



**VICTOR MASO**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS E  
FARMACOLÓGICOS DA QUERCETINA EM CÉLULAS DE  
PACIENTES COM MIELODISPLASIA E LEUCEMIA  
MIELOIDE AGUDA**

**CAMPINAS**

**2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**VICTOR MASO**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS DA  
QUERCETINA EM CÉLULAS DE PACIENTES COM MIELODISPLASIA E LEUCEMIA  
MIELOIDE AGUDA**

**orientadora: Sara Teresinha Olalla Saad**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de doutor em Fisiopatologia Médica na área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

este exemplar corresponde à versão final da tese de doutorado defendido pelo aluno Victor Maso e orientado pela profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

Assinatura do orientador

.....

**Campinas**

**2014**

iii

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M381i Maso, Victor, 1984-  
Investigação dos efeitos biológicos e farmacológicos da quercetina em células de pacientes com mielodisplasia e leucemia mieloide aguda / Victor Maso. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Sara Teresinha Olalla Saad.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Quercetina. 2. Apoptose. 3. Ciclo celular. 4. Autofagia. 5. Leucemia. I. Saad, Sara Teresinha Olalla, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Investigation of the biological and pharmacological effects of quercetin in cells of patients with myelodysplasia and acute myeloid leukemia

**Palavras-chave em inglês:**

Quercetin  
Apoptosis  
Autophagy  
Leukemia  
Cell cycle

**Área de concentração:** Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

**Titulação:** Doutor em Fisiopatologia Médica

**Banca examinadora:**

Sara Teresinha Olalla Saad [Orientador]  
Mary Ann Foglio  
Joao Ernesto de Carvalho  
Gisele Wally Braga Colleoni  
Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso

**Data de defesa:** 08-10-2014

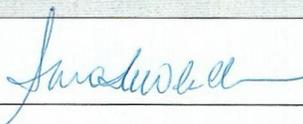
**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**  
**VICTOR MASO**

Orientador (a) PROF(A). DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD

**MEMBROS:**

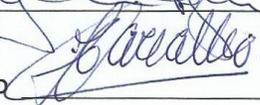
1. PROF(A). DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD



2. PROF(A). DR(A). MARY ANN FOGLIO



3. PROF(A). DR(A). JOAO ERNESTO DE CARVALHO



4. PROF(A).DR(A). GISELE WALLY BRAGA COLLEONI



5. PROF(A).DR(A). ELVIRA DEOLINDA RODRIGUES PÉREIRA VELLOSO



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 08 de outubro de 2014



## RESUMO

Síndromes mielodisplásicas (SMD) abrangem um espectro de doenças hematológicas caracterizadas por hematopoese ineficaz e risco de evolução para leucemia mieloide aguda (LMA). As leucemias agudas apresentam altas taxas de mortalidade devido, principalmente, à sua capacidade de resistir a diversos tipos de quimioterápicos, sendo necessário buscar novos compostos capazes de interferirem no crescimento tumoral.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da quercetina *in vitro* e *in vivo*, na linhagem celular P39/Tsugane, a qual foi estabelecida a partir de células leucêmicas do sangue periférico de paciente que possuía síndrome mielodisplásica, como modelo. O desenho experimental compreendeu o tratamento *in vitro* e *in vivo* com quercetina das células leucêmicas, verificando-se vias de apoptose, ciclo celular e autofagia. O modelo xenográfico de tumor de células leucêmicas subcutâneo foi utilizado para os ensaios *in vivo*. A quercetina induziu pronunciada apoptose das células leucêmicas P39, seguida por supressão da expressão de Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, aumento da expressão de Bax e modulação do potencial de membrana mitocondrial com liberação de citocromo c e ativação de caspases. O tratamento com quercetina resultou em retenção das células na fase G1 do ciclo celular, com pronunciada diminuição das proteínas CDK2, CDK6, ciclina D, ciclina E e ciclina A, diminuição na fosforilação de Rb e aumento na expressão de p21 e p27. Quercetina induziu a formação do autofagossomo nas células P39, com ativação de PI3K classe III, Beclina 1, Atg5-Atg12, Atg7, conversão de LC3-I em LC3-II e desfosforilação de Akt e mTOR. A inibição da autofagia induzida por cloroquina juntamente com quercetina

desencadeou aumento na apoptose, mas não alterou a modulação da fase G1 do ciclo celular induzida por quercetina. As células P39 tratadas com a combinação de quercetina e inibidores seletivos de ERK1/2 e/ou JNK (PD184352 e SP600125, respectivamente) apresentaram diminuição na retenção em fase G1 do ciclo, Este tratamento combinado, entretanto, não alterou a percentagem de células apoptóticas. Além disso, administração *in vivo* de quercetina reduziu significativamente o volume tumoral em camundongos inoculados com células P39 e confirmar os resultados *in vitro* relacionados com apoptose, autofagia e ciclo celular.

Assim, quercetina demonstra uma potente atividade antileucêmica através de sinalizações que causam parada do ciclo celular, apoptose e indução da autofagia. Esta última, por sua vez, parece proteger as células do alto grau de apoptose.

**Palavras-chaves:** quercetina, apoptose, ciclo celular, autofagia e leucemia

## ABSTRACT

This study proposes to investigate quercetin antitumor efficacy *in vitro* and *in vivo*, using P39 cell line as a model.

The experimental design comprised leukemic cells or xenografts of P39 cells, treated *in vitro* or *in vivo*, respectively, with quercetin; apoptosis, cell cycle and autophagy activation were then evaluated.

Quercetin caused pronounced apoptosis in P39 leukemia cells, followed by Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 downregulation, Bax upregulation and mitochondrial translocation, triggering cytochrome c release and caspases activation. Quercetin also induced the expression of FasL protein. Furthermore, our results demonstrated an antioxidant activity of quercetin. Quercetin treatment resulted in an increased cell-arrest in G1 phase of the cell cycle, with pronounced decrease in CDK2, CDK6, cyclin D, cyclin E and cyclin A proteins, decreased Rb phosphorylation and increased p21 and p27 expression. Quercetin induced autophagosome formation in P39 cell line, with upregulation of PI3K class III proteins, Beclin-1, Atg5-Atg12, Atg7, conversion of LC3-I to LC3-II, and dephosphorylation of Akt and mTOR. Autophagy inhibition induced by quercetin with chloroquine triggered apoptosis but did not alter quercetin modulation in the G1 phase. P39 cell treatment with a combination of quercetin and selective inhibitors of ERK1/2 and/or JNK (PD184352 or SP600125 respectively), significantly decreased cells in G1 phase, this treatment however did not change the apoptotic cell number. Furthermore, *in vivo* administration of quercetin significantly reduced tumor volume in P39 xenografts and confirmed *in vitro* results regarding apoptosis, autophagy and cell cycle arrest.

**Keywords:** quercetin, apoptosis, cell cycle, autophagy and leukemia



# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	xiii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Atividade Antioxidante .....	31
1.2 Atividade Antiproliferativa .....	34
1.3 Atividade Apoptótica .....	37
1.4 Atividade no Processo Autofágico .....	40
2. OBJETIVOS .....	45
2.1 Objetivo principal .....	45
2.2 Objetivos específicos.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1 Reagentes e anticorpos.....	46
3.2 Tratamento in vitro com quercetina .....	46
3.3 Análise de viabilidade celular .....	48
3.4 Marcação com acridina laranja para detecção de autofagia.....	48
3.5 Análise da atividade de caspases.....	48
3.6 Detecção de apoptose por citometria de fluxo.....	49
3.7 Análise do ciclo celular .....	49
3.8 Análise de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	49
3.9 Medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ m).....	50
3.10 Medida da liberação de citocromo c .....	50
3.11 Análise por Western Blot .....	50
3.12 Modelo xenográfico de tumor humano .....	51
3.13 Imunohistoquímica.....	52
3.14 Análise estatística.....	52
4. RESULTADOS .....	53
4.1 Quercetina induz citotoxicidade e apoptose em células P39.....	53

4.2 Quercetina bloqueia o ciclo celular na fase G1 e reduz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	58
4.3 Ativação de MAP quinases participa da modulação da fase G1 promovida pela quercetina .....	61
4.4 Quercetina induz autofagia em células P39 .....	63
4.5 Quercetina inibe a sinalização Akt-mTOR.....	64
4.6 Autofagia induzida pela quercetina é protetora da morte celular .....	65
4.7 Quercetina reduz crescimento celular em modelo xenográfico de tumor humano.....	67
4.8 Quercetina modula sinalização ERK/JNK e Akt-mTOR em modelo xenográfico de tumor humano .....	70
4.9 Quercetina modula apoptose em modelo xenográfico de tumor humano	72
4.10 Alteração das proteínas do ciclo celular em modelo xenográfico de tumor humano.....	75
4.11 Quercetina modula o processo autofágico em modelo xenográfico de tumor humano .....	78
5. DISCUSSÃO .....	80
6. CONCLUSÕES.....	89
7. REFERÊNCIAS .....	90

## ***AGRADECIMENTOS***

Ao amor da minha vida, Andrana, por todos os momentos ao meu lado, pelo amor, carinho, dedicação e apoio. Ao meu filho Joaquim, que renova a cada minuto minha razão de viver;

À minha mãe, Ivete, que sempre me revestiu de amor, carinho e dedicação. Por estar sempre pronta para uma palavra amiga, me acolhendo em momentos de aflição e vibrando e se orgulhando a cada desafio vencido;

Ao meu pai Santo, pelas oportunidades, pelo incentivo;

À minha irmã, minha amiga, Emanoella. Por seu amor incondicional e por estar sempre presente na minha vida. E também aos meus queridos compadres Andressa e Talui pela grande amizade;

À querida professora Sara, pela amizade, pelos conselhos, por todas as oportunidades e pelo crescimento científico;

Aos meus sogros Ires e Maria de Lourdes pelo carinho e apoio;

Aos meus amigos Thiago, Pedro, Mariana, Juliana, Matheus, João Kleber, Ana Leda, Irene, Aline, Pablo, Karla, Juares, Renata, Gilberto e aos outros que encontramos ao longo dessa caminhada, pela grande amizade, ajuda e apoio;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo incentivo financeiro e científico;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais esta etapa vencida na minha vida.





figura 7: Processo autofágico. A autofagia é iniciada com a interação entre as proteínas beclina-1 e PI3K classe III formando uma membrana inicial chamada de fagóforo, necessária para o englobamento das partículas que serão degradadas. Para o alongamento e formação da vesícula autofágica chamada autofagossomo são necessárias a ativação da junção proteica Atg5-Atg12 e transformação de LC3-I em LC3-II, a proteína Atg7 é responsável pela transformação. Após a formação do autofagossomo contendo os constituintes que serão degradados, ocorre a fusão dessa vesícula com lisossomo – formação do autolisossomo. O lisossomo libera suas enzimas necessárias para a decomposição dos constituintes. ....42

figura 8: Cariótipo representativo de células P39. Todas as metáfases apresentaram cariótipo 46,XY, + del(6), -9, -16, -17, +2 mar.....47

figura 9: Quercetina induz citotoxicidade e apoptose em células P39. Viabilidade celular e apoptose de células P39 tratadas com diferentes doses de quercetina após 12, 24 e 48 horas foram analisados por MTT análise colorimétrica ou Anexina V-FITC/PI citometria de fluxo. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes.\* p < 0,05; \*\* p < 0,0001.....544

Figura 10: Quercetina induz FAS ligante e diminui o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) em células P39. Células P39 foram tratadas com 10, 50 e 100uM de quercetina por 24 horas e marcadas com rodamina 123 ( 200 ug/mL). A expressão proteica de FAS ligante e FAS receptor foi analisada por western blotting. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes.\* p < 0,05; \*\* p < 0,0001. ....555

figura 11: Quercetina induz apoptose por diminuição de proteínas antiapoptóticas e libera citocromo c. Células P39 foram tratadas com 10, 50 e 100uM de quercetina por 24 horas BcL-2, BcL-xL. Bax e McL-1 e liberação de citocromo c foram analisadas por western blotting.Gliceraldeido-3-fosfato deidrogenase (GAPDH), canal iônico dependente de voltagem (VDAC) e actina foram usados como controles internos. Todos os dados são representados por 3 experimentos independentes. ....56

figura 12: Quercetina modula ativação de caspases. Células P39 foram tratadas com 10, 50 e 100uM de quercetina por 24 horas . A atividade de caspase-3, -8 e -9 foi analisada por citometria de fluxo e a clivagem de pró-caspase-3 foi determinada por western blotting. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes.\* p < 0,05; \*\* p < 0,0001.57

figura 13: Quercetina bloqueia o ciclo celular e modula a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Após tratamento com 10, 50 e 100 uM de

quercetina a distribuição do ciclo celular de acordo com seu teor de DNA foi revelado por PI (20 ug/mL) utilizando citometria de fluxo. A produção intracelular de EROs foi estimulado por TBHP (100uM), quantificada por marcação com 25 uM de DCFDA através de citometria de fluxo. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes.\* p < 0,05; \*\* p < 0,0001; # p< 0.001 vs TBHP.....59

figura 14: Quercetina retém as células na fase G1 com modulação de ciclinas, Cdks, inibidores de Cdks e Rb. Após tratamento com 10, 50 e 100 uM de quercetina a expressão proteica de ciclinas -D, -E e -A; Cdk-4, -6 e -2; p27, p21 e fosforilação de Rb foi analisada por western blotting. Actina foi utilizada como controle interno. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes. ....600

figura 15: Ativação de ERK e JNK participa do aprisionamento das células em fase G1 induzido por quercetina. Após tratamento com 10, 50 e 100 uM de quercetina a fosforilação de ERK Thr183/Tyr187 e JNK Thr183/Tyr185 foi analisada por western blotting. Células P39 foram pré-tratadas por 1 hora com PD184352 (20uM) e/ou com SP600125 (20uM), em seguida, incubadas com 50uM de quercetina durante 24 horas. Após tratamento, células foram marcadas com anexina V/PI ou PI (20 ug/mL) para avaliação da percentagem de células apoptóticas e ciclo celular, utilizando citometria de fluxo. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes. \* p< 0.05; \*\* p< 0.0001, # p< 0.05 vs quercetina.....622

figura 16: Quercetina induz autofagia em células P39. Após tratamento com 10, 50 e 100 uM de quercetina, células foram A) coradas com acridina laranja(AO) e analisadas por citometria de fluxo. B) expressão proteica de PI3K classe III, beclina-1, Atg7, Atg5-Atg12 e LC3 I/II foi analisada por western blotting. Actina foi utilizada com controle interno. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes.....64

figura 17. Quercetina inibe fosforilação da sinalização Akt-mTOR. Após tratamento com 10, 50 e 100 uM de quercetina, a fosforilação de mTOR Ser 2448 e Akt Ser473 foi analisada por western blotting. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes.....65

figura 18: autofagia modula apoptose induzida. Após tratamento com 10, 50 e 100 uM de quercetina, células P39 foram pré-tratadas por 1 hora com cloroquina (20uM), em seguida, incubadas com 50uM de quercetina durante 24 horas. Após tratamento, células foram marcadas com PI (20 ug/mL) ou anexina V/PI para avaliação da percentagem de células apoptóticas e ciclo celular, utilizando

citômetro de fluxo. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes. \* p< 0.05; \*\* p< 0.0001, # p< 0.05 vs quercetina. ....66

figura 19: Desenho experimental de implantação do modelo xenográfico de tumor humano. Células P39 (1x10<sup>7</sup>) foram injetadas subcutaneamente no dorso de camundongos NOD/SCID (n=6). Após os tumores alcançarem entre 100-200 mm<sup>3</sup>, os camundongos foram tratados com 120 mg/Kg de quercetina (i.p), uma vez a cada 4 dias. A cada 7 dias o volume tumoral foi avaliado de acordo com a seguinte fórmula: volume do tumor (mm<sup>3</sup>) = C (comprimento) x L2 (largura) / 2. Após 3 semanas, os tumores foram retirados e preparados para análise por imunohistoquímica e western blotting. ....68

figura 20: Quercetina reduz o crescimento tumoral em modelo xenográfico de tumor humano. Células P39 (1x10<sup>7</sup>) foram injetadas subcutaneamente no dorso de camundongos NOD/SCID. Após os tumores alcançarem entre 100-200 mm<sup>3</sup>, os camundongos foram tratados com 120 mg/Kg de quercetina (i.p), uma vez a cada 4 dias. A cada 7 dias o volume tumoral foi avaliado de acordo com a seguinte fórmula: volume do tumor (mm<sup>3</sup>) = C (comprimento) x L2 (largura) / 2. Grupo controle recebeu a mesma quantidade de solução de diluição, como indicado em material e métodos. Volume dos tumores após 21 dias de tratamento. Os dados são médias ± DP (média de 6 camundongos por grupo). \* p< 0.05. ....69

figura 21: Quercetina modula sinalização ERK/JNK e Akt-mTOR em modelo xenográfico de tumor humano. Após 3 semanas de tratamento com quercetina (120 mg/Kg), os tumores foram retirados, lisados e submetidos à extração proteica. Fosfo-ERK Thr183/Tyr187 e fosfo-JNK Thr183/Tyr185; fosfo-Akt Ser 473 e fosfo-mTOR Ser 2448 foram submetidos à análise por western blotting. Os dados são médias ± DP (média de 6 camundongos por grupo) \* p< 0.05; \*\* p< 0.0001. ....711

figura 22: Quercetina modula proteínas apoptóticas em modelo xenográfico de tumor humano. Após 3 semanas de tratamento com quercetina (120 mg/Kg), os tumores foram retirados, lisados e submetidos à extração proteica. Bcl-1 e Bcl-xL, McL-1 e Bax foram submetidas à análise por western blotting. Actina foi utilizada como controle interno. Os dados são médias ± DP (média de 6 camundongos por grupo) \* p< 0.05; \*\* p< 0.0001. ....73

figura 23: Quercetina modula caspase-3 em modelo xenográfico de tumor humano. Após 3 semanas de tratamento com quercetina (120 mg/Kg), os tumores foram fixados em 10% de tampão formalina, cortados e preparados em lâminas. Imunohistoquímica foi realizada nas lâminas utilizando anticorpo anti-caspase-3; percentagem de núcleos positivos marcados com caspase-3. Contagem de 4 campos por seção tumoral utilizando microscópio de luz (Olympus CBA, Olympus America, Bethesda, MA) com objetiva de 40x. Os dados são médias ± DP (média de 6 camundongos por grupo) \* p< 0.05. ....75

figura 24: Quercetina modula ciclinas e atividade de Rb em modelo xenográfico de tumor humano. Após 3 semanas de tratamento com quercetina (120 mg/Kg), os tumores foram retirados, lisados e submetidos à extração proteica. Cdk6, -4 e -2; ciclina D, -E, -A e fosfo-Rb foram submetidas à análise por western blotting. Actina foi utilizada como controle interno. Os dados são médias  $\pm$  DP (média de 6 camundongos por grupo) \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,0001$ .....76

figura 25: Quercetina modula p21 em modelo xenográfico de tumor humano. Após 3 semanas de tratamento com quercetina (120 mg/Kg), os tumores foram fixados em 10% de tampão formalina, cortados e preparados em lâminas. Imunohistoquímica foi realizada nas lâminas utilizando anticorpo anti-p21; percentagem de núcleos positivos marcados com 21. Contagem de 4 campos por seção tumoral utilizando microscópio de luz (Olympus CBA, Olympus America, Bethesda, MA) com objetiva de 40x. Os dados são médias  $\pm$  DP (média de 6 camundongos por grupo) \*  $p < 0,05$ .....77

figura 26: Quercetina modula autofagia em modelo xenográfico de tumor humano. Após 3 semanas de tratamento com quercetina (120 mg/Kg), os tumores foram retirados, lisados e submetidos à extração proteica. PI3K classe III e Beclina-1; Atg5-Atg12 e Atg7 foram submetidas à análise por western blotting. Actina foi utilizada como controle interno. Os dados são médias  $\pm$  DP (média de 6 camundongos por grupo) \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,0001$ .78

figura 27: Quercetina modula LC3 em modelo xenográfico de tumor humano. Após 3 semanas de tratamento com quercetina (120 mg/Kg), os tumores foram fixados em 10% de tampão formalina, cortados e preparados em lâminas. Imunohistoquímica foi realizada nas lâminas utilizando anticorpo anti-LC3; percentagem de núcleos positivos marcados com LC3. Contagem de 4 campos por seção tumoral utilizando microscópio de luz (Olympus CBA, Olympus America, Bethesda, MA) com objetiva de 40x. Os dados são médias  $\pm$  DP (média de 6 camundongos por grupo) \*  $p < 0,05$ .....79



## ***LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS***

Akt/PkB - *serine/threonine-specific protein kinase*

AO – acridina laranja

APAF-1- *apoptotic protease activating factor 1*

ARE - elementos de resposta antioxidante

Atg - *Autophagy-related*

AVOs - organelas vesiculares ácidas

Bax – *bcl-2-like protein 4*

BcL-2 – *B-cell lymphoma 2*

BcL-xL – *Bcl-2-like protein 1*

c-FLIP - *Cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein*

c-kit - *proto-oncogene kit or CD117*

Cdk - quinases dependentes de ciclinas

CEBPA - proteína alfa potenciador ligado-CCAAT

CIP/KIP - *CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein*

CKI - Inibidores de quinases dependentes de ciclinas

DCFDA - diacetato 2',7'-diclorofluoresceína

E2F1 – *E2F transcription factor 1*

EGFR - fator de crescimento epidermal

ERK - quinase extracelular sinal regulado

EROs – espécies reativas de oxigênio

FADD - Fas-Associated protein with Death Domain

FAS - *First apoptosis signal*

FLT3-ITD - proteína quinase-3 relaciona a fms

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase

GSH – glutationa

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

HIF-1alfa - fator 1-alfa induzido por hipoxia

*i.p* – intraperitoneal

IPSS - *International Prognostic Scoring System*

JNK - quinase NH<sub>2</sub>-terminal c-jun

Keap-1 - Kelch-like ECH associado à proteína-1

LC3 - *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*

LLC – leucemia linfóide aguda

LMA - leucemia mielóide aguda

LPS – *Lipopolysaccharide*

MAPK - *mitogen-activated protein kinase*

McL-1 - *Myeloid cell leukemia 1*

mTOR - *mammalian target of rapamycin*

MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

NADPH - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NF-κB - *factor nuclear kappa B*

NPM1 - nucleofosmina-1

Nrf2 - Fator nuclear eritróide relacionado com 2p45

PI – iodeto de propídeo

PI3K - fosfatidilinositol-3-fosfato

PKC - proteína quinase c

PTEN - *phosphatase and tensin homolog*

Raf – *proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*

ras – *oncogene GTPase*

Rb – retinoblastoma

SBF – soro bovino fetal

SMD – síndrome mielodisplásica

TBHP - *tert*-butil hidroperóxido

TNF - *Tumor necrosis fator*

TRAIL - *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

VDAC - canal iônico dependente de voltagem

$\Delta\Psi_m$  - potencial de membrana mitocondrial



## **1. INTRODUÇÃO**

Síndromes mielodisplásicas (SMD) abrangem um espectro de doenças hematológicas caracterizadas por hematopoese ineficaz e risco de evolução para leucemia mielóide aguda (LMA). Pode ocorrer em pessoas jovens, mas é uma doença que acomete principalmente idosos, aumentando significativamente sua incidência em pessoas maiores de 65 anos (GARCIA-MANERO, 2014) (NOLTE; HOFMANN, 2008).

Com base no grau de citopenia e seu potencial maligno, as SMD podem ser classificadas, segundo o Índice de Prognóstico Internacional (*International Prognostic Scoring System*), em baixo e alto risco (NOLTE; HOFMANN, 2008). Em baixo risco, medula hipercelular e citopenias periféricas estão comumente presentes devido à apoptose em células tronco progenitoras. No entanto, diminuição da apoptose ocorre durante a transformação para o alto risco, que manifesta-se com aumento de mieloblastos (NOLTE; HOFMANN, 2008) . A maioria dos pacientes apresenta a doença de baixo risco e sua morbidade é devido à anemia, neutropenia ou trombocitopenia.

Leucemia mieloide aguda é uma desordem clonal de células tronco hematopoéticas caracterizada pela inibição da diferenciação e acúmulo de células em vários estágios incompletos de maturação. Características citogenéticas continuam sendo muito importantes para o prognóstico da leucemia, sendo geralmente classificadas em três categorias de risco (BYRD et al., 2002) mas, recentemente, dados obtidos com marcadores moleculares para prognóstico dentro dos grupos de risco levaram a um refinamento adicional. O grupo de risco favorável apresenta citogenética normal com mutações em *NPM1*(nucleofosmina) ou *CEBPA* (proteína alfa potenciador ligado-CCAAT) e ausência de mutação *FLT3-ITD* (proteína quinase-3 relaciona a fms); o perfil molecular no grupo intermediário

demonstra mutações em *NPM1* e *CEBPA*, além da presença de alterações em *c-KIT*; no caso da categoria de alto risco, o qual apresenta um cariótipo complexo com deleções -5, -5q,-7, -7q dentre outras, apresenta geralmente mutações em *FLT3-ITD* (FALINI et al., 2005; FRÖHLING et al., 2002; 2004).

