

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

João Lucas Rodrigues dos Santos

Efeitos da Quercetina sobre a viabilidade e morte celular e expressão
gênica de marcadores do ciclo celular em células de Melanoma cutâneo
murino B16F10

Montes Claros - Minas Gerais
2020

João Lucas Rodrigues dos Santos

Efeitos da Quercetina sobre a viabilidade e morte celular e expressão gênica de marcadores do ciclo celular em células de Melanoma cutâneo murino B16F10

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Mauricio Batista de Paula

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Bozzi

Montes Claros - Minas Gerais

2020

S237e

Santos, João Lucas Rodrigues dos.

Efeitos da Quercetina sobre a viabilidade e morte celular e expressão gênica de marcadores do ciclo celular em células de Melanoma cutâneo murino B16F10 [manuscrito] / João Lucas Rodrigues dos Santos. – Montes Claros, 2020.

58 f. : il.

Bibliografia: f. 53-57.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes,

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula.

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Bozzi.

1. Melanoma cutâneo. 2. Quercetina - Efeitos. 3. Terapêutica. 4. Técnicas *in vitro*. I. Paula, Alfredo Maurício Batista de. II. Bozzi, Adriana. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS-UNIMONTES

Reitor: Prof. Antonio Alvimar Souza

Vice-reitora: Profa. Ilva Ruas de Abreu

Pró-reitora de Pesquisa: Profa. Clarice Diniz Alvarenga Corsato

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Prof. Virgílio Mesquita Gomes

Coordenadoria de Iniciação Científica: Profa. Sônia Ribeiro Arrudas

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Profa. Sara Gonçalves Antunes de Souza

Pró-reitor de Pós-graduação: Professor André Luiz Sena Guimarães

Coordenadoria de Pós-graduação Lato-sensu: Prof. Luís Ricardo Fernandes da Costa

Coordenadoria de Pós-graduação Stricto-sensu: Prof. Marcelo Perim Baldo

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador: Prof. Alfredo Batista Mauricio de Paula

Coordenadora Adjunta: Profa. Marise Fagundes Silveira



MESTRANDO: JOÃO LUCAS RODRIGUES DOS SANTOS

TÍTULO DO TRABALHO: "Efeitos da Quercetina sobre a viabilidade e morte celular e expressão gênica de marcadores do ciclo celular em células de Melanoma cutâneo murino B16F10".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e Aspectos Clínicos da Doença

LINHA DE PESQUISA: Etiopatogenia e Fisiopatologia das Doenças

BANCA EXAMINADORA (MEMBROS TITULARES)

PROF. DR. ALFREDO MAURÍCIO BATISTA DE PAULA - ORIENTADOR

PROF.^a DR.^a ADRIANA BOZZI - COORIENTADORA

PROF. DR. OTÁVIO CARDOSO FILHO

PROF.^a DR.^a LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS

ASSINATURAS

BANCA XAMINADORA (MEMBROS SUPLENTES)

PROF.^a DR.^a LUDMILLA REGINA DE SOUZA DAVID

PROF. DR. JOÃO MARCUS DE OLIVEIRA ANDRADE

ASSINATURAS

APROVADO

REPROVADO

Hospital Universitário Clemente Farias - HUCF

<http://www.unimontes.br> / ppacs@unimontes.br

Telefone: (0xx38) 3224-8372 / Fax: (0xx38) 3224-8372

Av. Cula Mangabeira, 562, Santo Expedito, Montes Claros - MG, Brasil - Cep: 39401-001

Dedico este trabalho aos meus pais Clemente e Elzany, ao meu irmão Pedro Henrique e à todos meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, nas pessoas de minha mãe Elzany e meu pai Clemente, por todos os esforços feitos desde o dia de meu nascimento até o presente dia, pela força, pela compreensão, pelo respeito às minhas escolhas e por sua presença constante e reconfortante. Ao meu irmão Pedro Henrique, pela companhia, paciência, afeto e atenção durante os dois anos de mestrado.

Ao universo por conspirar sempre a favor dos meus planos e anseios, por permitir que meus desejos pudessem sempre ser realizados e por fornecer energia sempre para que conquistas como esta pudessem tornar-se reais.

Agradeço à equipe do laboratório de pesquisa em saúde do hospital universitário Clemente de Faria na pessoa da colega e companheira de trabalho Magda Mendes Vieira, pelo suporte, apoio, auxílio e conhecimento oferecido desde o primeiro momento que me tornei parte do grupo de pesquisa.

Ao meu orientador Alfredo Maurício Batista de Paula, pelo acolhimento e pelo volume imensurável de conhecimento adquirido, aconselhamento e orientação de extrema qualidade e eficiência, bem como à coorientadora de todos Ludmilla Regina. Ao grupo de pesquisa sob coordenação do professor Alfredo de Paula, o Nupemoc, agradeço nas pessoas de Amanda Rodrigues, Luciana, Otávio, Vinícius e Bruna pelo coleguismo, companheirismo, suporte e pelo auxílio na execução dos trabalhos, fossem eles prático, teóricos, laboratoriais ou de bioterismo.

Agradeço também à coorientadora Adriana Bozzi e seu aluno de doutorado Vitor Hugo Simões pela orientação, acolhimento e atenção prestados no Instituto René Rachou – Fiocruz Minas, pela paciência e dedicação no treinamento de novas técnicas que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e de trabalhos futuros.

Agradeço, em especial, à minha colega de trabalho e companheira de projeto Amanda Lacerda pelo suporte, apoio e companhia em todos os momentos, desde o desenvolvimento do

projeto até os desafios de desenvolver o trabalho e alcançar resultados, e, acima de tudo, pela atenção e suporte psicológico durante este período.

Um agradecimento especial também a todas as estagiárias de recepção e manutenção do laboratório de pesquisa, em nome da atual estagiária Sara, pela paciência, disponibilidade em ajudar e pela responsabilidade tomada em manter a ordem do laboratório em todas as circunstâncias, meu muito obrigado.

À todos os professores e educadores que passaram por minha vida, desde o início, na pré-escola, até os dias de hoje, em especial à professora Márcia, professora da escola José da Costa Chaves, no município de Cotia-SP, onde iniciei minha alfabetização, pois esta foi a principal responsável pelo meu ingresso no mundo do conhecimento, pela minha alfabetização e pela formação de grande parte de quem sou hoje.

Agradeço aos auxílios financeiros recebidos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Enfim, sinto-me lisonjeado e grandemente feliz em ter todas estas pessoas em minha vida, e é claro que seria impossível agradecer a todos aqueles que se fizeram importantes até o presente momento, mas gostaria que todos aqueles que estiveram ou estarão presentes e se fizeram importantes para que pudesse chegar a este momento, seja direta ou indiretamente, seja por me permitirem estar em seus pensamentos ou emanando suas energias positivas, sintam-se agradecidos e abraçados por estas palavras.

Muito obrigado a todos!

“Uma criança, um professor, uma caneta e um livro podem mudar o mundo”.

(Malala Yousafzai)

RESUMO

Introdução: O Melanoma cutâneo (MC) se desenvolve a partir dos melanócitos, células responsáveis pela pigmentação da pele e mucosas. O MC é considerado um tipo de câncer agressivo clinicamente devido a precocidade com que desenvolve metástases. A Quercetina (Querc) é um polifenol de ocorrência natural que atua como um modulador negativo das vias moleculares relacionadas à progressão de neoplasias malignas, incluindo àquelas responsáveis pela proliferação celular e apoptose.

Objetivo: No presente estudo, investigamos os efeitos da Querc na viabilidade celular, morte e expressão de marcadores do ciclo celular de células de MC murino B16F10.

Métodos: Em nosso estudo, células B16F10 a uma suspensão de 2×10^4 células foram cultivadas na presença de Querc nas doses de 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μM por período de 48 hora. Ao final deste período, analisamos a viabilidade celular através do ensaio colorimétrico MTT (ensaio colorimétrico de *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* for). O comportamento celular foi acessado por meio da expressão de mRNA das ciclinas reguladoras do ciclo celular A2, B1, D3 e E1, por meio de qPCR e ensaio colorimétrico de fluorescência com brometo de etídio e acridina laranja (BE/AA) para estabelecimento das taxas de morte celular. Como controle, células B16F10 cultivadas na ausência de Querc foram submetidas às mesmas análises.

Resultados: Os resultados mostraram diferenças significativas na viabilidade celular e morte de células B16F10 expostas a Querc, com destaque para a concentração de 200 μM , uma vez que a droga foi capaz de diminuir a viabilidade celular em mais de 50% em sua maior concentração, bem como promover um aumento nos eventos de morte celular superior a 50%. Em relação aos eventos moleculares que regulam o ciclo celular, a Querc na concentração de 200 μM foi capaz de aumentar a expressão da ciclina D3, que atua como bloqueadora da transição do ciclo celular da fase G1 para S1, levando, conseqüentemente, a uma maior frequência de células B16F10 nas fases G0/G1 do ciclo celular. Todos estes resultados moleculares foram condizentes com a alteração na expressão de ciclinas observada nas células B16F10 quando tratadas com Querc em sua maior concentração.

Conclusões: Nossos resultados mostraram que o tratamento com Querc atuou como um agente indutor de morte celular, regulador da expressão de marcadores do ciclo celular e redutor da viabilidade celular em células B16F10. Esses achados evidenciam o potencial uso da Querc como um nutracêutico com propriedades terapêuticas neoadjuvantes anticâncer.

Palavras-chave: Quercetina, Melanoma, Terapêutica, Técnicas *in vitro*

ABSTRACT

Introduction: Cutaneous melanoma develops from melanocytes, the cells responsible for skin pigmentation, considered a type of cancer that is clinically aggressive due to the precociousness of its development of metastasis. Quercetin (Querc) is a naturally occurring polyphenol that acts as a negative modulator of molecular pathways related to the progression of malignances, including those responsible for cell proliferation and apoptosis.

Aim: In the present study, we investigated the effects of Querc on cell viability, death and expression of markers of cell cycle of murine cutaneous Melanoma B16F10 cells.

Methods: In our study, B16F10 cells in a suspension of 2×10^4 cells were cultured on the presence of Querc at doses of 200, 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 μM for a time period of 48 hours. At the end of this period, we analyzed cell viability using the MTT colorimetric assay (3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide for colorimetric assay), the cell proliferation by the expression of mRNA of the A2, B1, D3 and E1 cyclins, using qPCR and colorimetric fluorescence assay with ethidium bromide and orange acridine (BE / AA) for establishing cell death rates. As a control, B16F10 cells cultured in the absence of Querc were subjected to the same analyzes.

Results: Our results showed significant differences in the cell viability of B16F10 cells exposed to Querc, highlighting the concentration of 200 μM as the most effective one, since the drug was able of decreasing cell viability by more than 50% at its highest concentration, increasing the events of cell death over 50% as well. Regarding the molecular events that regulate the cell cycle, Querc at the concentration of 200 μM was able of increasing the expression of the cyclin D3, which acts as a blocker of the cell cycle transition from phase G1 to S1, leading, consequently, to a increase on the frequency of B16F10 cells in the G0 / G1 phases of the cell cycle. All of these molecular results were consistent with the changes in the cyclines expression observed in B16F10 cells when treated with Querc at its highest concentration.

Conclusions: Our results showed that the treatment with Querc acted as an inductor of cell death, a modulator of cell cycle markers expression and promoter of cell death in B16F10 cells. These findings demonstrate the potential use of Querc as a nutraceutical with adjunctive anti-cancer therapeutic properties.

Key-words: Quercetin, Melanoma, Therapeutics, In vitro techniques.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Vegetais, frutas e chá e suas concentrações de quercetina.....	22
Figura 2 - Compostos fenólicos e não fenólicos encontrados no vinho.....	23
Figura 3 - Estrutura química da quercetina aglicona.....	24
Figura 4 - Estrutura química dos principais flavonoides encontrados na natureza.....	24
Figura 5 – Principais configurações de quercetina.....	25
Figura 6 - Principais ações de quercetina na saúde.....	26
Figura 7 – Vias metabólicas de compostos fenólicos.....	27
Figura 8 – Estrutura química dos glucosídeos de quercetina.....	28
Figura 9 - Principais efeitos de polifenóis sobre o desenvolvimento do câncer.....	30
Figura 10 - Pontos de interação entre ciclo celular e quercetina.....	32
Figura 11 - Danos à saúde promovidas por ROS.....	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais alimentos com quercetina e suas respectivas quantidades em porções comestíveis de produtos vegetais e derivados.....	22
--	----

APRESENTAÇÃO

João Lucas Rodrigues dos Santos, filho de Elzany Moreira de Almeida Santos e Clemente Rodrigues dos Santos, nascido na cidade de Itapevi – SP e atualmente residente na cidade de Montes Claros – MG. Iniciou sua alfabetização na Escola Municipal José da Costa Chaves, passando por diversos colégios no decorrer de sua vida, entre elas a Escola Estadual Jornalista Roberto Corte Real, Escola Municipal Nova Fátima, Escola Estadual Coronel Idalino Ribeiro e Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (IFNMG).

