

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS -**  
**FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA**

**QUERCETINA REVERTE O FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS**  
**DROGAS EM LINHAGEM ERITROLEUCÊMICA**

Biol. Maiara Bernardes Marques

Dissertação submetida como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Paula de Souza Votto, do Instituto de Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula de Souza Votto

**RIO GRANDE**

**Março de 2014**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à essa força maior que nos move, nos conduz, nos direciona, que está presente em tudo e todos! É só querer sentir/ouvir/ver...

Agradeço aos meus pais Graça e Nedi, bases de tudo, essa dissertação é dedicada à vocês! Mesmo eles não entendendo muito bem o que eu faço, contribuíram para que eu chegasse até aqui. Obrigada pelo apoio, pelo amor incessante, por sempre confiarem em mim e me fazerem ser quem eu sou. Também agradeço ao meu irmão Matheus, pelo carinho, pelos sorrisos e abraços! Obrigada por me dar café, trazer água para o mate e viver me paparicando. A mana te ama mais que tudo nessa vida!

À Maria e demais funcionários do ICB pela simpatia e carinho todos os dias. À todos professores do Programa de Ciências Fisiológicas por me ajudarem a aprender sobre Fisiologia, dentro ou fora da sala de aula.

Às todos os amigos da salinha 2: Aline, Renatinha, Anahy, Milene, Priscila, Fernanda, Simone, Regina, Robson, Lili, Mauricio, Vinicius, Geny, Michele, Laís, Josi, Camila (as 2), Tábata, Bruna e Marina por me aguentarem na TPM, por me ajudarem em muitos momentos, pelas risadas, pela amizade!

As meninas da Cultura Celular: Aline, Renatinha, Anahy, Milene, Priscila e Michele, por toda ajuda nesses 2 anos, principalmente nessa reta final! Adoro vocês!!

À banca (Gilma e Eduardo) por terem aceitado o meu convite. Tenho certeza que fiz uma ótima escolha, e que vocês acrescentarão muito em meu trabalho.

À Daza, Bia, Márcio, por todo carinho, apoio, ajuda, em todos os momentos desde que entrei no laboratório.

Às minhas amigas da dança, principalmente a Gio, Bruna e Sara, Dani e Mari obrigada pelos momentos em que a gente coloca a sapatilha e vai ser feliz!! Com vocês o momento de descontração é garantido!

Às minhas amigas de Pelotas Thuti, Mari, Livia, Maiarina, Maya, Gabi, Paulinha e minha prima Gabi, por sempre me alegrarem, sempre estarem perto (mesmo longe), por me ajudarem a descontrair, por serem minhas amigas de verdade, desde sempre pra sempre! Amo vocês!

Aos meus outros tantos amigos: Bruno Oliveira, Gisele, Lidi, Bruno Cruz, Cris, Cássia, Yuri e Gustavo por todo carinho, palavra de apoio, abraços, por me fazerem mais feliz e me ajudarem tanto! E também àquelas pessoas que não estão nomeadas aqui, mas tiveram uma importante participação na minha trajetória, na minha vida.

À Dani, Márcio, Fred e Luf por todo apoio na Molecular nessa árdua reta final. Principalmente à Dani, por toda sua atenção, carinho, e disposição. Mesmo grávida, me ajudou até mesmo no Feriado de Carnaval. Sem palavras Dani...

Ao Ronaldo meu parceiro, amigo e amor por me ajudar, acalmar e ter paciência comigo. Nos reencontramos na hora certa, né?! Os dois no fim do mestrado e início do Doutorado! Sorte para nós!!

À Ayane, minha estagiária querida, que me ajuda tanto e vive me alegrando. Obrigada querida por todo apoio, espero poder te retribuir toda ajuda em dobro!! À Jéssica que me acompanhou no primeiro ano do mestrado e me ajudou bastante também. Tenho um carinho enorme por ti querida!

À Aline e a Renatinha, amigas queridas, que vêm me acompanhando há tanto tempo... Obrigada pela paciência, pela ajuda de sempre. Renatinha, obrigada por todos os mates e por ter sido minha amiga de laboratório/casa em quase todo o mestrado. Aline querida, há 6 anos

tenho a felicidade de te ter na minha vida, tenho certeza que essa amizade é para sempre!  
Amo vocês!!

Às Carolinas (Peixoto e Reyes) por terem dividido comigo esse mestrado todo... Desde o ingresso nele, até o final. Vocês são demais! E mesmo que essa vida acadêmica venha a nos distanciar, a nossa amizade nunca vai deixar de existir! Peixoto, obrigada por todas as vezes que tu seguraste minha mão nesses últimos anos, não tenho nem palavras para te agradecer todo o carinho e apoio principalmente nessa reta final e Reyes, obrigada por estar sempre com o brilho no olho me dizendo que tudo vai dar certo, mesmo longe (nos últimos meses) tu te fizeste sempre presente! Amo vocês!!!

À Gilma por ser uma pessoa tão especial nas nossas vidas e ser nosso referencial de profissional. Por estar sempre disponível, por ser essa pessoa tão querida e amada, por ter essa luz tão grande que irradia por toda a parte!! Obrigada por tudo o que tu representaste na minha vida, obrigada por ter me dado a oportunidade de trabalhar no lab. de Cultura há 6 anos atrás!

E por último, e não menos importante, pelo contrário, à Ana, minha orientadora e amiga querida. Sem palavras para enumerar tudo o que eu gostaria de te dizer... Obrigada por me ajudar tanto, por ser essa pessoa tão especial, tão amiga, tão sincera. Obrigada por confiar em mim nesses últimos anos, por me incentivar, me ouvir. És um exemplo pra mim de profissional. Sempre ética, sempre buscando o melhor para todos. Obrigada por ter me ensinar o que é ser uma pesquisadora, por ter me ensinado a pensar, escrever, analisar, tudo! Devo 100% da minha formação à tua pessoa. Meu carinho e amor por ti ultrapassam esses laços materiais... Espero um dia de alguma maneira poder retribuir tudo o que aprendi contigo! Obrigada!!

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>2</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>6</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>7</b>
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>18</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>18</b>
<b>ARTIGO</b> .....	<b>19</b>
Abstract.....	20
1. Introduction .....	20
2. Materials and Methods .....	22
2.1. Cells and culture conditions .....	22
2.2. Assessment of the sensitivity of cells .....	22
2.3. Quantitative analysis of apoptosis and necrosis .....	23
2.4. Capacity of Quercetin to induce DNA damage .....	24
2.5. Intracellular level of reactive oxygen species (ROS) .....	25
2.6. Analysis of P-gp activity .....	25
2.7. Assessment of the MDR phenotype modulation .....	26
2.8. Gene expression.....	26
2.8.1.Total RNA extraction and cDNA synthesis .....	26
2.8.2. RT-PCR relative quantification ABCB1 .....	27
2.9. Statistical analysis .....	28
3. Results .....	28
3.1. Growth-inhibitory and cytotoxicity effects of QUE.....	28
3.2. Detection of apoptosis/necrosis .....	29
3.3. DNA damage .....	30
3.4. Intracellular level of reactive oxygen species (ROS) .....	31
3.5. P-gp activity after exposure to quercetin .....	31
3.6 Assessment of the MDR phenotype modulation .....	32
3.7 Effect of quercetin on MDR1 (ABCB1) gene expression.....	33
4. Discussion.....	34
5. Conflict of Interest.....	37
6. Acknowledgments .....	37
7. References .....	37
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>43</b>

## RESUMO GERAL

A resistência a múltiplas drogas (MDR) é considerada uma das principais causas na falta de sucesso no tratamento do câncer. Neste sentido, alguns compostos de origem natural têm sido estudados com o objetivo de propor tratamentos que ultrapassem o fenótipo MDR. A quercetina é um flavonoide encontrado em vários vegetais que tem sido estudada por seus usos terapêuticos como antioxidante e anticancerígeno, entre outros. Assim, o objetivo geral deste projeto foi comparar a sensibilidade de linhagens celulares tumorais humanas, com (K562-Lucena) e sem (K562) o fenótipo MDR à quercetina, bem como verificar os processos celulares envolvidos nos possíveis efeitos deste composto. Foi analisada a viabilidade celular através da técnica exclusão por azul de tripan, após exposição à quercetina, a capacidade da quercetina de induzir morte celular por apoptose ou necrose utilizando microscópio de epifluorescência, sua capacidade de produzir estresse oxidativo quantificado pelo fluorímetro, provocar dano de DNA pela técnica cometa, assim como os efeitos na atividade da P-gp pelo teste rhodamina-123 e expressão do gene MDR1 através de PCR em tempo real, que codifica esta proteína. Os resultados obtidos mostram que a quercetina foi capaz de inibir a proliferação e modificar a viabilidade celular de maneira concentração e tempo dependentes, em ambas as linhagens celulares, independente do fenótipo MDR. A quercetina induziu morte celular por apoptose e necrose, causou dano de DNA, aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em ambas as linhagens, além de inibir a atividade da P-gp e aumentar a expressão do gene MDR1. Esses resultados permitem atribuir um possível papel anti-MDR da quercetina.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

### **Células, câncer e leucemia**

As células são as unidades fundamentais dos seres vivos, gerenciam uma série de funções para se manterem vivas, e em consequência disso, mantêm a sobrevivência do organismo como um todo. Existe toda uma rede de sinalização que controla o crescimento, reprodução, diferenciação e sobrevivência destas células. Quando uma célula passa a se reproduzir desobedecendo aos limites normais de divisão celular e começam a invadir e colonizar outros tecidos temos o que denominamos de câncer (ALBERTS et al., 2010). Uma célula tumoral pode apresentar características como a perda da capacidade de formar estruturas funcionais, acúmulo de mutações, deficiência nos mecanismos de reparo, e ainda resistência à morte (Hanahan e Weinberg 2011).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA 2014), o câncer engloba um conjunto de mais de 100 tipos de doenças. No relatório de dezembro de 2013 da World Health Organization (WHO 2013), somente em 2012, 14.100 milhões de novos casos foram detectados no mundo, com cerca de 8.200 milhões de mortes. Diante do exposto, fica evidente que o câncer é um dos maiores problemas de saúde pública do mundo.

