

## AÇÃO DA QUERCETINA EM CULTURA DE CÉLULAS HEP-2

Alves, P. C. M. C.<sup>1</sup>, Machado, A. H. A.,<sup>2</sup> da Silva, N. S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Vale do Paraíba / Lab. Biologia Celular e Tecidual, perlacampos@ig.com.br

<sup>2</sup>Universidade do Vale do Paraíba / Lab. Biologia Celular e Tecidual, alineh@univap.br

<sup>3</sup>Universidade do Vale do Paraíba / Lab. Biologia Celular e Tecidual, nsoares@univap.br

**Resumo-** O presente trabalho mostra a ação do flavonóide quercetina em diferentes concentrações sobre a linhagem celular Hep-2 (carcinoma de laringe humana). Foi realizado o teste de viabilidade celular (MTT) para a avaliação da ação do flavonóide nas concentrações 1µM, 5µM, 10µM, 25µM, 50µM e 100µM. A leitura do teste foi realizada no leitor de Elisa Spectracount (Packard, USA). As análises evidenciaram que a quercetina em concentrações elevadas é tóxica para a linhagem celular Hep-2.

**Palavras-chave:** Quercetina, Cultura de Células, MTT

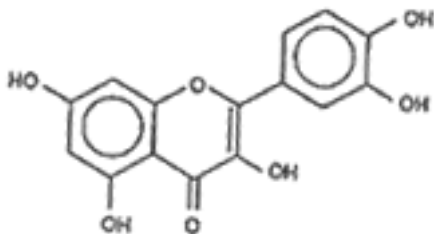
**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas

### Introdução

Em vários países do mundo, incluindo-se o Brasil, tem sido crescente o interesse pelo uso terapêutico de princípios ativos de origem vegetal. Inúmeros grupos de pesquisadores têm demandado esforços no sentido de identificar novos princípios e investigar suas ações biológicas e seus efeitos.

Alimentos, chás, ervas e temperos têm sido investigados quanto a sua propriedade antioxidante, devido ao conhecimento da importância dessa classe de compostos para a manutenção da saúde (VELIOGLU et al., 1998; CALLISTE et al., 2003), pois os agentes antioxidantes auxiliam na eliminação de radicais livres e principalmente das espécies reativas de oxigênio (ROS) gerados pelo metabolismo, tais como o oxigênio singleto, o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila.

A quercetina, (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavone) (figura 1), caracterizada por conter o grupo hidroxila situado nos anéis de benzeno e no anel heterocíclico pirano, é um dos flavonóides mais comuns na natureza, encontrado em uma grande variedade de frutas, vegetais e em bebidas como chá e vinho (WEN-FU et al., 2003; CALDWELL et al., 2006), assim como no broto da samambaia *Pteridium aquilinum* L. Kuhn.



**Figura 1 - Fórmula estrutural da quercetina (CASAGRANDE; DARBON, 2001)**

Esse flavonóide tem sido incansavelmente estudado devido a algumas de suas ações farmacológicas, principalmente ação antioxidante, que interage com os radicais livres, protegendo o DNA contra danos oxidativos, assim como na prevenção de arteriosclerose e de inflamações crônicas, também agindo como anticarcinogênico, antineoplásico, antibacteriano, antiviral, antialérgico, antimutagênico e exibindo atividade cardiovascular. Adicionalmente, pode atuar como um fitoestrógeno, o que leva a redução do risco para alguns tipos de carcinoma. No entanto, a literatura é relativamente farta de relatos de desenvolvimento e malignização de tumores em humanos e animais, destacando-se os bovinos, que apresentam o hábito de ingerir o broto da samambaia *Pteridium aquilinum* L. Kuhn, que tem a quercetina como seu principal princípio ativo.

Além disso, tem sido relatado que a quercetina reprime o crescimento de tumores *in vivo* e *in vitro*, provavelmente devido a sua ação citostática e sua capacidade de induzir apoptose (WEN-FU et al., 2003), além de demonstrar interferir na progressão do ciclo celular por induzir um bloqueio na transição de G1/S ou G2/M do ciclo, dependendo do tipo celular (YANG et al., 2005; RASPAGLIO, G. et al., 2003; CHOI et al., 2001).