Iniciou o curso de Ciências Biológicas Bacharelado no ano de 2013 pela Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), e, no ano seguinte ingressou no laboratório de pesquisa em saúde localizado no Hospital Universitário Clemete de Farias em atividades orientadas pelo Prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula.

Participou dos programas institucionais de iniciação científica voluntária e iniciação científica oferecidos pelos programas de apoio à pesquisa da Capes, CNPQ e Fapemig, estando envolvido em diversos projetos de pesquisa, como o projeto intitulado “Análise da expressão plasmática de myomiRNAs em indivíduos controles, com lesões cancerizáveis da mucosa bucal e com Carcinoma de células escamosas de boca, não-caquéticos e caquéticos”, o projeto intitulado “Avaliação do potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais murinas na caquexia experimental associada ao câncer em diferentes modelos de xenotransplante tumoral” e “Ensaio clínico de fase II para a avaliação dos diferentes regimes de Benznidazol como tratamento da Doença de Chagas em fase crônica em pacientes adultos”.

Ingressou no Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) pela Unimontes no ano de 2018, devido ao interesse em pesquisa, conhecimento acerca da competência atribuída ao Núcleo de Pesquisa de Montes Claros (NUPEMOC) do qual já fazia parte como membro atuante nas atividades bem como ao fato de já estar inserido na pesquisa

por um tempo, tendo assim interesse em dar continuidade a trabalhos já iniciados.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REFERENCIAL TEORICO.....	19
2.1 Melanoma cutâneo.....	19
2.2 Quercetina.....	20
2.3 Quercetina e câncer.....	29
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4 PRODUTO CIENTÍFICO.....	36
4.1 Produto científico: <i>Quercetin reduces cell viability, and down-regulates expression of cell proliferation and anti-apoptotic gene products of B16F10 murine cutaneous melanoma cells</i>	36
5 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXOS.....	58
ANEXO A – Normas de submissão da revista <i>Phytomedicine</i>	58

1 INTRODUÇÃO

O Melanoma cutâneo é o tipo de câncer que se desenvolve a partir dos melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina e coloração da pele. Tem início com um pequeno tumor cutâneo pigmentado na pele, mais frequentemente em áreas de exposição sazonal ou crônica ao sol, sendo quase 50% dos casos ocorrentes a partir de nevos melanocitos pré-existentes (1). Trata-se de um câncer diferente dos demais cânceres de pele devido à produção de metástase de forma rápida, mais comumente para outros pontos da pele, fígado e pulmões (2), sendo responsável pela maioria das mortes por câncer de pele metastático (3).

Quando tratamos de um contexto histórico, tratamentos de doenças humanas bem sucedidos são atualmente atribuídos ao uso de agentes nutracêuticos, tais como os flavonoides, que são compostos naturais presentes em diversos tipos de vegetais (4). Atualmente, esses nutracêuticos têm ganhado espaço na literatura científica devido às suas diversificadas propriedades para o tratamento de doenças (5, 6).

Quercetina (Querc) é tida como um dos flavonoides mais frequentemente estudados, dentre as 6 subclasses de compostos desta natureza, sendo um composto polifenólico com possível emprego em dietas, tido como um inibidor do transporte de auxinas em tecidos vegetais (7). O termo polifenólico é utilizado no meio científico referindo-se aos flavonoides, taninos, ácidos fenólicos e seus derivados(8).

A Querc é considerada e tida como um poderoso agente anti-oxidante, devido à sua capacidade de capturar radicais livres e ligar íons metálicos de transição aos mesmos, sendo capaz de neutralizar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de ocorrência natural (9). A pesquisa tem confirmado e demonstrado a aplicação de Querc nos mais diversos campos e no tratamento de diversas questões em saúde e doença, tais como anti-idade, tratamento de alergias, angioproteção, anticarcinogênico, anti-inflamatório, tratamento da asma, tratamento de diabetes, melhoria no desempenho na prática de

exercícios, gastroproteção e desordens do humor (10-12).

Partindo do ponto em que propostas desenvolvidas por evidências científicas de que, componentes de dietas naturais são capazes de inibir o processo da carcinogênese e outras doenças, bem como influenciar efetivamente na redução do risco de desenvolvimento de cânceres em humanos, a ideia da quimioprevenção age como um importante adjuvante tanto na prevenção quanto no tratamento do câncer (13-15). Foi demonstrado que Querc apresenta importantes efeitos antiproliferativos quando relacionado ao tratamento do câncer, sendo tais efeitos comprovados por estudos *in vitro* e *in vivo* (16).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com Querc sobre a viabilidade, morte celular e expressão de marcadores do ciclo celular em células de Melanoma cutâneo murinas B16F10 em ensaios experimentais *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 Melanoma cutâneo

O Melanoma cutâneo (MC) é um tipo de câncer que se desenvolve nos melanócitos, células produtoras de melanina e responsáveis pela coloração da pele. Tem início com um pequeno tumor cutâneo pigmentado sobre a pele normal, mais frequentemente em áreas expostas ao sol, sendo quase metade dos casos decorrentes de nevos melanocíticos pré-existentes (1).

Trata-se de um câncer diferente dos demais cânceres de pele, tendo em vista que produz metástase de forma rápida, onde cresce e destrói os tecidos aos quais se liga e tecidos adjacentes, o que dificulta a viabilidade de tratamentos convencionais (2), sendo responsável pela maioria das mortes por câncer de pele metastático (3).

O MC é o 19º câncer mais comum no mundo, com cerca de 8.450 novos casos diagnosticados no Brasil no ano de 2020, tendo uma incidência crescente de forma rápida, mais do que qualquer outro tipo de câncer com alta taxa de letalidade (17).

O MC pode ser classificado em quatro tipos distintos, de acordo com as características clínicas e histológicas: o *melanoma expansivo ou superficial* é um tipo de melanoma que apresenta desenvolvimento associado à exposição solar sazonal, com crescimento radial e posteriormente invasão tecidual. Trata-se do tipo mais frequente e surge geralmente na faixa etária entre 40 a 50 anos. Nas mulheres surge principalmente nos membros inferiores e nos homens no tronco (1, 18-20).

O *melanoma nodular*, o segundo mais comum (15 a 30% dos casos), ocorre mais frequentemente nas quinta e sexta décadas de vida, em indivíduos do sexo masculino. Apresenta-se como uma lesão papulosa ou nodular, elevada, de cor castanha, negra ou azulada. São frequentes a ulceração e o sangramento; existe a variante amelanótica, com superfície crítematosa com crescimento vertical e metástases precoces (1, 18, 19).

O *melanoma lentigo ou lentiginoso acral* (MLA), surge nas regiões palmoplantares, extremidades

digitais, mucosas e semimucosas; é mais frequente em indivíduos de pele negra (35 a 60%). Essa forma clínica não tem predileção por sexo e é mais frequente na sétima década de vida. Nas extremidades digitais pode se apresentar como lesão tumoral acastanhada subungueal, melanoníquia estriada, fragmentação longitudinal da lâmina ungueal, além de paroníquia crônica e persistente. É o tipo histológico mais agressivo dentre os melanomas cutâneos (21, 22).

O quarto tipo é o *melanoma lentigo ou lentiginoso maligno* (MLM), pouco frequente (apenas 5% dos casos); é mais comum em idosos; surge em área de fotoexposição crônica¹¹, apresenta-se como mancha acastanhada ou enegrecida, de limites nítidos e irregulares, alcançando vários centímetros de diâmetro, localizada na face (90%), em mãos e membros inferiores (10%) (22, 23).

2.2 Quercetina

Flavonoides são compostos naturais presentes em vegetais (4) que têm ganhado espaço e chamado a atenção com relação às suas propriedades, a serem explanadas ao longo do texto, em um contexto de saúde, sendo as mesmas amplamente diversas quando comparadas aos efeitos de outros compostos naturais (5, 6).

Mais de 5000 flavonoides empregáveis em dietas foram identificados até o presente momento em componentes vegetais, porém, uma grande parte destes componentes fitoquímicos permanece desconhecida ou não apresenta efeitos terapêuticos ou dietéticos relevantes (24, 25).

Cada vez mais evidências mostram que uma alimentação saudável com um consumo moderado de produtos com base vegetal possui um importante papel na prevenção de doenças crônicas, tais como doenças coronarianas, cânceres, diabetes, Alzheimer, e declínio de funções relacionadas ao envelhecimento, fato este que se relaciona diretamente ao aumento do consumo de flavonoides (26-28).

O momento na história no qual se iniciaram os interesses da pesquisa sobre os benefícios dos

flavonoides na saúde ficou conhecido como “*the french paradox*” ou o paradoxo francês (29). Este momento é tido como um marco histórico, em que observações feitas sobre a alimentação de culturas mediterrâneas, onde mesmo com as dietas apresentando um alto teor calórico e de gorduras trans, fator associado ao desenvolvimento de doenças coronarianas, a população em questão apresentava uma baixa incidência de casos deste tipo de patologia quando comparada com culturas ocidentais (30).

O ponto chave foi a observação de que, a única grande diferença nos hábitos alimentares das diferentes culturas era o consumo moderado de vinho tinto pelas populações mediterrâneas, sendo o vinho dotado de uma grande quantidade de compostos fenólicos com importância fitoquímica (Figura 2) (31, 32).

O isolamento de flavonoides derivados de componentes vegetais foi relatado pela primeira vez no ano de 1936, pelo bioquímico Albert Szent-Gyorgyi, que através de estudos relacionados a componentes biológicos vegetais e sua ação sobre o stress oxidativo descobriu uma série de componentes bioativos isolados, entre eles, o que lhe rendeu um prêmio Nobel no ano de 1937 pela descoberta da ação da vitamina C sobre a oxidação de nutrientes (33, 34). Os Flavonóides são também referidos no meio científico e de suplementação alimentar como fitoquímicos, sendo estes compostos bioativos não nutrientes encontrados na composição de tecidos vegetais, como os destacados na figura 1 e quadro 1, sendo hipotetizados como responsáveis pela redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas (40, 41).

A Quercetina (Querc) é tida como um dos flavonoides mais estudados na literatura científica, dentre as 6 subclasses de compostos desta natureza, sendo um composto polifenólicos com possível emprego em dietas, presente nos mais diversos vegetais e produtos de origem vegetal, tido como um inibidor do transporte de auxinas em tecidos vegetais (7).

As auxinas são hormônios vegetais responsáveis por diversas funções nos tecidos e células vegetais, dentre elas, a divisão e alongamento celulares; promoção de dominância apical; promoção do

crescimento das raízes, flores e frutos; fototropismo, entre outras (35).

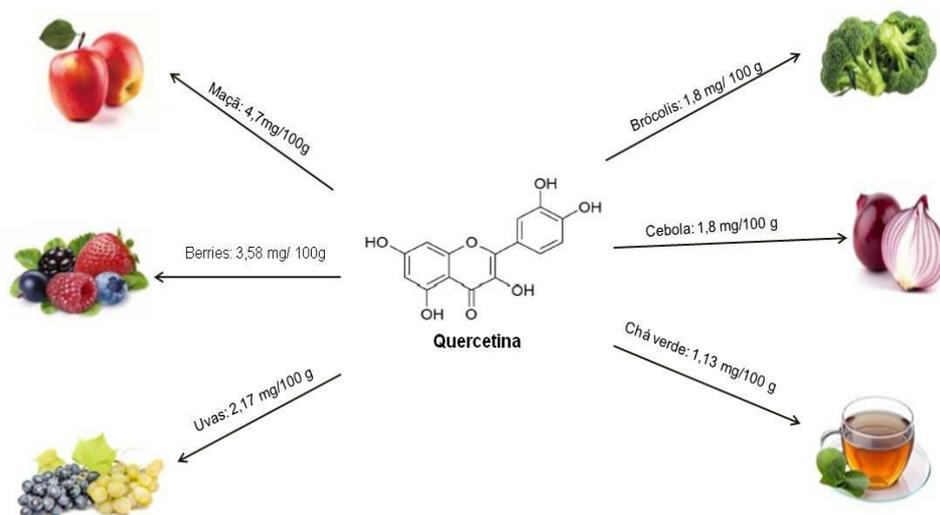
O nome Querc deriva-se da palavra *quercetum* (floresta de carvalho), que se tornou a palavra *quercicum*, sendo o termo utilizado desde 1857 (39).