Apesar de os dados apresentados serem alarmantes, se sabe da possibilidade de cura do tumor quando o mesmo é tratado nas fases iniciais de desenvolvimento (iniciação e promoção). Por outro lado, quando o tumor atinge a fase de progressão e, mais especificamente, quando há formação de metástases, a probabilidade de cura é muito diminuída (Contran et al., 2000).

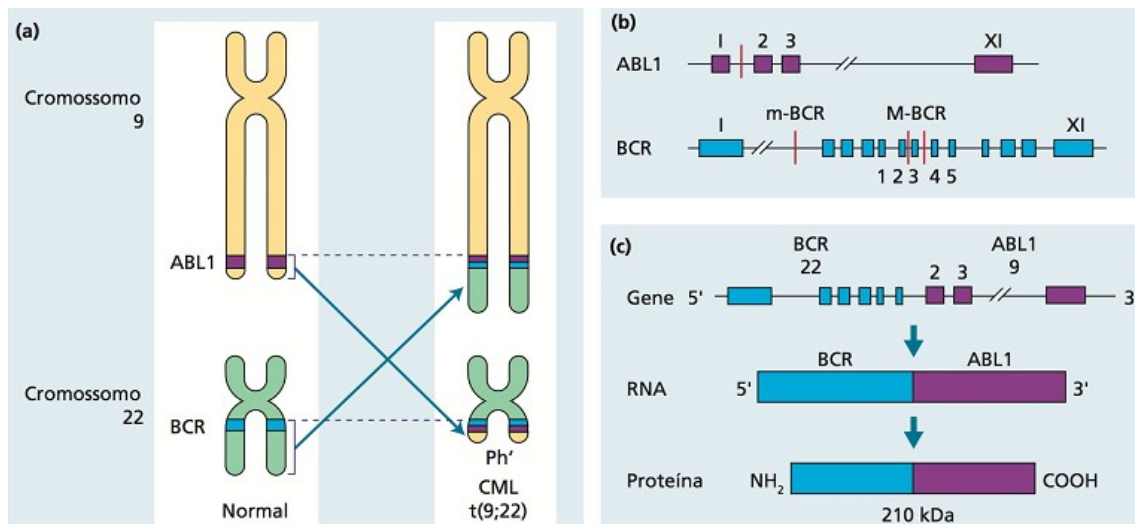
Células do sistema hematopoiético realizam uma variedade de funções para manterem a homeostase e sobrevivência dos organismos, assim como os outros tipos celulares. No entanto, estas células exibem certas características que as tornam completamente diferentes dos outros tipos celulares conhecidos, como a baixa sobrevivência quando ativas, a multiplicidade dos tipos celulares e a enorme dispersão destas em todo o corpo. A hematopoiese, processo de contínua formação das células sanguíneas, ocorre na medula óssea, através de células tronco hematopoiéticas. Entretanto, o organismo pode perder a capacidade de manutenção deste processo contínuo e homeostático, desencadeando um processo leucemogênico, e entre todos os tipos de câncer conhecidos, aqui neste trabalho, destacamos então a leucemia (Failace et. al 2009, Hoffbrand e Moss 2012).

A leucemia é uma desordem das células sanguíneas, caracterizada pela proliferação neoplásica do sistema hematopoiético, podendo ser tanto das células precursoras mieloides quanto das linfoides. Como já mencionado anteriormente, a medula óssea é o local de formação das células sanguíneas e estas ocupam o interior da cavidade dos ossos como vértebras, costelas, fêmur entre outros (Failace et al.,2009; Hoffbrand e Moss., 2012). A principal característica da leucemia é o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais. Esta modificação compromete a medula óssea, por modificar o microambiente indutivo, resultando na liberação das células malignas para circulação. A estimativa no país de novos casos de leucemias é de 8.510 a cada ano, sendo 4.570 novos casos para homens e 3.940 para mulheres (INCA 2014).

As leucemias são classificadas em quatro tipos: leucemias agudas e crônicas, que por sua vez, se subdividem em mieloides e linfoides. Nas leucemias agudas, a proliferação faz-se a partir de células primitivas da mielopoese ou de precursores linfoides, e em geral são doenças agressivas com rápida progressão, nas quais a transformação maligna ocorre em células tronco da hematopoiese ou em progenitores primitivos. Esses progenitores primitivos são chamados de blastos. Na leucemia crônica a característica é a proliferação de células em estágios mais maduros e a doença tem a progressão mais lenta. Sua incidência acomete geralmente adultos e idosos, com média 53 anos de idade, mas todos os grupos etários podem ser atingidos (Failace et al.,2009, Hoffbrand e Moss., 2012).

Destacaremos neste trabalho a Leucemia Mielóide Crônica (LMC). O diagnóstico deste tipo de leucemia é baseado principalmente na detecção do cromossomo Philadelphia. Essa anormalidade foi descrita pela primeira vez como cromossomo curto em 1960 por Nowell e Hungerford. Depois houve a identificação de uma translocação, de acordo com Rowley (1973). Essa leucemia é caracterizada por uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22  $t(9,22)(q34;q11)$ , parte do cromossomo 9 denominado ABL1 é transferido para o gene BCR do cromossomo 22. O cromossomo 22 anormal resultante é denominado cromossomo Philadelphia (Ph1). Na translocação anormal Ph1, éxons 5' do BCR são fundidos no éxon 3' do ABL1. O gene quimérico BCR-ABL1 resultante codifica uma proteína tirosina quinase aumentada, levando à desregulação proliferativa excessiva em relação ao seu produto normal, descontrolando completamente o ciclo celular destas células leucêmicas. Na Figura 1 temos a representação do cromossomo Ph1, bem como da translocação resultante e da proteína quimérica formada através dessa mutação.





**Figura 1:** (a) Há translocação do braço de parte do braço longo do cromossomo 22 para o braço longo do cromossomo 9 e translocação recíproca de parte do braço longo do cromossomo 9 para o cromossomo 22 (cromossomo Ph). Essa translocação traz a maior parte do gene ABL para a região BCR do cromossomo 22. (b) Figura mostrando os pontos de ruptura (traço vermelho) dos genes BCR e ABL nos seus respectivos éxons (c) Isso resulta em uma proteína de fusão de 210 kDa (Hoffbrand and Moss, 2012).

A fim de se ter um modelo biológico de estudo para este tipo de leucemia mieloide crônica, em 1975 Lozzio e Lozzio estabeleceram a linhagem celular denominada K562. Essa linhagem é uma eritroleucemia humana, caracterizada por uma proliferação sistêmica, progressiva e simultânea de células imaturas e atípicas de linhagens eritrocitária e/ou granulocitária, que apresentam mieloblastos como tipo celular precursor. A linhagem K562 tem a característica de ser sensível à quimioterapia e por esse motivo é amplamente usada como modelo de estudo para o desenvolvimento de fármacos. Nesse sentido as plantas têm sido bastante utilizadas e estudadas para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.

### Flavonoides, quercetina e seus diversos efeitos

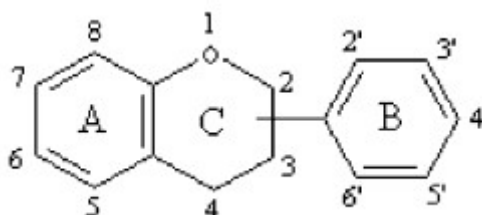
Nos últimos anos têm intensificado as pesquisas por novos quimioterápicos que eliminem ou freiem a proliferação de células tumorais, mas que ao mesmo tempo não sejam tóxicos às células normais. Como aliado nessa busca, encontramos nas plantas, importante material biológico de estudo. As plantas têm uma longa história no tratamento do câncer. O uso de plantas medicinais foi talvez uma das primeiras manifestações da humanidade em relação à busca de meios que pudessem aliviar suas dores e enfermidades. Desde os tempos pré-históricos, o homem emprega preparações derivadas de plantas utilizadas da flora, como suprimento de necessidades básicas como alimentação, cura de doenças, moradia, proteção e

transporte (Pachú, 2003). Em alguns países, remédios de ervas tradicionais são frequentemente usados junto com agentes quimioterápicos, e um extenso programa de triagem para identificar plantas medicinais que possam restaurar a sensibilidade de células tumorais a drogas anticâncer vem sendo realizado (Fong et al., 2007; Wang et al., 2012).

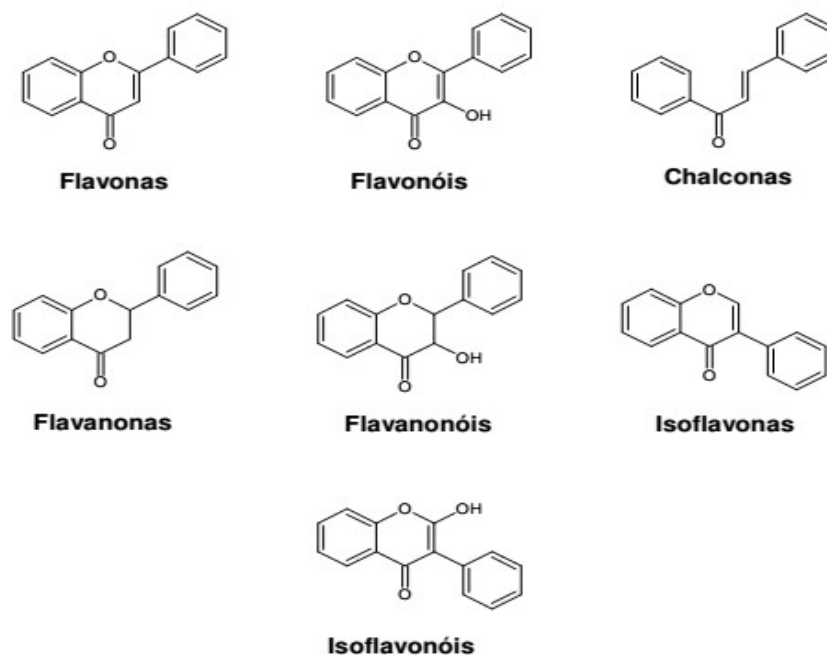
Nesse sentido, a busca por novos fármacos que atuem na quimioprevenção de tumores é uma importante linha de pesquisa que vêm sendo cada vez mais explorada. Quimioprevenção se refere ao uso de agentes que inibem, revertem ou retardam o processo tumorogênico. Muitos fitoquímicos, que são uma classe de compostos heterogêneos incluindo vitaminas e polifenóis presentes em plantas, vêm sendo relatados na literatura por interferir diretamente no processo carcinogênico (Simões et al., 2004), fato que ajuda explicar a diversidade de efeitos relatados.