Esse trabalho visa a compreensão da atuação da quercetina, através da avaliação da ação desse flavonóide, na viabilidade das células de carcinoma de laringe humana (Hep -2).

### Materiais e métodos

#### Linhagem Celular:

O tipo celular utilizado: - linhagem Hep - 2 (carcinoma de laringe humana). As células foram cultivadas em garrafas plásticas Nunc 25 cm<sup>2</sup>, contendo o meio de cultura adequado MEM (Meio

Mínimo Essencial) com 10 % de soro fetal bovino. Mantidas em incubadora (Forma Scientific), com controle automático de temperatura (37°C), e pressão de gases (5% CO<sub>2</sub>).

#### Meios de Cultura (GibcoBRL)

Meio Mínimo Essencial - MEM. Na composição básica destes meios de cultura são encontrados todos os aminoácidos fundamentais, D-glicose, indicador vermelho de fenol, vitaminas e sais inorgânicos. Ocorrendo a conservação em câmara fria de 2 a 8°C.

#### Quercetina

A quercetina (3,5,7,3',4'-pentahydroxiflavone) (quercetin dihydrate) e, para os ensaios *in vitro*, a mesma foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de 1 mM e armazenada a 10°C. Para se chegar as diferentes concentrações de quercetina (1µM, 5µM, 10µM, 25µM, 50µM e 100µM) foi utilizada a solução estoque de 1mM e Meio Mínimo Essencial – MEM

#### Crescimento e Manutenção da Cultura Celular:

Partindo-se inicialmente de um estoque de células estocado em nitrogênio líquido, foi preparada uma garrafa de cultura de 25cm<sup>2</sup>, contendo 1ml de cultura de células (~10<sup>6</sup> células/ml), e adicionadas a 2ml de meio de cultura, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL). A mistura foi então incubada a 37°C, em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. Estas células foram subcultivadas através de tripsinização, quando a densidade de células formarem uma monocamada confluenta.

#### Teste de viabilidade celular através da técnica MTT:

A citotoxicidade foi avaliada pela análise baseada na redução do sal 3-[(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) solúvel em água para um formazan insolúvel de cor roxa, produto das desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente ativas (vivas). O MTT foi dissolvido em PBS (0,01M; pH 7,4) a 5mg/ml, filtrado e estocado em -20°C. As células (L929) foram plaqueadas na concentração de 5x10<sup>4</sup> células/mL para cada poço de uma placa NUNC de 96 poços e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após incubação, o meio contendo o corante foi retirado e os poços lavados com PBS e em seguida adicionado o MTT na concentração de 0,5mg/mL em PBS. As placas foram incubadas por 90 minutos. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos através da adição de 100µl do solvente orgânico Dimetil Sulfóxido (DMSO) e mantidos por 30 min sob

agitação. Após estes procedimentos foi efetuada a leitura das placas no leitor de Elisa SpectraCount (Packard, USA), utilizando filtro de 570nm. O mesmo processo será repetido com diferentes tempos de incubação.

## Resultados

A figura 2 mostra a ação da quercetina em diferentes concentrações (1µM, 5µM, 10µM, 25µM, 50µM e 100µM) na cultura de células Hep-2. Concentrações de quercetina de 1µM, 5µM e 10µM foram não tóxicas à linhagem celular Hep-2; concentrações acima de 25µM foram consideradas tóxicas.

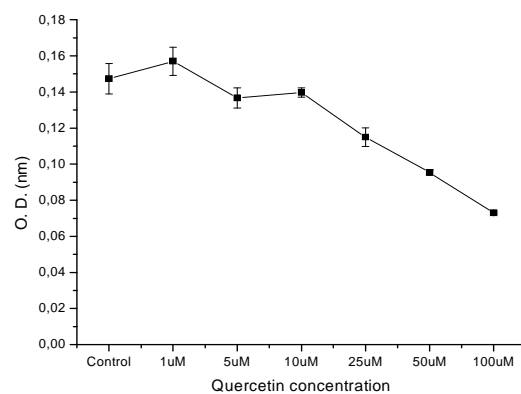


Figura 2: Ação de Diferentes Concentrações de Quercetina na Viabilidade Celular (HEP-2).

