mean \pm SD; 5 independent experiments. One-way ANOVA. Comparisons between groups were made using the Bonferroni test. Where * vs. Control group, # vs. P25 and P50 groups ($p < 0.05$).

FIGURE 6

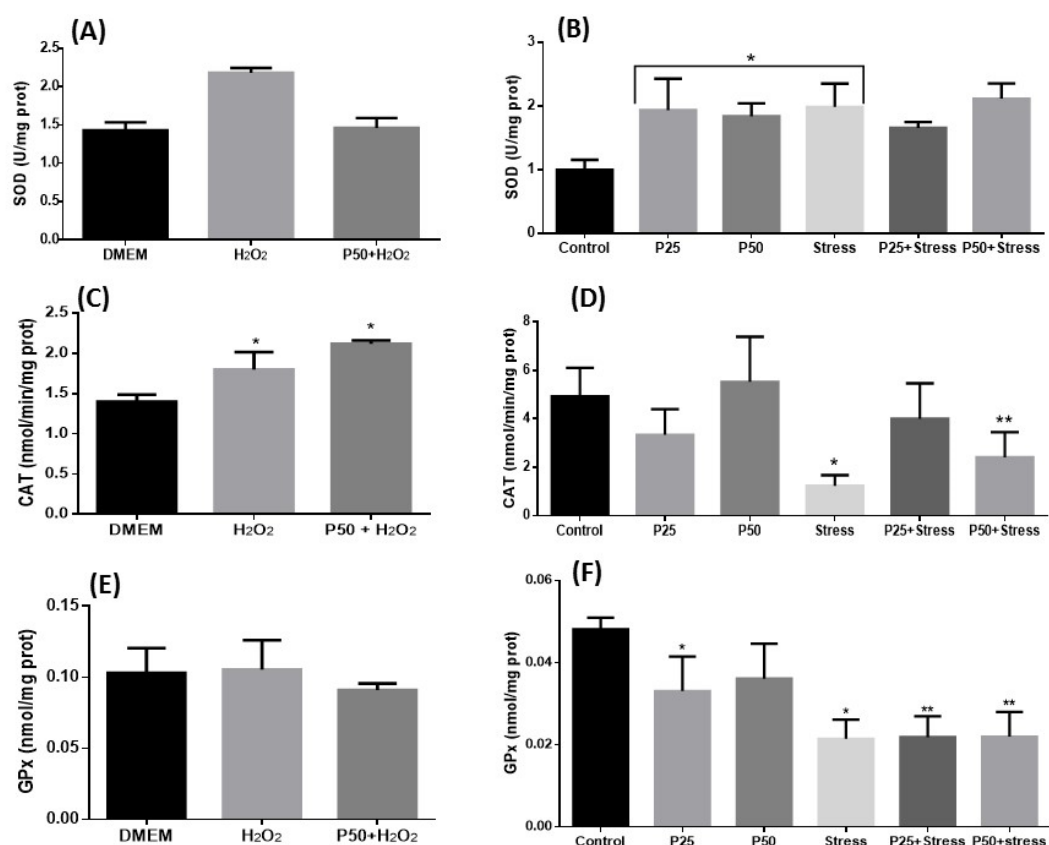


Fig. 6. Analysis of enzymatic antioxidant defenses by measuring superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). **(A) SOD, (C) CAT, (E) GPx** In H9c2 cardiac cells treated with pterostilbene (50 μ M – P50) during a period of 24 hours, before incubation with hydrogen peroxide. Values are expressed as mean \pm SD; 3 independent experiments. One-way ANOVA. Comparisons between groups were made using the Bonferroni test. **(C)** Where * vs. Control group ($p < 0.05$). **(B) SOD, (D) CAT, (F) GPx** In homogenates of right and left ventricle rat, submitted treated with pterostilbene (25 μ M – P25 e 50 μ M – P50) during a period of 1 hours, before oxidative damage induced by hydroxyl radical generator system. Values are expressed as mean \pm SD; 5 independent experiments. One-way ANOVA. Comparisons between groups were made using the Bonferroni test. **(B)** Where: * vs. control group ($p < 0.05$). **(D)** Where * vs. Control and P25 + Stress group, ** vs. P50 group ($p < 0.05$). **(F)** Where * vs. Control group and ** vs. P50 group ($p < 0.05$).