Dentre estes compostos naturais de grande destaque, nas pesquisas no Brasil e no mundo, encontram-se os flavonoides. Esses fitoquímicos são metabólitos secundários de plantas vasculares, como angiospermas e gimnospermas. Eles respondem à luz, protegendo as plantas contra danos UV, controlam os níveis de auxinas, que são reguladores do crescimento e diferenciação da planta (Harbore, 1986). Eles são sintetizados a partir da via fenilpropanoides, no qual, constituem uma classe importante de polifenóis. Polifenóis são substâncias caracterizadas por possuírem uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático. Existe uma diversidade estrutural grande entre os flavonoides e isso se deve ao fato deste grupo sofrer muitas modificações químicas como hidroxilação, acetilação, metilação, glicosilação ente outros (Simões et al., 2004).

Flavonoides de uma maneira geral são formados por 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental ligado a um oxigênio e conectados por dois anéis benzênicos uma estrutura em cadeia de três carbonos (três anéis A, B e C). Dois anéis benzênicos (A e B), os quais são conectados por um anel pirênico (C) contendo oxigênio -figura 2 (Erlund et al.,2004).



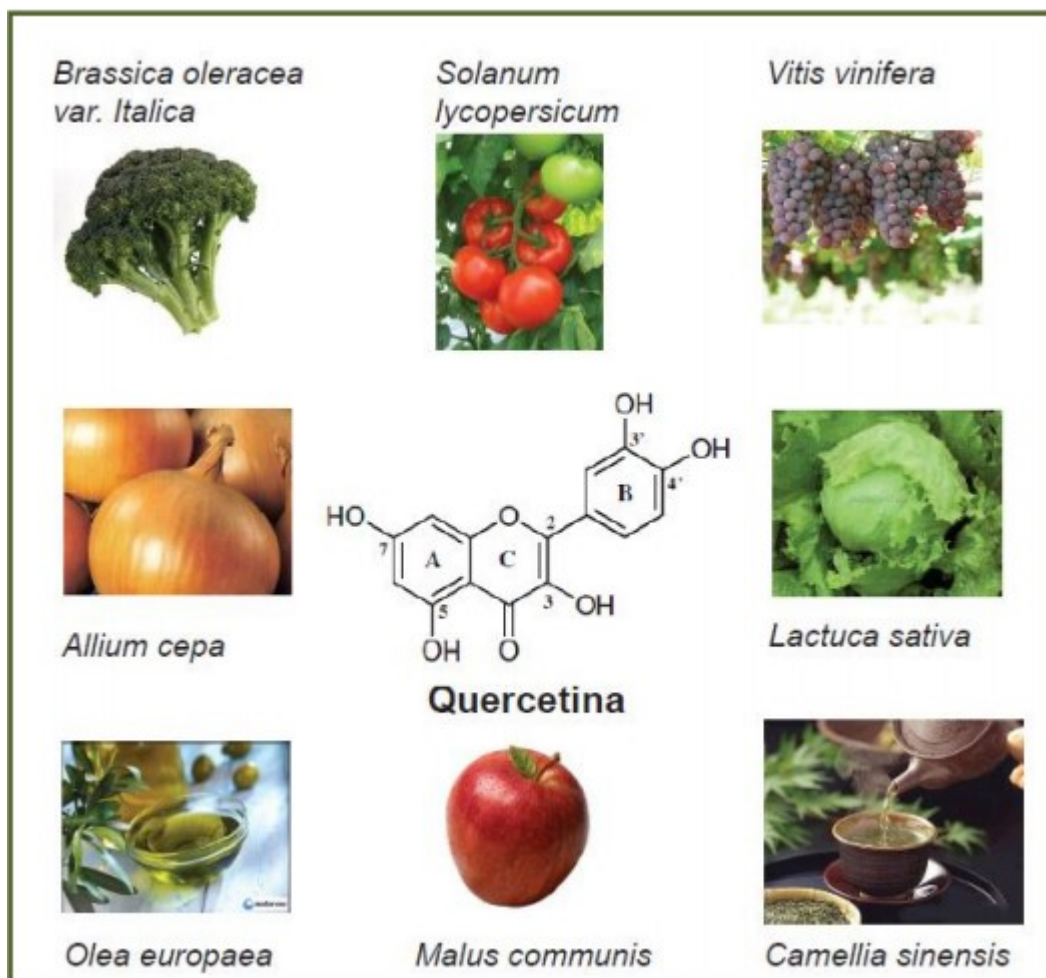
**Figura 1-** estrutura básica de um flavonoide (Erlund et al., 2004)



**Figura 2:** Diferentes classes e estruturas químicas dos flavonoides (Herreiras., 2009)

Os flavonoides possuem muitas atividades biológicas e farmacológicas que atuam sobre diferentes sistemas. Muitas dessas atividades atuam de forma benéfica para a saúde humana, e por isso, estes compostos têm recebido muita atenção. Pode-se inferir que os seres humanos ingerem muitas gramas de flavonoides por dia (Simões et al., 2004). Atualmente, já foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonoides (Peterson e Dwyer., 1998). Dentre as atividades sobre os sistemas biológicas descritas até o presente momento, os efeitos destacados é a capacidade antioxidante, atividade contra o desenvolvimento de tumores, atividades anti-inflamatória e de efeito vasodilatador, atuação antiplaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais (Robaszkiewicz et al., 2007; Votto et al., 2010; Kleemann et al., 2011; Paolillo et al., 2011; Trapa et al., 2012). Os efeitos preventivos do câncer também são atribuídos a vários mecanismos antioxidantes, característica bem estudada dos flavonoides (Shih et al., 2000; Moon et al., 2006; Ishisaka et al., 2011; Wang et al., 2012 ; Zhang et al., 2012). Estes estão presentes em diversos vegetais, frutas, cereais, chás e em alguns corantes alimentares (An et al., 2010). Um dos alimentos amplamente consumidos, a cebola tem sido caracterizada por pela presença do flavonol quercetina e seus derivados (Prakash et. al, 2007; Bonaccorsi et al, 2008, Votto et al., 2010).

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) é uma das principais moléculas pertencentes ao grupo dos flavonoides, cuja característica principal é pertencer à subclasse dos flavonóis. A característica principal desta classe é apresentar três anéis A-C-B com um esqueleto difenilpropano (C-6-C-3-C-6) como mostrado na figura 3. A quercetina possui uma hidroxila na posição C-3, e isso difere em cada grupo de flavonoide. Os anéis são derivados do metabolismo da glicose (Simões et al, 2004). Como já dito, a quercetina está presente em muitos alimentos, e por ser um flavonoide integrante da nossa dieta comum se sugere que ela seja tolerada pelo metabolismo, apresentando tenha baixa toxicidade. Hertog e colaboradores publicaram em 1992 um trabalho onde os alimentos que possuem maior concentração de quercetina são: cebola (284 - 486 mg/kg), brócolis (30 mg/kg), tomate (8 mg/kg), alface (14 mg/kg), chá verde (10 - 25 mg/L), maçã (21 - 72 mg/kg), vinho tinto (13 - 16  $\mu$ M), suco de uva (23 - 30  $\mu$ M), azeite de oliva, frutas vermelhas, alcaparras, entre outras, representam as principais fontes de quercetina na dieta humana, conforme ilustrado na Figura 3. Ainda neste contexto, um estudo sobre a farmacocinética da quercetina em pacientes com câncer mostrou que esta foi bem tolerada (Ferry et al., 1996) e em 1999 a IARC (The International Agency for Research on Cancer) concluiu que a quercetina não é classificada como carcinogênica para os humanos (Okamoto., 2005).

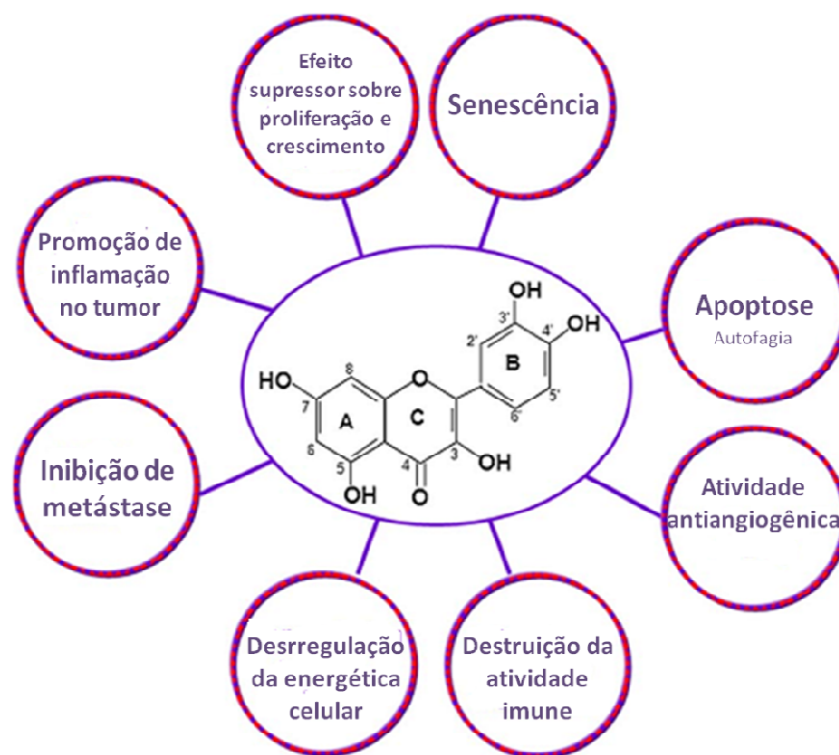


**Figura 3-** Principais alimentos contendo quercetina (Pachú et al., 2003)

Na natureza a quercetina é encontrada principalmente na forma de glicosídeo, onde ao menos um grupo hidroxila é substituído por vários tipos de açúcares. Quanto maior a quantidade de grupos açúcares conjugados, maior a solubilidade em água. Um dos motivos da quercetina ser um dos principais flavonoides estudados é pelo fato de ela ser altamente biodisponibilizada no organismo. A quercetina é metabolizada em diferentes órgãos como intestino delgado, cólon, fígado e rim. Depois de metabolizada ela se torna biodisponível (Holman et al., 1995).