Quadro 1: Alimentos e suas respectivas quantidades em porções comestíveis de quercetina.

Fonte Alimentar	Quantidade de quercetina (mg/100g) porção comestível
Alcaparras	233,84
Pimentas amarelas	50,73
Cebola roxa	39,21
Aspargo	15,16
Cranberries	14,84
Pimentas verdes	14,70
Mirtilo	7,67
Alface	7,61
Cebola branca	6,17
Tomate	4,12
Maçã	3,86
Brócoli	3,26
Chá verde	2,49
Cereja	2,29
Chá preto	2,19
Uvas roxas	2,08
Uvas verdes	1,12
Vinho tinto	1,04
Vinho branco	0,04

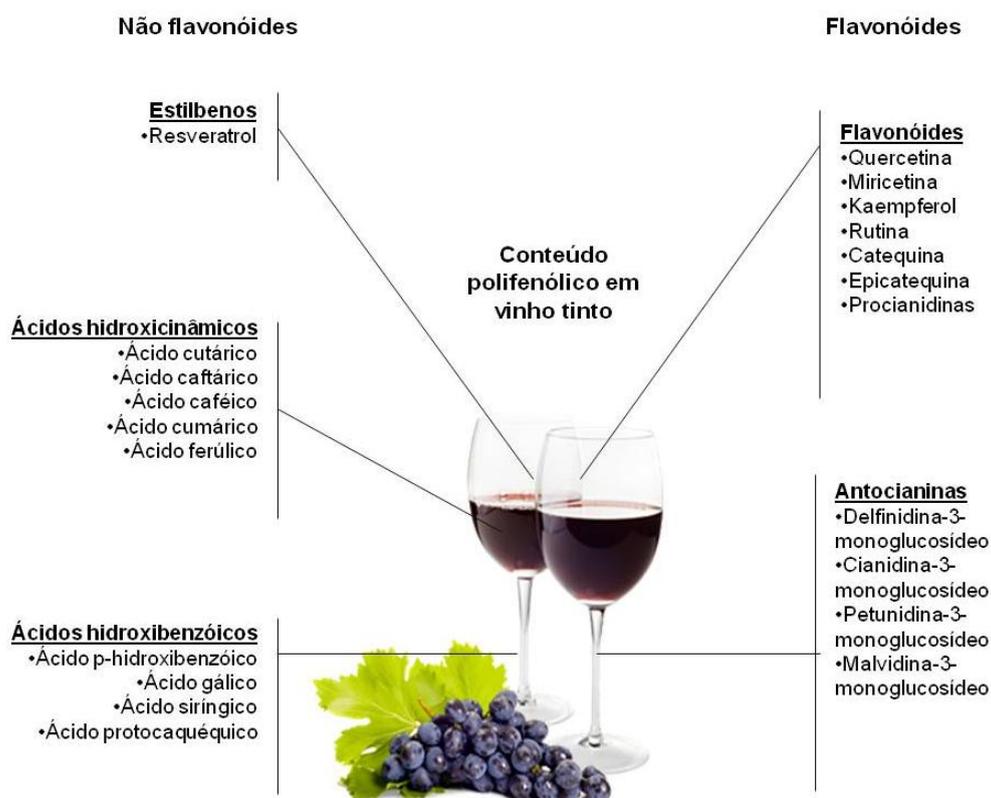
Figura 1 - Vegetais, frutas e chá e suas concentrações de quercetina.

Fonte: Adaptado de D'Andrea G (5)



Fonte: Adaptado de Gurib-Fakim A (36)

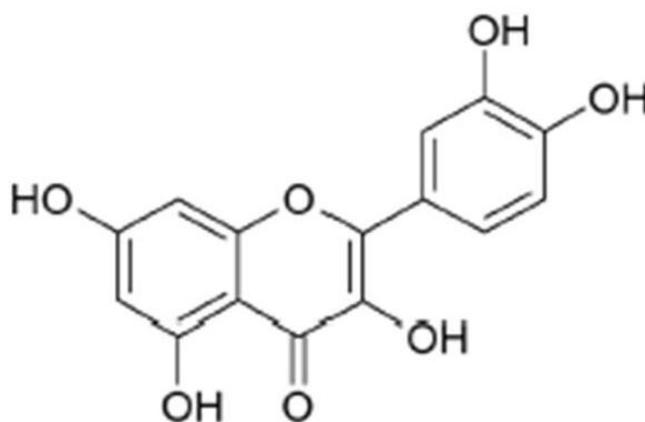
Figura 2 - Compostos fenólicos e não fenólicos encontrados no vinho.



Fonte: Liu RH Adaptado de (37)

A Querc é um dos mais abundantes flavonoides polifenóis de ocorrência natural, sendo originado como um metabólito secundário do metabolismo vegetal e amplamente distribuído neste reino, possível de ser encontrado na forma de glicosídeos de quercetina, sendo esta a molécula de Querc conjugada com resíduos de açúcar (38).

Figura 3 - Estrutura química da quercetina aglicona.

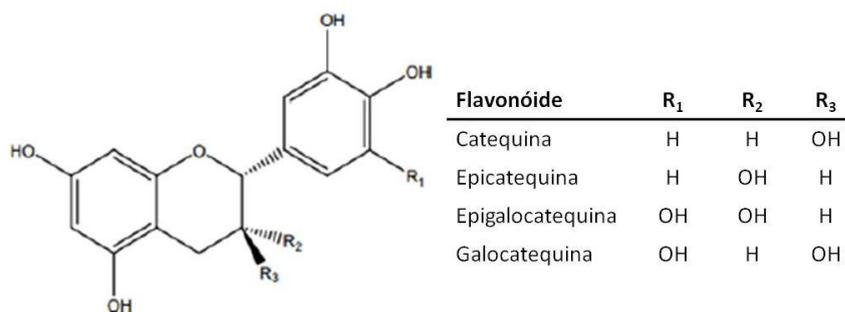


Fonte: Adaptado de Cione E et. al. (39)

A Querc em forma de aglicona (figura 3), que é a Querc livre de resíduos de açúcar, é a normalmente encontrada em produtos comerciais como um componente de suplementos alimentares, apresentando diferentes benefícios ou propósitos benéficiais que não são o foco principal apresentado nos diversos trabalhos científicos desenvolvidos (40).

Com relação à sua estrutura química, os flavonoides são componentes do maior grupo de compostos fenólicos, compostos por 2 anéis aromáticos ou anéis benzênicos (anel A e anel B), que são conectados por um oxigênio ligado a um pireno ou anel heterocíclico (anel C) (Figura 4) (41, 42).

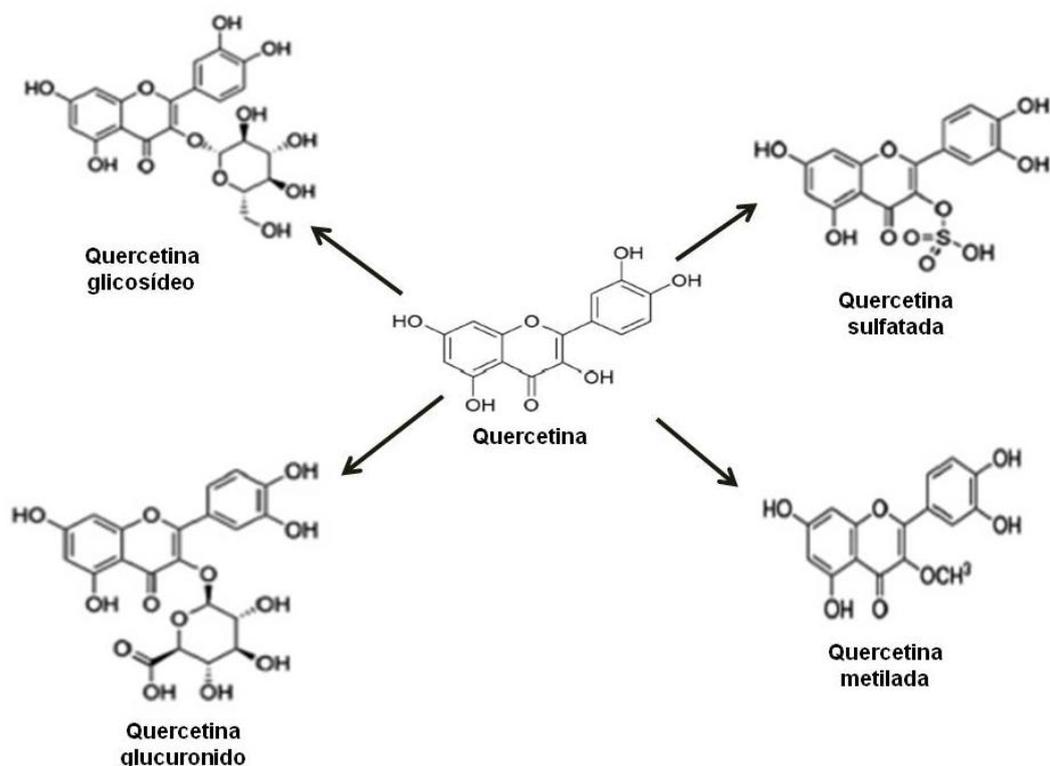
Figura 4 - Estrutura química dos principais flavonoides encontrados na natureza.



Fonte: Adaptado de D'Andrea G (5)

A Querc é naturalmente encontrada em formas derivadas, tanto na forma de glicosídeo (ligada a glicose ou rutinose), ligada a éteres, e, de forma muito mais rara, como um substituto de um sulfato e de um prenil (Figura 5) (41). É encontrada *in natura* na forma de cristais amarelos, sendo completamente insolúvel em água fria, levemente solúvel em água morna, retomando sua disponibilidade em chás, e completamente solúvel em compostos lipídicos e ou compostos alcoólicos, retomando sua alta disponibilidade em vinhos (7). Por ser um componente lipofílico, Querc apresenta capacidade de atravessar a membrana celular e dar início a múltiplas sinalizações que promovem a quimioproteção (43).

Figura 5 – Principais configurações de quercetina.

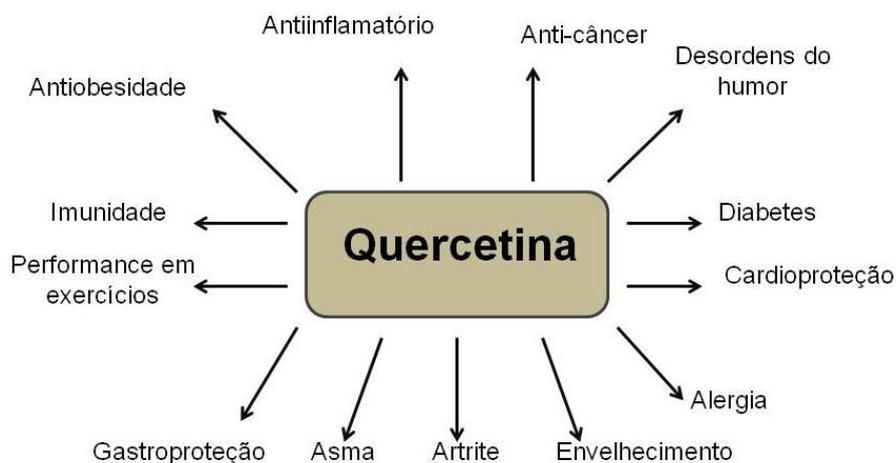


Fonte: Adaptado de Williams CA e Grayer RJ (44)

A atividade antioxidante de Querc é, majoritariamente, manifestada através de seu efeito sobre a glutathiona (GSH). Sua atividade enzimática, caminhos de sinalização transducional e neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs), cuja ação maléfica é provocada por fatores toxicológicos e ambientais(45, 46).

A Querc tem sua aplicação confirmada em pesquisas nos mais diversos campos e no tratamento das mais diversas formas de doença, tais como anti-idade, tratamento de alergias, angioproteção, anticarcinogênico, anti-inflamatório, tratamento da asma, tratamento de diabetes, melhoria na performance na prática de exercícios, gastroproteção e desordens do humor (Figura 6) (10-12).

Figura 6 - Principais ações de quercetina na saúde.