FIGURE 7

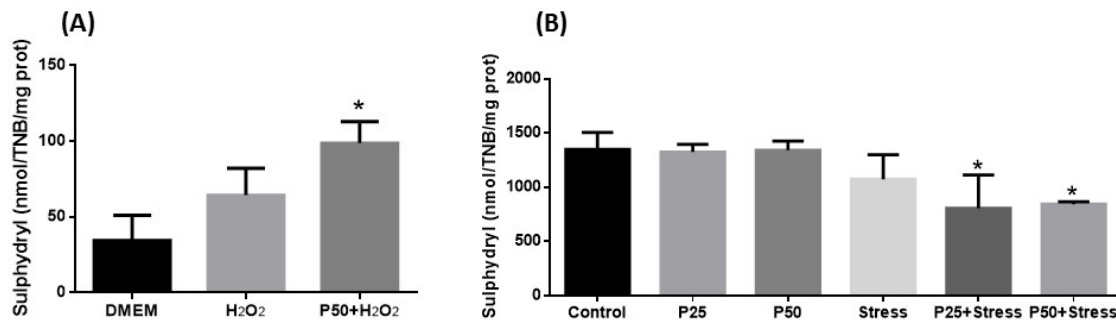


Fig. 7. Analysis of antioxidant defenses non-enzymatic by measuring levels of sulfhydryl. **(A)** In H9c2 cardiac cells treated with pterostilbene (50 μ M) during a period of 24 hours, before incubation with hydrogen peroxide. Values are expressed as mean \pm SD. 3 independent experiments. One-way ANOVA. Comparisons between groups were made using the Bonferroni test. Where * vs. H₂O₂ group (p<0.05). **(B)** In homogenates of right and left ventricle rat, submitted treated with pterostilbene (25 μ M – P25 e 50 μ M – P50) during a period of 1 hours, before oxidative damage induced by hydroxyl radical generator system. Values are expressed as mean \pm SD; 5 independent experiments. One-way ANOVA. Comparisons between groups were made using the Bonferroni test. Where * vs. P25 and P50 groups (p<0.05).

FIGURE 8

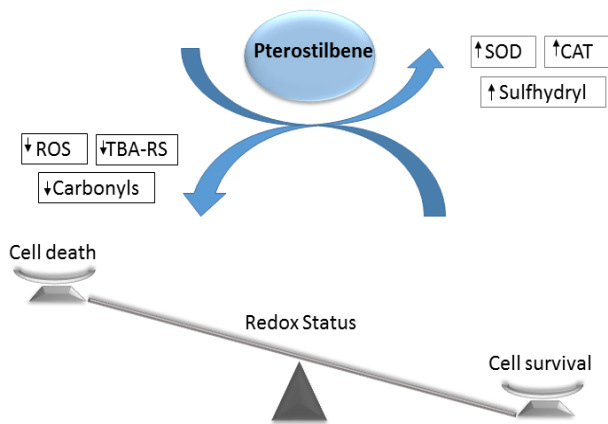


Fig.8. Action of pterostilbene to increasing cell survival and balance redox system. Pterostilbene is increasing enzymatic antioxidant defenses and non-enzymatic, enhances cell survival. Also, concomitantly, decreases pro-oxidizing agents, reducing cell death / damage.

O presente estudo propôs investigar a ação do pterostilbeno como potencial cardioprotetor contra dano oxidativo. Os efeitos antioxidante e anti-inflamatório desta substância são considerados satisfatórios em doenças como câncer, diabetes e micoses. (31, 51, 52). Em células cardíacas e em homogeneizado de tecido cardíaco *in vitro*, no entanto, o mecanismo protetor do pterostilbeno ainda permanece pouco explorado. Deste modo, objetivou-se analisar a ação antioxidante do pré-tratamento com pterostilbeno não sobre somente cardiomioblastos (em cultura de células), mas também em tecido cardíaco com células adultas submetidos ao dano oxidativo. A alteração da homeostase redox foi estabelecida de duas maneiras distintas: inicialmente, por meio da incubação com peróxido de hidrogênio (no modelo de cultura de cardiomioblastos); posteriormente, pela geração do radical hidroxil em homogeneizado de tecido cardíaco, conforme método descrito por Halliwell e colaboradores (49).