Os fotoquímicos de uma maneira geral vêm atraindo o interesse dos cientistas através da variedade dos compostos disponíveis para testes. Há mais de 10.000 fitoquímicos potencialmente disponíveis na natureza. Através de seu importante potencial agente anticâncer, a quercetina tem atraído muita atenção.. Estudos vêm sendo realizados sobre a atividade quimioterápica e anti-genotóxica da quercetina. O câncer é uma doença

multifatorial, altamente variável para cada tipo de tumor. Em 2000 Hanahan e Weinberg publicaram ‘Hallmarks of câncer’, mostrando neste trabalho, algumas das principais características do câncer encontradas em diferentes tipos de cânceres. Muitos são os trabalhos publicados sobre quercetina que podem colaborar com o estudo do câncer; a seguir uma figura que ilustra alguns destes (Figura 4).



**Figura 4-** Contribuições da quercetina para as marcas do câncer, adaptado de Hanahan e Weinberg (2000). Estrutura molecular da quercetina.

A proliferação de células normais é altamente regulada. Fatores de crescimento e receptores transmembrânicos são recrutados para ativar diversas vias de sinalização (Hanahan and Weinberg, 2000). A desregulação de algum, ou defeitos em um ou mais de um deles, podem levar a célula a um descontrole do ciclo celular e assim uma proliferação excessiva, levando a formação de tumor. A quercetina inibe o crescimento e proliferação *in vitro* em mais de um tipo de câncer, por exemplo, lipossarcoma (Huang, et al., 2006) e carcinoma gástrico (Wang et al., 2012). A quercetina atua em genes que regulam diretamente o ciclo celular, estimulando ou inibindo o crescimento das células. Muitos mecanismos vêm sendo propostos para explicar o efeito da quercetina no ciclo celular e o

que se têm observado é que a quercetina bloqueia a mudança do ciclo celular da fase G1 para a S em células tumorais, etapa crítica na divisão celular (Yoshida et al., 1990, Vidya et al., 2010).

Outro mecanismo muito estudado é a apoptose, ou morte celular programada. Por as células cancerosas serem resistentes a esse mecanismo de morte celular, ele é um dos mais importantes e estudados. A apoptose é controlada por duas vias: a intrínseca e a extrínseca. Na via extrínseca ou via de receptores de morte, moléculas sinalizadoras se ligam a receptores de morte celular na superfície da membrana. Os ligantes mais conhecidos são o Fas (ligante Fas), Trail (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF) e TNF (fator de necrose tumoral). Já a via intrínseca é ativada quando ocorre algum dano ao DNA. A família de genes Bcl-2 é quem controla a via intrínseca. Ela é dividida em 2 grupos de proteínas as anti-apoptóticas representadas principalmente pela própria Bcl-2 e as pró-apoptóticas, representadas pelas proteínas Bax e BaK. Todas estas proteínas atuam como moduladoras da permeabilidade da membrana mitocondrial (Elmore S., 2007; Riedl and Y., 2004).

Nesse sentido, a quercetina diminui a proporção de Bcl-2/Bax com o aumento da expressão de caspase-3 demonstrando que a quercetina induz a apoptose em células tumorais de carcinoma gástrico (Wang et al., 2012). Em outro estudo a quercetina protegeu a linhagem de neurônios humanos (SH-SY5Y), expostas a concentrações de peróxido de hidrogênio, por inibir a ativação de caspases que levam a fragmentação de DNA (Suematsu et al., 2011). Huang e colaboradores em 2006 também verificaram alterações em genes que induzem a apoptose em linhagens de liposarcoma humano (SW 872) através da verificação de perda no potencial mitocondrial, com ativação de caspase-3, aumento da expressão de Bax e diminuição na expressão de Bcl-2. Em um estudo em modelo vivo, a quercetina inibiu significativamente a apoptose através da modulação da proporção de Bax para Bcl-2 e suprimiu a expressão de caspase-3 no fígado de ratos tratados com chumbo (Liu et al., 2010).

### **Quercetina e o fenótipo MDR**

Nas últimas décadas, considerável atenção tem sido dedicada a pesquisas por novos compostos que ultrapassem o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR). O fenótipo MDR é considerado a principal causa de falta de sucesso no tratamento do câncer. Este fenótipo é oriundo de um fenômeno pelo qual tumores que inicialmente respondem a determinados quimioterápicos, adquirem resistência a drogas que podem ser ou não

quimicamente relacionadas (Gottesman e Pastan., 1993). O êxito terapêutico é comprometido quando os tumores adquirem esse fenótipo MDR. O fenômeno MDR possui características que ainda não se encontram bem definidas e têm sido sugerido como a maior causa da falta de êxito na quimioterapia de diversos tipos de câncer (Gottesman e Pastan., 1993; Fernandes et al., 2005; Gottesman e Ling., 2006; Ferguson et al., 2009).

Apesar do processo de resistência ser multifatorial, o fenótipo MDR apresenta algumas características principais como resistência a drogas não relacionadas (Kartner e Ling., 1989; Tiirikainen e Krusius., 1991), extrusão do corante rodamina (Neyfakh., 1988), alterações de citoesqueleto, com mudanças na distribuição de microtúbulos (Erokhina et al., 1997 e Votto et al., 2007) e superexpressão de proteínas como a glicoproteína P (P-gp/ABCB1) (Gottesman e Pastan., 1993; Klappe, et. al, 2009; Marques et al., 2010). Desta forma, embora vários fatores possam levar ao fenótipo MDR, a superexpressão da P-gp, um transportador da família das ATPases, super família ABC (ATP binding cassette), de cerca de 170 KDa, codificado pelo gene MDR1/ABCB1 (Ford e Hait., 1990; Gottesman e Pastan., 1993; Uchiumi et al., 1993; Sonneveld e Wiemer., 1997) é o mecanismo melhor estudado (Ford e Hait., 1990, Lopes et al., 2003, Ambudkar et al., 2006). A superexpressão de P-gp e o efluxo ativo de drogas resulta na acumulação reduzida da droga anticâncer e efetividade terapêutica em células tumorais MDR (Patil et al, 2009). Além das células neoplásicas, uma variedade de tecidos humanos normais expressam diferentes níveis desta glicoproteína (Schinkel., 1997).

Na pesquisa de células MDR, Rumjanek et al., (1994; 2001) estabeleceram um modelo *in vitro*, utilizando vincristina (VCR) para selecionar uma linhagem eritroleucêmica originalmente sensível à quimioterapia a manifestar o fenótipo de resistência a múltiplas drogas e, com isso, permitir um estudo experimental de células MDR. A essa linhagem MDR foi dado o nome K562-Lucena-1 (Lucena) para distinguir de sua linhagem parental K562 (Maia et al., 1996a, 1996b, Marques-Silva et al., 1996).

Dentre os tratamentos bastante utilizados para a LMC destaca-se o Imatinib®, um composto desenvolvido para um alvo específico (inibidor competitivo do sítio de ATP do receptor tirosina- cinase BCR/ABL) como um dos quimioterápicos mais bem sucedidos até o presente momento para o tratamento deste tipo de leucemia. No entanto, dados recentemente publicados por Silva e colaboradores (2013) mostram que a linhagem celular Lucena-1 apresenta resistência a esse quimioterápico, e por essa razão, justifica-se a busca por um fármaco que ultrapasse o fenótipo MDR desta linhagem celular.



Sendo assim, a busca por drogas anticâncer que não sejam substratos de bombas de efluxo superando o fenótipo MDR é de alta prioridade (Peer e Margalit, 2006). Neste sentido, Chung e colaboradores (2005), sugerem que a quercetina pode atuar como inibidora de bombas de efluxo em células da linhagem MCF-7 resistentes a adriamicina, e outro estudo evidenciou que a quercetina possui atividade inibitória no crescimento de células da linhagem celular leucêmica HL-60 e de células resistentes MDR oriundas da mesma linhagem (Kang e Liang, 1997).

Diante do embasamento exposto, tendo em vista que produtos naturais do grupo dos flavonoides compostos de origem natural podem ter uma interação com células leucêmicas e alterar a atividade da P-gp este trabalho realizou a comparação entre a sensibilidade de linhagens que expressam, ou não expressam (K562), o fenótipo MDR à quercetina, o efeito de diferentes concentrações deste composto, bem como a verificação dos possíveis mecanismos de ação da quercetina como sua capacidade de induzir morte celular por apoptose ou necrose, capacidade de produzir danos ao DNA, sua possível capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio, efeitos na atividade da P-gp, bem como, a expressão do gene relacionado ao fenótipo MDR (MDR-1).

## **OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste estudo visa comparar a sensibilidade de linhagens celulares tumorais humanas, com e sem o fenótipo MDR à quercetina, assim como verificar os processos celulares envolvidos nos possíveis efeitos deste composto.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a sensibilidade de linhagens com e sem fenótipo MDR, a diferentes concentrações de quercetina, a fim de construir uma curva dose-resposta.

- Avaliar a capacidade da quercetina em induzir apoptose e/ou necrose em linhagens sensíveis (K562) e resistentes (Lucena-1) a múltiplas drogas;

- Verificar a capacidade da quercetina em causar dano ao DNA em linhagens sensíveis (K562) e resistentes (Lucena-1) a múltiplas drogas;

- Verificar a capacidade da quercetina em gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) em linhagens sensíveis (K562) e resistentes (Lucena-1) a múltiplas drogas;

- Avaliar o possível efeito da quercetina na atividade da P-gp na linhagem MDR;

- Avaliar a expressão do gene MDR-1 na linhagem celular sensível (K562) e resistente a múltiplas drogas (Lucena-1) expostas a quercetina.