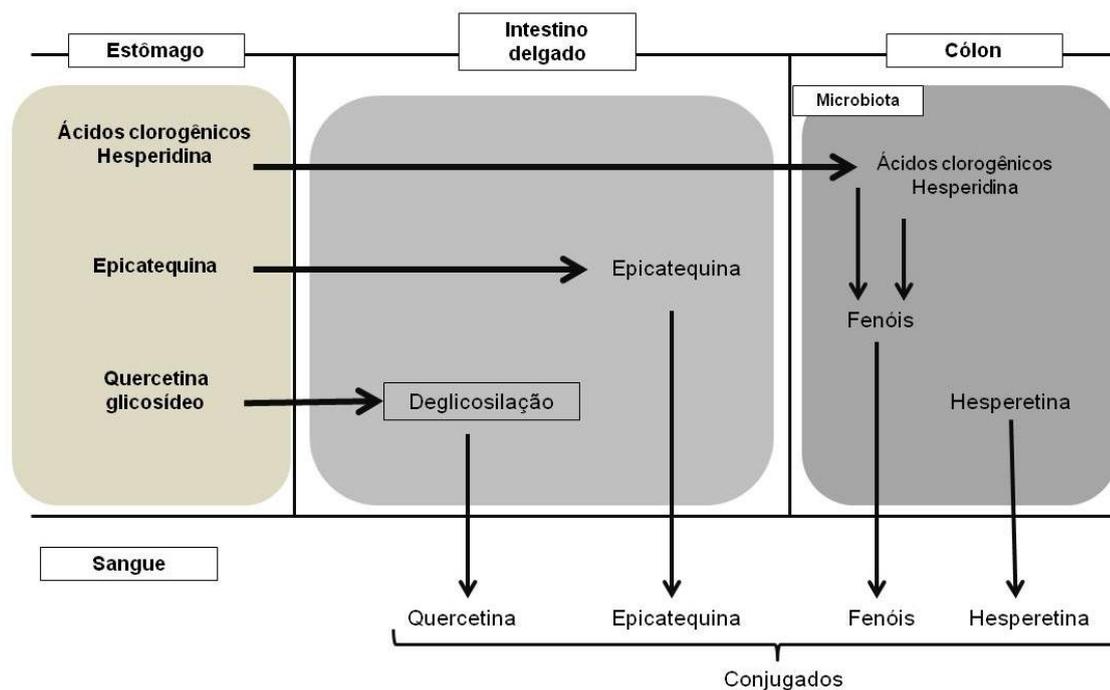


Fonte: Adaptado de D'Andrea G (5)

Além dos efeitos anti-trombóticos e antiinflamatórios, que são os efeitos com mais foco terapêutico e de investigações científicas de Querc, a mesma pode ser utilizada como método preventivo ao desenvolvimento de doenças relacionadas à obesidade, doenças relacionadas ao estilo de vida e no tratamento de algumas manifestações do câncer, sendo estes campos terapêuticos com crescente desenvolvimento dentro do campo científico (27, 47, 48).

Até o momento, não existem trabalhos sobre os efeitos tóxicos de Querc que contestem a segurança no consumo da mesma (49, 50). Sua absorção e metabolização podem ser observadas tanto nos intestinos quanto no fígado (Figura 7) (39, 51).

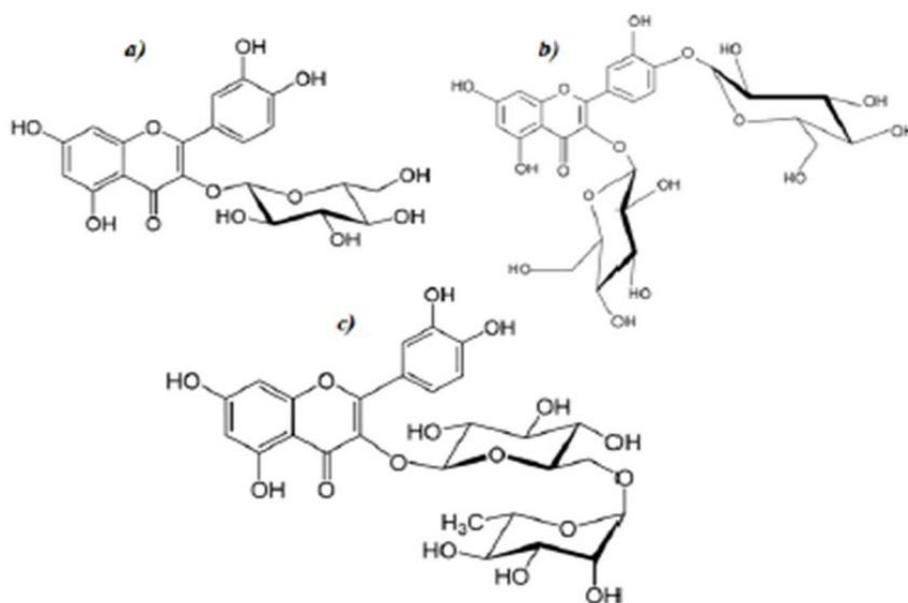
Figura 7 – Vias metabólicas de compostos fenólicos.



Fonte: Adaptado de Williamson G (8)

A Querc em forma glicosilada (forma mais comum na natureza) pode ser absorvida de maneira diferente, de acordo com o açúcar ao qual se liga. Evidências disponíveis mostram que os glucosídeos de Querc (como os encontrados nas cebolas) são absorvidos de forma muito mais eficaz que as formas rutinosiladas (a principal forma de Querc encontrada em chás). Os glucosídeos (Figura 8) são hidrolizados de maneira muito mais eficaz no intestino delgado pela beta-glucosidase (52).

Figura 8 – Estrutura química dos glicosídeos de quercetina.



Fonte: Adaptado de D'Andrea G (5)

2.3 Quercetina e câncer

O campo da quimioprevenção é definido como o responsável pela elaboração de estudos envolvendo componentes naturais ou sintéticos que possam ser utilizados como estratégia para complementar, a longo prazo, a prevenção, inibição ou reversão da carcinogênese. Este é um dos campos da pesquisa com o maior avanço, especialmente devido ao aumento no interesse sobre o uso da medicina complementar e produtos de origem natural no tratamento de enfermidades (15, 53).

Alterações no estilo de vida e alimentação estão intimamente associadas à uma menor incidência de certos tipos de cânceres, como câncer colo retal, câncer de estômago, câncer de pulmão, dentre outros, e doenças crônicas, como diabetes e doença coronariana, sendo a inclusão do consumo de produtos vegetais em uma dieta balanceada, vista como um dos métodos mais efetivos para tal (13-15).

Nos anos recentes, as pesquisas têm focado nas ações de Querc, desde considerações acerca de seu

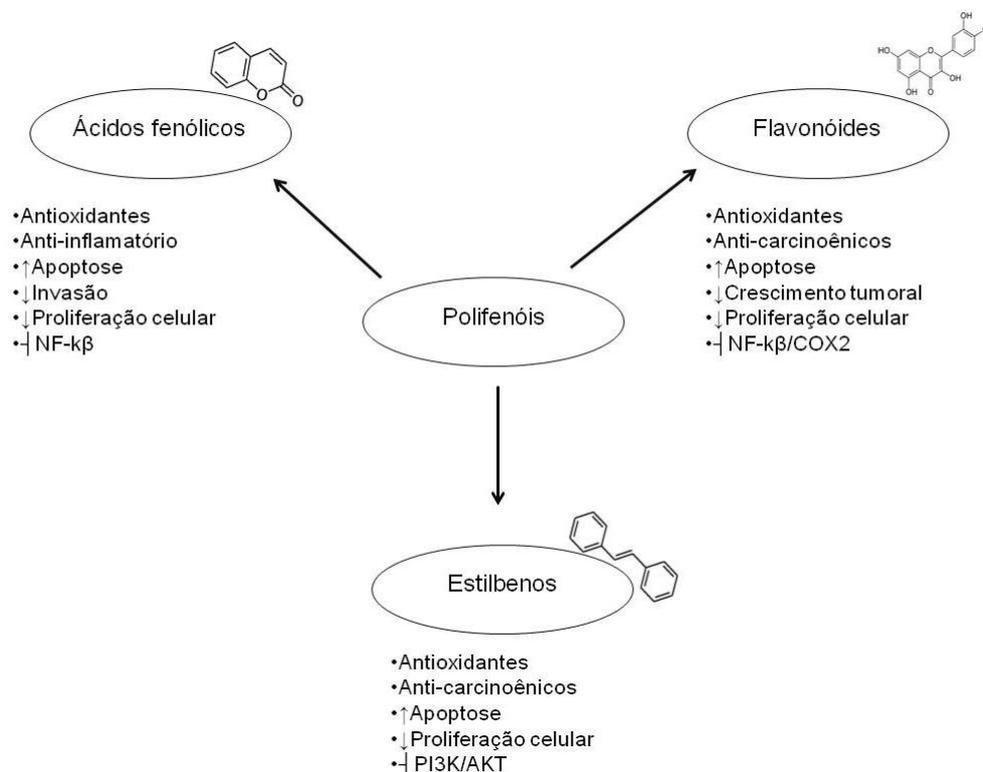
potencial carcinogênico, através de avaliações sobre possíveis promoções de mutação por Querc, até avaliações de seu potencial como agente anticarcinogênico, assim como seus agentes anticâncer (54). Os efeitos antitumorais da Querc têm sido descritos em diferentes tipos de câncer, incluindo o carcinoma de cabeça e pescoço, carcinoma colorretal, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, carcinoma pulmonar, câncer de bexiga, câncer de pâncreas, hepatocarcinoma, câncer da tireoide, câncer ovariano, câncer gástrico, entre outros (55-59).

A administração de Querc em um contexto de tratamento do câncer demonstra a capacidade de promover alterações na morfologia de diversas linhagens de células cancerosas, bem como a supressão de seu metabolismo glicolítico, sendo tais efeitos associados à sua ação antitumoral (60).

Resultados obtidos através de cultivo celular e experimentos envolvendo animais revelam ainda que os flavonoides, como Querc, exercem efeitos protetores e preventivos sobre a carcinogênese e distúrbios neurodegenerativos, principalmente devido à sua ação antioxidante, capacidade de produção de diversas enzimas desintoxicantes e capacidade de modular cascatas de sinalização proteicas (Figura 9).

Isto interfere em estágios específicos do processo carcinogênico, podendo inibir a proliferação celular e induzir a apoptose, autofagia e promover citotoxicidade celular específica em diversos tipos de células cancerosas (61, 62).

Figura 9 - Principais efeitos antineoplásicos promovidos pelos polifenóis.



Fonte: Adaptado de Murakami A, Ashida H e Terao J. (63).

A autofagia é tida como um processo de autorreciclagem, ou autodestruição, através do qual, células que apresentam dano em quaisquer de seus componentes são degradadas, sendo tal mecanismo associado tanto com processos de pró-sobrevivência, quanto processos antitumorais, a depender do contexto celular (64).

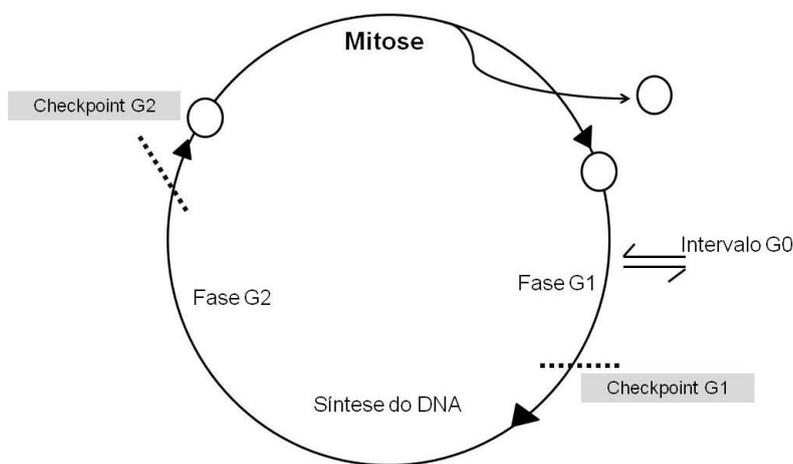
Os Flavonóides são também referidos no meio científico e de suplementação alimentar como fitoquímicos, sendo estes compostos bioativos não nutrientes encontrados na composição de tecidos vegetais, como os destacados na figura 1 e quadro 1, sendo hipotetizados como responsáveis pela redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas (40, 41).

Evidências crescentes sugerem que os flavonoides, em especial o resveratrol e a Querc, podem contribuir para a remodelação da cromatina, interferindo assim no surgimento de alterações epigenéticas importantes na progressão do câncer (65). Os Flavonóides são também referidos no

meio científico e de suplementação alimentar como fitoquímicos, sendo estes compostos bioativos não nutrientes encontrados na composição de tecidos vegetais, como os destacados na figura 1 e quadro 1, sendo hipotetizados como responsáveis pela redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas (40, 41). Em particular, compostos como Querc atuam no bloqueio da evolução tumoral através da inibição ou ativação de vias de sinalização chave, resultando na restauração da ação de genes supressores do tumor e inibição da expressão de oncogenes (66).