Nossos resultados demonstraram que o pterostilbeno aumentou a viabilidade, na menor dose administrada (50 μM), no experimento com células, corroborando com os achados de Pan e colaboradores (2014), os quais, também observaram a diminuição da viabilidade celular ao aumentar a concentração da substância. Estes autores, entretanto, analisaram pterostilbeno em células cancerígenas da mama as quais têm metabolismo muito diferente quando comparadas com células saudáveis (53). Dados da literatura também mostram que a ação benéfica do pterostilbeno, em células, pode ser dose-dependente. Estes estudos, entretanto, utilizaram doses inferiores as nossas (2, 3,7, 7,5, 15, 30 e 60 μM) (54). Porém, estes achados foram em células malignas, e o nosso estudo foi baseado na utilização de células sadias, submetidas ao pterostilbeno previamente ao dano. As diferentes respostas à ação do pterostilbeno podem ser parcialmente explicadas pelos diversos e distintos modelos experimentais estudados. Pterostilbeno também não

levou ao aumento significativo na viabilidade quando acrescentamos H₂O₂. Observamos uma diminuição na viabilidade quando comparamos os grupos com dose de 50 µM sem estresse com os submetidos ao estresse. Diante dos resultados obtidos, pode-se inferir que o efeito do pterostilbeno, em células híidas, parece não ser lesivo aos cardiomioblastos e ao tecido cardíaco adulto em baixas concentrações.

Com relação aos marcadores de dano oxidativo a lipídios e proteínas, analisamos TBA-RS e carbonilas, respectivamente, gerados durante o processo oxidativo celular. No nosso estudo, estes marcadores aumentaram apenas nos grupos estressados, indicando que os métodos de indução ao dano oxidativo foram plenamente efetivos. Do mesmo modo, os níveis de nitritos e ERO total também apresentaram aumento significativo nos grupos estressados, reforçando a efetividade dos modelos de estresse desenvolvidos neste estudo. Apesar de não termos observado diminuição de TBA-RS em nossos experimentos, LAMEIRO *et al* (2012) encontraram diminuição significativa do TBA-RS em experimentos com ratos Wistar, demonstrando uma ação protetora do pterostilbeno contra dano oxidativo a lipídeos (55). Além disso, quando observamos os resultados de nitritos, podemos notar uma diminuição do grupo 25 uM + stress o que pode inferir uma proteção do pterostilbeno, visto que o modelo de estresse ao qual este foi submetido tem por princípio a oxidação do ferro e, assim, a formação de nitritos. Por este aspecto, a substância protegeu o tecido da formação de nitritos.

Em contrapartida, nos grupos que foram tratados apenas com pterostilbeno nas doses de 25µM e 50µM, em ambos os casos – células e tecido – observamos que os marcadores de dano oxidativo se mantiveram estáveis, não sofrendo alteração. Ainda, é importante salientar que o grupo tratado com 25µM de pterostilbeno e com estresse induzido (grupo: P25+Stress) mostrou uma diminuição na dosagem de ROS total, inferindo que em doses baixas, o pterostilbeno pode ser eficaz.

Células e tecido cardíaco possuem uma variedade de agentes antioxidantes enzimáticos. A SOD é responsável por um importante sistema de defesa contra ânios superóxido. Funciona reduzindo esses radicais em H_2O_2 (56). Nosso experimento apresentou um aumento significativo na atividade da SOD, em tecido cardíaco, dos grupos tratados com pterostilbeno. Tanto nos grupos estressados quanto naqueles que possuíam apenas o pterostilbeno. No entanto, no experimento com células não observamos aumento da atividade da SOD, a qual se manteve igual ao controle. Chiou *et al.* 2011 também observaram um aumento da atividade da SOD, com pterostilbeno em células de câncer de cólon (57), o mesmo que foi observado por Wu *et. al* 2010, em fígados de ratos (58). Por outor lado, Wang *et al* 2015, observaram uma diminuição da atividade da SOD em seus estudos com córtex renal de ratos (37). É possível que pterostilbeno tenha, juntamente com o estresse, induzido o aumento da SOD, já que os grupos que possuíam apenas a substância também produziram um aumento desta enzima. Podendo, assim, sugerir uma possível ação do efeito hormético, ou seja, a indução do estresse a fim de estimular ação endógena antioxidante.