## ARTIGO

Artigo a ser submetido à Food and Chemical Toxicology journal

### **Anti-MDR effect of quercetin in chronic myeloid leukemia (CML) cells**

Maiara Bernardes Marques<sup>1,2</sup>, Michele Carrett-Dias<sup>1,2</sup>, Daniela Volcan Almeida<sup>1,2</sup>, Priscila Antiqueira Santos<sup>1,2</sup>, Ayane Pontes Machado<sup>2</sup>, Flavio M. R. da Silva Júnior<sup>2</sup>, Daza M. V. B. Filgueira<sup>2</sup>, Luis Fernando Marins<sup>1,2</sup>, Ana Paula S. Votto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada, FURG, Rio Grande - RS, Brazil.

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande - RS, Brazil.

Corresponding author: Ana Paula de Souza Votto

Phone/Fax: +55 53 32935192/ + 55 53 32336848

E –mail adress: [anavotto@yahoo.com.br](mailto:anavotto@yahoo.com.br)

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brazil

Zip Code: 96203-900

Rio Grande, RS, Brazil

## Abstract

The multidrug resistance (MDR) is considered the main cause of the lack of success in cancer treatment. Therefore, some natural compounds have been studied to propose treatments which overcome the mechanisms of drug resistance. In this sense, the aim of this work was to analyze the effect of Quercetin (QUE), a flavonol studied as a potential anticancer agent, in MDR chronic myeloid leukemia cells (Lucena-1) and its K562 (non-MDR) parental cell line. Our studied demonstrate that QUE exerted antiproliferative and cytotoxic effect on cells, both apoptosis and necrosis, DNA damage, increased ROS production, P-gp inhibition and induction MDR1 gene expression. Results obtained suggest that the effects in cell viability were caused by P-gp activity inhibition and mainly by DNA damage. Thus, it is plausible to suggest an anti-MDR effect of QUE in this model of MDR human leukemia.

**KEYWORDS:** quercetin; leukemia cell; MDR phenotype; P-gp; gene expression

**ABBREVIATIONS:** quercetin (QUE); multidrug resistance (MDR); myeloid leukemia (CML); P-glycoprotein (P-gp); phosphate buffered saline (PBS); rhodamine 123 (Rho 123); vincristine (VCR); reactive oxygen species (ROS).

### 1. Introduction

In the last decades, considerable attention has been dedicated to the search for new approaches to overcome the mechanisms of drug resistance. The multidrug resistance (MDR) is considered the main cause of the lack of success in cancer treatment. In this sense, some natural compounds have been studied to propose treatments effective against tumors. The best understood MDR mechanism is conferred by the overexpression of Pgp, which

belongs to the ABC-ATPase superfamily and acts by pumping out a number of unrelated drugs from the cell interior. This glycoprotein is encoded by the MDR1/ABCB1 gene (Gottesman and Pastan 1993; Ford and Hait 1990; Uchiumi et al. 1993; Ambudkar et al. 2006). In tumor cells, an increased efflux of drugs by up-regulated ABC transporters is observed upon prolonged drug medication (Klappe et al. 2009). The result is, inevitably, a reduced accumulation of the anticancer drug and sub-optimal therapeutic effectiveness in drug-resistant tumor cells (Patil et al. 2009).

Rumjanek et al. (1994, 2001) have established a leukemic multidrug resistance (MDR) cell line, named K562-Lucena (Lucena), which was obtained after selection by progressively higher concentrations of the antimitotic drug vincristine (VCR), being an important biologic model to study compounds anti-MDR. This cell line was obtained from K562 cell line, chronic myeloid leukemia (CML), probably the most extensively studied human malignancy (Deininger et al. 2000). The first CML cell line was derived from the selective culturing of Ph<sup>+</sup> retaining myeloblastic cells from a CML patient. This cell line, known as K562, proliferates rapidly but retains the ability to differentiate within myeloid lineage maturation pathways (Lozzio and Lozzio 1975). Therefore, to search for anticancer drugs that are not substrates for resistance pumps or that can overcome the MDR phenotype it is a high priority (Peer and Margalit, 2006).

Among them, quercetin has been reported to significantly inhibit the function of Pgp in the adriamycin resistant cell line MCF-7 (Chung et al. 2005). Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) (QUE) is one of the main molecules belonging to the flavonoid group. Present largely foods consumed of in the world like vegetables, fruits and tea, it's suggested that low concentrations quercetin is not toxic to non-tumor cells (Ferry et al., 1996). Through its significant potencial, its rol as an anticancer agent, quercetin has been attracting attention. Quercetin effects are multi-targeted. It presents a wide range of

biological activities including antiproliferative action against several human cancer cell, induction of apoptosis and/or necrosis, DNA damage, anti- and pro-oxidative effects (Borska et al. 2012; Wang et al. 2012; Suematsu et al. 2011 and Robaszekiewicz et al. 2007).

Therefore, the aim of this work was to analyze the effect of QUE in MDR chronic myeloid leukemia cells and its non-MDR parental cell line as well as investigating possible cell process involved in this effect.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cells and culture conditions

The tumor cells were obtained from the Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brasil. The K562 cells were grown in RPMI 1640 (Sigma) medium supplemented with sodium bicarbonate (2.0 g/l) (Vetec), L-glutamine (0.3 g/l) (Vetec), Hepes (25 mM) (Acros), with 10% fetal bovine serum (Gibco), plus 1% antibiotic (penicillin 100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (Gibco) and antimycotic (0.25 µg/ml) (Sigma), in disposable plastic flasks, at 37°C in the atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The MDR Lucena cells were grown under the same conditions, but in the presence of 60 nM vincristine (VCR) (Sigma), in order to preserve the MDR phenotype.

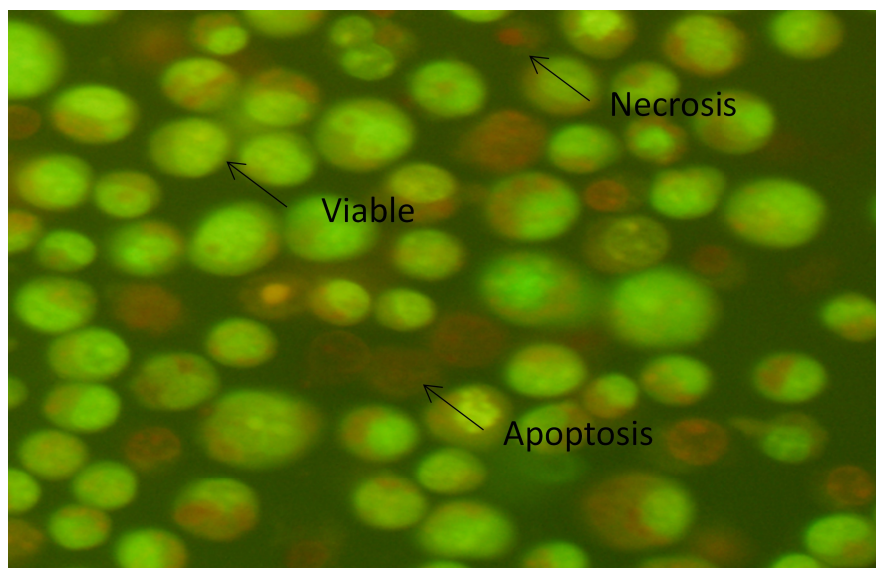
### 2.2 Assessment of the sensitivity of cells

Cells were grown for two days (K562) and for three days (Lucena) before the beginning of experiments (Trindade et al., 1999). Both cells were centrifuged, washed with phosphate buffered saline (Ca<sup>+2</sup> and Mg<sup>+2</sup> free) (PBS) and suspended in medium without β-mercaptoethanol to a final concentration of 2,5x10<sup>5</sup> cells/ml. Cells were treated in media

with different concentrations (5, 10, 50, 100, and 500 µg/ml) of quercetina (QUE - Sigma Aldrich). Control groups received the same volume of sterile water, and were incubated at 37° C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in 96 well culture plates. During the experiments, no VCR was added to Lucena cell cultures. Cell viability was assessed by trypan blue (Gibco) 0,08% exclusion immediately, 24 h, 48 h and 72 h after incubation with QUE. This assay was used to distinguish between proliferation inhibition and cytotoxicity, since the majority of the tests only permit to observe the number of viable cells.

### 2.3 Quantitative analysis of apoptosis and necrosis

For detection of apoptosis and necrosis both cell lines ( $2,5 \times 10^5$ ) was treated with 10 and 50 µg/ml of QUE and incubated at 37° C in the atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for 48 h. After, cells were centrifuged and washed with PSB. The evaluation of apoptosis and necrosis was realized according to Ribble et al. (2005) with the addition of 2 µL of a solution 1:1 of acridine orange (AO) and ethidium bromide (EB), composed by PBS, 100 µg/mL of AO and 100µg/mL of EB, at each well of the plate. Analysis was performed from areas captured from the well plate (40 x) with epifluorescence microscope (Olympus IX81). All cells were analyzed and the data were expressed in percentage related to total cells number visualized on the captured area. The cells were classified according Kosmider et al (2004) modified, as following: those evincing yellow-orange fluorescence cytoplasm and green nucleus were considered viable cells; those presenting orange nucleus with fragmented chromatin were considered apoptotic. Those cells with uniformly orange-stained nucleus were considered necrotic.