## Discussão

A utilização de doses elevadas do flavonóide quercetina pode ser prejudicial aos organismos, visto sua interferência na viabilidade celular de Hep-2. Vários alimentos possuem quercetina em sua composição nutricional, como a uva e seu derivado o vinho (CALLISTE et al., 2003) dentre outros utilizados no cotidiano de muitas pessoas. O uso elevado e/ou prolongado desse componente pode interferir nos mecanismos celulares, causando danos (BIANCHI, 1999).

## Conclusão

O flavonóide quercetina não interferiu na viabilidade celular quando nas concentrações de 1µM, 5µM e 10µM. Porém, nas concentrações acima de 25µM houve ação tóxica. Sugere-se que esse flavonóide em doses elevadas e/ou contínuas possa causar danos celulares. Novos estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação da quercetina em relação a cada um dos componentes celulares.

## Referências

- ALONSO-AMELOT AND AVENDANO, M. Human Carcinogenesis and Bracken Fern: A Review of the Evidence. *Current Medicinal Chemistry*, v. 9:675:86, 2002.
- BIANCHI, M. L. P. AND ANTUNES, L. M. G.; Free radicals and the main dietary antioxidants. *Rev. Nutr.*, Campinas, 12(2): 123-130, maio/ago., 1999
- BROWN, J., O'PREY, J. and HARRISON, P. R. Enhanced sensitivity of human oral tumors to the flavonol, morin, during cancer progression: involvement of the Akt and stress kinase pathways. *Carcinogenesis*, v. 24, n. 2 p. 171-77, 2003.
- CALDWELL, S. T., PETTERSON, H. M., FARRUGIA, L. J., MULLEN, W., CROZIER, A. and HARTLEY, R. C. Isotopic labeling of quercetin 3-glucoside. *Tetrahedron* 62, p. 7257-65, 2006.
- CALLISTE, C. A., ALLAIS, D. P., SIMON, A., MARFAK, A., DELAGE, C. AND LUC, J.; Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas; *Food Chemistry Volume 80, Issue 3, Pages 399-407*, , March 2003
- CHOI, E. J., LEE, B. H., LEE, K. AND CHEE, K. M. Long-term combined administration of quercetin and daidzein inhibits quercetin-induced suppression of glutathione antioxidant defenses. *Food and Chemical Toxicology Volume 43, Issue 5, May 2005, Pages 793-798*
- EVANS, I. A.; OSMAN, M. A. Carcinogenicity of bracken and shikimic acid. *Nature*, v.250, p.348-49, 1974.
- EVANS I. A.. Bracken carcinogenicity, p. 1171-1204. *Chemical Carcinogens. ACS Monograph 182, American Chemical Society, Washington, DC. 1984*
- FENWICK G. R. Bracken (*Pteridium aquilinum*) – Toxic effects and constituents. *J. Sci. Food Agric.* 46:147-173. 1988
- FRANÇA, T. N., TOKARNIA, C. H. e PEIXOTO, P. V. Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 22, n. 3, p. 1-22, 2002.
- FREITAS, R. N.; O'CONNOR, P. J.; PRAKASH, A. S.; SHAHIN, M.; POVEY, A. C. Bracken (*Pteridium aquilinum*) – induced DNA adducts in mouse tissues are different from the adduct induced by the activated form of the bracken carcinogen ptaquiloside. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.281, p.589-94, 2001.
- FREITAS, R. N.; BRASILEIRO-FILHO, G.; SILVA, M. E.; PENA, S. D. J. Bracken fern induced malignant tumors in rats: absence of mutations in p53, H-ras and K-ras and no microsatellite instability. *Mutant Research*, v. 499, p. 189-96, 2002.
- HIRONO, I.; UENO, I.; HOSAKA, S.; TAKANASHI, H.; MATSUSHIMA, T.; SUGIMURA, T. Carcinogenicity examination of quercetin and rutin in ACI rats. *Cancer Lett.*, v. 13, p.15-21, 1981.
- HIRONO, I.; AISO, S.; YAMAJI, T.; MORI, H.; YAMADA, K.; NIWA, H. Carcinogenicity in rats of ptaquiloside isolated from bracken. *Jap. J. Cancer*, v. 75, p. 83f3-36, 1984.
- KINGSBURY, J. M.. *Poisonous plants of the United States and Canada*. Prentice-Hall, New Jersey. p.626. 1964
- LIU, W. & Guo, R. Interaction between flavonóide, quercetin and surfactant aggregates with different charges. *Journal of Colloid and Interface Science*. June, p. 1-12, 2006.
- OLRICHS, P. B., NG, J. C. and BARTLEY, J. Purification of ptaquiloside, a carcinogen from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry*, v. 40, n. 1, p. 53-56. 1995.
- PAMUKCU, A. M.; EARTURCK, E.; YALCINER, S.; MILLI, U. E.; BRYAN, G. T. Carcinogenic and mutagenic activities of milk from cows fed bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Research*, v.38, p. 1556-1560, 1978.