Catalase e GPx também são agentes enzimáticos antioxidantes importantes para proteção do organismo frente ao estresse oxidativo. A catalase é uma defesa eficaz quando as células são desafiadas à elevadas concentrações de peróxido de hidrogênio, em uma condição de alto nível de estresse oxidativo (56). Ela é especialmente importante quando atividade da GPx está limitada ou reduzida (56). Nossos achamos demonstraram um aumento na CAT, no experimento em tecido, no grupo tratado com a dose de 50 μ M sem estresse associado e no grupo P25+stress e, nas células, no grupo P50+ H_2O_2 . Este aumento da CAT parece relevante, especialmente, porque nossos dados mostraram diminuição da GPx nos grupos estressados do experimento com tecido. Sabe-se que GPx, diferentemente da CAT, atua como defesa antioxidante em níveis de baixo de estresse (59).

Dessa forma, a catalase pode estar desempenhando um papel importante no desenvolvimento de tolerância ao estresse oxidativo, sendo assim, uma resposta adaptativa ao estresse gerado. Pari and Satheesh (2006) também encontraram aumentos significativos na CAT nos fígados de ratos diabéticos tratados com pterostilbeno, resultado importante, visto que a diabetes tende a diminuir essas enzimas (60).

Com relação aos componentes de defesa não-enzimáticos das células analisamos as sulfidrilas. Nossos resultados mostraram diminuição nos grupos estressados, em tecido, com pterostilbeno (P25+stress e P50+stress), podendo este dado indicar que as defesas não-enzimáticas não estejam sendo estimuladas pelo pterostilbeno. Por outro lado, sulfidrilas, no experimento celular, aumentaram significativamente no grupo com tratamento e H_2O_2 (P50+ H_2O_2). Este resultado sugere que o pterostilbeno, em células, estaria agindo de forma a levar a um aumento de estresse endógeno a fim de aumentar o limiar das células. Assim, observa-se uma resposta mais rápida nas células quando comparado ao experimento com tecido.

Mediante os resultados obtidos podemos concluir que o pterostilbeno em tratamentos *in vitro*, sem associação com estresse, teve ação benéfica, pois este aumentou as defesas antioxidantes enzimáticas como a SOD (homogeneizado) e CAT (células e homogeneizado). A substância, entretanto, não conseguiu reverter os efeitos de dano oxidativo de forma integral, mas quando observamos os grupos submetidos ao estresse tratados com 25 μM de pterostilbeno ocorre redução de relevantes parâmetros pró-oxidativos. Por outro lado, em decorrências das diferentes respostas, das células isoladas e do tecido cardíaco, à ação do pterostilbeno, são necessários mais estudos, como estudos *in vivo*, a fim de aumentar a complexidade do sistema e entender a ação da substância de forma plena.

1. Saúde OMD. Relatório Mundial sobre doenças não transmissíveis 2010 Genebra. 2011.
2. Mathers CD LD. Projeções da mortalidade mundial e carga da doença 2002-2030. *Plos Med* 2006; 11:442.
3. Stone S. Z. YT, Bagchi M., Chatterjee A., Vinson J. A. and Bagchi D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food* 2007; 51:675 – 83.
4. Ribeiro GA, Cotta MMR, Ribeiro RMS. A promoção da saúde e a prevenção integrada dos fatores de risco para doenças cardiovasculares. *Saúde coletiva* 2012; 17:7-17.
5. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*2009 Mar;73(3):411-8.
6. Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*2004 Nov 12;95(10):957-70.
7. A.L.A. Ferreira LSM. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista associação médica brasileira* 1997; 43:61-8
8. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*2002 Jan;82(1):47-95.
9. Green K BM, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes journal* 2004; 53:110-8

10. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*2007;39(1):44-84.
11. Halliwell B. G, J.M.C. *Free Rad in Biology and Medicine* 2007.
12. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*1986 May 1;246(2):501-14.
13. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*2007 Jan;87(1):315-424.
14. Barbosa K. B. F. CNMB, Alfenas R. C. G., Paula S. O., Minim V. P. R., Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição* 2010; 23:629-43.
15. Welch KD, Davis TZ, Van Eden ME, Aust SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med*2002 Apr 1;32(7):577-83.
16. Fernandes R.O. BJH, Baregza B., de Castro A.L., Puukila S., Forsyth H., Schenkel P. C., Llesuy S. F., Brum I.S., Araujo A. S., Khaper N., Belló-Klein A., . Modulation of apoptosis by sulforaphane is associated with PGC-1 α stimulation and decreased oxidative stress in cardiac cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*2014.
17. Patterson CE, Rhoades, R.A. Protective role of sulfhydryl reagents in oxidant lung injury. 1988;14:1005-19.
18. Monostori P, Wittmann, G., Karg, E., Túri, S. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. *journal of chromatography B*2009;877(28):3331-46.
19. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*2008 Aug;10(8):1343-74.

20. Kim D. E. KB, Shin H. S., Kwon H. J., Park E. S. The protective effect of hispidin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells through Akt/GSK-3 β and ERK1/2 signaling pathway experimental cell research 2014.
21. Kinsella J.E. FEN, German J.B., Kanner J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. Food Thecnology 1993; 47:85-9.
22. Duthie G. G. GPT, Kyle J. A. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? Cambridge jornal 2003; 62:599-603.
23. Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. Mol Aspects Med Dec;31(6):435-45.
24. Heber D. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. J Postgrad Med 2004 Apr-Jun;50(2):145-9.
25. Rodrigo R, Miranda A, Vergara L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. Clin Chim Acta Feb 20;412(5-6):410-24.
26. Dell'Agli M, Galli GV, Vrhovsek U, Mattivi F, Bosisio E. In vitro inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. J Agric Food Chem 2005 Mar 23;53(6):1960-5.
27. Soobrattee M. A. NVS, Luximon-Ramma A., Aruoma O. I., Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 2005; 579:200-13.
28. Ross J. A. KCM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. Annual Review of Nutrition 2002; 22:19-34.
29. Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. Biochim Biophys Acta 2011 Jul;1812(7):719-31.

30. Kaspar JW, Jaiswal AK. Antioxidant-induced phosphorylation of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of Bach1 that allows Nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression. *J Biol Chem* 2010 Jan 1;285(1):153-62.
31. Estrela JM, Ortega A, Mena S, Rodriguez ML, Asensi M. Pterostilbene: Biomedical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2013 May-Jun;50(3):65-78.
32. McCormack D. MD. A Review of Pterostilbene Antioxidant Activity and Disease Modification *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013:1-15.
33. Chabert P. FA, Brouillard R. Anti-mitotic properties of resveratrol analog (Z) - 3,5,4'-trimethoxystilbene. 2006;27:37-46.
34. Lin HS, Yue BD, Ho PC. Determination of pterostilbene in rat plasma by a simple HPLC-UV method and its application in pre-clinical pharmacokinetic study. *Biomed Chromatograf* 2009 Dec;23(12):1308-15.
35. McCormack MD, David McFadden M.D. Pterostilbene and Cancer: Current Review. *Journal of Surgical* 2011; 173:53-61.
36. Remsberg CM, Yanez JA, Ohgami Y, Vega-Villa KR, Rimando AM, Davies NM. Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. *Phytother Res* 2008 Feb;22(2):169-79.
37. Wang C, Sun H, Song Y, Ma Z, Zhang G, Gu X, et al. Pterostilbene attenuates inflammation in rat heart subjected to ischemia-reperfusion: role of TLR4/NF-kappaB signaling pathway. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(2):1737-46.
38. Freshney RI. culture of animal cells. A manual of basic technique 1994;3.
39. Korke R, Rink A, Seow TK, Chung MC, Beattie CW, Hu WS. Genomic and proteomic perspectives in cell culture engineering. *J Biotechnol* 2002 Mar 14;94(1):73-92.