Esse conjunto de alterações provoca mudanças em diferentes vias, como PI3K/Akt/mTOR e ERK/JNK, responsáveis pela proliferação, sobrevivência, apoptose e diferenciação das células neoplásicas, favorecendo desta maneira, a leucomogênese (figura 1).

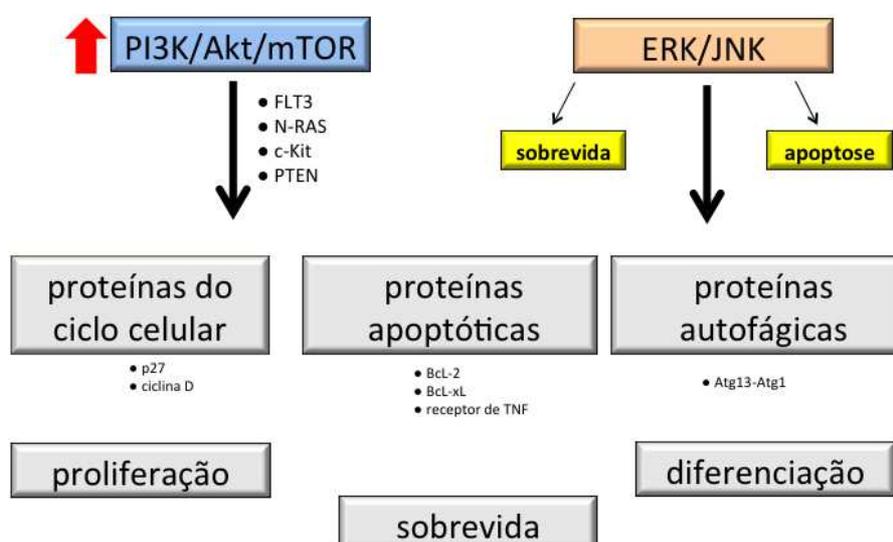


figura 1: Mutações na sinalização intracelular. Alterações nas vias de sinalização PI3K/Akt/mTOR e ERK/JNK presentes em clones neoplásicos modulam proteínas do processo apoptótico, autofágico e ciclo celular, favorecendo a leucomogênese.

Devido à heterogeneidade de lesões moleculares, a cura permanece difícil. Em pacientes acima de 65 anos, a taxa de cura no tratamento com quimioterápicos é menor do que 10%. Além disso, não existe terapia específica para cada categoria de LMA. A terapia quimioterápica é bastante agressiva e, para que ocorra alguma chance de cura, a associação com transplante alogênico se faz necessária na maioria dos casos (SANCHEZ, 2011)

Mais da metade dos pacientes com leucemia mieloide aguda possuem mais de 65 anos e cerca de um terço mais de 75 anos. Geralmente, pacientes idosos apresentam fracos resultados no tratamento convencional de indução e menos de 10% dos pacientes tratados intensivamente alcançam sobrevivência de 5 anos (ERBA, 2010; FERRARA, 2010).

Muitos pacientes possuem comorbidades médicas pré-existentes que impedem o tratamento intensivo; pacientes muito idosos ou frágeis não suportam quimioterapia prolongada; alguns pacientes apresentam pobres resultados quando submetidos à quimioterapia padrão. A presença de alterações clonais dinâmicas e quiescência da célula tronco leucêmica aumentam as chances de recidiva e resistência a tratamentos quimioterápicos. Deste modo, estratégias que aumentem a vigilância imune contra as células neoplásicas, ou modifiquem o metabolismo celular e do microambiente são atualmente objeto de investigação (FERRARA; SCHIFFER, 2013).

Durante muito tempo, a abordagem de pesquisas com drogas seguia o paradigma: “única molécula, único alvo, única droga”. No entanto, essa abordagem muitas vezes não conseguia alcançar os resultados esperados, pois a incidência e progressão de muitas doenças são geralmente induzidos por múltiplos fatores. Assim, os pesquisadores voltaram suas atenções para o desenvolvimento de drogas com ações multi-alvos, como: desenvolvimento de drogas com múltiplos componentes; desenvolvimento de drogas com interação em complexos multi-componentes; descoberta de drogas através do estudo de sinergismo entre compostos; e descoberta de compostos em plantas medicinais ou interação de drogas e compostos à base de plantas (TIAN; LIU, 2012). O objetivo principal do nosso trabalho é o estudo do fitoquímico quercetina em células de leucemia mieloide aguda.

Os flavonóides são uma grande família de compostos naturais derivados da estrutura benzo-gama-pirona, biossintetizados através da via do ácido chímico e do acetil coenzima A; são constituintes de plantas, flores e vegetais e possuem grande diversidade estrutural e funcional. Vários estudos têm mostrado propriedades farmacológicas de alimentos ricos em flavonóides, como: anti-câncer, anti-inflamatório, protetor cardiovascular e proteção contra doenças degenerativas (BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008; MCCULLOUGH et al., 2012).

São usualmente classificados em 6 grupos principais: Flavona, tais como baicalina, apigenina; Flavonol, fisetina e quercetina; Flavanona, eriodictiol, hesperidina; Flavanol, como catequina e epicatequina; Antocianidina, apigenidina; e Isoflavina, tais como daidzina e prunetina (figura 2).

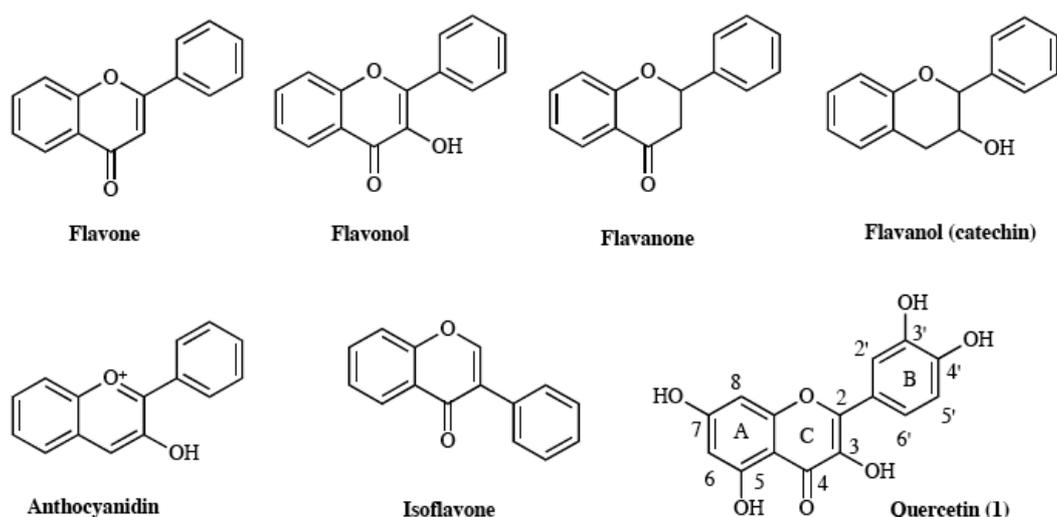


figura 2: Classificação dos flavonóides. Apresentam 6 grupos principais: flavona, flavonol, flavanona, flavanol, antocianidina e isoflavona. Quercetina (3,3',4',5,7 – pentahidroxi-flavonol) pertence à família dos flavonóis. Figura obtida do artigo de Ketan V. et al. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2009, 9, 138-161.

Quercetina - 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavonol – (figura 3) é um importante flavonóide presente em diferentes vegetais, frutas, sementes, chás e vinhos tintos (FORMICA; REGELSON, 1995; PARK; PEZZUTO, 2012). Possui como característica marcante ter alta biodisponibilidade com sua estrutura aglicona

comparada a outros fitoquímicos. A ingestão diária de quercetina na dieta é estimada entre 5 e 40 mg/dia (HERTOG et al., 1995), embora esse nível possa aumentar para 200-500 mg/dia em indivíduos que consomem grandes quantidades de frutas e vegetais ricos em quercetina (maçãs, cebolas e tomates) (HARWOOD et al., 2007). Em alimentos, não está presente como aglicona (sem grupo açúcar ligado ao anel), mas está diferentemente glicosilada. Além disso, sua biodisponibilidade depende do tipo de glicosídeo presente na molécula.

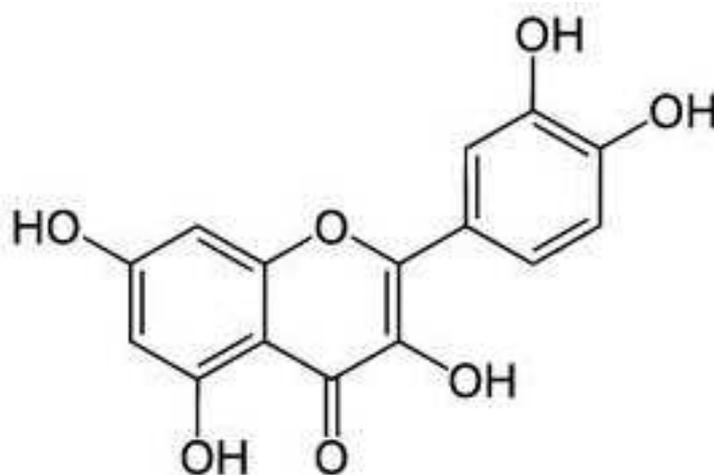


figura 3: Composição estrutural da quercetina. Possui a estrutura básica dos flavonoides: difenilpropano (C6-C3-C6) com grupos hidróxis ligados aos anéis. A nomenclatura oficial segundo a IUPAC é 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxí-4H- cromen-4-ona.

Após absorção, quercetina é metabolizada em diferentes órgãos, como intestino, cólon, fígado e rins. Nestes, a molécula é conjugada com grupos metil, sulfato e ácido glicurônico. Além disso, a absorção é influenciada pela microflora intestinal. Como resultado dessa absorção e metabolismo, quercetina total derivada da dieta está presente no plasma a uma concentração nanomolar (<100nM), mas pode ser aumentada à concentração micromolar após suplementação. Por exemplo, em 28 dias de suplementação com 1g/dia de quercetina, observou-se concentrações plasmáticas de até 1,5uM (CONQUER et al., 1998; MANACH et al., 2005).

Estudo realizado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (OKAMOTO, 2005) , conduzido pelo Programa Nacional Toxicológico do Japão, demonstrou que ratos F344/N alimentados com 2g/Kg/dia de quercetina (corresponde a uma dose de 140g para indivíduos com 70 Kg) exibiram nefropatia crônica severa, hiperplasia e neoplasia do epitélio renal tubular. Baixas doses, 50-500mg/Kg/dia, não induzem efeitos adversos relevantes (HARWOOD et al., 2007). Em humanos, estudo clínico de fase I recomenda uma dose de 1400 mg/m<sup>2</sup>, o que corresponde a 2,5g para indivíduos com 70 Kg, administrados através de infusões intravenosas por 3 semanas em intervalos semanais. Altas doses, acima de 50mg/Kg (3,5g/70Kg), demonstraram toxicidade renal sem sinais de nefrites ou uropatia obstrutiva (FERRY et al., 1996). Outros estudos não demonstraram qualquer efeito adverso associado à administração oral de quercetina em dose única de até 4g ou depois de um mês com 500 mg duas vezes ao dia (LAMSON; BRIGNALL, 2000).

Quercetina pode ser considerada um protótipo natural de agente quimiopreventivo devido às suas propriedades biológicas (antioxidante, anti-inflamatória, pró-apoptótica e anti-angiogênica). Interage em todos estágios da carcinogênese, da iniciação à invasão e metástase, interferindo em diferentes aspectos genéticos, bioquímicos e imunológicos que sustentam o desenvolvimento e manutenção das células tumorais. A habilidade da quercetina em interagir com diferentes alvos faz dessa molécula, junto com outros fitoquímicos, um inibidor multi-alvos com efeitos pleiotrópicos e sinérgicos em células tumorais. A literatura sugere que quercetina possa ser eficiente no tratamento do câncer por induzir apoptose, retenção do ciclo celular e autofagia; um processo que envolve inibição de oncogenes seletivos (tais como, McL-1, ras, MAPK, PI3K) ou ativação de genes supressores tumorais (p53, p21), as quais estimulam vias importantes para eliminação de células tumorais (RUSSO et al., 2012).

## **1.1 Atividade Antioxidante**

Entre os flavonóides, quercetina é um dos mais potentes antioxidantes, como demonstrado em diferentes estudos *in vitro* e *in vivo* (VARGAS; BURD, 2010). Em geral, flavonóides são bons agentes antioxidantes uma vez que são capazes de estabilizar os radicais formados pela reação de  $O_2$  molecular. Quercetina é capaz de reagir com espécies reativas de oxigênio (EROs) e quelatos de EROs produzidos por íons metálicos, permitindo uma diminuição do estresse oxidativo no DNA (MUROTA; TERAQ, 2003). É conhecido que os grupos hidroxilas presentes na estrutura da quercetina possuem a capacidade de aceitar elétrons quando estão no estado semiquinona e que seu grupo catecol é o constituinte capaz de quelar os íons metálicos. A adição de moléculas de açúcar para formar glicosídeos de quercetina pode obstruir sua capacidade antioxidante, por isso a forma aglicona da molécula é a que possui o maior poder antioxidante.

O mecanismo antioxidante da quercetina acontece primeiramente com a ligação com  $O_2$  gerando o radical semiquinona e  $H_2O_2$ . Quercetina também reage com  $H_2O_2$ , na presença de peroxidase, diminuindo seus níveis. Além disso, sua capacidade antioxidante depende da disponibilidade de glutathiona (GSH) intracelular (figura 4).

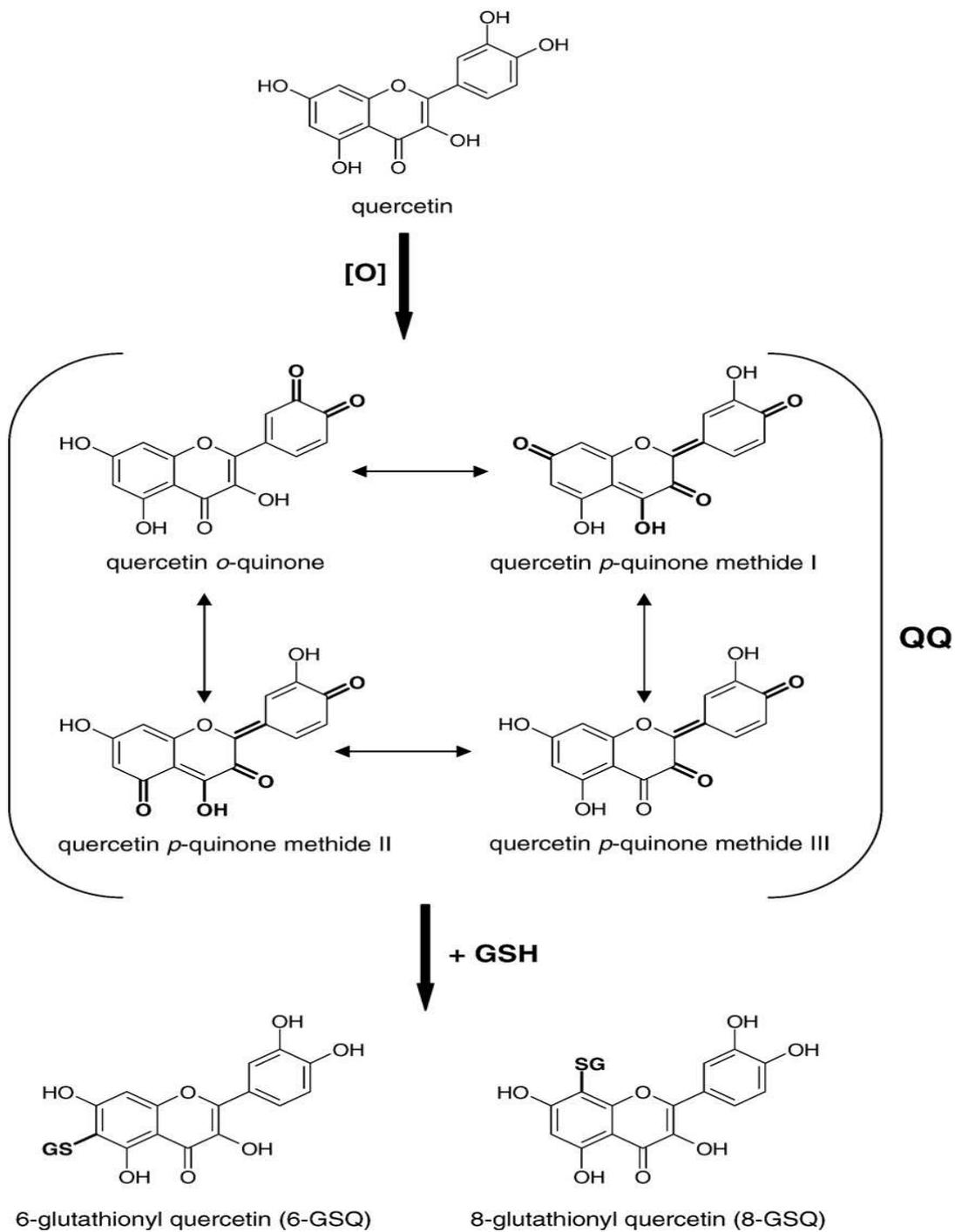


Figura 4: Mecanismo antioxidante da quercetina. Reação de oxidação da quercetina com radicais  $O_2^{\cdot -}$  e formação do radical semi-quinina (QQ). Interação de quercetina com GSH intracelular.. Figura obtida do artigo de Boots. et al. *European Journal of Pharmacology*, 2008, v.585, p. 325-337.

Kim e colaboradores (KIM; JANG, 2009) examinaram a relação entre quercetina oxidada e GSH em linhagem celular de hepatoma (HepG2), demonstrando que 10 e 100uM de quercetina são capazes de produzir um efeito antioxidante. Mais especificamente, os dados indicam que quercetina é capaz de quelar íons metálicos reativos que produzem EROs; reage com peróxido de hidrogênio e usa o sistema mediado por GSH para retornar EROs ao seu estado reduzido (KIM; JANG, 2009). Essa cooperatividade com GSH é um provável mecanismo pelo qual a quercetina pode proteger as células da mutagênese. Também possui capacidade de trabalhar em sinergia com outros sistemas antioxidantes no organismo a fim de diminuir o estresse oxidativo (BOOTS et al., 2003).

Fator nuclear eritróide relacionado com 2p45 (Nrf2) desempenha um papel importante na indução de enzimas antioxidantes e desintoxicantes através da sua ligação a elementos de resposta antioxidante (ARE) (ANDREADI et al., 2006; EGGLER; GAY; MESECAR, 2008). Nrf2 é sequestrado no citoplasma pelo complexo repressor Kelch-like ECH associado à proteína-1 (Keap-1). A dissociação de Nrf2/Keap-1 é essencial para sua translocação nuclear seguido por ligação ao DNA e ativação de genes citoprotetores (EGGLER; GAY; MESECAR, 2008). Várias quinases de sinalização relacionadas com sobrevivência/proliferação, como quinase extracelular sinal regulado (ERK), quinase NH2-terminal c-jun (JNK), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e proteína quinase c (PKC) influenciam a regulação de Nrf2 por fosforilação, ativando ou inibindo os elementos de resposta antioxidante (ARE) (PI et al., 2007).

Assim, quercetina, além de usar a glutathiona (GSH), pode interagir com o sistema de defesa celular, como NADPH, quinona oxireductase, monooxigenase, xantina oxidase, lipoxigenase e complexo Nrf2/Keap1, que proporcionam um significativo mecanismo biológico para proteção contra os efeitos tóxicos das

espécies reativas de oxigênio endógenas e carcinógenos exógenos e/ou seus intermediários reativos (MASELLA et al., 2005; WANG et al., 2010). Entretanto, as propriedades antioxidantes da quercetina não podem explicar completamente sua habilidade em inibir o crescimento celular, apoptose e ativação do processo autofágico.

## ***1.2 Atividade Antiproliferativa***

A proliferação celular é um processo regulado através da ligação de fatores de crescimento e receptores transmembrana que ativam vias de sinalização e controlam o ciclo celular, crescimento, sobrevivência e metabolismo energético (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A desregulação desse processo ou defeitos em uma ou mais dessas etapas podem transformar uma célula normal em maligna.

A progressão do ciclo celular é dirigida pela ativação do complexo de ligação quinases dependentes de ciclinas (Cdks) e ciclinas (Cdk4/6-ciclina D responsável pela fase G1; Cdk2-ciclina E responsável pela fase G1/S; Cdk1-ciclina B responsável pela fase G2/M). Inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CKIs) são os principais reguladores da atividade ciclinas-Cdks. Existem duas famílias de CKIs em mamíferos: a família INK4, a qual inibe especificamente o complexo ciclina-Cdk da fase G1, e a família CIP/KIP, a qual interage com um número maior de ciclinas-Cdks para um amplo controle sobre o ciclo celular (figura 5).

Dois dos principais CKIs: p21<sup>Cip1</sup> e p27<sup>Kip1</sup>, possuem diferentes tarefas na regulação do ciclo (ABBAS; DUTTA, 2009). p21 é induzida em resposta a injúria do DNA e retém as células na fase G1 e G2. p27 possui um importante papel na “saída” do ciclo celular e mantém a quiescência das células (CHU; HENGST; SLINGERLAND, 2008). Camundongos com perda da proteína p27 são maiores em

tamanho devido ao aumento da proliferação resultante da falha nas células em saírem apropriadamente do ciclo celular (NAKAYAMA; NAKAYAMA, 1998).

Outra proteína responsável pela progressão é a retinoblastoma, Rb, essencial para promover a transição da fase G1/S. Rb é especificamente fosforilada pelo complexo Cdk4/6 - ciclina D. No final da fase G1 o complexo Cdk2/ciclina E é importante para a completa fosforilação da proteína Rb. Totalmente fosforilada, Rb libera fator E2F, a qual permite a transcrição de genes da fase S (SATYANARAYANA; HILTON; KALDIS, 2008)(figura 5).

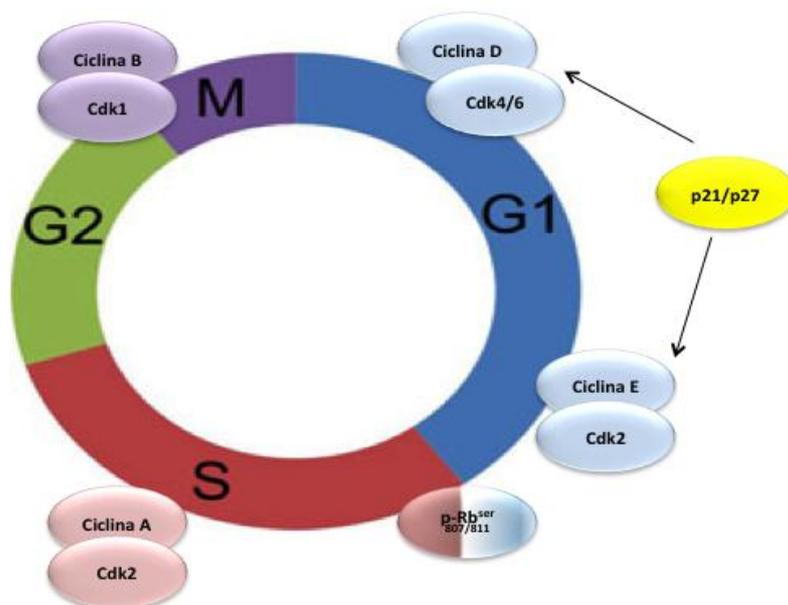


figura 5: Mecanismo global do ciclo celular. O ciclo celular possui 4 fases: G1, S, G2 e M. A passagem das fases é governada pela interação entre proteínas ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (Cdks). O início da fase G1 é governado pela interação de ciclina D-Cdk4/6, posteriormente é necessária a interação de ciclina E com Cdk2 para fosforilação de retinoblastoma (Rb). A fase S é governada pela interação de ciclina A-Cdk2. Finalmente, G2-M é controlada pela interação de ciclina B com Cdk1. Inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CKI), tais como p21 e p27, controlam a atividade dos complexos ciclinas-Cdks.