19. RASMUSSEN, L. H., KROGHSBO, S. FRISVAD, J. C. and HANSEN, H. C. B. Occurrence of the carcinogenic bracken constituent ptaquiloside in fronds, topsoils and organic soil layers in Denmark. *Chemosphere*, v. 51, p. 117-127, 2003.
20. RASPAGLIO, G., FERRANDINA, G., FERLINI, C., SCAMBIA, G. and RANELLETTI, F.O. Epidermal Growth Factor-Responsive Laryngeal Squamous Cancer Cell Line Hep2 Is More Sensitive Than Unresponsive CO-K3 One to Quercetin and Tamoxifen Apoptotic Effects. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, Volume 14, Number 2, 2003, pp. 83-91(9)
21. SAITO, D.; SHIRAI, A. MATSUSHIMA, T.; SUGIMURA, T.; HIRONO, I. Teste f carcinogenicity of quercetin, a widely distributed mutagen in food. *Teratogenesis, Carcinogenesis, Mutagenesis*, v. 1, p. 213-221, 1980.
22. SHAIN, M.; SMITH, B.L. AND PRAKASH, A. S. Bracken carcinogens in the human diet. *Mutation Research* 443:69-79, 1999.
23. SHEN, S. C.; CHEN, Y. C.; HSU, F. L.; LEE, W. R. Differential apoptosis-inducing effect of quercetin and its glycosides in human promyeloleukemic HL-60 cells by alternative activation of the caspase 3 cascade. *J. Cell Biochem*, 89(5):1044-55, 2003.
24. SMITH, B. L.; SEAWRIGHT, A. A; NG, J.C.; HERTLE, A.T.; THOMSON, J.A. AND BOSTOCK, P.D. Concentration of ptaquiloside, a major carcinogen in bracken fern (*Pteridium* sp), from eastern Australia and from a cultivated worldwide collection held in Sydney, Australia. *Nat Toxins* 2, 347-53, 1994.
25. TOKARNIA, C. H., DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. *Plantas Tóxicas do Brasil*. Editora Helianthus, Rio de Janeiro, 320p.
26. VELIOGLU, Y. S., MAZZA, G., GAO, L., OOMAH, B. D; Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 4113-4117
27. WEN-FU, T., LI-PING, L., MEI-HONG, L., YI-XIANG, Z., YUN-GUANG, T., XIAO, D. AND DING, J. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. *European Journal of Pharmacology*. Volume 459, Issues 2-3, 17 January 2003, Pages 255-262
28. YANG, J. H., HSIA, T.C., KUO, H. M., CHAO, P. D. L., CHOU, C. C., WEI, Y. H. AND CHUNG, J.G. Inhibition of Lung Cancer Cell Growth by Quercetin Glucuronides via G2/M Arrest and Induction of Apoptosis. *Drug Metabolism and Disposition Fast Forward* First published on November 9, 2005.