O ponto da replicação celular G1 é controlado pelo gene TP53, sendo este gene o principal responsável pelo controle deste processo de um modo geral (67). Querc apresenta a capacidade de detectar células no final do estágio proliferativo G1, impedindo sua continuidade (Figura 10) (68). Sendo assim, sabe-se que a administração de Querc em sistemas *in vitro* promove uma queda na expressão do gene TP53 mutante, sendo o mesmo apontado como o principal responsável na promoção de processos carcinogênicos (69-71).

Figura 10 - Pontos de interação entre ciclo celular e quercetina.

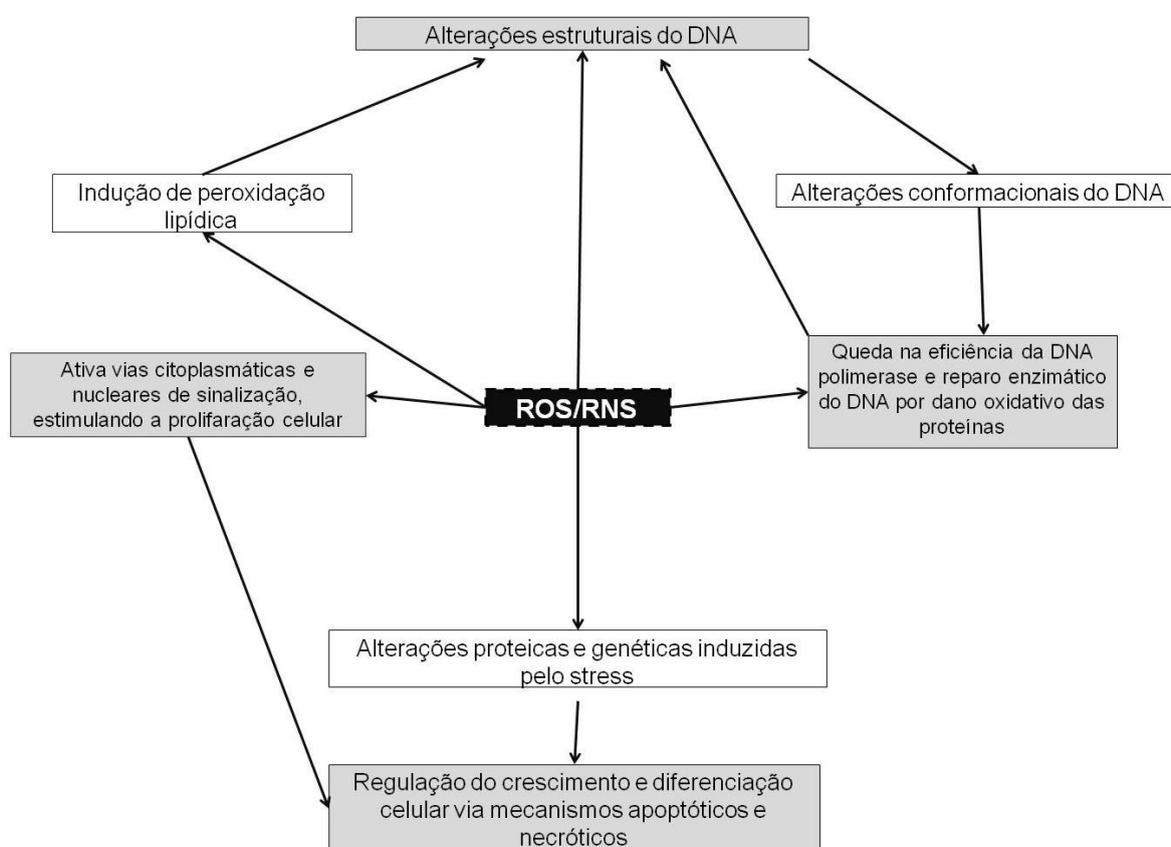


Fonte: Adaptado de Scholz (54)

São crescentes as evidências de que espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) desempenham papel chave no desenvolvimento do carcinoma humano,

especialmente com as crescentes evidências de que antioxidantes podem prevenir ou atrasar o desenvolvimento de certos tipos de cânceres (72). ROS é um termo coletivo usado frequentemente na biologia, incluindo os radicais de oxigênio, os superperóxidos, hidroxilas, peroxilas e alcoxilas e certos compostos não radicais que também atuam como agentes oxidantes (73-75). Uma das ações únicas de Querc, além de sua capacidade antioxidante e que tem chamado a atenção de pesquisadores na busca de respostas sobre seus mecanismos de ação, é a propriedade de atuar como agente antioxidante como um agente promotor de oxidação (76). A ação de EROs (Figura 11), responsáveis pelo processo oxidativo, sobre as moléculas de DNA é tida como a principal fonte de mutações, ativação e inativação em genes chave em células saudáveis, levando a um crescimento descontrolado de células tumorais (77).

Figura 11 - Danos à saúde promovidos por ROS.



Fonte: Adaptado de Zhang Q, Zhao X-H e Wang Z-J (73)

Na maioria dos tumores malignos, a angiogênese é o processo que dá início à metástase tumoral (78). Os vasos que envolvem o tumor fornecendo nutrientes e oxigênio servem também como possível porta de migração para células iniciadoras de tumor, que, ao entrar na corrente sanguínea, passam por uma série de processos de sinalização, podendo promover a formação de um tumor secundário em sítios distantes do que se localiza o tumor primário (79).

A densidade de vasos sanguíneos que envolvem uma massa tumoral é tida como chave que dita as probabilidades de desenvolvimento de metástase para um indivíduo (80, 81). Outro ponto chave de atuação de Querc na evolução tumoral dá-se através da inibição de formação de novos vasos sanguíneos (78).

Querc também é tida como uma possível inibidora da migração epitélio mesenquimal (EMT), fenômeno a partir do qual se dá o processo de metástase. O composto fenólico é demonstrado como responsável por promover o aumento da expressão de E caderinas, que são proteínas responsáveis por promover a adesão e ancoragem celular, e diminuição da expressão de N caderinas, que são as proteínas responsáveis pela perda de adesão e migração das células (82). O comportamento de inibição da EMT foi observado em casos de carcinoma de cabeça e pescoço e câncer colorretal (83, 84).

O uso de Querc foi apresentado, também, como um excelente adjuvante no uso de terapias convencionais, onde estudos realizados *in vitro* e *in vivo* revelam que Querc foi capaz de promover uma melhora na ação da droga Cisplatina, onde animais portadores de tumor e células cancerosas quando tratados com Querc em conjunto com a droga de uso convencional no tratamento de diversos cânceres apresentaram efeito na queda na proliferação celular, aumento de processos apoptóticos e uma queda no aumento do volume tumoral quando comparados com o uso de cisplatina apenas (85).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da administração de Quercetina (Querc) sobre a expressão gênica e biomarcadores do ciclo celular e da atividade apoptótica em células murinas de Melanoma cutâneo (MC) B16F10.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a viabilidade de células murinas de MC B16F10 tratadas com Querc nas concentrações 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μM ;
- Quantificar a expressão gênica de marcadores do ciclo celular (ciclina A2, B1, E1 e D3) em células murinas de MC B16F10 tratadas com Querc na concentração de 200 μM ;
- Analisar a frequência de morte celular promovida pelo tratamento com Querc em células murinas de MC B16F10.

4 PRODUTO CIENTÍFICO

4.1 Produto científico: *Quercetin reduces cell viability, increases cell death and regulates the expression of cell proliferation markers of B16F10 murine cutaneous melanoma cells.*

Artigo científico submetido para avaliação no periódico *Phytomedicine*.

PRODUTO CIENTÍFICO

Quercetin reduces cell viability, increases cell death and regulates the expression of cell proliferation markers of B16F10 murine cutaneous melanoma cells.

Running-title: Antitumoral effects of Quercetin on murine cancer cells.

João Lucas Rodrigues dos Santos¹; Magda Mendes Vieira¹, Valéria Couto Quintão¹; Sérgio Henrique Sousa Santos⁴, Lucyana Conceição Farias⁵, André Luiz Sena Guimarães⁵, Ludmilla Regina de Souza David¹, Alfredo Mauricio Batista De-Paula^{1,5}

¹ Nucleus of Epidemiological and Molecular Research Catrumano (NUPEMOC). Health Research Laboratory. Health Science Post-graduate Programme. Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), 39401-001, Montes Claros, MG, Brazil.

² Department of Physical Education. Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), 39401-001, Montes Claros, MG, Brazil.

³ Institute of Agricultural Sciences, Food Engineering College, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Montes Claros, Brazil.

⁵ Department of Dentistry. Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), 39401-001, Montes Claros, MG, Brazil.

Address correspondence to:

Alfredo Maurício Batista De-Paula.
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.
Hospital Universitário Clemente de Faria - Universidade Estadual de Montes Claros.
Avenida Cula Mangabeira, 562. Bairro Santo Expedito, Montes Claros.
Minas Gerais, Brazil.
CEP: 39401-001.
Phone: 55-21-38 32248380
e-mail: ambpatologi@gmail.com

Abstract

Introduction: Cutaneous melanoma is the type of cancer that develops from melanocytes, the cells responsible for skin pigmentation, considered a type of cancer that is clinically aggressive due to the precociousness of its development of metastasis. Quercetin (Querc) is a naturally occurring polyphenol with anti-oxidant properties that acts as a negative modulator of molecular pathways related to the progression of malignances, including those responsible for cell proliferation and apoptosis.

Study design: *In vitro* study.

Purpose: In the present study, we investigated the effects of Querc on cell viability, death and expression of markers of cell cycle of murine cutaneous Melanoma B16F10 cells.

Methods: In our study, B16F10 cells in a suspension of 2×10^4 cells were cultured on the presence of Querc at doses of 200, 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 μM for a time period of 48 hours. At the end of this period, we analyzed cell viability using the MTT colorimetric assay (3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide for colorimetric assay), the cell proliferation by the expression of mRNA of the A2, B1, D3 and E1 cyclins, using qPCR and colorimetric fluorescence assay with ethidium bromide and orange acridine (BE / AA) for establishing cell death rates.

Results: Our results showed significant differences in the cell viability of B16F10 cells exposed to Querc, since the drug was able of decreasing cell viability by more than 50% at its highest concentration. Regarding the molecular events that regulate the cell cycle, Querc was also able of increasing the expression of the cyclin D3, which acts as a blocker of the cell cycle transition from phase G1 to S1, leading, consequently, to a increase on the frequency of B16F10 cells in the G0 / G1 phases of the cell cycle.

Conclusions: Our results showed that the treatment with Querc acted as an inductor of cell death, a modulator of cell cycle markers expression and promoter of cell death in B16F10 cells. These findings demonstrate the potential use of Querc as a nutraceutical with adjunctive anti-cancer therapeutic properties.

Key-words: Anti-oxidant, Quercetin, Melanoma, Therapeutics, *In vitro* techniques.

Introduction

Cutaneous melanoma (CM) is the type of cancer that affects the melanocytes, which are the cells responsible for the production of melanin, being so responsible for the skin color. It starts as a small pigmented cutaneous tumor on the normal skin, commonly observed on sun exposed areas (1). This type of cancer is treated as a different cancer from the others due to its capability of promoting fast and aggressive metastasis, becoming responsible for the majority of death cases caused by metastatic cancers, with a five-year overall survival rate of about 20% for patients with late stage of malignancy (2, 3).

Most successful medical treatments reported in a historical context are currently related to the use of flavonoids, natural compounds found in vegetables(4). Querc is a flavanol found mostly in fruits and vegetables, being also found in any part of a vegetable, that exhibits, between many other applications, antioxidant and anti-inflammatory properties (5).

Querc has received attention as a strategy in adjuvant treatment for malignant tumors because, according to findings from many studies, it is capable of modulating multiple cellular-signaling pathways that are usually altered during tumorigenesis and progression of many solid cancers, including inhibition of cancer cell proliferation and programmed cell death (apoptosis) (6, 7).

The use of Querc as an adjuvant agent administered in conjunction with certain chemotherapeutic, such as cisplatin, a commonly used antineoplastic drug, has promoted efficient antineoplastic effects on patients with cancer (8).

However, molecular mechanisms triggered by Querc have not been fully unraveled in many cancer cells, mostly related to the poor amount of studies that highlights it's potential on the diverse areas of application (9).