Quercetina inibe o crescimento e proliferação de linhagens celulares de diferentes tipos de cancers (próstata, pulmão, mama, cólon e neoplasias) e vários mecanismos têm sido propostos para explicar esses efeitos. Alguns estudos mostram a habilidade desse composto em interagir com proteínas regulatórias

específicas, como ciclinas (A, B, D e E), quinases dependentes de ciclinas (Cdks) e inibidores de Cdks (p21<sup>cip1/waf1</sup> e p27<sup>kip1</sup>) (CASAGRANDE; DARBON, 2001). Dependendo do tipo celular, quercetina é capaz de bloquear a transição G2/M ou G1/S do ciclo celular. Em linhagem de carcinoma mamário humano, tais como SK-Br3 e MDA-MB-453, baixas concentrações de quercetina (20uM) inibem a proliferação. O bloqueio do ciclo ocorre na fase G1 através da indução de p21 e diminuição na fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb). Nesse mesmo modelo, ocorreu uma diminuição na expressão de ciclina B1 e Cdk1, que são essenciais para progressão da fase G2/M (JEONG et al., 2009). Em OCM-1 (melanoma), quercetina em altas concentrações (70uM) bloqueia a proliferação e retém às células na fase G1 com inibição da atividade de Cdk2 e aumento de p21 e p27 (CASAGRANDE; DARBON, 2001). Baixas concentrações de quercetina diminuem a atividade de 16 quinases, em mais de 80%, relacionadas com o ciclo celular, incluindo: ABL1, Aurora-A,-B,-C, CLK1, FLT3, JAK3, MET, PAK3, RET, FGF-R2 e Rss (BOLY et al., 2011).

Quercetina é um potente inibidor da atividade do receptor tirosina quinase do fator de crescimento epidermal (EGFR), que possui um importante papel na proliferação celular. No entanto, ela não inibe diretamente o EGFR, mas interfere com diferentes vias de sinalização “*downstream*” de EGFR que regulam a proliferação e sobrevivência (JUNG et al., 2010; LEE et al., 2004). Uma delas é a família Src-Hck tirosina quinase que é expressa em células linfóides e mielóides da medula óssea.

Concentração de 25uM de quercetina inibe a atividade de PI3K-Akt/PKB em células malignas PTEN *null* (onde Akt/PKB é constitutivamente ativado). Proteínas quinases raf e MEK também são alvos moleculares da quercetina, a inibição da atividade MEK1 é mais eficiente que PD98059, um inibidor específico (LEE et al., 2008).

### ***1.3 Atividade Apoptótica***

Apoptose é de crucial importância para o desenvolvimento e homeostase da hematopoese. Células progenitoras hematopoéticas que não recebem apropriadamente sinais de sobrevivência do microambiente são removidas por apoptose. Resistência à apoptose pode promover transformação maligna dessas células. Portanto, proteínas que regulam essa via podem estar intimamente envolvidas no desenvolvimento de leucemia (DE GRAAF; DE WITTE; JANSEN, 2004).

A sobrevivência celular é um balanço entre fatores que promovem ou inibem a apoptose. Várias vias e família de proteínas estabelecem um limiar para que a apoptose ocorra apenas em resposta a um estímulo adequado de morte, enquanto sua inibição é alcançada por sinais de sobrevivência.

Dois caminhos principais agem como sensores de sinais de morte e podem ativar o programa de morte celular por apoptose. A extrínseca ou via mediada por receptor envolve membros da superfamília de receptor TNF, o qual ativa caspase-8 através de proteínas adaptadoras FAS associadas ao domínio de morte FADD, e são ativadas por citocinas (principalmente por FAS e TRAIL ligantes) e sinais extracelulares. A via intrínseca é ativada em resposta a sinais intracelulares e insultos citotóxicos, mediada pela família das proteínas Bcl-2 ancoradas à mitocôndria (figura 6). Essas duas vias controlam a ativação de caspases. Caspases são as executoras da apoptose quando proteoliticamente ativadas e permitem a desmontagem das células (DE GRAAF; DE WITTE; JANSEN, 2004).

A via intrínseca envolve a liberação de proteínas pró-apoptóticas (ex. citocromo c) no citosol, formação de apoptossomo e ativação de caspase 9, a qual subsequentemente cliva e ativa procaspase 3 (SAIKUMAR; MIKHAILOVA; PANDESWARA, 2007). Proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (Bcl-xL, Bcl-2 e

Mcl-1) antagonizam a permeabilização da membrana e previne a liberação de citocromo c da mitocôndria. Proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 podem ser divididas em dois subgrupos: as proteínas pró-apoptóticas com multidomínios (Bax e Bak) – participam da formação do poro na membrana mitocondrial por onde o citocromo c é liberado (LEBER; LIN; ANDREWS, 2007); as proteínas apenas com domínio BH3 – Bim e Bid – são requeridas para a ativação de proteínas pró-apoptóticas com multi-domínios através da associação com proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (GOMEZ-BOUGIE; BATAILLE; AMIOT, 2005).

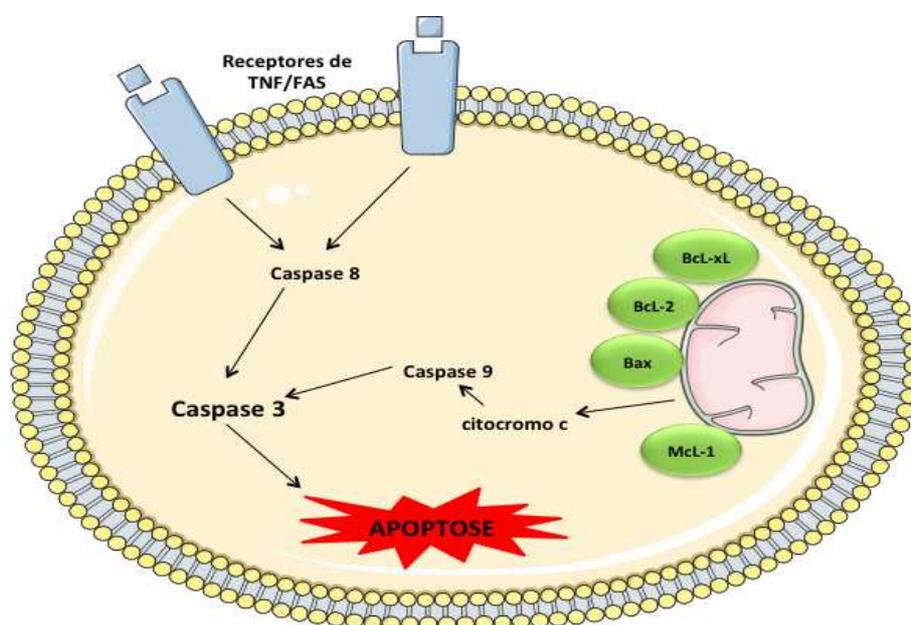


figura 6: Visão geral do processo apoptótico. A morte celular por apoptose é representada por duas vias principais: a via extrínseca ou via mediada por receptores que envolve proteínas da família de TNF (fator de necrose tumoral) e seus principais ativadores: os ligantes FAS e TRAIL; a via intrínseca é mediada pela família das proteínas Bcl-2 ancoradas à mitocôndria sendo ativada em resposta a sinais intracelulares. Essas vias ativam proteínas caspases que finalizam a morte celular por apoptose.

O efeito apoptótico da quercetina pode resultar na ativação de múltiplas vias. Em células MDA-MB- 231, ela aumenta os níveis de  $Ca^{2+}$  citosólico e reduz o potencial de membrana mitocondrial promovendo a ativação de caspase-3,-8,-9 (CHIEN et al., 2009). A capacidade da quercetina em induzir apoptose pela via mitocondrial também é confirmada em células U937, onde a perda do potencial de

membrana mitocondrial provoca liberação de citocromo c no citoplasma com ativação das caspases -3 e -7 (LEE et al., 2006). Além disso, em animais injetados com células U937 (modelo xenográfico), os efeitos da quercetina resultaram em aumento da expressão do fator pró-apoptótico Bax e inibição da proteína anti-apoptótica McL-1 (CHENG et al., 2010). Quercetina diminui McL-1, a qual é frequentemente ativa em leucemia linfóide crônica (LLC), e age direta ou indiretamente sobre a estabilidade do mRNA e degradação dessa proteína, sugerindo, dessa forma, que esse mecanismo pode transpor a resistência à apoptose em células isoladas de pacientes com LLC (SPAGNUOLO et al., 2011). Esses mesmos autores demonstraram que quercetina causa apoptose em células primárias de leucemia, mas não em células mononucleares de sangue periféricos de doadores saudáveis, a uma concentração de 50µM. Em modelo *ex vivo* de LLC, baixas concentrações de quercetina (10-20µM) foram capazes de sensibilizar células B de pacientes que apresentavam resistência à apoptose desencadeada pela fludarabina, droga de primeira linha para quimioterapia de LLC (RUSSO et al., 2010).

Os efeitos anticâncer e pró-apoptóticos da quercetina também têm sido demonstrados em modelos *in vivo* usando células de câncer de pâncreas (MOURIA et al., 2002). Nessas, quercetina induz apoptose e previne contra metástases. Além disso, se for associada com outro fitoquímico (resveratrol), um efeito sinérgico foi observado na ativação de caspase-3 e inibição de NF-kB. Outro estudo *in vivo* demonstrou que quercetina age sinérgicamente com sulforafane para inibir o crescimento de células tronco de câncer pancreático em modelo xenográfico, com redução da proliferação, angiogênese e apoptose, sem causar toxicidade para as células normais (ZHOU et al., 2010).

A inibição do crescimento e ativação da apoptose pela quercetina também é verificada pela regulação da atividade transcricional de B-catenina/Tcf, com diminuição de ciclina D e survivina (MA et al., 2005). Pode exercer essas atividades

através da ligação direta à tubulina, provocando a despolimerização de microtúbulos celulares (GUPTA; PANDA, 2002). Além disso, quercetina é um potente modulador de apoptose induzida por ligantes de receptores de TNF (FAS e TRAIL ligantes) através da indução da expressão de receptor de morte DR-5, um fenômeno que ocorre especificamente em células de câncer de próstata (JUNG et al., 2010). A regulação de DR-5 junto com a baixa expressão de c-FLIP (inibidor de caspase-8) são dois mecanismos que sensibilizam células de carcinoma hepático com disfunção de receptores TNF (SABLINA et al., 2005).

Assim, a capacidade da quercetina em induzir apoptose (ambos pelas vias extrínseca e intrínseca) em células cancerígenas torna, sem dúvida, uma molécula promissora no campo da oncologia.

#### ***1.4 Atividade no Processo Autofágico***

A autofagia é um processo catabólico, conservado evolutivamente, de degradação e reciclagem de componentes celulares. O mecanismo é disparado quando um sinal indutor de autofagia (dito pró-autofágico) é percebido pela célula, tanto fisiologicamente quanto em contextos patológicos. Diversos sinais pró-autofágicos estão bem caracterizados, como: a presença de organelas ou proteínas danificadas, a presença de toxinas extracelulares; e compostos citotóxicos. Desta maneira, a autofagia está envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos, tais como desenvolvimento e manutenção da homeostase do organismo, diferenciação celular, neurodegeneração, infecção e câncer (LEVINE; YUAN, 2005).

No processo de autofagia há o desenvolvimento de uma estrutura inicial de membrana lipídica dupla chamada fagóforo, a partir do pró-fagóforo, o qual inicia o processo de envolvimento de componentes celulares citoplasmáticos, como proteínas e organelas. Esta é a etapa de nucleação/iniciação da autofagia. As

principais proteínas envolvidas nesta etapa inicial são as proteínas fosfatidilinositol 3-quinase classe III (PI3K III) e os membros 5, 6, 7, 10, 12 e 16 da família de proteínas Atg (principais controladores da autofagia). A partir da formação do fagóforo há o recrutamento de formação de complexos protéicos que dirigem o englobamento final dos componentes celulares, formando uma vesícula de membrana dupla chamada autofagossomo (ou vesícula autofágica), na etapa de sequestramento. Para esta etapa, são fundamentais os membros 3, 4 e 7 da família de genes Atg, além da proteína LC3 (BEHRENDTS et al., 2010).

Três isoformas da proteína LC3 (LC3A, LC3B e LC3C) sofrem modificações pós-traducionais durante o processo autofágico. A clivagem de LC3 logo após a tradução produz a forma citosólica de LC3, chamada LC3-I. Quando o processo autofágico é ativado, LC3-I sofre clivagem e lipidação com fosfatidiletanolamina por um sistema que envolve as proteínas Atg7 e Atg3, sendo então convertida à LC3-II, a qual se associa à membrana das vesículas autofágicas (HE et al., 2003; KABEYA et al., 2000; WU et al., 2006).

Em seguida ocorre a etapa de fusão, na qual o autofagossomo se funde com um lisossomo para formar a estrutura funcional da autofagia, o autofagolisossomo (também dita “madura”). No interior desta estrutura, o ambiente ácido e as enzimas lisossomais dirigem a degradação dos componentes celulares, última etapa, que gera produtos de degradação que são utilizados pela célula (BEHRENDTS et al., 2010; WANG; KLIONSKY, 2003).

A maquinaria molecular de controle da autofagia é coordenada finamente por um grupo de genes, a família Atg. As proteínas geradas a partir destes genes possuem atividades específicas durante as diferentes etapas do processo autofágico.

O processo de iniciação da autofagia envolve diversos membros da família Atg (membros Atg5, 6, 7, 10, 12 e 16), sendo os três principais Atg6 (também chamada de beclina-1), Atg5 e Atg12. A formação do autofagossomo envolve um

sistema de conjugação, no qual Atg12 é covalentemente ligada à Atg5 e direcionada à membrana do autofagossomo. Tal conjugação é mediada pelas enzimas Atg7 e Atg10, semelhantes às ubiquitina-ligasas E1 e E2, respectivamente. Finalmente, o membro da família Atg mais importante no processo de sequestro e formação do autofagossomo, Atg8 (também chamada de LC3), sofre uma lipidação por Atg7 e em consequência se acopla à membrana do autofagossomo em formação (REGGIORI; KLIONSKY, 2002; SUZUKI et al., 2001) (figura 7).

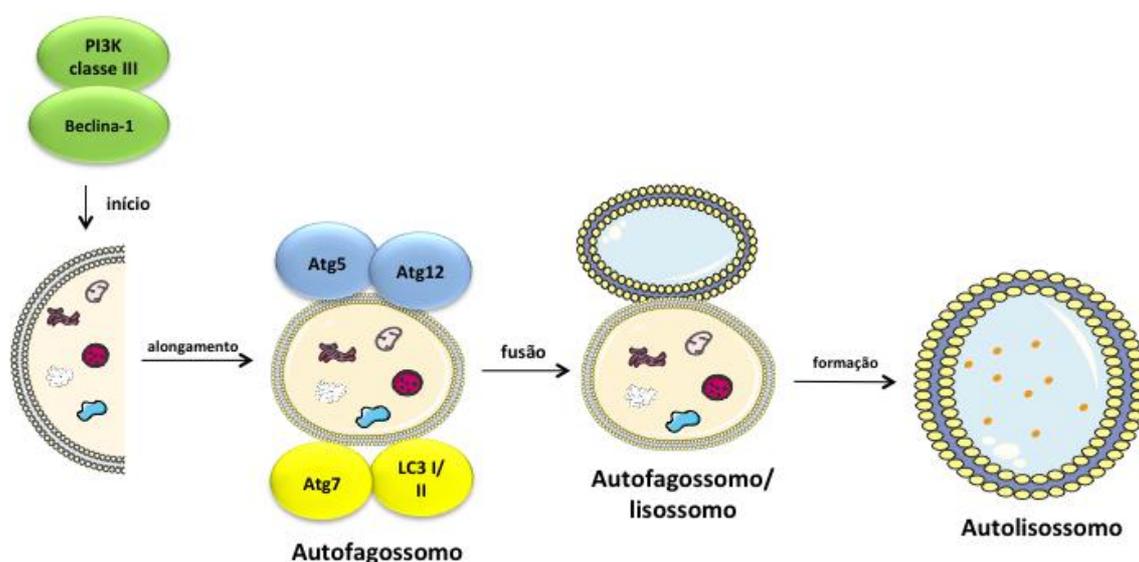


figura 7: Processo autofágico. A autofagia é iniciada com a interação entre as proteínas beclina-1 e PI3K classe III formando uma membrana inicial chamada de fagóforo, necessária para o englobamento das partículas que serão degradadas. Para o alongamento e formação da vesícula autofágica chamada autofagossomo são necessárias a ativação da junção proteica Atg5-Atg12 e transformação de LC3-I em LC3-II, a proteína Atg7 é responsável pela transformação. Após a formação do autofagossomo contendo os constituintes que serão degradados, ocorre a fusão dessa vesícula com lisossomo – formação do autolisossomo. O lisossomo libera suas enzimas necessárias para a decomposição dos constituintes.

Quercetina demonstra induzir autofagia e morte celular (KLAPPAN et al., 2012; WANG et al., 2011) e parece que a ativação de autofagia é uma tentativa para resgatar as células da apoptose induzida (WANG et al., 2011). Por ser um potente indutor de apoptose, quercetina pode ser considerada um agente quimioterápico, pois afeta vários alvos celulares o que poderia explicar sua propriedade de indução

de autofagia. Este flavonol pode induzir sirtuinas (HOWITZ et al., 2003), produção de EROs (MERTENS-TALCOTT et al., 2005) e JNK 1/2; Mek/ERK (NGUYEN et al., 2004), todos capazes de influenciar a regulação do processo autofágico. Outro alvo são as proteínas da via PI3K, a qual possui diferentes classes, podendo afetar negativa ou positivamente a regulação autofágica. Além disso, quercetina ajuda no acúmulo de HIF-1alfa (fator 1-alfa induzido por hipoxia) que reprime a sinalização mTOR e induz a expressão de BNIP3/BNIP3 ligante, ajudando na ruptura do complexo Beclina-1/BcL-2(BcL-xL) para ativação de Atg7, Atg12-Atg5 e clivagem de LC3 em células gástricas (WANG et al., 2011). Contrariamente, quercetina também pode inibir o fluxo autofágico. Esse resultado foi obtido pela inibição de PI3K classe III e da via NFk-B (que pode inibir ou induzir autofagia dependendo do contexto) (GORDON; HOLEN; SEGLEN, 1995). Outra propriedade interessante da quercetina é que, em combinação com outras substâncias, pode potencializar seus efeitos indutores autofágicos e apoptóticos (JAKUBOWICZ-GIL et al., 2010). Efeitos sinérgicos com outras substâncias indutoras de autofagia encontradas em plantas foram percebidos com resveratrol e ácido elágico (MERTENS-TALCOTT et al., 2005; MERTENS-TALCOTT; PERCIVAL, 2005). Isto pode ser relevante em um contexto nutricional, onde a quercetina, que é encontrada em vários alimentos, pode atuar sinergicamente com outros metabólitos indutores de autofagia encontrados na dieta.

Apesar de todas as evidências dos efeitos antineoplásicos da quercetina, há poucos estudos sobre os efeitos desta droga em leucemias agudas. Levando-se em conta que esta é uma doença com altas taxas de mortalidade e de recaída, uma caracterização abordando diversos efeitos da quercetina é muito apropriada. Existem aproximadamente 60 trabalhos (fonte NCBI: “National Center for Biotechnology Information”) descrevendo os efeitos da quercetina sobre células de leucemia mielóide. Todos, exceto um estudo, apresentaram suas conclusões com base apenas em experimentos *in vitro*. Estudo *in vivo* realizado por (CHENG et al.,

2010), demonstrou a eficácia da quercetina em induzir apoptose em xenotransplantes de células U937, porém dados de autofagia e ciclo celular não foram apresentados.

Em relação ao ciclo celular, existem poucos estudos *in vivo* relacionando leucemia vs quercetina (CASELLA et al., 2014; KIM et al., 2010; SCHLACHTERMAN et al., 2008). Além disso, poucas vias de sinalização foram estudadas relacionando os efeitos da quercetina sobre as fases do ciclo celular, as quais são melhores caracterizadas em tumores sólidos, como câncer de mama (CHOU et al., 2010; SEO et al., 2011), câncer de próstata (VIJAYABABU et al., 2005), câncer de cólon (KIM et al., 2010), entre outros. No entanto, todos estes estudos destacam apenas os processos individualmente sem mencionar qualquer tipo de ligação entre as vias para elucidar o mecanismo de ação da quercetina.

O efeito da quercetina sobre o processo autofágico em células leucêmicas não foi demonstrado por outros grupos. Existem alguns estudos em células de glioblastoma (KIM et al., 2013), um estudo em células gástricas (WANG et al., 2011) e outro em câncer de ovário (DE et al., 2013).

Assim, tanto quanto sabemos, este é o primeiro estudo abordando os efeitos da quercetina sobre células leucêmicas através de experimentos *in vitro* e *in vivo* que investiga as relações existentes entre diversos processos biológicos para determinar o mecanismo de ação da quercetina sobre essas células.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo principal**

Estudar os efeitos biológicos e farmacológicos da quercetina em células leucêmica/mielodisplásicas. Para tal, foi escolhido como modelo a linhagem P39, a qual foi estabelecida a partir de células leucêmicas do sangue periférico de paciente que possuía síndrome mielodisplásica em transformação.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Em células P39 submetidas ao tratamento com quercetina, avaliar:
  - a) A citotoxicidade e apoptose;
  - b) O ciclo celular e produção de espécies reativas de oxigênio;
  - c) A autofagia;
  - d) As vias de sinalização PI3K/Akt/mTOR e ERK/JNK.
  
2. Validar os resultados em modelo xenográfico de tumor de células P39

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Reagentes e anticorpos**

Quercetina aglicosilada (> 98% de pureza), sal de acridina laranja, MTT, cloroquina, SP600125 (inibidor de JNK), PD184352 (inibidor de ERK), TBHP (agente pró-oxidante), DCFDA (interage com EROs) e rodamina 123 (detecta polarização da membrana mitocondrial) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Kit de detecção de apoptose anexina-V – FITC foi obtido da BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). Anticorpos anti-ciclina –D, -E, -A, Cdk 4, -2, -6, p21, p27, Bcl-xL, Bax, Bcl-2, citocromo c, McL-1, Fas, Fas ligante, actina e GAPDH foram obtidos da Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). Rb, pRb<sup>S807/811</sup>, Beclina-1, PI3K classe III, mTOR e p-mTOR<sup>ser2448</sup> foram obtidos da Cell Signaling (Beverly, MA, USA), pERK<sup>Thr185/Tyr187</sup>, pJNK<sup>Tyr183/185</sup>, ERK 1/2 e JNK foram da Invitrogen (Camarillo, CA, USA). Atg5-Atg12, Atg7, LC3 I/II e VDAC foram da Abcam Inc (Cambridge, MA, USA). Anticorpos conjugados com peroxidase anti-rabbit, anti-mouse e anti-goat foram obtidos da KPL, Inc (Gaithersburg, MD, USA).

#### **3.2 Tratamento *in vitro* com quercetina**

Linhagem celular mielóide P39, a qual foi estabelecida a partir de células leucêmicas do sangue periférico de paciente que possuía síndrome mielodisplásica em transformação (NAGAI et al., 1984), foi cedida gentilmente pela profa. Eva Hellstrom-Lindberg do Instituto Karolinska, Estocolmo, Suécia. Células P39 foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) em estufa à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. O composto quercetina obtido da empresa Sigma Chemical® foi dissolvido em DMSO e RPMI a uma concentração final de 0,1% (v/v). Para os

experimentos subsequentes, células P39 foram tratadas com cloroquina (20uM), SP600125 (20uM), PD184352 (20uM) ou quercetina a uma concentração final de 10, 50 ou 100uM por 12, 24 ou 48 horas. Células controle foram tratadas apenas com solução diluente.

Há discussão na literatura sobre possível contaminação da linhagem P39 com células HL-60 ((DREXLER; DIRKS; MACLEOD, 2009; STEENSMA, 2010). Analisamos o cariótipo de ambas as linhagens e todas células P39 exibiram cromossomo XY, como esperado (linhagem P39 é derivada de paciente do sexo masculino, enquanto as células HL-60 são derivadas de um paciente feminino). Além disso, como demonstrado da figura 8, células P39 apresentaram anormalidades cromossômicas em todas as metáfases (+del(6), q(15), -16 e -17 ), como descrito anteriormente ((NAGAI et al., 1984)



figura 8: Cariótipo representativo de células P39. Todas as metáfases apresentaram cariótipo 46,XY, + del(6), -9, -16, -17, +2 mar.

### ***3.3 Análise de viabilidade celular***

Análise por MTT foi realizada como previamente descrito (MOSMANN, 1983). Resumidamente,  $5 \times 10^4$  células foram distribuídas em placa de 96 poços com RPMI suplementada com 10% de SBF e incubada com diferentes concentrações de quercetina (1, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ). Após 12, 24 e 48 horas, 10  $\mu\text{L}$ /poço de MTT (5 mg/mL) foram adicionados e incubados por 4 horas, sendo a reação finalizada com 0,1N HCl em isopropanol para solubilizar os cristais de formazana. A absorbância foi medida em 570 nm usando leitor de placas automático.