**Figure 1:** Cells treated with QUE showing viable cells, apoptosis or necrosis captured by fluorescence microscopy

#### 2.4 Capacity of Quercetin to induce DNA damage

K562 and Lucena cells ( $5 \times 10^5$  cell/ml) were treated in medium with 10 and 50  $\mu\text{g/ml}$  of QUE and incubated at  $37^\circ\text{C}$  in the atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  for 24 h. DNA damage was evaluated by the alkaline single cell electrophoresis (comet) assay, performed as described Singh et al. (1988) and Steinert et al. (1998), with some modifications. An aliquot (80  $\mu\text{l}$ ) of cell suspension of each sample ( $5 \times 10^5$  cell/ml) was mixed with 60  $\mu\text{l}$  of 1% low melting point agarose and added to fully frozen slides which had been covered with a layer of 1.5% normal melting point agarose. Following the solidification of the new layer, cells on the slides were lysed with (2.5 M NaOH, 0.1 M EDTA, 0.01 M Tris, 1% Triton X-100, and 10% dimethyl sulfoxide, pH 10) overnight at  $4^\circ\text{C}$ . Subsequently, samples were placed in the electrophoresis solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13) for 30 min to allow DNA unwinding. Then, electrophoresis was performed for 25 min at 25 V and 280 mA. Finally, the slides were neutralized with 0.4 M Tris buffer (pH 7.5), stained with 30  $\mu\text{L}$  of Syber Gold (1:10,000; Molecular Probes) and analyzed using a fluorescence microscope



(Olympus BX50) connected to a CCD camera (Pro-Series, High Performance) and coupled to commercial software for image acquisition. A total of 50 nuclei were randomly selected and photographed on each slide. The nuclei were analyzed by Image\_J software and DNA damage was represented by tail moment. DNA strand breaks were expressed as a percent the tail moment (% tail DNA x tail length).

## 2.5. Assessment of intracellular level of reactive oxygen species (ROS)

K562 and Lucena cells ( $5 \times 10^5$  cell/ml) were treated in medium with 10 and 50  $\mu\text{g/ml}$  of QUE and incubated at 37° C in the atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> during 24 h. Then cells were washed with PBS (two times) and incubated for 30 min at 37° C with the fluorogenic compound 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) at a final concentration of 40  $\mu\text{M}$ . After the loading with H<sub>2</sub>DCF-DA, the cells were washed with PBS two times and then suspended in fresh PBS. Aliquots of 160  $\mu\text{l}$  of each sample (five replicates) were placed into an ELISA plate and the fluorescence intensity was determined during 90 min at 37°C, using a fluorimeter (Victor 2, Perkin Elmer), with an excitation and emission wavelength of 485 and 520 nm, respectively. ROS levels were expressed in terms of fluorescence area, after fitting fluorescence data to a second order polynomial and integrating between 0 and 90 min in order to obtain its area.

## 2.6. Analysis of P-gp activity

The accumulation of rhodamine 123 (Rho 123) (Sigma) was measured in the Lucena cells, as a method to evaluate P-gp activity. The Lucena cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were treated in medium with 10 and 50  $\mu\text{g/ml}$  of QUE and incubated at 37°C for 24 h. After the treatment, the cells were washed with PBS and fresh medium was added containing 300

ng/ml of Rho 123. Following this, cells were incubated for 60 min at 37° C in the atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, washed twice in PBS and left to extrude the dye in dye-free medium for another 60 min at 37°C. Cells were then washed twice and suspended in PBS. Rho 123 accumulation was measured using a fluorimeter, with an excitation and emission wavelength of 485 and 590 nm, respectively. The K562 cells were utilized as positive controls for Rho 123 fluorescence.

## 2.7. Assessment of the MDR phenotype modulation

To evaluate the MDR phenotype modulation cells Lucena were incubated for 72 h with QUE (10 µg/ml) in the presence of 5 µM of verapamil (VP). A positive control was utilized using VCR (60 nM) and VP. Cell viability was assessed by was assessed by trypan blue (Gibco) exclusion immediately, 24h, 48h and 72h after of incubation with.

## 2.8. Gene expression

### 2.8.1. Total RNA extraction and cDNA synthesis

The K562 and Lucena cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were treated with 10 and 50 g/ml of QUE and incubated at 37°C in the atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. After the treatment the cells were washed with PBS twice and four wells of each treatment were pooled and suspended in 1 ml to form each sample ( $2 \times 10^6$  cells/ml), then total RNA was extracted according to the protocol of the manufacturer of TRIzol Reagent (Invitrogen, Brazil). Total RNA was treated with DNase-free<sup>TM</sup> Kit (Applied Biosystems, Brazil). RNA integrity was confirmed by electrophoresis in 1.5% agarose gel with 0.5 µg/mL ethidium bromide. The RNA was reverse transcribed to cDNA (complementary DNA) following the protocol of the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Brazil). The cDNA

was quantified by fluorometry in a Qubit<sup>TM</sup> fluorimeter (Invitrogen, Brazil) using the QuantiT<sup>TM</sup> ssDNA Assay Kit (Invitrogen, Brazil).

### 2.8.2. RT-PCR relative quantification of ABCB1

The gene expression analysis was performed using Real-time PCR System 7500 equipment (Applied Biosystems, Brazil). PCR reactions were carried out using Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Super Mix – UDG (Invitrogen, Brazil) and diluted cDNA (1:5) from K562 or Lucena cells. The gene-specific primers used at this stage were designed based upon the human ABCB1 gene sequence (accession number NM000927.4) available at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The primer sequences are the following: forward ABCB1 (MDR1) (5'-TCCTCAGTCAAGTTCAGAGTCTTCA-3'), reverse ABCB1 (MDR1) (5'-TCTCCACTTGATGATGTCTCTCACT-3'). Quantitative real-time PCRs with cDNA serial dilutions was performed for all primers in order to test reaction efficiency.

To calculate the mean normalized expression of the target genes, the geNorm VBA applet for Microsoft Excel was used to calculate a normalization factor based on two reference genes (Vandesompele et al. 2002). Beta-actin ( $\beta$ -actin: accession number NM001101.3) and Elogation factor 1 alpha (EF1a: accession number NM001402.5) were selected as reference genes in this experiment. The primer sequences are the following  $\beta$ -actin: forward 5'-CCACCCCACTTCTCTCTAAGGA-3', reverse: 5'-ACCTCCCCTGTGTGGACTTG-3'; and EF1a: forward 5'-GCCAGTGGAACCACGCTGCT-3', reverse: 5'-ATCCTGGAGAGGCAGGCGCA-3'.

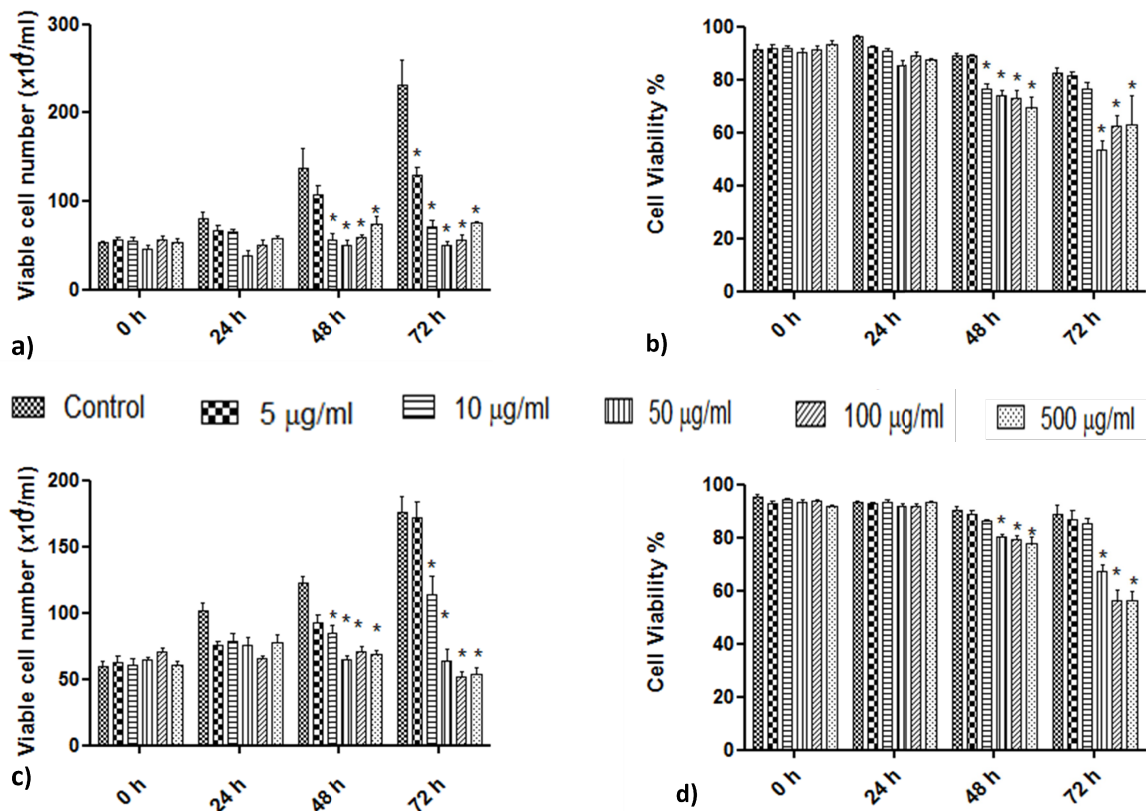
## 2.9. Statistical analysis

In all cases, three independent experiments were performed using triplicates in each condition. Data are expressed as mean + standard error and analyzed with one way or two way ANOVA followed by Tukey's range test. Significance level was fixed at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Growth-inhibitory and cytotoxicity effects of QUE