Therefore, the aim of this present study is investigate the *in vitro* effects of Querc on cell

viability, proliferation, and apoptosis in murine B16F10 CM cells.

Materials and Methods

Cell culture

Murine B16F10 cutaneous melanoma cells were obtained from the cell bank of Rio de Janeiro and cultured in DMEM supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS, v/v) (EuroClone), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (Lonza, Basel, Switzerland). The cells were incubated and kept at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator.

Cell viability assay

The cell viability test was performed by using the MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The MTT reagent is enzymatically reduced by viable cells in culture, becoming purple formazan, turning the medium purple. Initially, 2×10^4 cells were seeded in 96-well plates. The plates were placed in standard conditions of culture (37°C and 5% CO₂ humidified incubator) for 24 h, for allowing cell adhesion to the plate, then exposed to increasing concentrations of Querc (200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µM) for a period of 48 h. The cells were then incubated with 0.5 mg / mL of MTT solution and then placed at standard culture conditions for 4 h. The absorbance at 570 nm was measured using a spectrophotometer (DR-200B). All concentrations of Querc were tested in triplicate.

Cell death assay

For cell death assay we used the method of differential staining with ethidium bromide/acridine orange (BE/AA). This is the method appointed for visually differentiating

viable cells from dead cells, due to apoptosis or necrosis. In a six-well plate, 3×10^5 cells/well was seeded. The cells were then submitted to treatment with Querc on the concentrations of 50, 100 and 200 μM for 48 h. After treatment, cells were removed from the plate, centrifuged and resuspended in 25 μL of RPMI medium. After that, 1 μL of the BE/AA (1:1) mixture (0.5 mg/mL both BE and AA) was added to the cells. The cell suspension was then analyzed by fluorescence microscopy (Olympus FSX100) at 5 \times magnification, three fields per well. The cells that showed green fluorescence emission were classified as viable, and the dead cells were observed by red or orange fluorescence emission. The images obtained by fluorescence microscopy were submitted to ImageJ[®] software analysis for quantifying the amount of dead cells, measured in percentage.

RNA isolation

Total RNA was isolated from cells treated (case) and non treated (control) with Querc by a RiboPure kit (Ambion, Austin, TX, USA) over the manufacturer's instructions. For eliminating the genomic DNA contamination, isolated RNA was treated with RNase-free DNase I (DNA-free kit; Ambion, Austin, TX, USA). The total RNA concentration was determined by measuring the absorbance at 260 nm and then submitted to qPCR analysis.

qPCR analysis for gene expression

For our qPCR analysis, the B16F10 cells were seeded in 25 cm^2 culture flasks. The amount of cells to be seeded at each flask were established differently for control (2×10^5 cells) and treatment ($3,5 \times 10^5$ cells) groups, so that the control group would be able of reaching the confluence at the end of the experiment and the experimental group could reach the number of cells necessary for RNA extraction. Querc treatment was established with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 48 h. After the treatment, the adherent cells were removed from the

flasks then used for the extraction of RNA. Samples were submitted to DNase I treatment for removing DNA residues. The reverse transcription reaction was performed using 1000 ng of total RNA, M-MLV Reverse transcriptase, OligodT (15), Specific Primers and RNase inhibitors (RnaseOUT™). Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed using a TaqMan gene expression assay according to the manufacturer's instructions. 5 µL of the TaqMan® Universal PCR Master Mix assay (2x), 0.5 µL of the primer (TaqMan gene expression assay 20x), 3.5 µL water and 1 µL of cDNA were mixed for each sample. The primers specifications used were: Cyclin A2 (access code: Mm00438070_m1 4453320), Cyclin B1(access code: Mm00838401_g1 4453320), Cyclin D3 (access code: Mm01612362_m1 4453320), and Cyclin E1(access code: Mm01266311_m1 4448892). The endogenous gene primer adopted for this work was the gapdh (access code: Mm99999915_g1). The comparative CT method was applied to compare the gene expression levels between the groups (10).

Statistical analysis

All quantitative data in the present study was shown as mean \pm SD of two or three independent experiments, as indicated, and compared with Student's t-test or ANOVA with Bonferroni post hoc test unless otherwise specified. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant. For statistical analysis, it was used the Prism software version 5.

Results

Querc administration decreases cell viability in murine B16F10 melanoma cells

Viability effects promoted by Querc on the concentrations of 6,25; 12,5; 25; 50; 100 and 200 was tested *in vitro* on murine B16F10 melanoma cell culture using the cell death MTT assay as described on the anterior section. The results were statistically analyzed then evaluated.

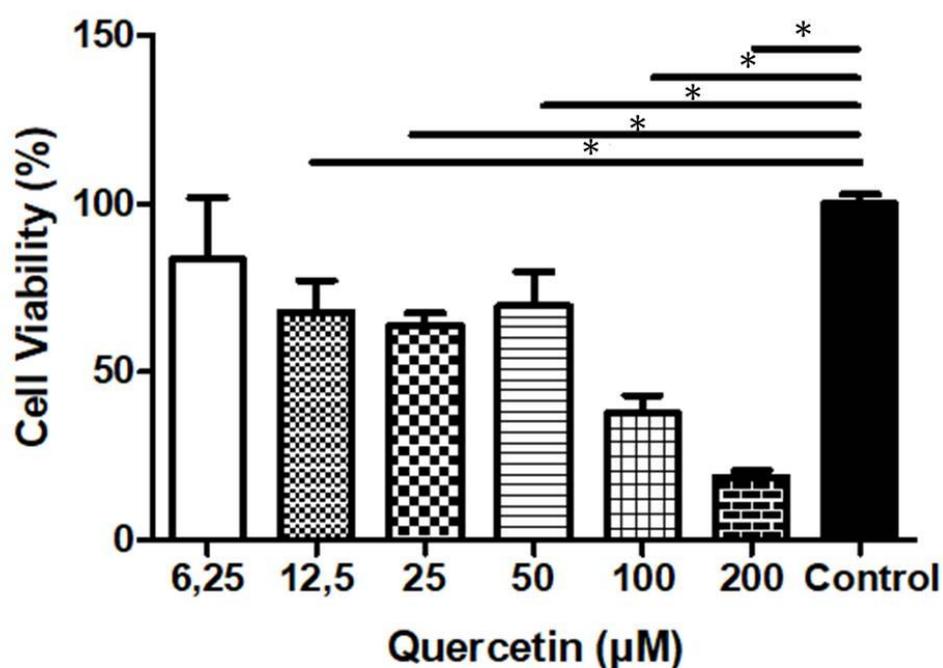


Figure 1 – Analysis of cell viability in B16F10 cells with Querc use using the MTT assay. Representative graph of the data obtained after statistical analysis of the MTT assay for the different concentrations of quercetin 6,25; 12,5; 25; 50; 100 and 200 µM in the *in vitro* treatment of cutaneous malignant melanoma cells B16F10.

*Significant result: $p < 0,05$

The result from the cell viability MTT assay (Figure 1) showed that Querc was

capable of promoting a significative decrease of cell viability on the treated cells. In comparison with the control group, it is possible to observe that, the group treated with the highest concentration of Querc (200 μ M) were reduced in viability over 50%. The decrease on the cell viability was, as observed, dose dependent. All concentrations promoted a significative decrease on cell viability, except the concentration of 6,25 μ M.

Querc treatment promoted high death rates in murine B16F10 melanoma cell

In relation to the cell death assay (Figure 2), it was possible to observe that Querc was able of promoting high rates of cell death. For this result we analyzed specifically the doses of 50, 100 and 200 μ M, showing that, on the dosage of 200 μ M of Querc, we could observe the promotion of an increase of the death events in approximately 60% when compared to the control group, showing that, similar to the cell viability, cell death promoted by Querc is also dose dependent.

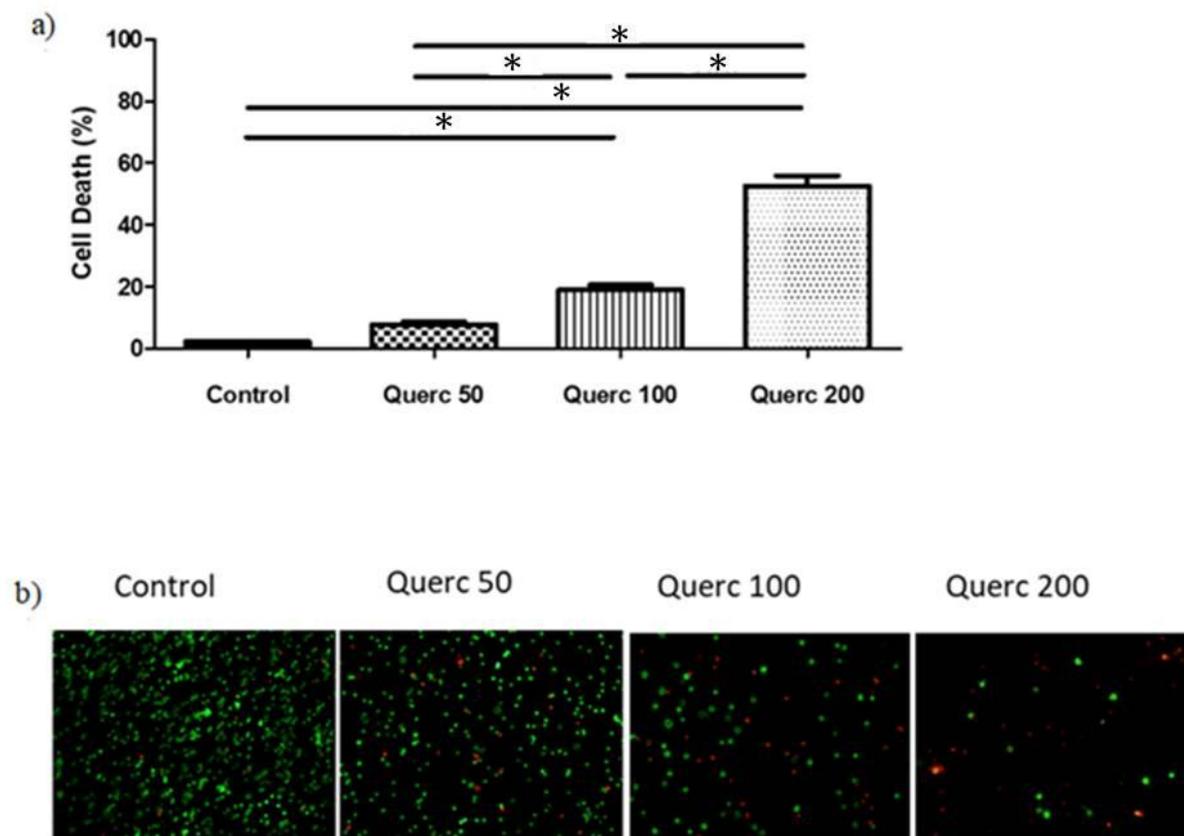


Figure 2 - Cell death assay. Representative graph and fluorescence microscopy images of the cells treated with the different concentrations of quercetin 50; 100 and 200 μM in the *in vitro* treatment of cutaneous malignant melanoma cells B16F10 for the death assay. a) graphic results of the quercetin promotion of cell death on malignant melanoma cells B16F10. b) Fluorescence microscopy of the cells after treatment and staining with BE/AA. green cells are the cells that remained viable after treatment and red cells the dead cells.

*Significant result: $p < 0,05$

Querc treatment affect the gene expression of cyclins involved in cell cycle in murine B16F10 melanoma cell

We analyzed the expression of cycline genes related to cell cycle by the method of qPCR as described on the anterior section. After accessing the results from de qPCR analysis (Figure 3) we were able of observing that Querc was able of promoting non

statistically significant decrease on the expression of the cyclins A2, B1 and E1. In relation to the cyclin D3, the treatment with Querc was able of promoting a low significantly increase on its expression.