### ***3.4 Marcação com acridina laranja para detecção de autofagia***

Na marcação de células com acridina laranja citoplasma e núcleo emitem fluorescência a um comprimento de onda de 510-530 nm (FL1-H), enquanto compartimentos ácidos emitem em torno de 650 nm (FL3-H) (ZHANG et al., 2010). Emissão de  $1 \times 10^4$  células foi medida por citometria de fluxo usando software CellQuest<sup>®</sup>. Resumidamente, células P39 foram distribuídas em placas de 6 poços e tratadas com 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  de quercetina por 24 horas. Após tratamento, as células foram incubadas com 1  $\mu\text{g/mL}$  de acridina laranja em PBS por 15 minutos, lavadas 2 vezes e analisadas com FACSCalibur<sup>®</sup>.

### ***3.5 Análise da atividade de caspases***

A atividade de caspases-3, -8 e -9 foi analisada por citometria de fluxo, utilizando kit de detecção de caspases (Calbiochem, Merck KGA, Darmstadt, Germany). Após tratamento com quercetina, as células foram incubadas com 1  $\mu\text{L}$  de

FITC-DEVD-FMK ou RED-IETD-FMK ou RED-LEHD-FMK por 1 hora em estufa (37° C graus 5% CO<sub>2</sub>), lavadas e ressuspensas em tampão de lavagem. A atividade de caspase foi analisada por citometria de fluxo usando os canais FL-1 e FL-2.

### ***3.6 Detecção de apoptose por citometria de fluxo***

Células P39 foram distribuídas em placas de 12 poços e tratadas com diferentes concentrações de quercetina (10, 50 ou 100uM). Após 24 horas, as células foram lavadas 2 vezes com PBS gelado e ressuspensas em tampão de ligação contendo 1ug/mL iodeto de propídeo (PI) e 1ug/mL anexinaV – FITC. Todas as amostras foram analisadas por FACSCalibur<sup>®</sup> depois de 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, protegidas da luz. Dez mil eventos foram adquiridos por amostra.

### ***3.7 Análise do ciclo celular***

Após tratamento com quercetina, as células foram fixadas com etanol 70% por no mínimo 2 horas antes do experimento. Foram marcadas e incubadas com 20 ug/mL de iodeto de propídeo (PI) contendo 10ug/mL de RNase A por 30 minutos em temperatura ambiente. A análise de fluorescência das células foi executada com FACSCalibur (Becton-Dickinson, CA, USA). O resultado da distribuição de DNA proporcional às fases do ciclo celular foi verificado através do software Modifit<sup>®</sup> (Verify Software House Inc., Topsham, ME, USA).

### ***3.8 Análise de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)***

A geração intracelular de EROs foi medida por citometria de fluxo com marcação de 25uM de diacetato 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA). Após indução de EROs com tert-butilhidroperóxido-TBHP (100uM), células P39 foram tratadas com

diferentes concentrações de quercetina (10, 50 e 100uM). As células foram coletadas e a fluorescência foi analisada utilizando o canal FL1-H.

### ***3.9 Medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi m$ )***

O efluxo de rodamina 123 (detecta polarização da membrana mitocondrial) foi analisado por citometria de fluxo.  $5 \times 10^5$  células foram incubadas em PBS contendo 200 ug/mL de rodamina 123 por 20 minutos a 37° C. Posteriormente, as células foram lavadas 2x com PBS e fluorescência de rodamina 123 foi detectada usando canal FL1-H.

### ***3.10 Medida da liberação de citocromo c***

Para determinar a liberação de citocromo c do compartimento mitocondrial, células P39 foram tratadas com diferentes concentrações de quercetina por 24 horas. A fração citosólica e mitocondrial foi separada de acordo com o kit MIT 1000 Mitochondrial/Cytosol fractionation® (Millipore® Corporation, Billerica, MA, USA), para subsequente análise de citocromo c por imunoblot

### ***3.11 Análise por Western Blot***

Proteínas totais foram extraídas em tampão RIPA (50mM Tris, pH7.2, 1% Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 500 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mg/mL de leupeptina e aprotinina e 1mM PMSF). A concentração de proteínas foi quantificada pelo kit Bio-Rad protein assay. Quantidades iguais de proteína foram fracionadas em géis de SDS-poliacrilamida (8-15%) e eletroforeticamente

transferidas para membrana de nitrocelulose. Sítios de ligação não específicos foram bloqueados pela incubação com tampão Tris (10mmol/L, pH 7,4), NaCl (150 mmol/L), Tween 20<sup>®</sup> (0,1%) e leite sem gordura (5%). As membranas foram incubadas 24 horas com anticorpos primários específicos a 4<sup>o</sup> C, seguido por anticorpo secundário HRP-conjugado à temperatura ambiente por 1 hora. A imunoreatividade foi visualizada por ECL Western Blot Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, UK).

### ***3.12 Modelo xenográfico de tumor humano***

Camundongos NOD/SCID (linhagem NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J), 6-8 semanas, provenientes do Laboratório Jackson, USA., foram criados pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área da ciência em animais de laboratório – CEMIB da Universidade Estadual de Campinas, sob condições livre de patógenos. Os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos e orientações do Comitê Institucional de Uso e Cuidado Animal, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA-UNICAMP, sob o número: 1760-1. Os camundongos foram inoculados (n=6), subcutaneamente, na região dorsal com 100uL de células P39 em suspensão (1x10<sup>7</sup> células/camundongo). Com o auxílio de um paquímetro, o volume tumoral foi avaliado a cada 7 dias de acordo com a seguinte fórmula: volume tumoral (mm<sup>3</sup>) = comprimento x (largura)<sup>2</sup>/ 2. O tratamento com quercetina foi iniciado após os tumorais alcançarem entre 100-200 mm<sup>3</sup>, sendo administrada uma vez a cada 4 dias por injeção intraperitoneal (i.p) a uma concentração de 120mg/Kg de peso corporal. O grupo controle recebeu quantidades iguais de solução veículo, como previamente descrito (WANG et al., 2011). Os camundongos foram sacrificados após 3 semanas; tumores foram removidos,

macerados e homogeneizados em tampão de extração proteica ou imediatamente fixados em formalina para imunohistoquímica.

### ***3.13 Imunohistoquímica***

A expressão de caspase-3ativada, p21 e LC3 I/II foi medida em secções do tumor incluído em parafina, utilizando técnicas de imunohistoquímica convencionais. Resumidamente, secção de 4µm de tumor foi desparafinado e reidratado e a recuperação dos antígenos foi realizada pelo pré-tratamento das lâminas em tampão citrato (pH6,0) em forno de micro ondas por 12 minutos. As lâminas foram incubadas com anticorpos monoclonais de interesse por 12 horas à 4º C. A reação foi detectada pelo complexo streptavidina-biotina peroxidase e coloração com diaminobenzidina. Contracoloração foi realizada com hematoxilina de Meyer.

### ***3.14 Análise estatística***

Para comparação dos diferentes grupos, foi realizado teste-t de Student ou Análise de Variância (ANOVA). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando a versão 5,0 do software GraphPad Software®, San Diego, CA, USA. Comparações dos grupos foram consideradas significativas para valores de  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Quercetina induz citotoxicidade e apoptose em células P39**

Viabilidade da linhagem P39 tratada com quercetina foi determinada pela análise com MTT. Como demonstrado na figura 9, a inibição da proliferação das células P39 por quercetina é dose e tempo dependentes. Concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  de quercetina reduzem significativamente a viabilidade celular após 12, 24 e 48 horas. Com 25  $\mu\text{M}$ , a redução foi observada após 24 e 48 horas de tratamento e com 10  $\mu\text{M}$  apresentou redução em torno de 10%, após 24 e 48 horas. Quando o tempo de incubação das células com quercetina foi prolongado por 48 horas, a viabilidade celular diminuiu ligeiramente em comparação a 24 horas. Desta forma, para realizarmos os experimentos subsequentes adotamos como tempo padrão 24 horas de tratamento com quercetina a concentrações de 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ .

A seguir, a indução de morte celular por quercetina foi analisada (figura 9). Primeiramente, utilizamos marcação com anexina V-FITC/PI. Tratamento com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de quercetina aumentou a percentagem de células em processo apoptótico, correspondendo a  $33,9\% \pm 6,52$  e  $43,9\% \pm 7,29$ , respectivamente, após 24 horas de exposição (figura 9).

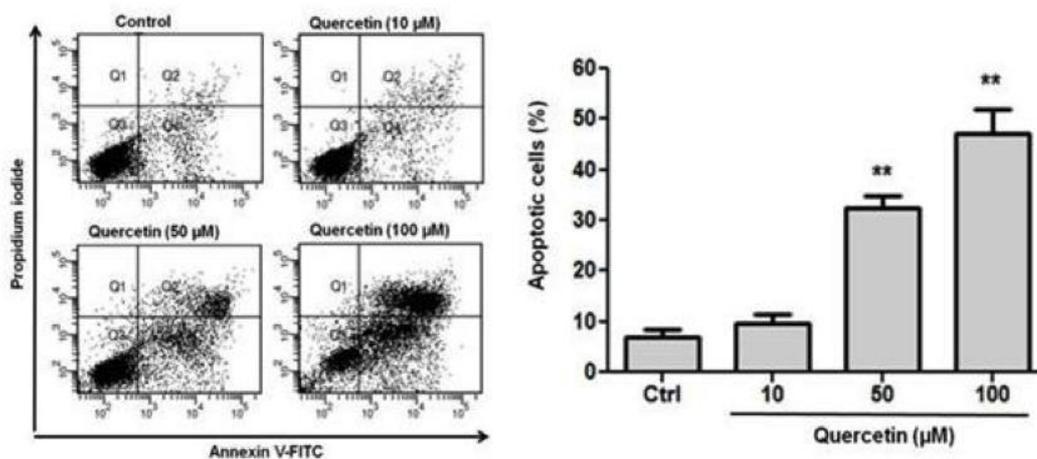
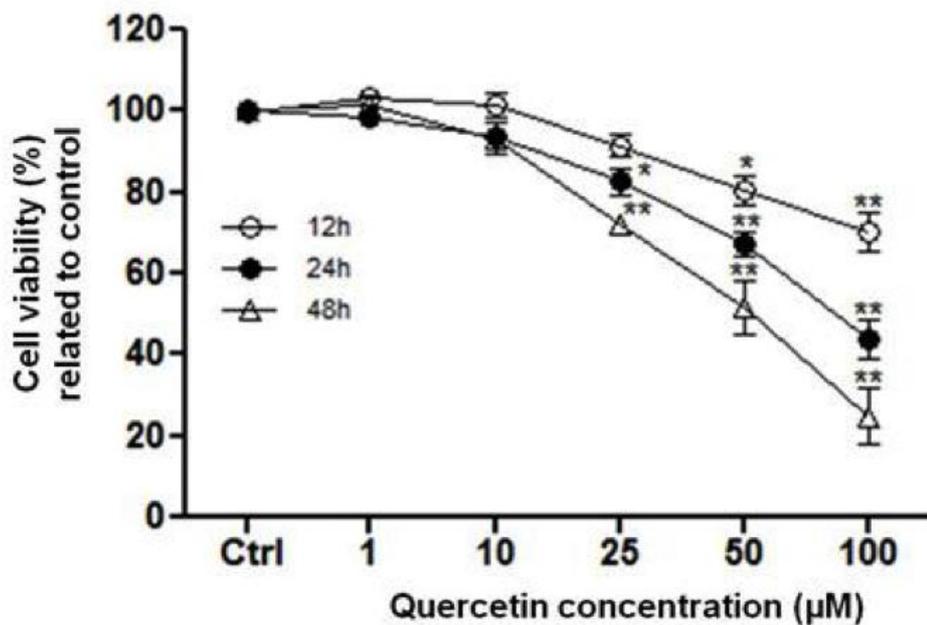


figura 9: Quercetina induz citotoxicidade e apoptose em células P39. Viabilidade celular e apoptose de células P39 tratadas com diferentes doses de quercetina após 12, 24 e 48 horas foram analisados por MTT análise colorimétrica ou Anexina V-FITC/PI citometria de fluxo. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes.\* p < 0,05; \*\* p < 0,0001.

Para determinar o envolvimento das vias intrínseca e extrínseca da apoptose, verificamos o comportamento da via mitocondrial apoptótica e o sistema de receptor Fas/Fas ligante. Avaliamos as alterações no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) através de marcação com rodamina 123 (200 ug/mL) por citometria de fluxo.

Tratamento com quercetina diminuiu a porcentagem de células que apresentavam fluorescência de: 96,7%  $\pm$  1,97 para células não tratadas; 78,5%  $\pm$  2,43 e 48,7%  $\pm$  6,7 para células tratadas com 50 e 100  $\mu$ M, respectivamente (figura 10), indicando que o tratamento com quercetina resultou numa rápida dissipação do potencial de membrana mitocondrial de forma dose dependente. O sistema Fas/Fas ligante é estimulado após 24 horas de tratamento com quercetina, ocorrendo um aumento na expressão proteica do ligante Fas sem modificação do seu respectivo receptor (figura 10). Dessa forma, quercetina foi capaz de induzir apoptose através de receptores de membrana celular.

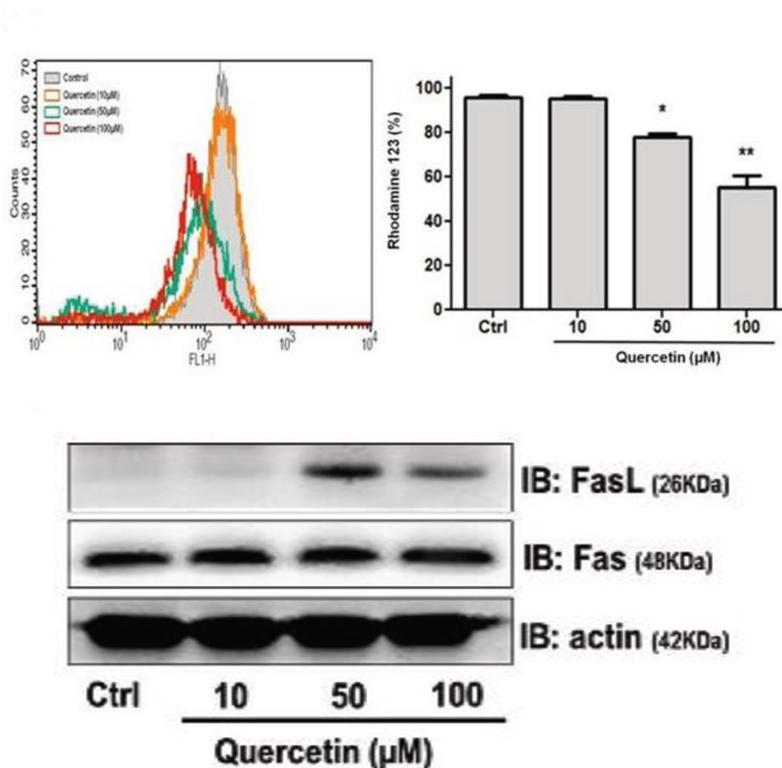


Figura 10: Quercetina induz FAS ligante e diminui o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) em células P39. Células P39 foram tratadas com 10, 50 e 100 $\mu$ M de quercetina por 24 horas e marcadas com rodamina 123 (200  $\mu$ g/mL). A expressão proteica de FAS ligante e FAS receptor foi analisada por western blotting. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,0001$ .

Em seguida, analisamos os níveis proteicos de moléculas relacionadas com apoptose. A expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas foi monitorada após o tratamento com quercetina por western blotting. Como mostrado na figura 11, a

diminuição das proteínas Bcl-2, Bcl-xL e McL-1 (anti-apoptóticas) é dependente da concentração de quercetina utilizada. Contrariamente, a expressão de Bax, uma proteína pró-apoptótica, foi visivelmente aumentada em resposta ao tratamento (figura 11). Juntos, esses resultados mostram que a família das proteínas Bcl-2 está envolvida na apoptose induzida pela quercetina em células P39. As proteínas da família Bcl-2 são os principais reguladores da liberação de citocromo c e ativação de caspases (BORNER, 2003).

Para análise de liberação de citocromo c, avaliamos a expressão dessa proteína em extrato celular fracionado, utilizando o kit MIT 1000 Mitochondrial/Cytosol fractionation® (Millipore® Corporation, Billerica, MA, USA). Observamos que citocromo c é efetivamente liberado da mitocôndria para o citosol quando células foram tratadas com 50 e 100  $\mu$ M de quercetina (figura 11)

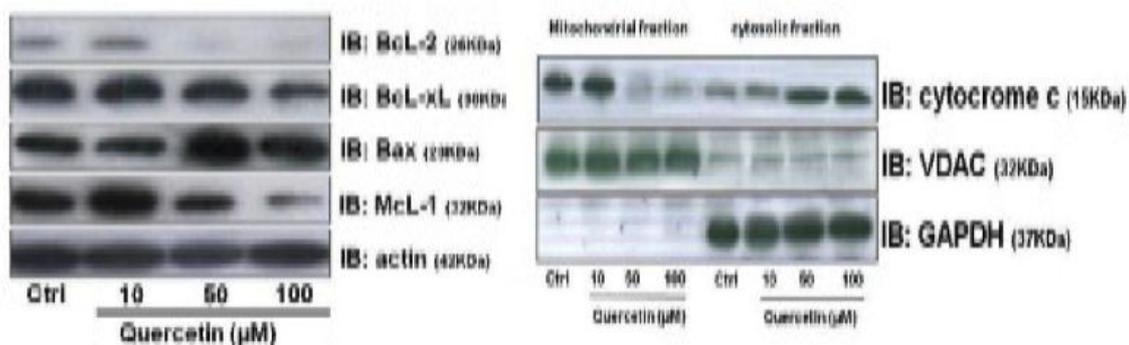


figura 11: Quercetina induz apoptose por diminuição de proteínas antiapoptóticas e libera citocromo c. Células P39 foram tratadas com 10, 50 e 100 $\mu$ M de quercetina por 24 horas. Bcl-2, Bcl-xL, Bax e McL-1 e liberação de citocromo c foram analisadas por western blotting. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), canal iônico dependente de voltagem (VDAC) e actina foram usados como controles internos. Todos os dados são representados por 3 experimentos independentes.

Citometria de fluxo foi realizada para determinar a atividade de caspase-3, -8 e -9 em resposta ao tratamento com quercetina (a detecção de caspases clivadas foi realizada por kit específico, como descrito em material e métodos). Após indução

com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de quercetina, ocorreu um acentuado aumento na percentagem de células marcadas com as caspases-3, -8 e -9 clivadas (figura 12).

O principal efetor da apoptose é a caspase-3, uma protease aspartato-cisteína específica que pertence à subfamília das caspases (ICE). Caspase 3 é expressa em células como um precursor inativo, do qual as subunidades p17 e p10 da caspase “ativa” são proteoliticamente geradas durante a apoptose. O precursor da caspase 3 é primeiramente clivado na região Asp175-Ser176 para produzir a subunidade p11 e o peptídeo p20. Subsequentemente, o peptídeo p20 é clivado em Asp28-Ser29 para gerar a subunidade ativa p17. Nas células P39, observamos a clivagem do precursor de caspase-3 após tratamento com quercetina (figura 12).

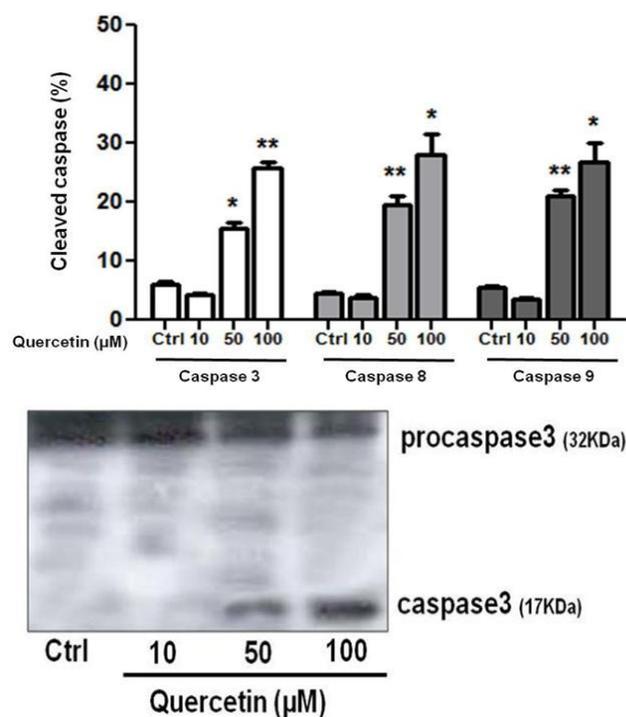


figura 12: Quercetina modula ativação de caspases. Células P39 foram tratadas com 10, 50 e 100 $\mu\text{M}$  de quercetina por 24 horas . A atividade de caspase-3, -8 e -9 foi analisada por citometria de fluxo e a clivagem de pró-caspase-3 foi determinada por western blotting. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes.\* p < 0,05; \*\* p < 0,0001.

#### ***4.2 Quercetina bloqueia o ciclo celular na fase G1 e reduz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs)***

Para avaliar o potencial mecanismo pelo qual quercetina inibe o crescimento das células P39, a progressão do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo. Células P39 foram tratadas com crescentes concentrações de quercetina (10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas e a percentagem de DNA distribuída entre as fases do ciclo celular foi verificada (com marcação por iodeto de propídeo). Como mostrado na figura 10, células não tratadas apresentaram como distribuição: fase G1 49,57% $\pm$ 1,95; fase S 38,48% $\pm$  1,51 e fase G2-M 12,58%  $\pm$  0,88. O tratamento das células com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de quercetina ocasionou um aumento no número de células em fase G1 (69,66%  $\pm$  1,92 e 70,84%  $\pm$  4, respectivamente) com redução no número de células em fase S (24,29%  $\pm$  0,67 e 23,88%  $\pm$  6,55, respectivamente) e na fase G2-M (6,77%  $\pm$ 0,05 e 5,27% $\pm$ 0,7, respectivamente) (figura 13).

A capacidade da quercetina de interferir na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células P39 foi determinada através da marcação intracelular de EROs utilizando o reagente diacetato 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA). EROs foram induzidas nas células P39 com 100 $\mu\text{M}$  do agente oxidante *tert*-butil hidroperóxido (TBHP) e, posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações de quercetina. Após as células serem induzidas com TBHP, observamos aumento na intensidade de fluorescência (353% $\pm$  87,65) quando comparadas às células sem indução (figura 13). Todas as concentrações de quercetina testadas diminuíram os níveis de formação de Eros: a intensidade de fluorescência comparada com o controle for de 301% $\pm$ 24,86 para tratamento com 10 $\mu\text{M}$ , 217% $\pm$ 26,86 para 50  $\mu\text{M}$  e 140%  $\pm$  27,07 para 100 $\mu\text{M}$ , respectivamente (figura 13), confirmando assim a atividade antioxidante da quercetina.

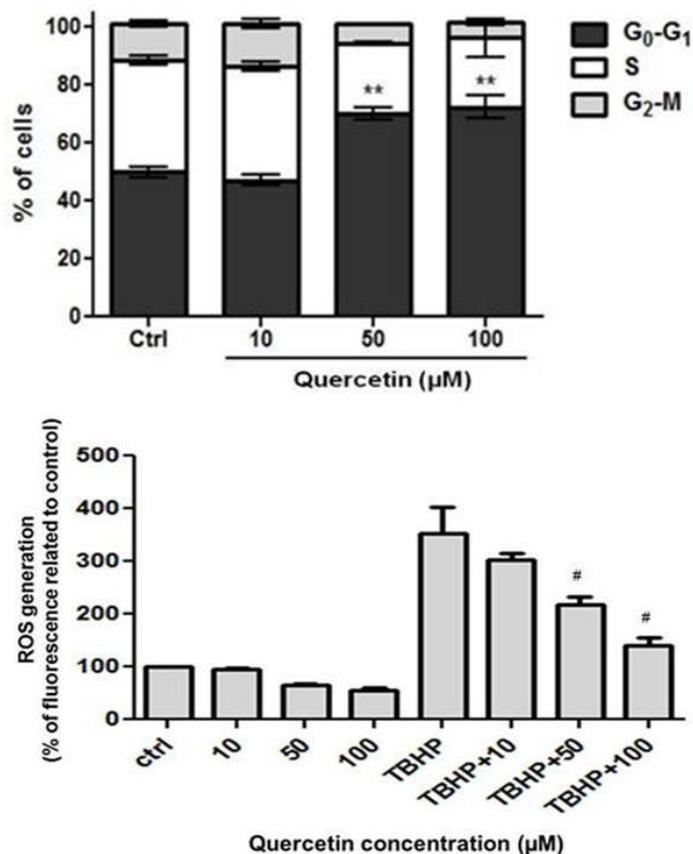


figura 13: Quercetina bloqueia o ciclo celular e modula a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Após tratamento com 10, 50 e 100 μM de quercetina a distribuição do ciclo celular de acordo com seu teor de DNA foi revelado por PI (20 μg/mL) utilizando citometria de fluxo. A produção intracelular de EROs foi estimulado por TBHP (100μM), quantificada por marcação com 25 μM de DCFDA através de citometria de fluxo. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes.\* p < 0,05; \*\* p < 0,0001; # p< 0.001 vs TBHP.