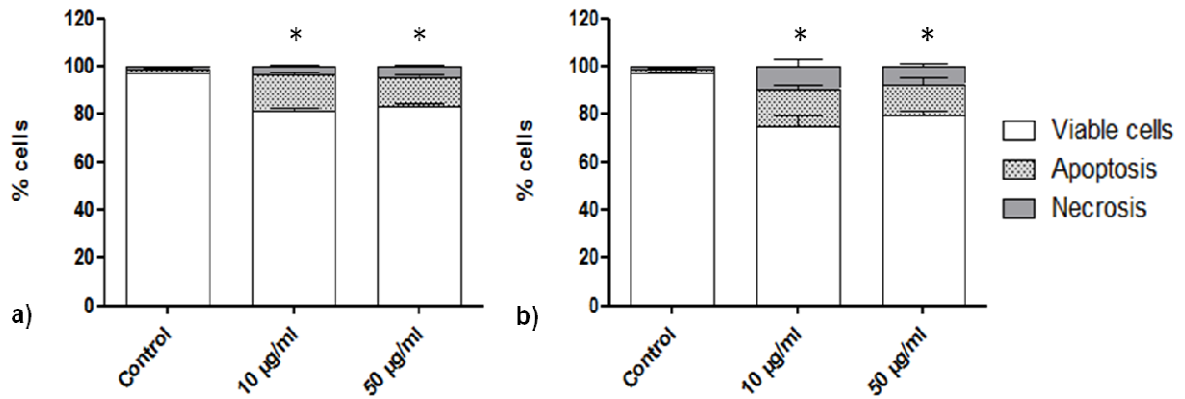
It is very important to highlight that similar results were observed in both cell lines. Quercetin inhibited cell proliferation and caused cytotoxicity in a concentration-dependent manner. In the K562 cell line the lowest concentration of QUE (5  $\mu\text{g/mL}$ ) inhibited cell proliferation as indicated by a decrease in the viable cell number when compared to control, after 72 h of exposure without decrease of cellular viability. On the other hand, concerning Lucena cell lines an inhibition of proliferation was observed for concentrations above 10  $\mu\text{g/mL}$  with decrease of viable cell number when compared to control already in 48h of exposure. The concentration of 10  $\mu\text{g/mL}$  was cytotoxic for K562 cells after 48 hours of exposure as indicated by the decrease in the viable cell number and viability in relation to control. The concentrations of 50, 100 and 500  $\mu\text{g/mL}$  showed cytotoxic effect after 48 hours of exposure on K562 and Lucena cells as indicated by the decrease in the viable cells number and cell viability when compared respect to the control (Figure 2).



**Figure 2:** Viable cell number (A) and viability (%) of K562 (non MDR phenotype) cells (B); viable cell number (C) and viability (%) Lucena (MDR phenotype) cells (D) assessed by trypan blue exclusion test. Through that technique it is possible to analyze whether there is inhibition of cell proliferation and/or effect cytotoxic, immediately (0), 24, 48 and 72 h after exposure to different concentrations of QUE. Data are expressed as mean + standard error. \* - indicates significant difference from the respective control at each exposure time ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Detection of apoptosis/necrosis

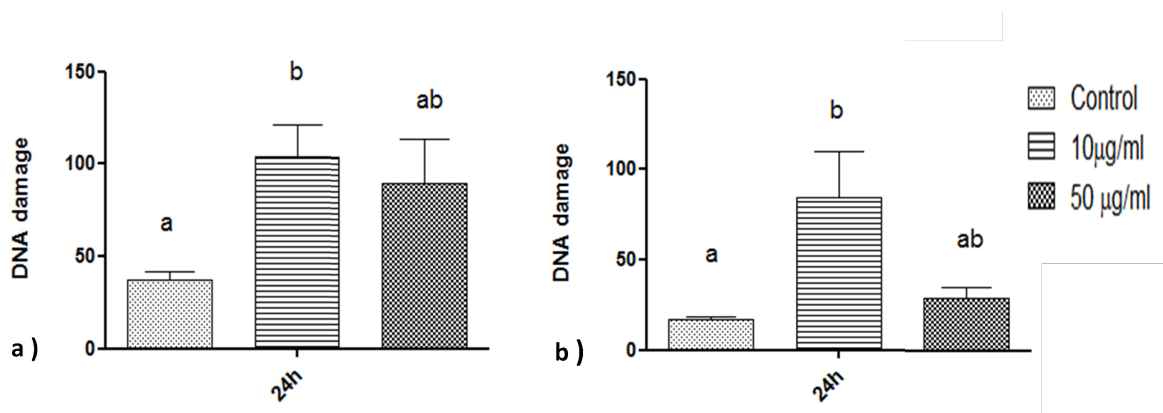
The both cell lines underwent apoptotic and/or necrotic in both treatments QUE (Figure 3).



**Figure 3:** Percentage of viable, apoptotic and necrotic K562 cells (a) and Lucena (b) 48h after treatment with 10 and 50 µg/ml of QUE from the visual field captured by a fluorescence microscope. Data shown are the mean ± standard error. \* - indicates significant difference in relation to control for viable, apoptotic and necrotic cells (  $p < 0.05$ ).

### 3.3. DNA damage

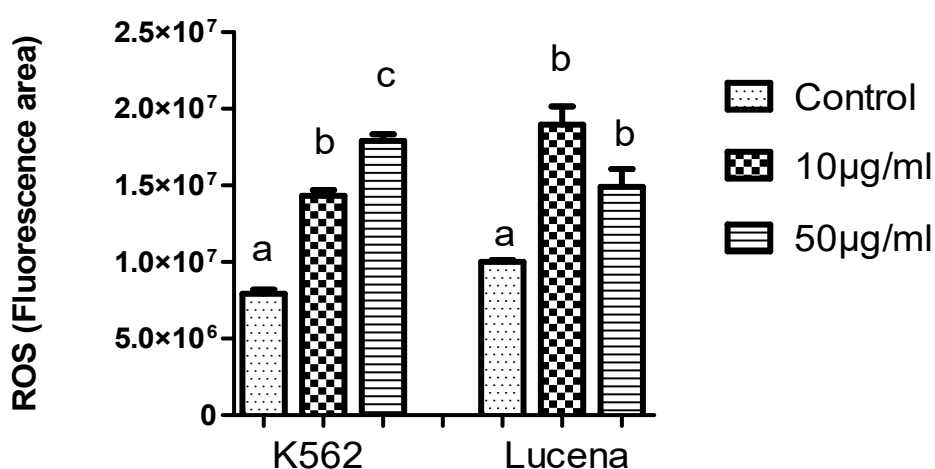
Both cell lines exhibited significant DNA damage at a concentration of 10 µg/ml of QUE when compared to respective controls. In contrast, no significant DNA damage was observed at a concentration of 50µg/ml (Figure 4).



**Figure 4:** DNA damage. Quantification of DNA damage expressed by tail moment values in K562 (a) and Lucena (b) cell lines exposed for 24 h to 10 and 50  $\mu\text{g/ml}$  QUE. Data are expressed as mean + standard error. \* - indicates significant difference from the respective control ( $p < 0.05$ ).

### 3.4. Intracellular level of reactive oxygen species (ROS)

A significant increased in ROS level was verified in both cell lines at a concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$  and 50  $\mu\text{g/ml}$  in relation to respective controls (Figure 5).

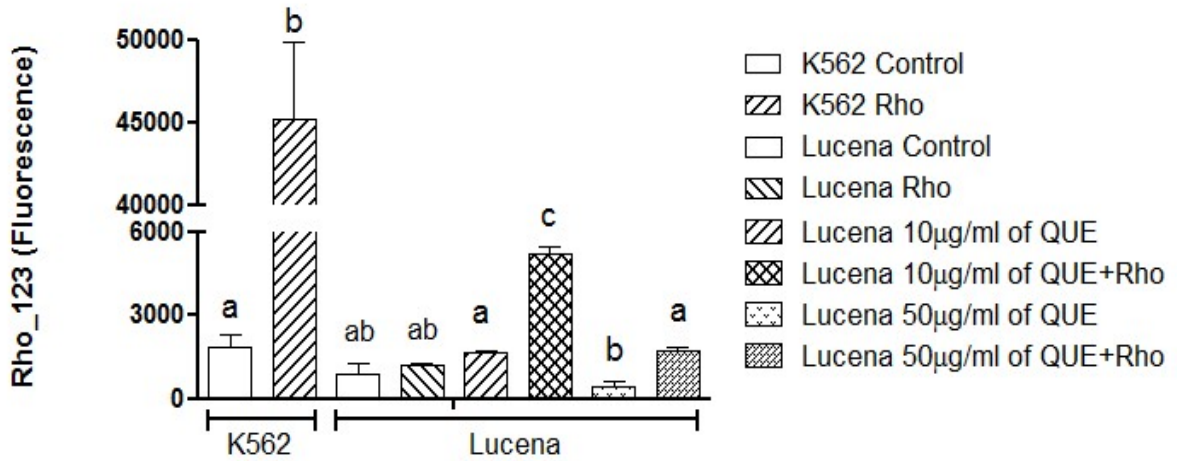


**Figure 5.** Intracellular level of reactive oxygen species (ROS) production in K562 and Lucena cells exposed for 24h at 10 and 50  $\mu\text{g/ml}$  of QUE. Data are expressed as mean + standard error. Different letters indicate significant difference at each cell line ( $p < 0.05$ ).

### 3.5. P-gp activity after exposure to quercetin

K562 cells incubated with Rho 123 showed a significant increase in fluorescence in relation to control without the dye. Lucena cells incubated only with Rho 123 or QUE (10 and 50  $\mu\text{g/ml}$ ) did not show significant differences in relation to basal fluorescence of these cells. Lucena cells treated with 10  $\mu\text{g/ml}$  of QUE +Rho 123 show significant fluorescence increase in relation to the cells treated only with 10  $\mu\text{g/ml}$  of QUE. The cell treated with 50

µg/ml of QUE and with 50 µg/ml of QUE + Rho 123 no exhibited difference significant in relation of control (Figure 6).