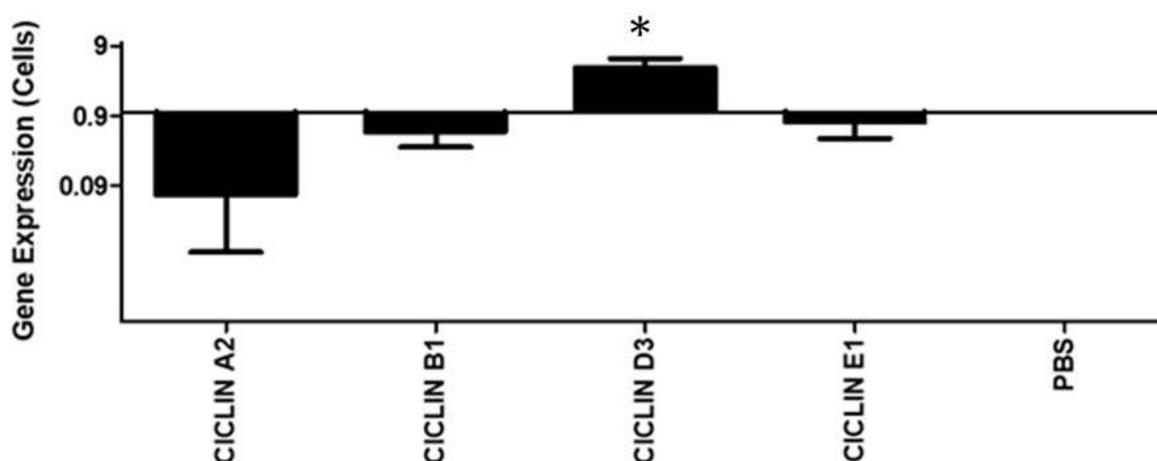


Figure 3 - Cyclins expression on cells treated with quercetin on the concentration of 200 μ M. Representative graph of the genetic expression of cyclins after RNA isolation of the cells of malignant murine melanoma B16F10 treated with quercetin. The data were obtained by isolation of the RNA from the cells isolated and treated with quercetin and posterior analysis.

*Significant result: $p < 0,05$

Discussion

According to our findings, Querc promoted a decrease in viability and an increase on death process in malignant murine melanoma B16F10 cells after treatment.

The decrease of cell viability and increase of cell death promoted by flavonoids is most shown as related to their broad spectrum of action, going from alterations on cell shape and glycolytic metabolism, until modulatory effects on the angiogenesis and epithelial mesenchymal transition, related mostly to their antioxidant properties (11, 12).

Concerning to cytotoxic effects, our results showed a dose dependent effect of Querc on the promotion of murine melanoma B16F10 cell death. Most of the studies involving the use of Querc on the cancer treatment (13, 14) have similar results related to a dose dependence of Querc and flavonoids in general when applied as treatment for different types of cancer.

The cell death and decrease on cell viability is, basically, related to two key processes on the maintenance on organism balance and development of neoplastic malignances: The apoptosis and autophagy processes (15).

It's also important to highlight that, experiments involving the use of quercetin on the treatment of CM is not unprecedented. Other experiments, such as the ones performed by (16) and by (17) had already shown that quercetin effects can go from promoting protective effects over oxidant damage of DNA and chromosomal aberrations, the inhibition of STAT3 signaling pathway, promoting a reduction of tumor growth and the inhibition of metastasis on a *in vivo* environment, between many other beneficial effects.

In this present study, the murine CM B16F10 cells exhibited a slight increase on the expression of the cyclin D3 that, when unbalanced with the expression of other cyclins is able of promoting a block on the advance of cell cycle to G1 to S1-phase (18). Studies as the one performed by (19) and the one performed by (20) shows with more details de ability of quercetin on promoting the inhibition of cell cycle progress. Both works showed that, in a dose dependent form, Querc was able of arresting the cancer cells at the G1 or early S phases, interrupting the cell cycle as a whole, starting this way the apoptosis process. Two of the most important group of proteins enrolled in cell cycle are cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs) (21). The cell cycle progress is driven by changes in cyclins complexes and expression, and if the control of the cell cycle is disrupted, the cycle progress might be stimulated by overexpressed cyclins (22).

In mammalian cells, cyclins from the D and E family complexes are required to promote cell cycle entrance from quiescence, progression through the G1 phase and transition from G1 into S phase (23, 24).

Our findings showed a tendency for decrease cyclins A2, B1 and E1 RNA expression and higher cyclin D3 RNA expression in murine CM B16F10 cells treated with Querc (concentração aqui). Knowing that the cyclins from the A family are responsible for the beginning of the G1 M and S cell cycle phases and the cyclins from B, D and E family are responsible for starting the G1 phase of the cell cycle, it is possible to conclude that, by down regulating the expression of key cyclins for the cell cycle process, Querc is able to down regulate the cell cycle in treated B16F10 cells (25, 26).

There are also studies that show that quercetin can also promote some malefic effects over melanoma, such as the study performed by (27), showing that the treatment proposed was able to promote an increase of melanogenesis by increasing tyrosinase activity. In our study we were not able to establish negative effects of querc over the treatment of the B16F10 cells.

As highlighted by (28), the field of research on the specific actions of Querc and other flavonoids is still not very developed, making with the specific actions of those compounds are still not completely realized, so more researches on this specific field of chemoprevention are still needed for complete realization of their potential, especially when it comes to cancer treatment.

In conclusion, findings from this study showed that Querc administration, specially at the concentration of 200 μ M, was able to promote an increase on cell death rates on murine MC B16F10 cells on a *in vitro* environment, being able to promote an increase on cell death rates and a decrease on the expression of the cyclins responsible for cell proliferation, being this way a potential source of adjuvant therapy for cancer.

Conflict Of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We would like to thank the Foundation for Research Support of the Minas Gerais State (FAPEMIG, processes numbers: PPM-00029-17 and DEG-00010-16); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, processes number: 437311/2016-3 and 430759/2016-9); and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the support to carry out this study.

References

1. RL B. Criteria for diagnosis and classification of melanoma. In: RL B, editor. Pathology of malignant melanoma. New York: Springer-Verlag; 2003. p. 2-17.
2. Siegel RL, Miller K, Jemal A: Cancer statistics, 2015. *CA Cancer j Clin.* 2015;65:5-29.
3. Lee JE, Mansfield PF, Ross MI, Pecherstorfer M, Keck A. Cutaneous melanoma metastases [6](multiple letters). *New England Journal of Medicine.* 1998;338(13):922-3.
4. Formica J, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and chemical toxicology.* 1995;33(12):1061-80.
5. Williamson G. The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutrition bulletin.* 2017;42(3):226-35.
6. Wang P, Zhang K, Zhang Q, Mei J, Chen C-j, Feng Z-z, et al. Effects of quercetin on the apoptosis of the human gastric carcinoma cells. *Toxicology in Vitro.* 2012;26(2):221-8.
7. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, De Biasi S, Roat E, et al. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence-based complementary and alternative medicine.* 2011;2011.
8. Hofmann J, Fiebig HH, Winterhalter BR, Berger DP, Grunicke H. Enhancement of the antiproliferative activity of cis-diamminedichloroplatinum (II) by quercetin. *International journal of cancer.* 1990;45(3):536-9.
9. Thakur VS, Deb G, Babcook MA, Gupta S. Plant phytochemicals as epigenetic modulators: role in cancer chemoprevention. *The AAPS journal.* 2014;16(1):151-63.
10. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols.* 2008;3(6):1101-8.
11. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *nature.* 2000;407(6801):249-57.
12. Zhang Q, Zhao X-H, Wang Z-J. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis. *Toxicology in vitro.* 2009;23(5):797-807.
13. Zhang Q, Zhao X-H, Wang Z-J. Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Food and Chemical Toxicology.* 2008;46(6):2042-53.
14. Kee J-Y, Han Y-H, Kim D-S, Mun J-G, Park J, Jeong M-Y, et al. Inhibitory effect of quercetin on colorectal lung metastasis through inducing apoptosis, and suppression of metastatic ability. *Phytomedicine.* 2016;23(13):1680-90.
15. Zhou Y, Zheng J, Li Y, Xu D-P, Li S, Chen Y-M, et al. Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients.* 2016;8(8):515.
16. Horváthová K, Chalupa I, Šebová L, Tóthová D, Vachálková A. Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2005;565(2):105-12.
17. Cao H-H, Tse AK-W, Kwan H-Y, Yu H, Cheng C-Y, Su T, et al. Quercetin exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling. *Biochemical pharmacology.* 2014;87(3):424-34.
18. Yu Z, Wang C, Wang M, Li Z, Casimiro MC, Liu M, et al. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. *The Journal of cell biology.* 2008;182(3):509-17.
19. Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N, Marui N, Matsumoto K, Fujioka A, et al. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS letters.* 1990;260(1):10-3.
20. Jeong JH, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *Journal of cellular biochemistry.* 2009;106(1):73-82.

21. Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*. 2004;116(2):221-34.
22. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2001;1(3):222-31.
23. Chulu JL, Liu HJ. Recent patents on cell cycle regulatory proteins. *Recent patents on biotechnology*. 2009;3(1):1-9.
24. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*. 1989;246(4930):603-8.
25. Johnson DG, Walker C. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1999;39(1):295-312.
26. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. *Cell*. 1991;66(6):1071-4.
27. Nagata H, Takekoshi S, Takeyama R, Homma T, Yoshiyuki Osamura R. Quercetin enhances melanogenesis by increasing the activity and synthesis of tyrosinase in human melanoma cells and in normal human melanocytes. *Pigment cell research*. 2004;17(1):66-73.
28. Massi A, Bortolini O, Ragno D, Bernardi T, Sacchetti G, Tacchini M, et al. Research progress in the modification of quercetin leading to anticancer agents. *Molecules*. 2017;22(8):1270.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao fim deste trabalho pudemos concluir que, a administração de Quercetina no tratamento *in vitro* proposta pelo mesmo demonstra ser eficaz no tratamento do carcinoma ao qual se propõe o teste, através da promoção de morte celular, bem como a promoção de alterações na expressão de ciclinas responsáveis por promover a manutenção do ciclo celular.

Sendo assim, podemos tratar a quercetina como um potencial adjuvante no tratamento do câncer, neste caso, o melanoma metastático que se relaciona às células submetidas ao tratamento.

Mais experimentos, como experimentos envolvendo células não desenvolvidas de linhagens de câncer, experimentos de especificidade de morte celular e ciclo celular e, especialmente, experimentos *in vivo* e em humanos, são necessários para um maior conhecimento acerca dos efeitos desse suplemento quando incorporado a um sistema biológico complexo.

REFERÊNCIAS

1. RL B. Criteria for diagnosis and classification of melanoma. In: RL B, editor. Pathology of malignant melanoma. New York: Springer-Verlag; 2003. p. 2-17.
2. al. Ae. Saúde para a Família. In: al. Ae, editor. Doenças da Pele. Rio de Janeiro: MSD; 2010.
3. Chen C, Wei Y, Hummel M, Hoffmann TK, Gross M, Kaufmann AM, et al. Evidence for Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. PLoS ONE. 2011;6(1):e16466.
4. Oh WY, Ambigaipalan P, Shahidi F. Preparation of quercetin esters and their antioxidant activity. Journal of agricultural and food chemistry. 2019;67(38):10653-9.
5. D'Andrea G. Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications? Fitoterapia. 2015;106:256-71.
6. Scotto G, Fazio V, Muzio LL, Coppola N. Screening for infectious diseases in newly arrived asymptomatic immigrants in southern Italy. Eastern Mediterranean Health Journal. 2019;25(4).
7. Beecher GR, Warden BA, Merken H. Analysis of tea polyphenols. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1999;220(4):267-70.
8. Williamson G. The role of polyphenols in modern nutrition. Nutrition bulletin. 2017;42(3):226-35.
9. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. Nutrition and Cancer. 1993;20(1):21-9.
10. Böhm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke A. Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. Zeitschrift für Ernährungswissenschaft. 1998;37(2):147-63.
11. Chen C. CiteSpace II: Detecting and visualizing emerging trends and transient patterns in scientific literature. Journal of the American Society for information Science and Technology. 2006;57(3):359-77.
12. Fazio A, Iacopetta D, La Torre C, Ceramella J, Muià N, Catalano A, et al. Finding solutions for agricultural wastes: antioxidant and antitumor properties of pomegranate Akko peel extracts and β -glucan recovery. Food & function. 2018;9(12):6618-31.
13. Kashyap D, Garg VK, Tuli HS, Yerer MB, Sak K, Sharma AK, et al. Fisetin and Quercetin: Promising Flavonoids with Chemopreventive Potential. Biomolecules. 2019;9(5):174.
14. Chen C, Kong A-NT. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. Trends in pharmacological sciences. 2005;26(6):318-26.
15. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, De Biasi S, Roat E, et al. Quercetin and cancer chemoprevention. Evidence-based complementary and alternative medicine. 2011;2011.
16. Fernández-Palanca P, Fondevila F, Méndez-Blanco C, Tuñón MJ, González-Gallego J, Mauriz JL. Antitumor Effects of Quercetin in Hepatocarcinoma In Vitro and In Vivo Models: A Systematic Review. Nutrients. 2019;11(12):2875.
17. INCA INdC-. Câncer de pele melanoma - versão para Profissionais de Saúde <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma/profissional-de-saude2020> [cited 2020 30/05/2020].
18. Criado PR, Vasconcellos C, Sittart JAS, Valente NYS, Moura BPS, Barbosa GL, et al. Melanoma maligno cutâneo primário: estudo retrospectivo de 1963 a 1997 no Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo. Revista da Associação Médica Brasileira. 1999;45:157-62.
19. Luke CG, Coventry BJ, Foster-Smith EJ, Roder DM. A critical analysis of reasons for improved survival from invasive cutaneous melanoma. Cancer causes & control : CCC. 2003;14(9):871-8.
20. Lindholm C, Andersson R, Dufmats M, Hansson J, Ingvar C, Möller T, et al. Invasive