Em seguida, analisamos a expressão das principais proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular. A passagem pelas fases do ciclo celular é mediada pela interação entre proteínas quinases dependentes de ciclinas (Cdks) e suas respectivas ciclinas (CANAVESE; SANTO; RAJE, 2012). Deste modo, analisamos se quercetina modula a expressão de proteínas que governam a fase G1 em células P39. A análise por western blotting revelou que o tratamento com quercetina por 24

horas resultou numa redução nos níveis das proteínas Cdk2, Cdk6, ciclina D, ciclina E e ciclina A de forma dose dependente (figura 14). O complexo ciclina D/Cdk4/Cdk6 fosforila a proteína retinoblastoma (Rb), promovendo a dissociação do fator transcricional E2F1, a qual regula a expressão de genes necessários para a progressão do ciclo (ZHAO; GARTENHAUS, 2009). Tratamento com 50 e 100  $\mu$ M de quercetina resultou na perda da fosforilação da proteína Rb no sítio Serina 807/811 (figura 14). A família dos inibidores dependentes de quinase (CdkIs), Kip1/p27 e Cip1/p21, é conhecida por interagir e inibir a atividade do complexo Cdk-ciclina, regulando tanto a transição G1-S quanto G2-M (ABBAS; DUTTA, 2009; CHU; HENGST; SLINGERLAND, 2008). Observamos um aumento nos níveis proteicos de p21 e p27 após tratamento com quercetina por 24 horas (figura 14).

Esses resultados indicam que a retenção na fase G1 das células P39 mediada por quercetina foi associada com diminuição da fosforilação de Rb e aumento na expressão de p21 e p27, as quais inibem a atividade do complexo Cdk-ciclina.

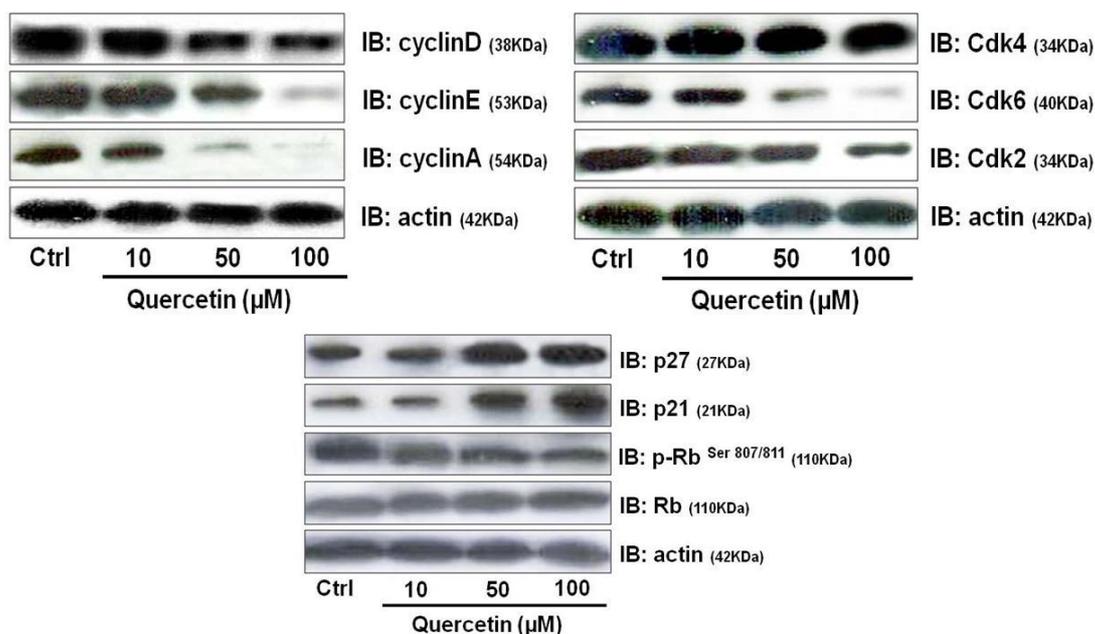


figura 14: Quercetina retém as células na fase G1 com modulação de ciclina, Cdk, inibidores de Cdk e Rb. Após tratamento com 10, 50 e 100  $\mu$ M de quercetina a expressão proteica de ciclina -D, -E e -A; Cdk-4, -6 e -2; p27, p21 e fosforilação de Rb foi analisada por western blotting. Actina foi utilizada como controle interno. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

### ***4.3 Ativação de MAP quinases participa da modulação da fase G1 promovida pela quercetina***

Vários estudos têm sugerido que MAP quinases, tais como ERK 1/2 e MAPK JNK, possuem funções em resposta a vários estímulos apoptóticos (CAI et al., 2013; KIM; CHOI, 2010). Para investigar se quercetina afeta a atividade dessas quinases em células P39, a atividade de ERK 1/2 e JNK foi avaliada por western blotting com anticorpos fosfo-específicos. Como mostrado na figura 15, quercetina promove fosforilação das proteínas ERK 1/2 e JNK de forma dose dependente após 24 horas de tratamento. A contribuição de ERK e JNK para inibição do crescimento e resposta apoptótica induzida por quercetina foi estudada utilizando inibidores seletivos PD184352 e SP600125. Quando as células P39 foram pré-tratadas por 1 hora com PD184352 (20uM) - inibidor de ERK e/ou com SP600125 (20uM) – inibidor de JNK, em seguida, incubadas com 50uM de quercetina durante 24 horas, não encontramos diferenças na percentagem de células apoptóticas ( dupla marcação com anexina V/PI) (figura 15). Utilizando os mesmos inibidores, avaliamos a distribuição do ciclo celular (figura 15). Após exposição de células P39 com quercetina (50uM) + PD184352 e/ou SP600125 durante 24 horas, observamos uma redução significativa no acúmulo de células na fase G1 (43,8% ± 10,43 para PD184352 e 41,47% ± 9,74 para SP600125) em comparação com células tratadas somente com quercetina (70,61% ± 6,51) (figura 15). Esses dados sugerem que a ativação de ERK e JNK desempenha um importante papel no aprisionamento das células na fase G1 do ciclo induzido por quercetina.

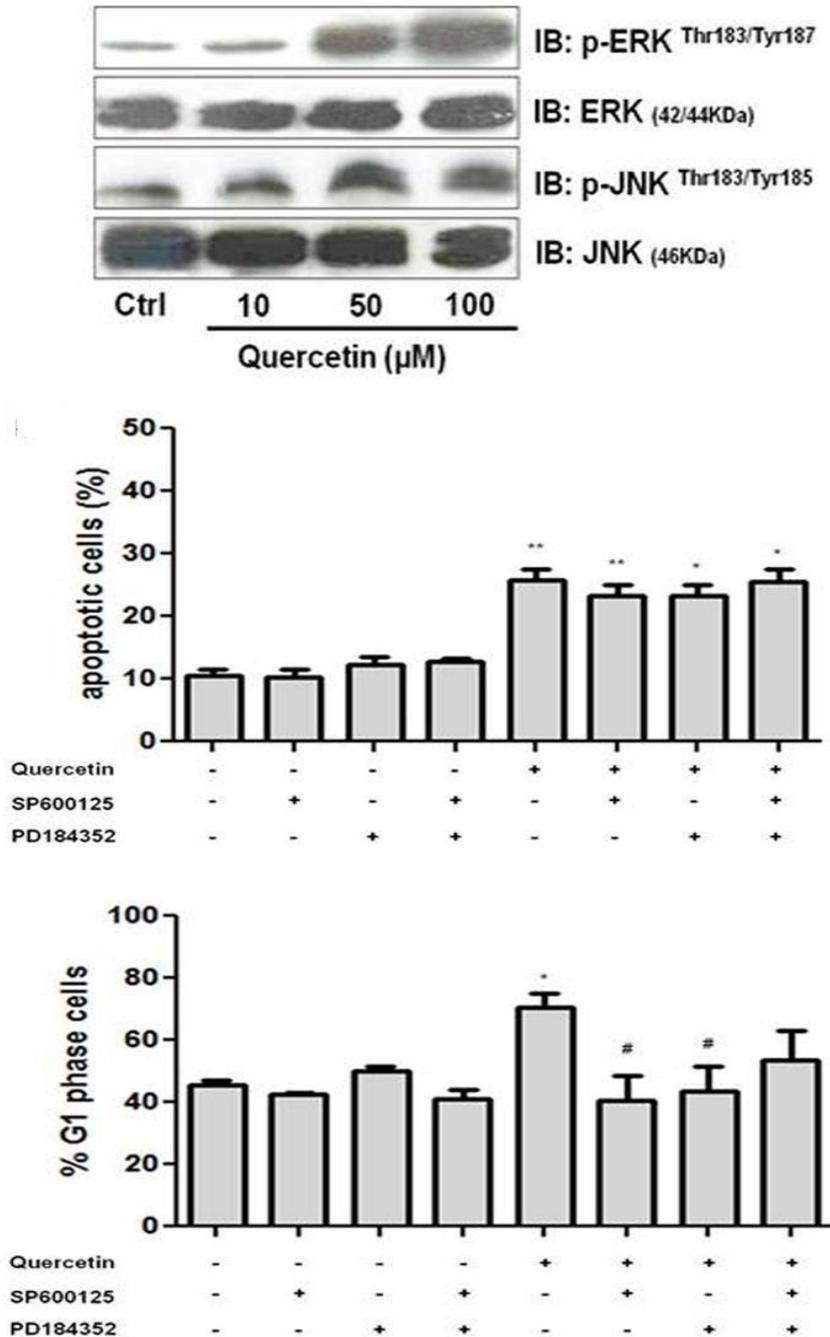


figura 15: Ativação de ERK e JNK participa do aprisionamento das células em fase G1 induzido por quercetina. Após tratamento com 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  de quercetina a fosforilação de ERK Thr183/Tyr187 e JNK Thr183/Tyr185 foi analisada por western blotting. Células P39 foram pré-tratadas por 1 hora com PD184352 (20 $\mu\text{M}$ ) e/ou com SP600125 (20 $\mu\text{M}$ ), em seguida, incubadas com 50 $\mu\text{M}$  de quercetina durante 24 horas. Após tratamento, células foram marcadas com anexina V/PI ou PI (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para avaliação da percentagem de células apoptóticas e ciclo celular, utilizando citometria de fluxo. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.0001$ , #  $p < 0.05$  vs quercetina.

#### ***4.4 Quercetina induz autofagia em células P39***

Quercetina tem sido relatada como sendo capaz de induzir autofagia (WANG et al., 2011). Para determinar se quercetina induz autofagia em células P39, realizamos a coloração por acridina laranja (AO) para identificar a formação de organelas vesiculares ácidas (AVOs). Células P39 foram tratadas com crescentes concentrações (10, 50 e 100  $\mu$ M) de quercetina por 24 horas, coradas com acridina laranja e analisadas por citometria de fluxo. Como demonstrado na figura 16, células P39 tratadas com quercetina apresentam um acúmulo intracelular de organelas ácidas, expresso pelo aumento de fluorescência em relação às células controle (sem quercetina).

Para melhor caracterizar a autofagia induzida pela quercetina em células P39, avaliamos uma característica fundamental da autofagia: conversão da proteína LC3-I em LC3-II (BEHRENDTS et al., 2010). Como demonstrado na figura 16, quercetina aumenta a expressão de LC3-II em doses elevadas (50 e 100 $\mu$ M). Além disso, analisamos marcadores específicos de autofagia que são essenciais para formação e alongamento do autofagossomo. Durante autofagia, uma série de genes associados à formação do autofagossomo é largamente ativada (YANG; KLIONSKY, 2009). Inicialmente, ocorre a interação entre PI3 quinase classe III e beclina-1 para formação da membrana autofágica, posteriormente essa membrana é alongada com ajuda do sistema ubiquitina-conjugado. Atg7, uma proteína chave para autofagia, contribui para ativação de Atg12 a qual se liga covalentemente a Atg5, formando um complexo responsável pelo alongamento da membrana autofágica (GENG; KLIONSKY, 2008). Nossos resultados demonstraram um aumento na expressão proteica de PI3K classe III, beclina-1, Atg7 e Atg5-Atg12 conjugada após tratamento com diferentes concentrações de quercetina por 24 horas (figura 16). Em conjunto,

esses dados demonstraram que quercetina efetivamente induz autofagia celular em células P39.

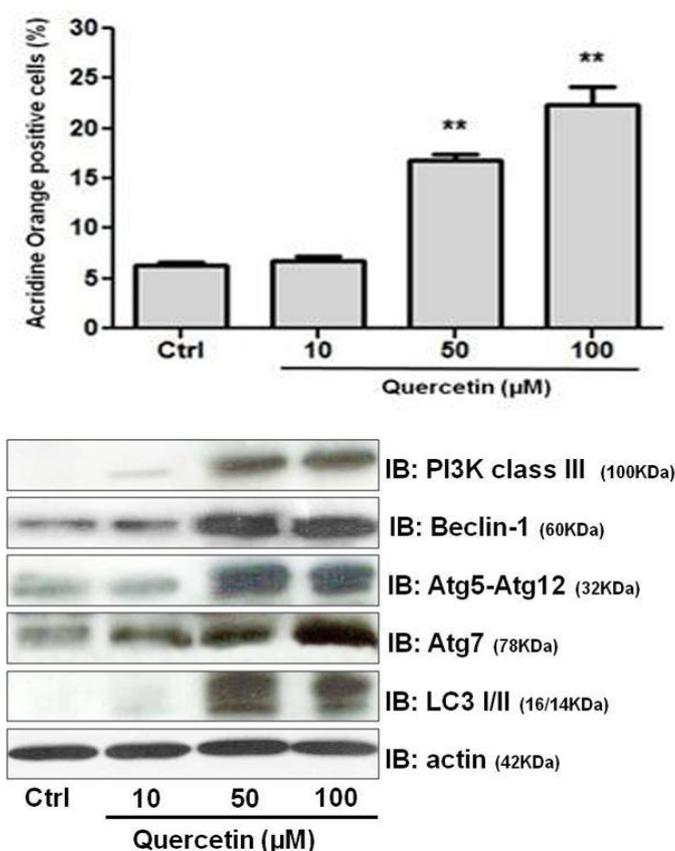


figura 16: Quercetina induz autofagia em células P39. Após tratamento com 10, 50 e 100  $\mu$ M de quercetina, células foram A) coradas com acridina laranja(AO) e analisadas por citometria de fluxo. B) expressão proteica de PI3K classe III, beclina-1, Atg7, Atg5-Atg12 e LC3 I/II foi analisada por western blotting. Actina foi utilizada com controle interno. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.5 Quercetina inibe a sinalização Akt-mTOR

A sinalização Akt-mTOR é considerada um regulador negativo de autofagia (YANG; KLIONSKY, 2009). Assim, examinamos se a fosforilação de Akt e mTOR está envolvida na autofagia induzida por quercetina em células P39. Como exibido na figura 17, células tratadas com quercetina resultaram em diminuição na fosforilação de Akt (Ser 473) e mTOR (Ser2448) após 24 horas, possuindo efeito pronunciado com concentração de 100  $\mu$ M.

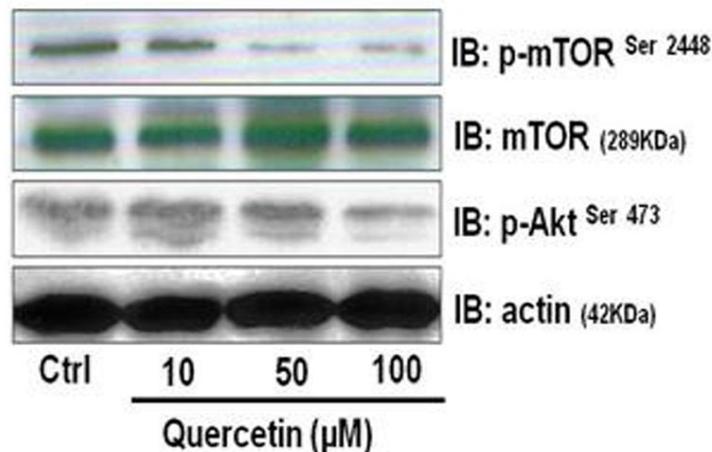


figura 17. Quercetina inibe fosforilação da sinalização Akt-mTOR. Após tratamento com 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  de quercetina, a fosforilação de mTOR Ser 2448 e Akt Ser473 foi analisada por western blotting. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### ***4.6 Autofagia induzida pela quercetina é protetora da morte celular***

Autofagia também pode conferir resistência a fármacos em células tumorais e a morte celular apoptótica pode ser potencializada pela inibição de autofagia (LEFRANC; KISS, 2008). Para determinar se autofagia serve como um mecanismo de sobrevivência para células P39, avaliamos o impacto da autofagia na citotoxicidade induzida por quercetina; para isso, utilizamos a cloroquina como inibidor farmacológico de autofagia. Cloroquina possui a propriedade de interromper a etapa final de formação do autolisossomo, ou seja, a interação entre autofagossomo e lisossomo. As células foram tratadas com 20 $\mu\text{M}$  de cloroquina e/ou combinado com 50 $\mu\text{M}$  de quercetina por 24 horas. Como demonstrado na figura 18, o papel da inibição de autofagia na modulação do crescimento celular foi determinada através da análise do ciclo celular (marcação com iodeto de propídeo). Inibição da autofagia não foi capaz de modular a fase G1 do ciclo como demonstrado quando as células foram tratadas somente com quercetina (figura 18). Entretanto, quando avaliamos a apoptose celular em células inibidas com cloroquina,

observamos um aumento significativo na porcentagem de células apoptóticas duplamente marcadas com anexina V/PI (figura 18). Conjuntamente, nossos resultados sugerem que a autofagia induzida por quercetina possui um papel protetor contra a morte celular por apoptose em células P39.

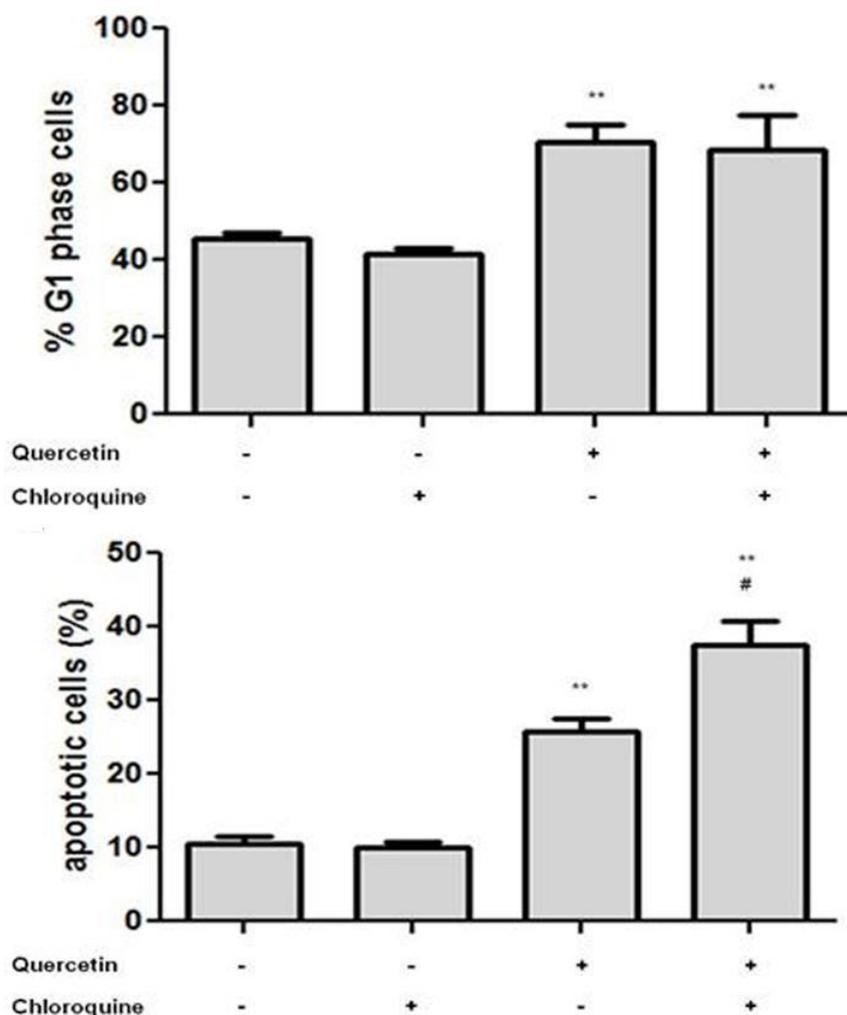


figura 18: autofagia modula apoptose induzida. Após tratamento com 10, 50 e 100 uM de quercetina, células P39 foram pré-tratadas por 1 hora com cloroquina (20uM), em seguida, incubadas com 50uM de quercetina durante 24 horas. Após tratamento, células foram marcadas com PI (20 ug/mL) ou anexina V/PI para avaliação da porcentagem de células apoptóticas e ciclo celular, utilizando citômetro de fluxo. Todos os dados são representativos de 3 experimentos independentes. \* p < 0.05; \*\* p < 0.0001, # p < 0.05 vs quercetina.

Para um melhor entendimento do mecanismo de ação da quercetina, extrapolamos nossa investigação para um modelo *in vivo* de tumor, buscando outras vias de sinalização que possam estar atuando conjuntamente.

#### ***4.7 Quercetina reduz crescimento celular em modelo xenográfico de tumor humano***

Camundongos têm sido extensivamente utilizados como instrumentos de estudos biológicos, especialmente nas áreas de imunologia, oncologia e genética, pois linhagens destes animais são bem padronizadas, bem caracterizadas através de varias gerações e desenvolvem tumores, que compartilham similaridades com os humanos, permitindo que múltiplas características do câncer sejam examinadas nesses modelos (HANN; BALMAIN, 2001; MCCORMACK; BRUSERUD; GJERTSEN, 2005).

Para realizar nossos estudos, utilizamos colônia de camundongos NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J (Laboratório Jackson, CA, USA). Estes animais exibem uma mutação recessiva no cromossomo 16, resultando na falha do gene que codifica a proteína quinase polipeptídeo catalítico DNA ativado (Prkdc). A interrupção desse gene, Prkdc, afeta a função da enzima DNA recombinante, resultando na incapacidade de rearranjo dos receptores de antígeno e assim comprometendo a imunidade humoral e celular, com perda funcional de linfócitos T e B (BOSMA; CARROLL, 1991).

Nosso desenho experimental foi realizado e adaptado de acordo com o trabalho publicado por Lin et al 2012 (LIN et al., 2012) (figura 19).

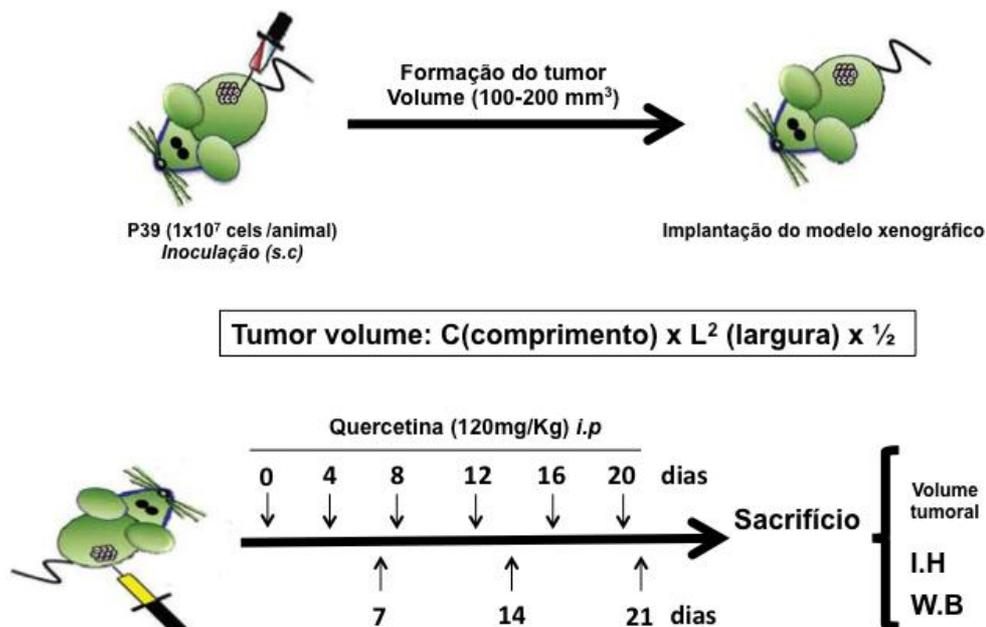


figura 19: Desenho experimental de implantação do modelo xenográfico de tumor humano. Células P39 ( $1 \times 10^7$ ) foram injetadas subcutaneamente no dorso de camundongos NOD/SCID ( $n=6$ ). Após os tumores alcançarem entre 100-200  $\text{mm}^3$ , os camundongos foram tratados com 120 mg/Kg de quercetina (*i.p.*), uma vez a cada 4 dias. A cada 7 dias o volume tumoral foi avaliado de acordo com a seguinte fórmula: volume do tumor ( $\text{mm}^3$ ) = C (comprimento) x L<sup>2</sup> (largura) / 2. Após 3 semanas, os tumores foram retirados e preparados para análise por imunohistoquímica e western blotting.