40. Hunter-Cevera JC, Belt A. Preservation and Maintenance of Cultures Used in Biotechnology. academic press1996.
41. Lewis AM, Jr., Alling DW, Banks SM, Soddu S, Cook JL. Evaluating virus-transformed cell tumorigenicity. J Virol Methods1999 Apr;79(1):41-50.
42. Rhim JS. Development of human cell lines from multiple organs. Ann N Y Acad Sci 2000; 919:16-25.
43. Park ES, Kang J. C., Jang Y. C., Park J. S., Jang S. Y., Kim D. E., Kim B., Shin H. S. Cardioprotective effects of rhamnetin in H9c2 cardiomyoblast cells under H₂O₂-induced apoptosis. journal of ethno-pharmacology2014;153:552-60.
44. Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. Exp Cell Res1976 Mar 15;98(2):367-81.
45. McCormack D, McFadden, D. A Review of Pterostilbene Antioxidant Activity and Disease Modification. Oxidative. Medicine and Cellular Longevity2013:1-15.
46. Gutteridge JM. Does redox regulation of cell function explain why antioxidants perform so poorly as therapeutic agents? Redox Rep1999;4(3):129-31.
47. Kim DE, Kim B, Shin HS, Kwon HJ, Park ES. The protective effect of hispidin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells through Akt/GSK-3beta and ERK1/2 signaling pathway. Exp Cell Res2014 Oct 1;327(2):264-75.
48. Zhang F. HB, Zhao Y., Tang S., Xu H., Wang L., Liang R., and Yang H. BNC Protects H9c2 Cardiomyoblasts from H₂O₂-Induced Oxidative Injury through ERK1/2 Signaling Pathway. Hindawi Publishing Corporation2013.
49. Halliwell B, Gutteridge, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol 1990; 186:1-85.
50. Dunford HB. Free radicals in iron-containing systems. Free Radic Biol Med1987;3(6):405-21.

51. Manickam M, Ramanathan M, Jahromi MA, Chansouria JP, Ray AB. Antihyperglycemic activity of phenolics from *Pterocarpus marsupium*. *J Nat Prod* 1997 Jun;60(6):609-10.
52. Kosuru R, Rai. U., Prakash,S., Singh, A., Singh, S. Promising therapeutic potential of pterostilbene and its mechanistic insight based on preclinical evidence. *European Journal of Pharmacology* 2016.
53. Golubnitschaja O. Cell cycle checkpoints: the role and evaluation for early diagnosis of senescence, cardiovascular, cancer, and neurodegenerative diseases. *Amino Acids* 2007;32(3):359-71.
54. Pan C, Hu, Y., Li, J., Wang, Z., Huang, J., Zhang, S., Ding, L. Estrogen Receptor- α Is Involved in Pterostilbene Induced Apoptosis and Anti-Proliferation in In Vitro and In Vivo Breast Cancer *PLoS ONE* 9 2014.
55. Lameiro MGS. Fitoquímicos e atividade metabólica de extratos de amorapreta (*Rubus* sp.) e mirtilo (*Vaccinium* sp.) em ratos Wistar. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas; 2012.
56. Wassmann S, Wassmann, K., Nickenig, G. Regulation of Antioxidant and Oxidant Enzymes in Vascular Cells and Implications for Vascular Disease *Current Hypertension Reports* 2006; 8: 69-78.
57. Chiou YS, Tsai, L. M., Nagabhushanam, K., Wang, J. Y., Wu, H. C., Ho,T. C., Pan, H. M. Pterostilbene Is More Potent than Resveratrol in Preventing Azoxymethane (AOM)-Induced Colon Tumorigenesis via Activation of the NF-E2-Related Factor 2 (Nrf2)-Mediated Antioxidant Signaling Pathway. *J Agric Food Chem* 2011; 59:2725-33.
58. Wu X, Kang, J., Xie, C., Burris, R., Ferguson, E. M., Badger, M. T., Nagarajan, S. Dietary Blueberries Attenuate Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice by

Upregulating Antioxidant Enzyme Expression The Journal of Nutrition Nutrition and Disease
2010(1628 - 1632).

59. Wassmann S, Wassmann, K., Nickenig, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. hypertension 2004;44:381-6.

60. Pari L, Satheesh, M. A. Effect of pterostilbene on hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin- and nicotinamide-induced diabetic rats. Life Sci 2006 Jul 10;79(7):641-5.