- cutaneous malignant melanoma in Sweden, 1990–1999. *Cancer*. 2004;101(9):2067-78.
21. Leonardo Fernandes de Souza Aguiar MWRA, Fernando Nakamura, Luis Felipe Araújo de Moraes Prado, Thomaz Santos Lyra, Cristiano D. Silveira Ramos. Análise do comportamento histopatológico do melanoma fundamental para uma boa prática na cirurgia plástica. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*. 2009;24(2):152-7.
 22. Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatology research and practice*. 2010;2010.
 23. DIMATOS DD, F; MACHADO, R; VIEIRA, V; VASCONCELLOS, Z; ELY, J; NEVES, R. Melanoma cutâneo no Brasil. *Arquivos Catarinenses de Medicina* 2009;38.
 24. Liu RH. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Advances in nutrition*. 2013;4(3):384S-92S.
 25. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research*. 2004;24(10):851-74.
 26. Liao H, Tang M, Luo L, Li C, Chiclana F, Zeng X-J. A bibliometric analysis and visualization of medical big data research. *Sustainability*. 2018;10(1):166.
 27. Pelletier DM, Lacerte G, Goulet ED. Effects of quercetin supplementation on endurance performance and maximal oxygen consumption: a meta-analysis. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*. 2013;23(1):73-82.
 28. Nishimuro H, Ohnishi H, Sato M, Ohnishi-Kameyama M, Matsunaga I, Naito S, et al. Estimated daily intake and seasonal food sources of quercetin in Japan. *Nutrients*. 2015;7(4):2345-58.
 29. Roman G, Jackson R, Gadhia R, Roman A, Reis J. Mediterranean diet: The role of long-chain ω -3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease. *Revue neurologique*. 2019.
 30. Criqui MH, Ringel BL. Does diet or alcohol explain the French paradox? *The Lancet*. 1994;344(8939-8940):1719-23.
 31. Formica J, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and chemical toxicology*. 1995;33(12):1061-80.
 32. Renaud Sd, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*. 1992;339(8808):1523-6.
 33. Heijnen CG, Haenen GR, Minou Oostveen R, Stalpers EM, Bast A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radical Research*. 2002;36(5):575-81.
 34. Jakaria M, Azam S, Jo S-H, Kim I-S, Dash R, Choi D-K. Potential Therapeutic Targets of Quercetin and Its Derivatives: Its Role in the Therapy of Cognitive Impairment. *Journal of clinical medicine*. 2019;8(11):1789.
 35. Leopold AC. Auxins and plant growth: Univ of California Press; 1955.
 36. Cione E, La Torre C, Cannataro R, Caroleo MC, Plastina P, Gallelli L. Quercetin, Epigallocatechin Gallate, Curcumin, and Resveratrol: From Dietary Sources to Human MicroRNA Modulation. *Molecules*. 2020;25(1):63.
 37. Amor S, Châlons P, Aires V, Delmas D. Polyphenol extracts from red wine and grapevine: Potential effects on cancers. *Diseases*. 2018;6(4):106.
 38. Andres S, Pevny S, Ziegenhagen R, Bakhiya N, Schäfer B, Hirsch-Ernst KI, et al. Safety aspects of the use of quercetin as a dietary supplement. *Molecular nutrition & food research*. 2018;62(1):1700447.
 39. Murota K, Nakamura Y, Uehara M. Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2018;82(4):600-10.
 40. Williams CA, Grayer RJ. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural product reports*. 2004;21(4):539-73.

41. Harborne JB. Flavonoids in the environment: structure-activity relationships. *Plant flavanoids in biology and medicine II*. 1988;17.
42. Rusznyak S, Szent-Gyorgyi A. Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature*. 1936;138.
43. Shafabakhsh R, Asemi Z. Quercetin: a natural compound for ovarian cancer treatment. *Journal of ovarian research*. 2019;12(1):55.
44. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, et al. Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients*. 2016;8(3):167.
45. Neagu V, García BM, Rodríguez AM, Ferrusola CO, Bolaños JG, Fernández LG, et al. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation post thaw. *Theriogenology*. 2011;75(1):10-6.
46. Kono Y, Kobayashi K, Tagawa S, Adachi K, Ueda A, Sawa Y, et al. Antioxidant activity of polyphenolics in diets: rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1997;1335(3):335-42.
47. Chen S, Jiang H, Wu X, Fang J. Therapeutic effects of quercetin on inflammation, obesity, and type 2 diabetes. *Mediators of inflammation*. 2016;2016.
48. Bazzucchi I, Patrizio F, Ceci R, Duranti G, Sgrò P, Sabatini S, et al. The effects of quercetin supplementation on eccentric exercise-induced muscle damage. *Nutrients*. 2019;11(1):205.
49. Gabriele B, Fazio A, Carchedi M, Plastina P. In vitro antioxidant activity of extracts of Sybaris liquorice roots from Southern Italy. *Natural product research*. 2012;26(23):2176-81.
50. Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD. Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Current sports medicine reports*. 2009;8(4):206-13.
51. Scholz. Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols in vivo. *International journal for vitamin and nutrition research*. 2007;77(3):224-35.
52. Costa LG, Garrick JM, Roquè PJ, Pellacani C. Mechanisms of neuroprotection by quercetin: counteracting oxidative stress and more. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016.
53. Kawabata K, Mukai R, Ishisaka A. Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. *Food & function*. 2015;6(5):1399-417.
54. Lamson DW, Brignall M. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*. 2000;5(3):196-208.
55. Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer letters*. 2008;269(2):315-25.
56. Rauf A, Imran M, Khan IA, ur-Rehman M, Gilani SA, Mehmood Z, et al. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. *Phytotherapy research*. 2018;32(11):2109-30.
57. Greenlee H, editor *Natural products for cancer prevention*. Seminars in oncology nursing; 2012: Elsevier.
58. Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, Joshi YC. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy reviews*. 2011;5(9):1.
59. So FV, Guthrie N, Chambers AF, Moussa M, Carroll KK. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. 1996.
60. Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C. The anti-cancer effect of quercetin: Molecular implications in cancer metabolism. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(13):3177.
61. Wu H, Pan L, Gao C, Xu H, Li Y, Zhang L, et al. Quercetin inhibits the proliferation of glycolysis-addicted HCC cells by reducing hexokinase 2 and Akt-mTOR pathway. *Molecules*. 2019;24(10):1993.
62. Pratheeshkumar P, Budhraj A, Son Y-O, Wang X, Zhang Z, Ding S, et al. Quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR-2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways. *PloS one*. 2012;7(10).
63. Carlos-Reyes Á, López-González JS, Meneses-Flores M, Gallardo-Rincón D, Ruíz-García E,

- Marchat LA, et al. Dietary compounds as epigenetic modulating agents in cancer. *Frontiers in Genetics*. 2019;10:79.
64. Shaik Y, Caraffa A, Ronconi G, Lessiani G, Conti P. Impact of polyphenols on mast cells with special emphasis on the effect of quercetin and luteolin. *Central-European journal of immunology*. 2018;43(4):476.
65. Zhang Q, Zhao X-H, Wang Z-J. Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(6):2042-53.
66. Sundaram MK, Ansari MZ, Al Mutery A, Ashraf M, Nasab R, Rai S, et al. Genistein induces alterations of epigenetic modulatory signatures in human cervical cancer cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2018;18(3):412-21.
67. Yoshikura H, Hirokawa Y. Induction of cell replication. *Experimental cell research*. 1968;52(2-3):439-44.
68. Casella ML, Parody JP, Ceballos MP, Quiroga AD, Ronco MT, Francés DE, et al. Quercetin prevents liver carcinogenesis by inducing cell cycle arrest, decreasing cell proliferation and enhancing apoptosis. *Molecular nutrition & food research*. 2014;58(2):289-300.
69. Wang P, Zhang K, Zhang Q, Mei J, Chen C-j, Feng Z-z, et al. Effects of quercetin on the apoptosis of the human gastric carcinoma cells. *Toxicology in Vitro*. 2012;26(2):221-8.
70. Jeong JH, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;106(1):73-82.
71. Cheek DB. The control of cell mass and replication. The DNA unit-a personal 20-year study. *Early human development*. 1985;12(3):211-39.
72. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M, group CRAc. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet*. 2005;366(9499):1784-93.
73. Baghel SS, Shrivastava N, Baghel RS, Agrawal P, Rajput S. A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. *World J Pharm Pharmaceutical Sci*. 2012;1(1):146-60.
74. Cody V. Plant flavonoids in biology and medicine, part II. *Prog Clin Biol Res*. 1988;280:461.
75. Avila MA, Cansado J, Harter KW, Velasco JA, Notario V. Quercetin as a modulator of the cellular neoplastic phenotype. *Dietary Phytochemicals in Cancer Prevention and Treatment*: Springer; 1996. p. 101-10.
76. Khan F, Niaz K, Maqbool F, Ismail Hassan F, Abdollahi M, Venkata N, et al. Molecular targets underlying the anticancer effects of quercetin: an update. *Nutrients*. 2016;8(9):529.
77. Awad HM, Boersma MG, Vervoort J, Rietjens IM. Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide–glutathione adducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000;378(2):224-33.
78. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *nature*. 2000;407(6801):249-57.
79. Bernards R, Weinberg RA. Metastasis genes: a progression puzzle. *Nature*. 2002;418(6900):823-.
80. Chan C-Y, Lien C-H, Lee M-F, Huang C-Y. Quercetin suppresses cellular migration and invasion in human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Biomedicine*. 2016;6(3).
81. Folkman J, editor *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis*. *Seminars in oncology*; 2002: Elsevier.
82. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1420-8.
83. Bielenberg DR, Zetter BR. The contribution of angiogenesis to the process of metastasis. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2015;21(4):267.

84. Cai H, Sale S, Schmid R, Britton RG, Brown K, Steward WP, et al. Flavones as colorectal cancer chemopreventive agents—phenol-O-methylation enhances efficacy. *Cancer prevention research*. 2009;2(8):743-50.
85. Hofmann J, Fiebig HH, Winterhalter BR, Berger DP, Grunicke H. Enhancement of the antiproliferative activity of cis-diamminedichloroplatinum (II) by quercetin. *International journal of cancer*. 1990;45(3):536-9.

ANEXOS

ANEXO A – Normas de submissão da revista *Phytomedicine*.

PREPARATION

Types of manuscript

Original papers

Articles should not exceed **12-15 typewritten pages** or up to **5,000 words**, including references, tables and figures. Previously reported methods should be referenced only. The number of references should not exceed 30 (except for review articles or reports on microarray data).

Short communications

Short communications should be condensed to **4-8 typewritten pages** or not more than **2,500 words** including references and a maximum of two illustrations.

Review articles

Review articles will only be by invitation. Review articles can provide concise and critical updates on a subject of current interest. Herbal drug-monographs are only acceptable if they contain the newest pharmacological and toxicological issues and an outlook on future directions.

Prof. Hildebert Wagner Award

The "Prof. Hildebert Wagner Award" was created to honor the outstanding efforts of Prof. Wagner for the journal *Phytomedicine*. This award will be granted to a graduate student or young post-doctoral researcher who is the first author of a paper reviewed by the Editors of *Phytomedicine* to be the best one in the Journal during the previous calendar year. The prize will be sponsored by Elsevier with EUR 500 for the awardee and a certificate for every Co-Author. Additionally an official notice will be published on the Journal homepage of *Phytomedicine* (<https://www.elsevier.com/locate/phymed>), on which the article will be available free of charge for one year. The reviewing editors for the first contribution to be awarded in *Phytomedicine* will be Prof. Hildebert Wagner himself, Prof. Alexander Panossian, and Prof. Susana Zacchino. To qualify, nominees must be younger than 35 years and an outstanding contribution to the field must be provided. Nominations can be made by first authors (resp. corresponding authors).