Células P39 foram inoculadas subcutaneamente no dorso dos camundongos, com concentração de  $1 \times 10^7$  células por animal (grupos de 6 animais). Após essas células formarem tumores e atingirem um volume entre 100 e 200  $\text{mm}^3$ , iniciou-se o tratamento dos camundongos com quercetina.

Quercetina foi preparada em uma solução contendo (50% de PEG 400 + meio RPMI sem soro). Foi utilizada uma concentração final de 120 mg/Kg de quercetina, aplicada intraperitoneal (*i.p.*) em um intervalo de 4 dias entre cada aplicação. O grupo controle recebeu uma solução igual a usada para solubilizar a quercetina.

Após a implantação do modelo xenográfico, o crescimento tumoral foi acompanhado através do volume tumoral com auxílio de um paquímetro. O tamanho tumoral foi medido individualmente uma vez a cada 7 dias e o volume tumoral foi

estimado de acordo com a seguinte fórmula: volume do tumor ( $\text{mm}^3$ ) = C (comprimento) x  $L^2$  (largura) / 2 (HO et al., 2009; JI et al., 2009).

Observamos que quercetina (120mg/Kg) foi capaz de reduzir significativamente o volume tumoral em camundongos inoculados com P39, com inibição de aproximadamente de 30% após 21 dias (figura 20).

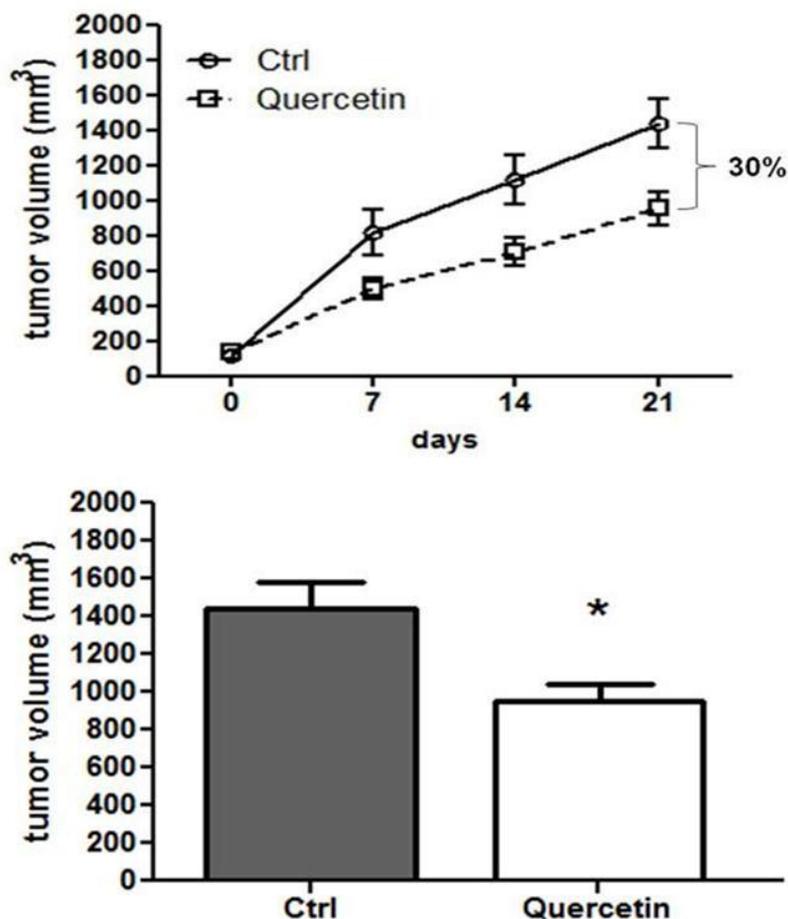


figura 20: Quercetina reduz o crescimento tumoral em modelo xenográfico de tumor humano. Células P39 ( $1 \times 10^7$ ) foram injetadas subcutaneamente no dorso de camundongos NOD/SCID. Após os tumores alcançarem entre 100-200  $\text{mm}^3$ , os camundongos foram tratados com 120 mg/Kg de quercetina (i.p), uma vez a cada 4 dias. A cada 7 dias o volume tumoral foi avaliado de acordo com a seguinte fórmula: volume do tumor ( $\text{mm}^3$ ) = C (comprimento) x  $L^2$  (largura) / 2. Grupo controle recebeu a mesma quantidade de solução de diluição, como indicado em material e métodos. Volume dos tumores após 21 dias de tratamento. Os dados são médias  $\pm$  DP (média de 6 camundongos por grupo). \*  $p < 0.05$ .

Após 21 dias de acompanhamento dos camundongos, os tumores foram retirados e processados para extração de proteínas e preparo de lâminas para imunohistoquímica.

#### ***4.8 Quercetina modula sinalização ERK/JNK e Akt-mTOR em modelo xenográfico de tumor humano***

As vias de sinalização MAP quinases (ERK/JNK) e Akt-mTOR coordenam os mecanismos de proliferação, diferenciação, autofagia, sobrevivência e morte celular. Análise por western blotting revelou alterações nos níveis de atividade de proteínas dessas vias quando os camundongos inoculados com células P39 foram tratados com quercetina (figura 21). Quercetina induziu ativação das formas fosforiladas de ERK Thr183/Tyr187 e JNK Thr183/Tyr185, além disso, o tratamento com 120 mg/Kg de quercetina resultou na diminuição da atividade de Akt (Ser 473) (figura 21) e mTOR (Ser 2448) (figura 18). Esses resultados sugerem que o tratamento com quercetina induz a mesma via de sinalização, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

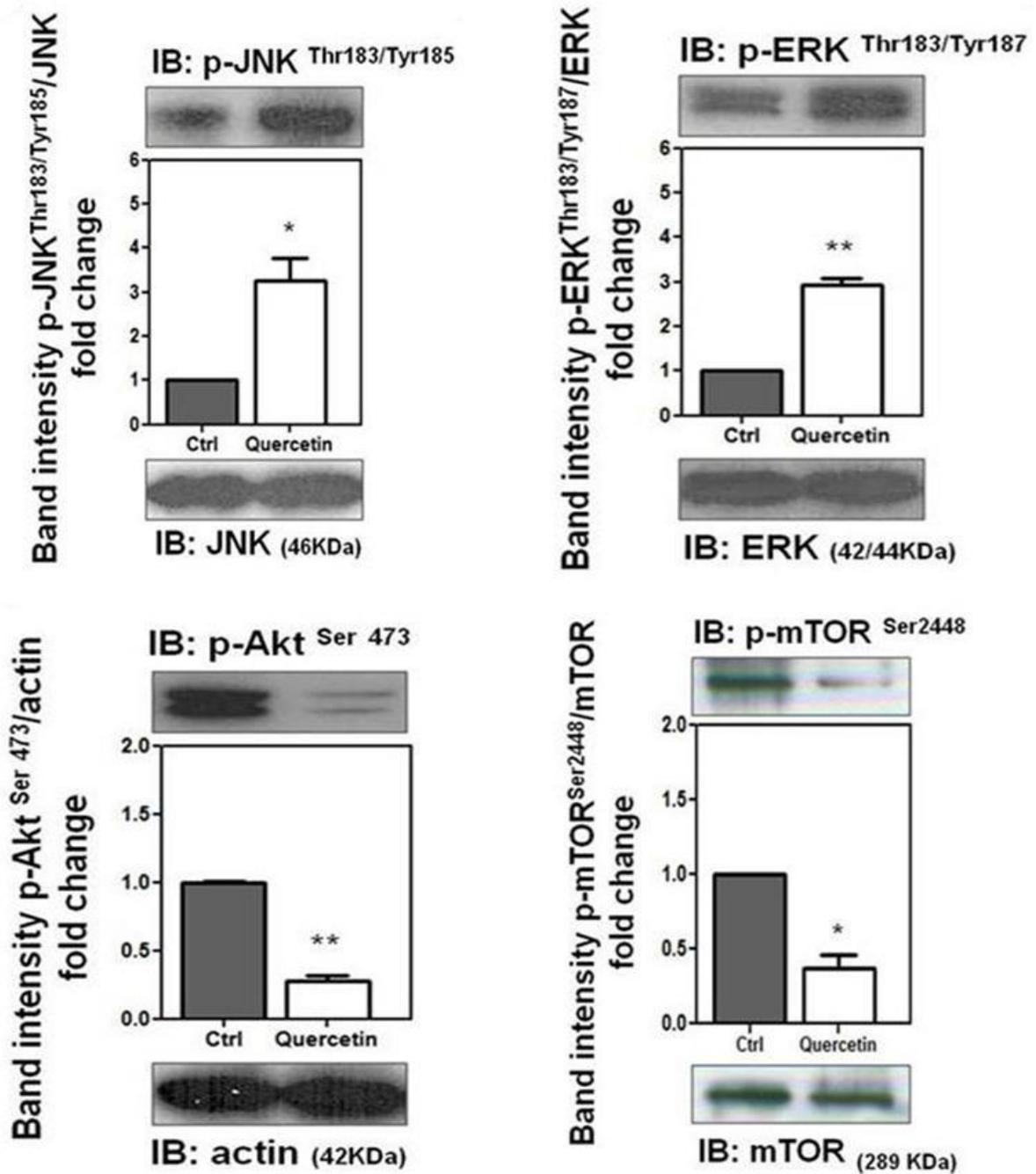


figura 21: Quercetina modula sinalização ERK/JNK e Akt-mTOR em modelo xenográfico de tumor humano. Após 3 semanas de tratamento com quercetina (120 mg/Kg), os tumores foram retirados, lisados e submetidos à extração proteica. Fosfo-ERK Thr183/Tyr187 e fosfo-JNK Thr183/Tyr185; fosfo-Akt Ser 473 e fosfo-mTOR Ser 2448 foram submetidos à análise por western blotting. Os dados são médias  $\pm$  DP (média de 6 camundongos por grupo) \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.0001$ .

#### ***4.9 Quercetina modula apoptose em modelo xenográfico de tumor humano***

Apoptose é de crucial importância para o desenvolvimento e homeostase da hematopoese. Reguladores chave da apoptose incluem a família das proteínas Bcl-2, as quais podem estar hiperativas em muitos tipos de células neoplásicas (LLAMBI; GREEN, 2011). Enquanto redução da expressão de Bcl-2 pode promover apoptose em resposta a drogas anti-cancerígenas, aumento da expressão promove resistência a compostos quimioterápicos e terapia por radiação. Lee D., et al 2008 (LEE; SZCZEPANSKI; LEE, 2008) demonstraram que quercetina estimula a dissociação entre Bax e Bcl-xL, permitindo ativação de caspases mediada pela via mitocondrial.

Nossos resultados demonstraram que quercetina foi capaz de estimular a ativação da via intrínseca do processo apoptótico através da análise da expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 e da proteína pró-apoptótica Bax. Nos animais tratados com quercetina (120mg/Kg), observamos redução na expressão das proteínas Bcl-2 e Mcl-1 (figura 22), sem modulação de Bcl-xL. Bax, proteína pró-apoptótica importante para liberação de citocromo c da mitocôndria, foi significativamente mais expressa nos animais tratados em comparação aos animais não tratados (figura 19).

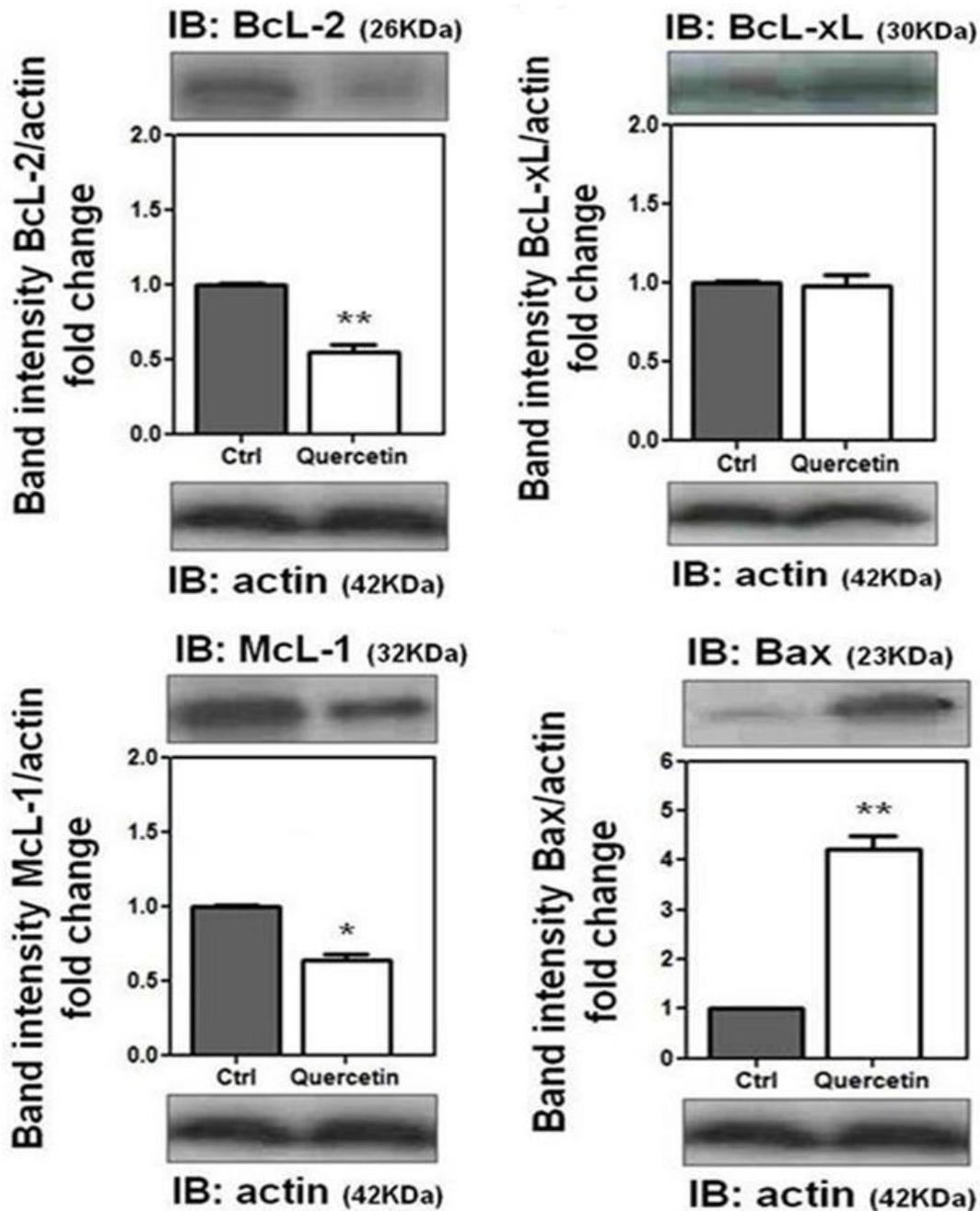


figura 22: Quercetina modula proteínas apoptóticas em modelo xenográfico de tumor humano. Após 3 semanas de tratamento com quercetina (120 mg/Kg), os tumores foram retirados, lisados e submetidos à extração proteica. Bcl-1 e Bcl-xL, Mcl-1 e Bax foram submetidas à análise por western blotting. Actina foi utilizada como controle interno. Os dados são médias  $\pm$  DP (média de 6 camundongos por grupo) \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.0001$ .

Além de avaliar a expressão das principais proteínas responsáveis pela ativação da via mitocondrial de apoptose, demonstramos através de imunohistoquímica que quercetina é capaz de induzir ativação de caspase-3.

Para identificar a proteína caspase-3, tumores retirados dos animais foram fixados em 10% de tampão formalina, cortados e preparados em lâminas imersas em tampão citrato pH 6,0 por 30 minutos. Depois disso, os cortes foram incubados a 4°C por 12-16 horas com anticorpo primário anti-caspase-3 obtido da empresa Santa Cruz biotechnology (Santa Cruz, CA). A específica reação de antígeno-anticorpo foi detectada com sistema baseado em streptavidina-biotina-peroxidase, de acordo com instruções da fabricante (code K5001, Dako Cytomation, CA, USA). A visualização foi realizada com 3,3- diaminobenzidino (Sigma, MO, USA), com a adição de 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão fosfato (pH 7,6). As imagens de cada corte do tumor foram obtidas por microscópio invertido Olympus CBA (Olympus America, Bethesda, MA) com objetiva de 40x e separadas em 4 campos. A contagem do total de células e a quantificação de células marcadas positivamente foram realizadas através do programa ImageJ.

Os cortes do tumor dos animais inoculados com células P39 demonstraram expressão média de 39,68% ± 6,90 quando tratados com 120 mg/Kg de quercetina. Para os animais controle o índice foi de 8,10% ± 2,13 (figura 23).

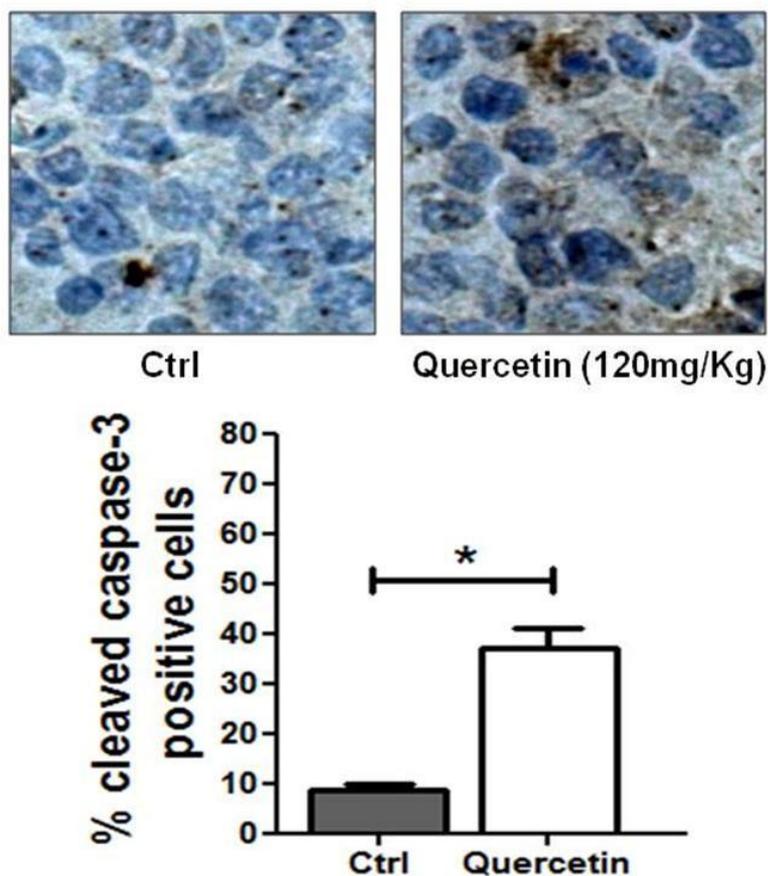


figura 23: Quercetina modula caspase-3 em modelo xenográfico de tumor humano. Após 3 semanas de tratamento com quercetina (120 mg/Kg), os tumores foram fixados em 10% de tampão formalina, cortados e preparados em lâminas. Imunohistoquímica foi realizada nas lâminas utilizando anticorpo anti-caspase-3; percentagem de núcleos positivos marcados com caspase-3. Contagem de 4 campos por seção tumoral utilizando microscópio de luz (Olympus CBA, Olympus America, Bethesda, MA) com objetiva de 40x. Os dados são médias  $\pm$  DP (média de 6 camundongos por grupo) \*  $p < 0.05$ .

#### ***4.10 Alteração das proteínas do ciclo celular em modelo xenográfico de tumor humano***

Para que ocorra a progressão no ciclo celular faz-se necessária a interação entre ciclinas e suas quinases dependentes de ciclinas (Cdks) e inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CKIs) são os principais reguladores da atividade ciclinas-Cdks.

Com isso, verificamos as principais proteínas que governam essa progressão através das técnicas de western blotting e imunohistoquímica. Para as Cdks, não

observamos mudanças significativas na expressão de proteínas extraídas dos animais submetidos ao tratamento com quercetina (figura 24). Entretanto, quando analisamos a expressão das ciclinas, podemos observar uma diminuição na expressão de ciclina D e ciclina E (figura 24), além de diminuição na fosforilação de retinoblastoma (Rb). Esses dados corroboram com os obtidos em testes *in vitro*, onde a capacidade da quercetina em bloquear as células na fase G1 do ciclo se deve à diminuição das ciclinas e atividade de Rb.

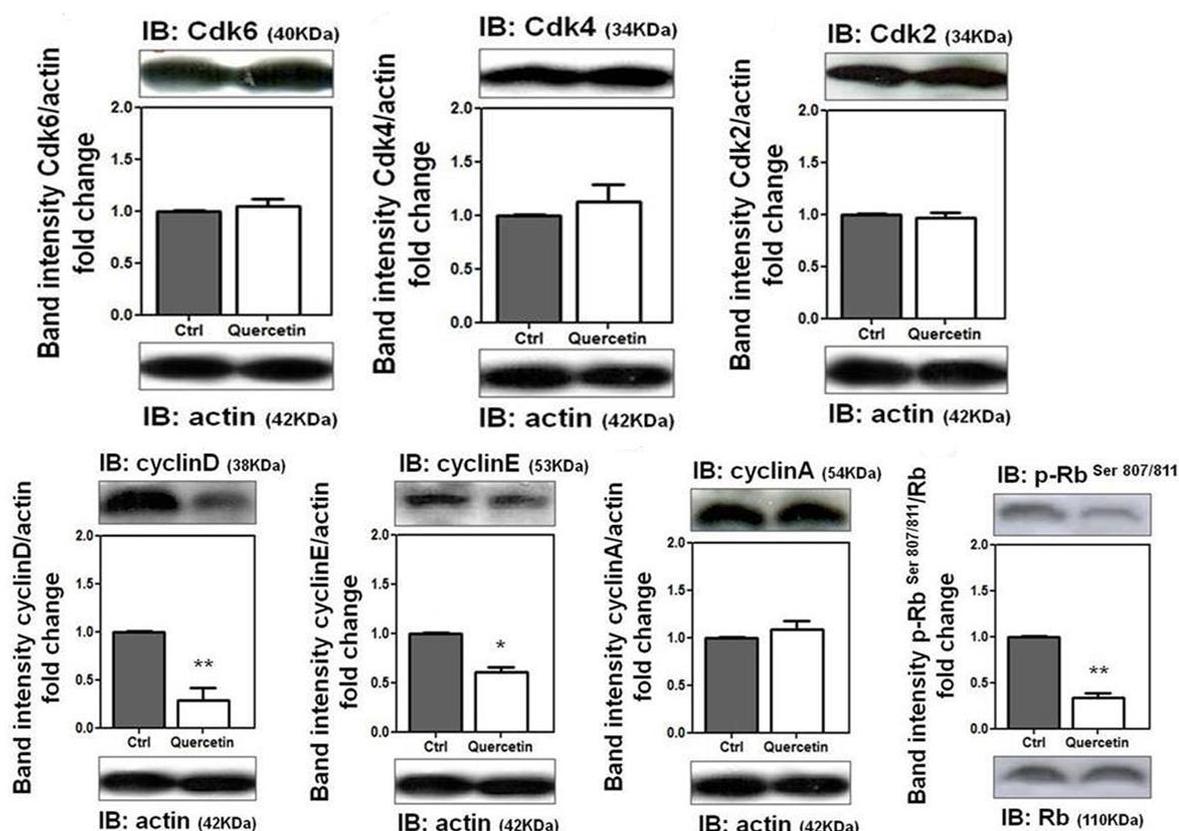


figura 24: Quercetina modula ciclinas e atividade de Rb em modelo xenográfico de tumor humano. Após 3 semanas de tratamento com quercetina (120 mg/Kg), os tumores foram retirados, lisados e submetidos à extração proteica. Cdk6, -4 e -2; ciclina D, -E, -A e fosfo-Rb foram submetidas à análise por western blotting. Actina foi utilizada como controle interno. Os dados são médias  $\pm$  DP (média de 6 camundongos por grupo) \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,0001$ .

Lâminas dos cortes tumorais foram preparadas para receber marcação com anticorpo anti-p21 para determinar expressão de inibidor de quinase dependente de ciclina (CKI). A visualização foi realizada com 3,3- diaminobenzidino sendo

adicionado 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão fosfato (pH 7,6). Animais inoculados com células P39 apresentaram em média 12% ± 2,61 de células marcadas (figura 25). Após o tratamento com quercetina, os tumores apresentaram um aumento em células positivas para p21 (54,54% ± 8,10).

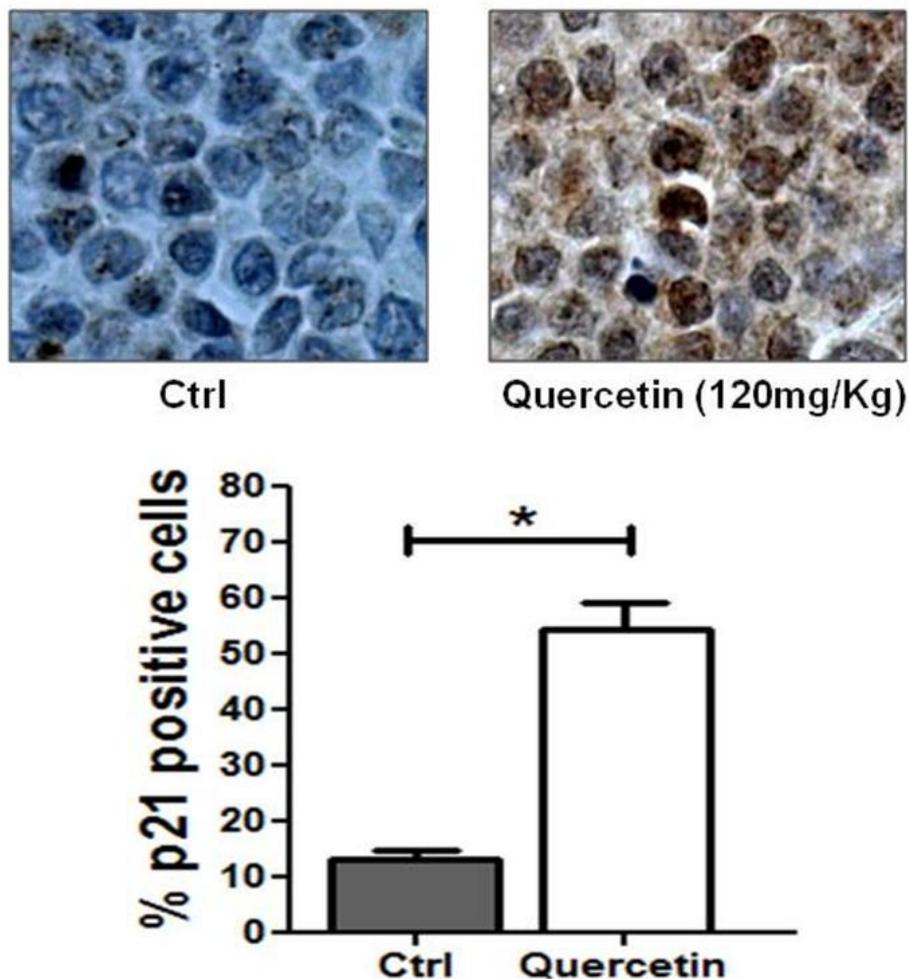


figura 25: Quercetina modula p21 em modelo xenográfico de tumor humano. Após 3 semanas de tratamento com quercetina (120 mg/Kg), os tumores foram fixados em 10% de tampão formalina, cortados e preparados em lâminas. Imunohistoquímica foi realizada nas lâminas utilizando anticorpo anti-p21; percentagem de núcleos positivos marcados com 21. Contagem de 4 campos por seção tumoral utilizando microscópio de luz (Olympus CBA, Olympus America, Bethesda, MA) com objetiva de 40x. Os dados são médias ± DP (média de 6 camundongos por grupo) \* p < 0.05.

#### 4.11 Quercetina modula o processo autofágico em modelo xenográfico de tumor humano

Em relação à autofagia, nossos resultados demonstraram que em animais tratados com quercetina ocorreu aumento na expressão das proteínas PI3K classe III e beclina-1 (figura 26), responsáveis pela iniciação-nucleação da cascata autofágica. Para formação do autofagossomo, é necessária a interação das proteínas Atg5-Atg12 com aumento de Atg7. Também observamos aumento da expressão de Atg5 e Atg 7 nos tumores retirados dos animais tratados com quercetina (120 mg/Kg). (figura 26).

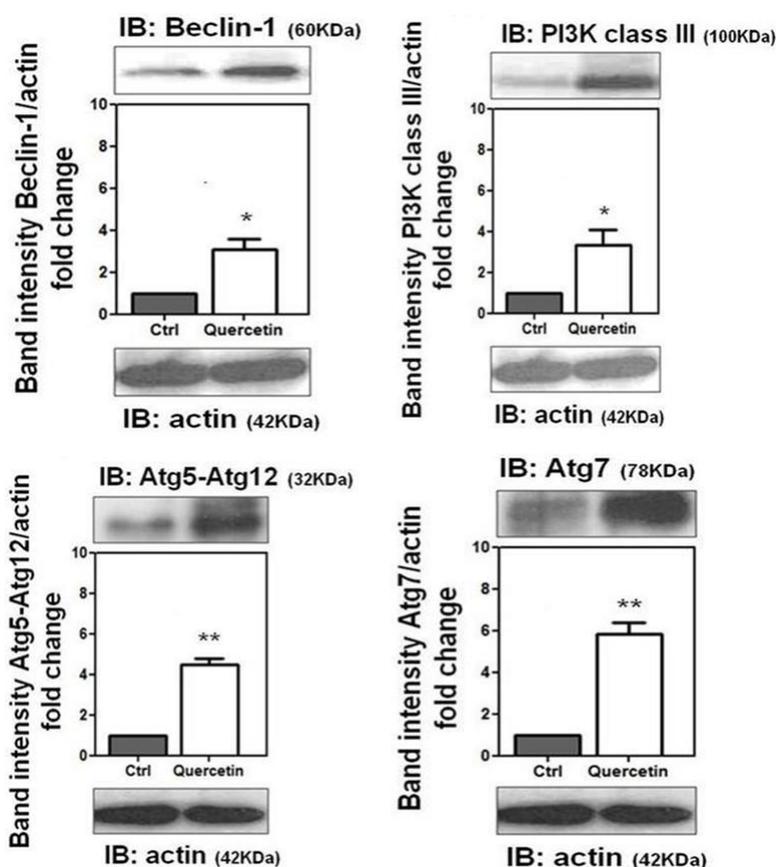


figura 26: Quercetina modula autofagia em modelo xenográfico de tumor humano. Após 3 semanas de tratamento com quercetina (120 mg/Kg), os tumores foram retirados, lisados e submetidos à extração proteica. PI3K classe III e Beclina-1; Atg5-Atg12 e Atg7 foram submetidas à análise por western blotting. Actina foi utilizada como controle interno. Os dados são médias  $\pm$  DP (média de 6 camundongos por grupo) \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,0001$ .

LC3 é uma proteína de cadeia leve associada a microtúbulo e é largamente utilizada para monitorar a autofagia. A detecção da conversão de LC3 (LC3 I para LC3 II) é associada à formação do autofagossomo. Através de análise por imunohistoquímica, determinamos a expressão de LC3 em tumores retirados dos animais inoculados com células P39.

Observamos pronunciada marcação de LC3 clivada nos cortes feitos em tumores de células P39 (figura 27). Os animais tratados apenas com a solução diluente apresentaram em média  $12,30\% \pm 2,62$  de células marcadas para LC3 clivada e aqueles que receberam quercetina (*i.p*) apresentaram uma marcação de  $41,66\% \pm 6,67$  (figura 27).

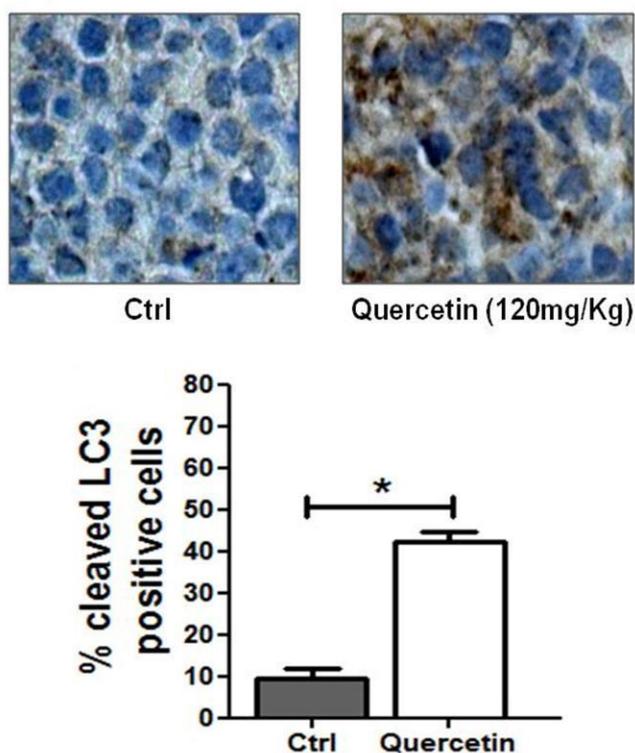


figura 27: Quercetina modula LC3 em modelo xenográfico de tumor humano. Após 3 semanas de tratamento com quercetina (120 mg/Kg), os tumores foram fixados em 10% de tampão formalina, cortados e preparados em lâminas. Imunohistoquímica foi realizada nas lâminas utilizando anticorpo anti-LC3; percentagem de núcleos positivos marcados com LC3. Contagem de 4 campos por seção tumoral utilizando microscópio de luz (Olympus CBA, Olympus America, Bethesda, MA) com objetiva de 40x. Os dados são médias  $\pm$  DP (média de 6 camundongos por grupo) \*  $p < 0.05$ .

## **5. DISCUSSÃO**

Células leucêmicas tornam-se frequentemente resistentes para a maioria das drogas usadas na quimioterapia, pois essas células possuem mecanismos genéticos e epigenéticos que bloqueiam os efeitos anti-proliferativos e apoptóticos dessas drogas. Por isso, o desenvolvimento de agentes que possam ser usados como forma alternativa de tratamento tem grande relevância; e compostos que agem de forma específica em certas vias de sinalização são promissores.

Quercetina é amplamente encontrada em plantas e produtos alimentícios e diferentes efeitos benéficos têm sido associados com o consumo desse bioflavonóide (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008). Uma variedade de estudos indica o possível uso da quercetina para o tratamento do câncer através de sua interação com múltiplas vias relacionadas ao câncer (JEONG et al., 2009). Nesse sentido, é importante estabelecer quais são os diferentes efeitos relacionados com o potencial quimioterapêutico da quercetina e se esses múltiplos efeitos estão conectados de alguma forma. No presente estudo, utilizamos a linhagem celular P39, que foi estabelecida a partir de células leucêmicas do sangue periférico de paciente que possuía síndrome mielodisplásica em transformação, como modelo. O tratamento da quercetina resultou em redução da viabilidade das células P39 e diminuição do volume tumoral quando essas células foram inoculadas em camundongos NOD/SCID. Esses efeitos foram acompanhados por modulação da morte celular, ativando as vias extrínseca e intrínseca da apoptose. Apoptose é de crucial importância para o desenvolvimento e homeostase da hematopoese. Reguladores-chaves da apoptose incluem a família das proteínas Bcl-2, que estão hiperativas em muitos tipos de células neoplásicas (LLAMBI; GREEN, 2011). Enquanto a redução da expressão de Bcl-2 pode promover apoptose em resposta a drogas anti-cancerígenas, seu aumento pode promover resistência a compostos quimioterápicos

ou terapia por radiação. Lee D., et al 2008 (LEE; SZCZEPANSKI; LEE, 2008) demonstraram que a quercetina estimula a dissociação entre Bax e Bcl-xL, permitindo ativação de caspases mediada pela mitocôndria. Células P39 expostas ao tratamento com quercetina apresentaram aumento na expressão da proteína pró-apoptótica Bax e supressão de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1, alterando, dessa forma, o balanço para a formação de poros permeáveis na membrana externa da mitocôndria (PARK et al., 2011). Nossos resultados corroboram aos recentemente publicados por Yuan, Z. et al., 2012 que demonstraram a capacidade da quercetina em causar apoptose em células leucêmicas por diminuição da expressão proteica de PI3 quinase, diminuição da fosforilação de Akt, diminuição dos níveis de Bcl-2 e aumento da ativação de caspase 2 e 3 (YUAN et al., 2012).

Em linhagem de câncer de mama (MCF-7), quercetina diminuiu significativamente a expressão de Bcl-2 e aumentou a de Bax, além de inibir a proliferação celular após 48 horas de exposição (DUO et al., 2012).

Cheng et al ( 2010) mostraram que a apoptose induzida por quercetina é acompanhada por diminuição de Mcl-1 e mudança conformacional de Bax na membrana mitocondrial de células U937. Além disso, administração *in vivo* de quercetina reduziu o crescimento de células U937 em modelo de xenotransplante, com aumento de células-TUNEL positivas (CHENG et al., 2010).

A disfunção mitocondrial, tal como a perda do potencial de membrana tem sido reportado como sendo inicial e central para indução da apoptose pela via intrínseca (GAO et al., 2013). Observamos uma redução na intensidade de fluorescência para células marcadas com Rodamina 123: a liberação de citocromo c da mitocôndria para o citoplasma sugere que eventos envolvendo disfunção mitocondrial e mudanças no potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ) estão envolvidos com a morte de células P39 causada pelo tratamento com a quercetina. Kim e

colaboradores (2013) demonstraram que, em células de glioblastoma humano, quercetina foi capaz de diminuir o potencial de membrana mitocondrial, com aumento na atividade de caspase 3 e 9 (KIM et al., 2013). Além disso, quercetina ativa JNK e aumenta a expressão de p53, que é translocado na mitocôndria conduzindo liberação de citocromo c para o citosol. Após verificarmos a modulação do potencial de membrana mitocondrial, identificamos nas células P39 eventos subsequentes que completam o processo apoptótico. É bem caracterizado que a perda do potencial de membrana causa liberação de fatores pró-apoptóticos, tais como liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol, que se liga e ativa APAF-1 e conseqüentemente forma o apoptossoma (CAO et al., 2004). Esse complexo é capaz de ativar caspase 9, acionando uma cascada de ativação de caspases (MATÉS et al., 2008). Nossos resultados estão de acordo com esses dados da literatura, pois o tratamento com quercetina resultou em aumento significativo da ativação das caspases 9, 8 e 3. Aumento na percentagem de caspase 8 ativada com elevada expressão de FAS ligante indica que a via de receptor de morte da membrana plasmática também é ativada em resposta ao estímulo com quercetina.

Quercetina é considerada um excelente removedor de radicais livres (ROBASZKIEWICZ; BALCERCZYK; BARTOSZ, 2007). Nossos resultados mostraram um efeito antioxidante da quercetina em células P39. Esse dado corrobora com os encontrados por Zhan e colaboradores (2011) onde quercetina diminui a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) em células de leucemia monocítica aguda (THP-1) quando estimuladas com LPS (ZHANG et al., 2011). Além disso, essa propriedade pode estar relacionada à capacidade de interagir com importantes sistemas antioxidantes de defesa celular, como complexo Nrf2/Keap. Esse complexo está relacionado com a via apoptótica através da regulação de proteínas da família Bcl-2 (NITURE; JAISWAL, 2011).

Keap1 parece ligar-se ao domínio BH2 das proteínas Bcl-2 e Bax, facilitando a apoptose. Quercetina modula a sinalização redox através da translocação e expressão nuclear de Nrf2 em células HepG2 (RAMYAA; KRISHNASWAMY; PADMA, 2014).

Desde o início deste século uma outra via tem chamado bastante atenção na resposta celular a alguns tipos de injúrias. Esta via, chamada de autofagia, pode apresentar duas funções distintas: como mecanismo fisiológico de proteção celular sem causar apoptose ou, dependendo do estímulo, iniciar o processo apoptótico nas células (KONDO et al., 2005).

A mitocôndria, uma organela de grande interesse na regulação da morte celular programada, é também especialmente sensível durante a autofagia. Esse processo é fisiologicamente regulado e evolutivamente conservado e envolve o sequestro de constituintes citoplasmáticos em vesículas chamadas de autofagossomos, que são fusionadas com vesículas lisossomais que liberam suas enzimas para que esse conteúdo seja degradado e reciclado (YANG; KLIONSKY, 2009; ZHU; WANG; CHU, 2013). Embora o papel da autofagia no catabolismo de proteínas e organelas seja bem documentado, o envolvimento desse processo na quimioterapia do câncer é ainda controverso. Alguns agentes anticancerígenos podem induzir a autofagia e aumentar a eficácia quimioterapêutica (CHEN et al., 2009). Entretanto, alguns agentes induzem o processo autofágico como um mecanismo protetor, permitindo o escape das células da morte por apoptose (KIM et al., 2009). Nossos resultados demonstraram que a quercetina ativa autofagia tanto *in vitro* quanto *in vivo* em células P39. Esses achados corroboram, em parte, os encontrados na literatura, entretanto até o presente momento não encontramos trabalhos relatando dados conjuntos *in vitro* e *in vivo* em células de leucemia mielóide. Wang e colaboradores (2011) demonstraram que exposição de células AGS e MKN28 (câncer gástrico) à quercetina resulta em um pronunciado efeito pró-

apoptótico, ativando o caminho mitocondrial, induzindo a formação de vacúolos autofágicos, conversão de LC3-I para LC3-II, recrutamento de LC3-II para o autofagossomo e ativação de genes que regulam a autofagia. Além disso, estudos funcionais revelaram que ativação da autofagia pode ser modulada pelas vias Akt-mTOR e fator 1-alfa induzido por hipóxia (HIF-1alfa) (WANG et al., 2011). Bruning e colaboradores (2012) relataram que o acúmulo de biomarcadores de autofagia em células de câncer epitelial se dá principalmente pela redução da fosforilação de substratos da via mTOR, 4E-BP1 e p70S6-quinase (BRÜNING, 2013).

Entretanto, a maioria desses trabalhos demonstraram de forma independente a ativação da sinalização autofágica. Chiela e colaboradores (2011) foram um dos poucos que tentaram relacionar a via de autofagia, apoptose e ciclo celular (FILIPPI-CHIELA et al., 2011). Eles estudaram o efeito do resveratrol (um composto polifenólico amplamente utilizado como anticancer em diferentes células neoplásicas) em células de glioblastoma. Resveratrol induziu a formação de autofagossomo em três linhagens de glioblastoma, com aumento na expressão de proteínas autofágicas Atg5, beclina-1 e LC3-II. Inibição da autofagia induzida por resveratrol desencadeia apoptose com aumento de Bax e clivagem de caspase 3. Resveratrol também induziu a retenção das células na fase S-G2/M, acompanhado de um aumento dos níveis de fosfo-Cdc2(Tyr15), ciclina A, E, B e fosfo-Rb(Ser 807/811) e diminuição de ciclina D. Interessantemente, este bloqueio, em S-G2/M, foi dependente da indução de autofagia e sua inibição aboliu o bloqueio do ciclo celular com retorno aos níveis normais das proteínas que governam essa fase (FILIPPI-CHIELA et al., 2011).

Finalmente, diversos trabalhos têm mostrado que apoptose e autofagia estão intimamente ligados por vias de sinalização compartilhadas e pela modulação recíproca de componentes específicos que interagem uma sobre a outra. Entre as principais proteínas se encontram as anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, que inibem

autofagia por “sequestrar” a proteína beclina-1. A redução dos níveis dessas proteínas ligadoras de beclina-1 com a utilização de agentes BH3 miméticos, desencadeou autofagia. Por esses compostos ligarem-se competitivamente a essas duas proteínas (Bcl-2 e Bcl-xL) perturbam a ligação das mesmas com beclina-1, que fica “livre” para formar complexo com PI3K classe III e disparar o processo autofágico (MAIURI et al., 2007).

Nossos resultados demonstraram através de análises funcionais que a inibição da autofagia (por cloroquina) aumenta fortemente a indução da apoptose induzida pela quercetina, sugerindo que a autofagia induzida pela quercetina proporciona um caráter protetor nas células P39.

A inter-relação das vias de sinalização é de extrema importância para definir o caminho de ação da quercetina. Por isso, temos indícios que a via PI3K/Akt/mTOR exerça um importante papel nesta relação, devido a sua ação sobre um amplo número de moléculas controladoras de proliferação, ciclo celular, síntese proteica e autofagia (KIM; LEE, 2007; SHINTANI; KLIONSKY, 2004). Entre as principais modulações estão a regulação negativa dos inibidores de progressão do ciclo celular, p27 e p21 (GESBERT et al., 2000; ZHOU et al., 2001); prevenção da apoptose através de inibição das proteínas pró-apoptóticas Bim, Bax, Bad, c-Raf e caspase 9; inibição da autofagia e ativação de síntese protéica através da fosfo-inativação da proteína tuberina (TSC2), com consequente ativação de mTOR e do complexo Raptor e ativação de p70S6k, entre outros (DANGAS et al., 2005; INOKI et al., 2002).

A quercetina tem sido descrita por interferir tanto na atividade de mTOR quanto na ativação da via PI3K/AkT, o que confere à quercetina vantagem funcional de inibidor duplo/específico de mTOR/PI3K. Essa capacidade torna a quercetina um agente promissor para o tratamento do câncer e outras doenças associadas com a regulação da via mTOR (BRÜNING, 2013). Nossos dados demonstraram desfosforilação de Akt e mTOR causada pelo tratamento com a quercetina, tanto *in*

*vitro* quanto no modelo xenográfico , e enfatiza a importância funcional da sinalização Akt-mTOR no efeito protetor da autofagia mediado pela quercetina em células P39. Nossos resultados entretanto, mostraram que a inibição da autofagia não altera a modulação do ciclo celular proporcionada pela quercetina. Esses resultados sugerem que o processo autofágico não está associado com a modulação do ciclo celular em células P39 tratadas com quercetina.

Durante análise das fases do ciclo celular foi demonstrado bloqueio na fase G1 do ciclo causado pelo tratamento com a quercetina. Além disso, verificamos diminuição nos níveis de Cdk2, Cdk6, ciclina D, ciclina E, ciclina A e fosfo-Rb acompanhado por indução de p21 e p27. Nesse sentido, Mu et al 2007 demonstraram que, em HepG2, células de hepatoma humano, a quercetina bloqueia a progressão do ciclo celular na fase G1; esse efeito foi acompanhado do aumento de p21, p27 e p53 (MU et al., 2007). p21 é um importante mediador para o bloqueio de crescimento, um regulador da atividade da proliferação celular; e de Cdk; inibe que as células entrem na fase G1 em resposta a dano de DNA e bloqueia a reentrada das células em G2 e S através do bloqueio de ciclina E-Cdk2 mediada pela fosforilação de Rb (MITREA et al., 2012). Inapropriada fosforilação de Rb devido ao rearranjo e aumento da expressão de ciclina D contribui para o desenvolvimento de vários tipos de tumores, incluindo linfomas e carcinomas (HUNTER; PINES, 1994). A alta produção de ciclina D e sua quinase Cdk4 permite uma constitutiva fosforilação da proteína Rb e desregulação na atividade do fator transcricional E2F. Desregulação de outras proteínas que governam a fase G1 do ciclo (ex. ciclina E) também estão associadas à tumorigênese (KEYOMARSI et al., 1995). Shukla e colaboradores (2007) demonstraram que apigenina, flavonóide da classe da quercetina, causa retenção das células de câncer de próstata na fase G1, com diminuição da fosforilação de Rb (Ser 807/811) e ativação da via ERK (SHUKLA; GUPTA, 2007). Como Rb é um substrato direto de Cdks, a diminuição na

fosforilação de Rb observada nos nossos resultados é consistente com a diminuição na expressão de Cdk e bloqueio na fase G1 do ciclo causada pela quercetina. Por outro lado, existem múltiplos mecanismos conhecidos que potencialmente inibem a fosforilação de Rb, incluindo degradação proteossomal e inibição das vias Ras/Raf/MAPK ou PI3K/Akt (BRADHAM; MCCLAY, 2006; LIANG; SLINGERLAND, 2003).

A família das MAP quinases é essencial para maquinaria de transdução de sinais entre receptores de superfície e componentes do meio. Possui 3 subfamílias: ERK, p38 e JNK (NEERGHEEN et al., 2010; SHIMIZU; SHIRAKAMI; MORIWAKI, 2008). A ERK tem um papel bem estabelecido na regulação da progressão entre as fases G1 e S em resposta a estímulos mitogênicos, além de ser fundamental para transformação mediada por Ras (HILGER; SCHEULEN; STRUMBERG, 2002). JNK é conhecida por aumentar a estabilidade de reguladores do ciclo celular, p21 e p27 (KIM et al., 2002). Observamos que o tratamento com quercetina induziu aumento na fosforilação de ERK1/2 e JNK em células P39 e no modelo xenográfico. Os efeitos da quercetina em ERK e JNK nas células P39 foram fortalecidos pelo uso de inibidores específicos de ERK e JNK (PD184352 e SP600125 respectivamente), os quais causaram diminuição significativa no acúmulo de células na fase G1 promovido pelo tratamento com quercetina. Esses dados mostraram que a sinalização ERK e JNK está fortemente relacionada com a inibição do crescimento de células P39 tratadas com quercetina.

Com isso, a quercetina emerge como uma molécula contendo múltiplas propriedades, todas direcionadas para o melhoramento das condições patológicas associadas a doenças degenerativas. A habilidade da quercetina em interferir nos diferentes estágios do desenvolvimento do câncer qualifica essa molécula como um inibidor multi-alvo com efeitos sinérgicos, que provocam a eliminação da célula cancerígena. Progressos significantes na biologia molecular e celular têm resultado

numa melhor caracterização e entendimento das anormalidades da leucemia aguda e crônica. Esse conhecimento tem dado novas oportunidades para o desenvolvimento de terapias inovadoras e mais efetivas. Entretanto, as terapias disponíveis para leucemias são apenas parcialmente efetivas, principalmente devido à heterogeneidade da doença e pelo fato da progressão da doença causar um maior impacto na resistência à quimioterapia e recidiva (IMBESI et al., 2013). Nesse sentido, tem se tornado claro que drogas com único alvo são ineficientes para tratar a recidiva e a progressão de muitas doenças, que envolvem múltiplos fatores. Drogas com um único alvo podem não induzir o efeito desejado em um sistema biológico inteiro; uma razão é que os organismos podem afetar a ação de drogas através de mecanismos compensatórios. Assim, cientistas não estão atentos apenas para a indústria farmacêutica sintética, mas também para plantas medicinais que contenham compostos para intervenções multi-alvos.

Em resumo, o presente trabalho indica que a quercetina efetivamente induz a morte de células leucêmicas humanas *in vitro* bem como *in vivo*. Além disso, nossos resultados indicam que essa atividade da quercetina envolve múltiplos níveis de cooperação entre apoptose, autofagia e ciclo celular. Esse modo de ação e a potente atividade antitumoral da quercetina ,revelada nesse estudo, aponta a quercetina como um importante agente antitumoral para malignidades hematológicas.

## **6. CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* permitem concluir que:

1. Quercetina causa citotoxicidade nas células P39 e induz apoptose pela ativação das vias intrínseca e extrínseca;
2. Quercetina retém as células na fase G1 do ciclo celular através da inibição de ciclinas e Cdk's e aumento na expressão proteica dos inibidores dependentes de quinases, p21 e p27;
3. Quercetina ativa o processo autofágico através do aumento na expressão das principais proteínas que orientam a via;
4. A inibição da autofagia por cloroquina aumenta a atividade apoptótica da quercetina em células P39;
5. Quercetina inibe a atividade Akt e mTOR nas células P39.;
6. Quercetina aumenta a atividade de ERK e JNK. Isto pode estar envolvido com a capacidade da quercetina em aprisionar às células na fase G1 do ciclo celular;
7. Quercetina é um composto antioxidante para as células P39;
8. Quercetina foi capaz de induzir resposta apoptótica, autofágica, antiproliferativa em animais NOD/SCID inoculados com células P39.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400–414, jun. 2009.
- ANDREADI, C. K. et al. Involvement of Nrf2, p38, B-Raf, and nuclear factor-kappaB, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemeoxygenase-1 by dietary polyphenols. **Molecular pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 1033–1040, mar. 2006.
- BEHRENDTS, C. et al. Network organization of the human autophagy system. **Nature**, v. 466, n. 7302, p. 68–76, 1 jul. 2010.
- BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6185–6205, 13 ago. 2008.
- BOLY, R. et al. Quercetin inhibits a large panel of kinases implicated in cancer cell biology. **International journal of oncology**, v. 38, n. 3, p. 833–842, mar. 2011.
- BOOTS, A. W. et al. Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 308, n. 3, p. 560–565, 29 ago. 2003.
- BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European journal of pharmacology**, v. 585, n. 2-3, p. 325–337, 13 maio. 2008.
- BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 11, p. 615–647, jan. 2003.
- BOSMA, M. J.; CARROLL, A. M. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. **Annual Review of Immunology**, v. 9, p. 323–350, 1991.
- BRADHAM, C.; MCCLAY, D. R. p38 MAPK in development and cancer. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 5, n. 8, p. 824–828, abr. 2006.
- BRÜNING, A. Inhibition of mTOR signaling by quercetin in cancer treatment and prevention. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1025–1031, set. 2013.
- BYRD, J. C. et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4325–4336, 15 dez. 2002.
- CAI, B. et al. Apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells caused by homocysteine via activating JNK signal. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63561, 2013.
- CANAVESE, M.; SANTO, L.; RAJE, N. Cyclin dependent kinases in cancer: potential for therapeutic intervention. **Cancer biology & therapy**, v. 13, n. 7, p. 451–457, maio. 2012.

CAO, L.-C. et al. Mitochondrial dysfunction is a primary event in renal cell oxalate toxicity. **Kidney international**, v. 66, n. 5, p. 1890–1900, nov. 2004.

CASAGRANDE, F.; DARBON, J. M. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. **Biochemical pharmacology**, v. 61, n. 10, p. 1205–1215, 15 maio. 2001.

CASELLA, M. L. et al. Quercetin prevents liver carcinogenesis by inducing cell cycle arrest, decreasing cell proliferation and enhancing apoptosis. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 2, p. 289–300, fev. 2014.

CHEN, Y.-J. et al. Platonin induces autophagy-associated cell death in human leukemia cells. **Autophagy**, v. 5, n. 2, p. 173–183, fev. 2009.

CHENG, S. et al. Quercetin induces tumor-selective apoptosis through downregulation of Mcl-1 and activation of Bax. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 16, n. 23, p. 5679–5691, 1 dez. 2010.

CHIEN, S.-Y. et al. Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Human & experimental toxicology**, v. 28, n. 8, p. 493–503, ago. 2009.

CHOU, C.-C. et al. Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. **Archives of pharmacal research**, v. 33, n. 8, p. 1181–1191, ago. 2010.

CHU, I. M.; HENGST, L.; SLINGERLAND, J. M. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 4, p. 253–267, abr. 2008.

CONQUER, J. A. et al. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. **The Journal of nutrition**, v. 128, n. 3, p. 593–597, mar. 1998.

DANGAS, G. et al. Effectiveness of the concomitant use of bivalirudin and drug-eluting stents (from the prospective, multicenter BivAlirudin and Drug-Eluting STents [ADEST] study). **The American journal of cardiology**, v. 96, n. 5, p. 659–663, 1 set. 2005.

DE GRAAF, A. O.; DE WITTE, T.; JANSEN, J. H. Inhibitor of apoptosis proteins: new therapeutic targets in hematological cancer? **Leukemia**, v. 18, n. 11, p. 1751–1759, nov. 2004.

DE, A. et al. Emblica officinalis extract induces autophagy and inhibits human ovarian cancer cell proliferation, angiogenesis, growth of mouse xenograft tumors. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e72748, 2013.

DREXLER, H. G.; DIRKS, W. G.; MACLEOD, R. A. F. Many are called MDS cell lines: one is chosen. **Leukemia research**, v. 33, n. 8, p. 1011–1016, ago. 2009.

DUO, J. et al. Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces

apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. **Molecular medicine reports**, v. 5, n. 6, p. 1453–1456, jun. 2012.

EGGLER, A. L.; GAY, K. A.; MESECAR, A. D. Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. **Molecular nutrition & food research**, v. 52 Suppl 1, p. S84–94, jun. 2008.

ERBA, H. P. Has there been progress in the treatment of older patients with acute myeloid leukemia? **Best practice & research. Clinical haematology**, v. 23, n. 4, p. 495–501, dez. 2010.

FALINI, B. et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. **The New England journal of medicine**, v. 352, n. 3, p. 254–266, 20 jan. 2005.

FERRARA, F. Treatment of older patients with acute myeloid leukaemia. **Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 1967–1968, 11 dez. 2010.

FERRARA, F.; SCHIFFER, C. A. Acute myeloid leukaemia in adults. **Lancet**, v. 381, n. 9865, p. 484–495, 9 fev. 2013.

FERRY, D. R. et al. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 2, n. 4, p. 659–668, abr. 1996.

FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e20849, 2011.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 33, n. 12, p. 1061–1080, dez. 1995.

FRÖHLING, S. et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4372–4380, 15 dez. 2002.

FRÖHLING, S. et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 22, n. 4, p. 624–633, 15 fev. 2004.

GAO, W. et al. Artemisinin induces A549 cell apoptosis dominantly via a reactive oxygen species-mediated amplification activation loop among caspase-9, -8 and -3. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 18, n. 10, p. 1201–1213, out. 2013.

GARCIA-MANERO, G. Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American journal of hematology**, v. 89, n. 1, p. 97–108, jan. 2014.

GENG, J.; KLIONSKY, D. J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems

in macroautophagy. "Protein modifications: beyond the usual suspects" review series. **EMBO reports**, v. 9, n. 9, p. 859–864, set. 2008.

GESBERT, F. et al. BCR/ABL regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39223–39230, 15 dez. 2000.

GOMEZ-BOUGIE, P.; BATAILLE, R.; AMIOT, M. Endogenous association of Bim BH3-only protein with Mcl-1, Bcl-xL and Bcl-2 on mitochondria in human B cells. **European journal of immunology**, v. 35, n. 3, p. 971–976, mar. 2005.

GORDON, P. B.; HOLEN, I.; SEGLEN, P. O. Protection by naringin and some other flavonoids of hepatocytic autophagy and endocytosis against inhibition by okadaic acid. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 11, p. 5830–5838, 17 mar. 1995.

GUPTA, K.; PANDA, D. Perturbation of microtubule polymerization by quercetin through tubulin binding: a novel mechanism of its antiproliferative activity. **Biochemistry**, v. 41, n. 43, p. 13029–13038, 29 out. 2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HANN, B.; BALMAIN, A. Building "validated" mouse models of human cancer. **Current opinion in cell biology**, v. 13, n. 6, p. 778–784, dez. 2001.

HARWOOD, M. et al. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 45, n. 11, p. 2179–2205, nov. 2007.

HE, H. et al. Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 31, p. 29278–29287, 1 ago. 2003.

HERTOG, M. G. et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Archives of internal medicine**, v. 155, n. 4, p. 381–386, 27 fev. 1995.

HILGER, R. A.; SCHEULEN, M. E.; STRUMBERG, D. The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. **Onkologie**, v. 25, n. 6, p. 511–518, dez. 2002.

HO, Y.-T. et al. Berberine inhibits human tongue squamous carcinoma cancer tumor growth in a murine xenograft model. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 16, n. 9, p. 887–890, set. 2009.

HOWITZ, K. T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, v. 425, n. 6954, p. 191–196, 11 set. 2003.

HUNTER, T.; PINES, J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 573–582, 18 nov. 1994.

IMBESI, S. et al. Oxidative stress in oncohematologic diseases: an update. **Expert**

**review of hematology**, v. 6, n. 3, p. 317–325, jun. 2013.

INOKI, K. et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. **Nature cell biology**, v. 4, n. 9, p. 648–657, set. 2002.

JAKUBOWICZ-GIL, J. et al. Temozolomide, quercetin and cell death in the MOGGCCM astrocytoma cell line. **Chemico-biological interactions**, v. 188, n. 1, p. 190–203, 6 out. 2010.

JEONG, J.-H. et al. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. **Journal of cellular biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 73–82, 1 jan. 2009.

JI, B.-C. et al. Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion-dependent pathways in vitro and suppresses lung xenograft tumor growth in vivo. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7596–7604, 26 ago. 2009.

JUNG, J. H. et al. Quercetin suppresses HeLa cell viability via AMPK-induced HSP70 and EGFR down-regulation. **Journal of cellular physiology**, v. 223, n. 2, p. 408–414, maio. 2010.

JUNG, Y.-H. et al. Quercetin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells via increased protein stability of death receptor 5. **Life sciences**, v. 86, n. 9-10, p. 351–357, 27 fev. 2010.

KABEYA, Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **The EMBO journal**, v. 19, n. 21, p. 5720–5728, 1 nov. 2000.

KEYOMARSI, K. et al. Deregulation of cyclin E in breast cancer. **Oncogene**, v. 11, n. 5, p. 941–950, 7 set. 1995.

KIM, E. K.; CHOI, E.-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1802, n. 4, p. 396–405, abr. 2010.

KIM, G.-N.; JANG, H.-D. Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on HO-induced oxidative stress in HepG2 cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1171, p. 530–537, ago. 2009.

KIM, G.-Y. et al. The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 33, p. 29792–29802, 16 ago. 2002.

KIM, H. et al. Quercetin induces mitochondrial mediated apoptosis and protective autophagy in human glioblastoma U373MG cells. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, p. 596496, 2013.

KIM, H.-J. et al. Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 15, p. 8643–8650, 11 ago. 2010.

KIM, R. H. et al. Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis. **Cancer research**, v. 69, n. 2, p.

700–708, 15 jan. 2009.

KIM, Y.-H.; LEE, Y. J. TRAIL apoptosis is enhanced by quercetin through Akt dephosphorylation. **Journal of cellular biochemistry**, v. 100, n. 4, p. 998–1009, 1 mar. 2007.

KLAPPAN, A. K. et al. Proteasome inhibition by quercetin triggers macroautophagy and blocks mTOR activity. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 137, n. 1, p. 25–36, jan. 2012.

KONDO, Y. et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 9, p. 726–734, set. 2005.

LAMSON, D. W.; BRIGNALL, M. S. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. **Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic**, v. 5, n. 3, p. 196–208, jun. 2000.

LEBER, B.; LIN, J.; ANDREWS, D. W. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 12, n. 5, p. 897–911, maio. 2007.

LEE, D.-H.; SZCZEPANSKI, M.; LEE, Y. J. Role of Bax in quercetin-induced apoptosis in human prostate cancer cells. **Biochemical pharmacology**, v. 75, n. 12, p. 2345–2355, 15 jun. 2008.

LEE, K. W. et al. Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine. **Cancer research**, v. 68, n. 3, p. 946–955, 1 fev. 2008.

LEE, L.-T. et al. Transinactivation of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and focal adhesion kinase phosphorylation by dietary flavonoids: effect on invasive potential of human carcinoma cells. **Biochemical pharmacology**, v. 67, n. 11, p. 2103–2114, 1 jun. 2004.

LEE, T.-J. et al. Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. **Cancer Letters**, v. 240, n. 2, p. 234–242, 28 ago. 2006.

LEFRANC, F.; KISS, R. The sodium pump alpha1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 10, n. 3, p. 198–206, mar. 2008.

LEVINE, B.; YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 10, p. 2679–2688, out. 2005.

LIANG, J.; SLINGERLAND, J. M. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 2, n. 4, p. 339–345, jul. 2003.

LIN, J.-P. et al. Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. **Environmental toxicology**, v. 27, n. 8, p. 480–484, ago. 2012.

LLAMBI, F.; GREEN, D. R. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. **Current opinion in genetics & development**, v. 21, n. 1, p. 12–20, fev. 2011.

- MA, H. et al. Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/beta-catenin-mediated survivin gene expression. **Oncogene**, v. 24, n. 22, p. 3619–3631, 19 maio. 2005.
- MAIURI, M. C. et al. BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). **Autophagy**, v. 3, n. 4, p. 374–376, jul. 2007.
- MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 230S–242S, jan. 2005.
- MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577–586, out. 2005.
- MATÉS, J. M. et al. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. **Archives of toxicology**, v. 82, n. 5, p. 273–299, maio. 2008.
- MCCORMACK, E.; BRUSERUD, O.; GJERTSEN, B. T. Animal models of acute myelogenous leukaemia - development, application and future perspectives. **Leukemia**, v. 19, n. 5, p. 687–706, maio. 2005.
- MCCULLOUGH, M. L. et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. **The American journal of clinical nutrition**, v. 95, n. 2, p. 454–464, fev. 2012.
- MERTENS-TALCOTT, S. U. et al. Ellagic acid potentiates the effect of quercetin on p21waf1/cip1, p53, and MAP-kinases without affecting intracellular generation of reactive oxygen species in vitro. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 3, p. 609–614, mar. 2005.
- MERTENS-TALCOTT, S. U.; PERCIVAL, S. S. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 218, n. 2, p. 141–151, 10 fev. 2005.
- MITREA, D. M. et al. Disorder-function relationships for the cell cycle regulatory proteins p21 and p27. **Biological chemistry**, v. 393, n. 4, p. 259–274, abr. 2012.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 16 dez. 1983.
- MOURIA, M. et al. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 98, n. 5, p. 761–769, 10 abr. 2002.
- MU, C. et al. Quercetin induces cell cycle G1 arrest through elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human hepatoma cell line (HepG2). **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, v. 29, n. 3, p. 179–183, abr. 2007.
- MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal

absorption and metabolism. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 417, n. 1, p. 12–17, 1 set. 2003.

NAGAI, M. et al. A novel human myelomonocytoid cell line, P39/Tsugane, derived from overt leukemia following myelodysplastic syndrome. **Gann = Gan**, v. 75, n. 12, p. 1100–1107, dez. 1984.

NAKAYAMA, K.; NAKAYAMA, K. Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 20, n. 12, p. 1020–1029, dez. 1998.

NEERGHEEN, V. S. et al. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. **Toxicology**, v. 278, n. 2, p. 229–241, 5 dez. 2010.

NGUYEN, T. T. T. et al. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 5, p. 647–659, maio. 2004.

NITURE, S. K.; JAISWAL, A. K. Inhibitor of Nrf2 (INrf2 or Keap1) protein degrades Bcl-xL via phosphoglycerate mutase 5 and controls cellular apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 52, p. 44542–44556, 30 dez. 2011.

NOLTE, F.; HOFMANN, W.-K. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. **Annals of hematology**, v. 87, n. 10, p. 777–795, out. 2008.

OKAMOTO, T. Safety of quercetin for clinical application (Review). **International journal of molecular medicine**, v. 16, n. 2, p. 275–278, ago. 2005.

PARK, C. et al. Induction of apoptosis by ethanol extract of *Prunus mume* in U937 human leukemia cells through activation of caspases. **Oncology reports**, v. 26, n. 4, p. 987–993, out. 2011.

PARK, E.-J.; PEZZUTO, J. M. Flavonoids in cancer prevention. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 12, n. 8, p. 836–851, 1 out. 2012.

PI, J. et al. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. **Free radical biology & medicine**, v. 42, n. 12, p. 1797–1806, 15 jun. 2007.

RAMYAA, P.; KRISHNASWAMY, R.; PADMA, V. V. Quercetin modulates OTA-induced oxidative stress and redox signalling in HepG2 cells - up regulation of Nrf2 expression and down regulation of NF- $\kappa$ B and COX-2. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 1, p. 681–692, jan. 2014.

REGGIORI, F.; KLIONSKY, D. J. Autophagy in the eukaryotic cell. **Eukaryotic cell**, v. 1, n. 1, p. 11–21, fev. 2002.

ROBASZKIEWICZ, A.; BALCERCZYK, A.; BARTOSZ, G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. **Cell biology international**, v. 31, n. 10, p. 1245–1250, out. 2007.

RUSSO, M. et al. Quercetin induced apoptosis in association with death receptors

and fludarabine in cells isolated from chronic lymphocytic leukaemia patients. **British journal of cancer**, v. 103, n. 5, p. 642–648, 24 ago. 2010.

RUSSO, M. et al. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. **Biochemical pharmacology**, v. 83, n. 1, p. 6–15, 1 jan. 2012.

SABLINA, A. A. et al. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. **Nature medicine**, v. 11, n. 12, p. 1306–1313, dez. 2005.

SAIKUMAR, P.; MIKHAILOVA, M.; PANDESWARA, S. L. Regulation of caspase-9 activity by differential binding to the apoptosome complex. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 12, p. 3343–3354, 2007.

SANCHEZ, J. F. Treatment of myelodysplastic syndromes in elderly patients. **Advances in therapy**, v. 28 Suppl 2, p. 1–9, mar. 2011.

SATYANARAYANA, A.; HILTON, M. B.; KALDIS, P. p21 Inhibits Cdk1 in the absence of Cdk2 to maintain the G1/S phase DNA damage checkpoint. **Molecular biology of the cell**, v. 19, n. 1, p. 65–77, jan. 2008.

SCHLACHTERMAN, A. et al. Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model. **Translational oncology**, v. 1, n. 1, p. 19–27, mar. 2008.

SEO, H. S. et al. Phytoestrogens induce apoptosis via extrinsic pathway, inhibiting nuclear factor-kappaB signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. **Anticancer research**, v. 31, n. 10, p. 3301–3313, out. 2011.

SHIMIZU, M.; SHIRAKAMI, Y.; MORIWAKI, H. Targeting receptor tyrosine kinases for chemoprevention by green tea catechin, EGCG. **International journal of molecular sciences**, v. 9, n. 6, p. 1034–1049, jun. 2008.

SHINTANI, T.; KLIONSKY, D. J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science (New York, NY)**, v. 306, n. 5698, p. 990–995, 5 nov. 2004.

SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 6, n. 9, p. 1102–1114, 2 maio. 2007.

SPAGNUOLO, C. et al. Quercetin downregulates Mcl-1 by acting on mRNA stability and protein degradation. **British journal of cancer**, v. 105, n. 2, p. 221–230, 12 jul. 2011.

STEENSMA, D. P. P39/Tsugane cells are a false cell line contaminated with HL-60 cells and are not suitable for mechanistic studies in myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 95, n. 7, p. 1229–1230, jul. 2010.

SUZUKI, K. et al. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. **The EMBO journal**, v. 20, n. 21, p. 5971–5981, 1 nov. 2001.

TIAN, X.-Y.; LIU, L. Drug discovery enters a new era with multi-target intervention strategy. **Chinese journal of integrative medicine**, v. 18, n. 7, p. 539–542, jul.

2012.

VARGAS, A. J.; BURD, R. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. **Nutrition reviews**, v. 68, n. 7, p. 418–428, jul. 2010.

VIJAYABABU, M. R. et al. Quercetin-induced growth inhibition and cell death in prostatic carcinoma cells (PC-3) are associated with increase in p21 and hypophosphorylated retinoblastoma proteins expression. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 131, n. 11, p. 765–771, nov. 2005.

WANG, C.-W.; KLIONSKY, D. J. The molecular mechanism of autophagy. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 9, n. 3-4, p. 65–76, mar. 2003.

WANG, K. et al. Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of Akt-mTOR- and hypoxia-induced factor 1 $\alpha$ -mediated signaling. **Autophagy**, v. 7, n. 9, p. 966–978, set. 2011.

WANG, X. et al. Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: possible role of Nrf2 and MAP kinases. **Chemico-biological interactions**, v. 184, n. 3, p. 328–337, 30 mar. 2010.

WU, J. et al. Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B--two novel markers of autophagosome. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 339, n. 1, p. 437–442, 6 jan. 2006.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. An overview of the molecular mechanism of autophagy. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 335, p. 1–32, 2009.

YUAN, Z. et al. Quercetin-induced apoptosis of HL-60 cells by reducing PI3K/Akt. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 7, p. 7785–7793, jul. 2012.

ZHANG, M. et al. Antioxidant properties of quercetin. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 701, p. 283–289, 2011.

ZHANG, X.-Q. et al. Apogossypolone, a novel inhibitor of antiapoptotic Bcl-2 family proteins, induces autophagy of PC-3 and LNCaP prostate cancer cells in vitro. **Asian journal of andrology**, v. 12, n. 5, p. 697–708, set. 2010.

ZHAO, X. F.; GARTENHAUS, R. B. Phospho-p70S6K and cdc2/cdk1 as therapeutic targets for diffuse large B-cell lymphoma. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 13, n. 9, p. 1085–1093, set. 2009.

ZHOU, B. P. et al. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. **Nature cell biology**, v. 3, n. 3, p. 245–252, mar. 2001.

ZHOU, W. et al. Dietary polyphenol quercetin targets pancreatic cancer stem cells. **International journal of oncology**, v. 37, n. 3, p. 551–561, set. 2010.

ZHU, J.; WANG, K. Z. Q.; CHU, C. T. After the banquet: mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival. **Autophagy**, v. 9, n. 11, p. 1663–1676, 1 nov. 2013.