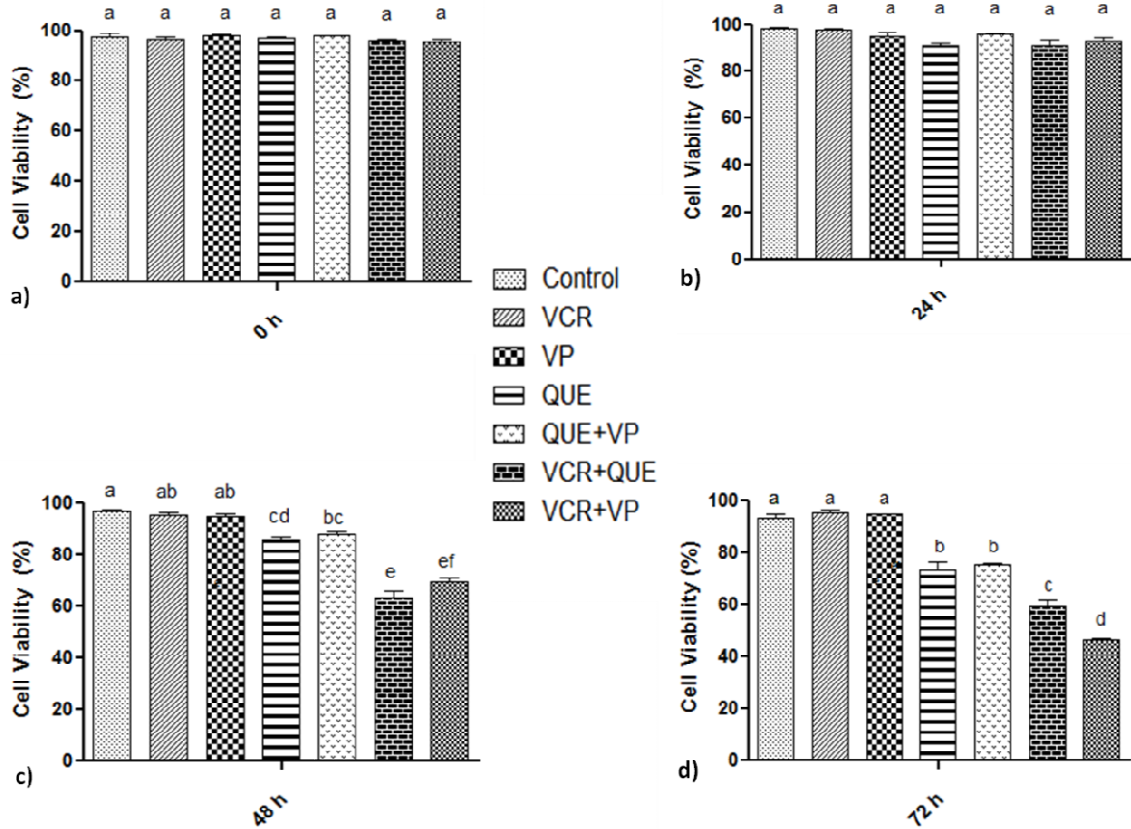


**Figure 6:** Rho 123 fluorescence of untreated K562 cells (a) and Lucena cells (b) incubated with 10 and 50 µg/ml of QUE with or without Rho 123 for 24 h. Data are expressed as mean + standard error. Different letters indicate significant difference at each cell line ( $p < 0.05$ ).

### 3.6 Assessment of the MDR phenotype modulation

When cells were treated with VCR or VP alone, there was no decrease in cell viability after 72 h of exposure compared to control. However, the treatment with QUE + VCR significantly decreased the cell viability compared to 48h of exposure with QUE. But when cells were treated with QUE + VP no significant reduction in cell viability was verified in relation to treatment with QUE (Figure 7).

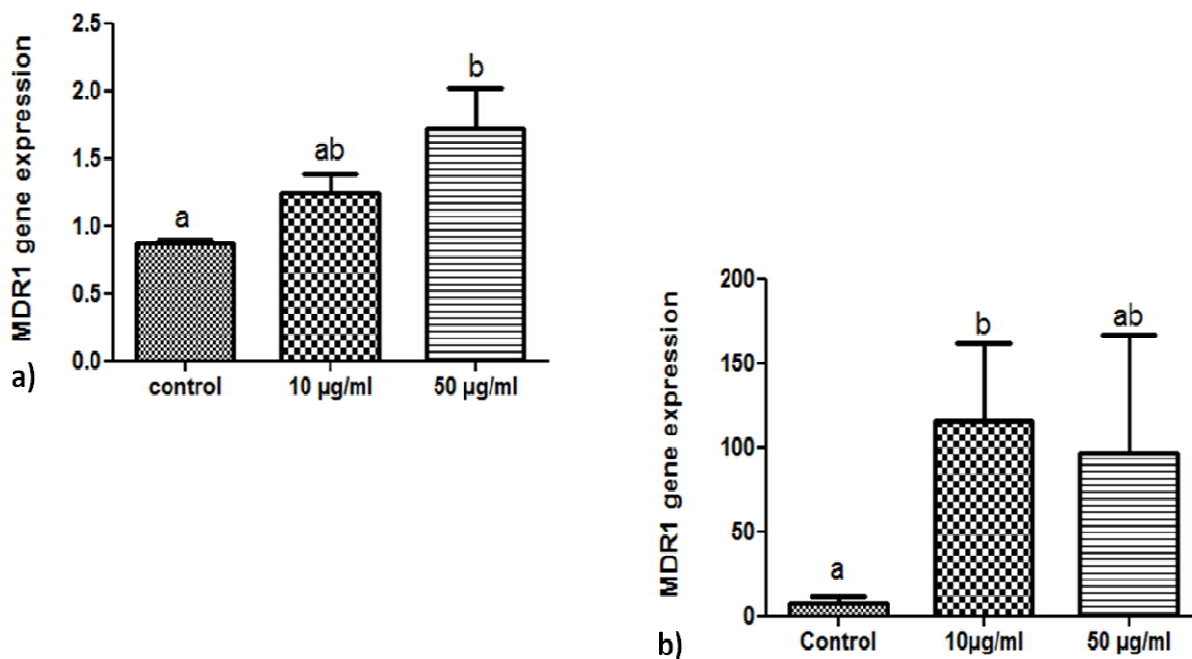




**Figure 7:** Cellular viability (%) of Lucena cells (MDR phenotype) by trypan blue exclusion (A) immediately (0), (B) 24, (C) 48 and (D) 72 h after exposure to QUE (10 µg/ml) in the presence of 5 µM of Verapamil (+VP), and 60 nM of Vincristin (VCR). Data are expressed as mean + standard error. Different letters indicate significant difference between the treatments at each exposure time ( $p < 0.05$ ).

### 3.7 Effect of quercetin on MDR1 (ABCB1) gene expression

The results of MDR1 gene expression showed that 50 µg/ml of QUE induced the expression of this gene in K562 cells. For the cell line Lucena, the concentration of 10 µg/ml significantly increased the expression of the MDR1 gene (Figure 8).



**Figure 8:** Relative gene expression of MDR1 in K562 (non MDR – a) and Lucena (MDR - b) cell lines exposed for 24 h to 10 and 50 µg/ml of QUE. Data are expressed as mean + standard error. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

It is well known that phenolic compounds, like quercetin found in several fruits and vegetables, exert various biological effects, consequently, many studies have been performed to elucidate its action mechanisms. In this work was verified that quercetin inhibited cell proliferation and induced cytotoxicity as function of time and concentration-dependent manner studied in both cell lines, regardless of MDR phenotype. Knowing that drug resistance is a major obstacle to advances in cancer chemotherapy, the identification of new substances with anti-MDR properties is urgently required (Fernandes et al. 2003), making this result very important.

Similar studies observed the same antiproliferative effect when gastric carcinoma cells in concentration of 12 $\mu$ M after 72h exposed to QUE (Borska et al. 2012), on human myelogenous leukemia (K562) cells and their derivative adriamycin-resistant (K562/ADM), in QUE concentration of 20  $\mu$ M the identical antiproliferative effect was verified for Ikegawa et al. (2002). Another study using leukemic cell lines also elucidated growth-inhibitory activity of quercetin in concentration of 10  $\mu$ M exposed to QUE on HL-60 cells and cells derived from the same lineage that acquired the phenotype of multidrug resistance (Kang e Liang 1997).

Huang et al. (2005) verified growth-inhibitory and apoptotic effects in SW 872 human liposarcoma cells when exposed to quercetin. Lee et al. (2006) demonstrated that quercetin increases DNA fragmentation in dose-dependent manner and induces apoptosis in human lymphoma cell line, in concentration of 20  $\mu$ g/ml. These results corroborate our study, since both cell lines underwent cell death for apoptotic and/or necrotic, at two concentrations tested (10 and 50  $\mu$ g/ml) (Figure 3) with subsequent DNA damage. Interestingly, this effect was similar in both cell lines, thus reducing the importance the disregarding MDR phenotype (Figure 4). In this sense, other authors also verified that these cell lines present similar sensitivity to treatments that have DNA as preferential cellular target (Trindade et al., 1999; Trindade et al., 2000; Votto et al., 2010). Other possible route for apoptosis induction acts through increased production of mitochondrial ROS induced by quercetin, to gastric carcinoma cells leading apoptosis (Wang et al., 2011). According to Boots et al. (2007) quercetin can exert a prooxidant role, indicating that to ROS production lead to apoptotic cell-death by mitochondrial pathway. Inhibition of growth and apoptosis due ROS production was also verified for Zhang et al. (2012). In agreement with these findings, a significant increase in ROS levels was verified in both cell lines, suggesting their potential involvement on cellular death. This is an intriguing result since usually the cell line

Lucena is resistance to oxidizing agents due its higher basal antioxidant capacity (Trindade et al., 1999; Votto et al., 2007 and 2010). Other question to consider is whether the cytotoxic effect observed in Lucena cells after QUE treatment is possible because QUE is not P-gp substrate or due to a decrease of P-gp efflux capacity, or even by reduction of MDR1 gene expression. Our Rho 123 tests results demonstrated that Lucena cells treated with QUE +Rho 123 showed significant fluorescence increase in relation to cells treated only with QUE, indicating that P-gp pumping capacity was impaired (Figure 6). Also, when the cells were treated with QUE +VCR cell viability was lower when compared to those exposed to QUE for 48h, which was not observed when cells were treated with QUE + VP (Figure 7). Therefore it is possible to suggest the inhibition of P-gp activity by quercetin. Chung et al. (2005) showed inhibition of efflux pumps by quercetin on adriamycin-resistant MCF-7 cell lines. According to Ikegawa et al. (2002) flavonoid-derived compounds such as quercetin, are shown more potent than typical P-gp inhibitors, like cyclosporine A and verapamil.

When evaluating the effect of quercetin on gene expression MDR1 (ABCB1), both cells line showed an increased expression of gene, however the lineage MDR this expression starts in 10µg/ml (Figure 8). This increase may be an attempt to compensate for Pg-p inactivity, increasing MDR1 gene to encode more proteins. This compensatory mechanism has been frequently observed among different genes working on the same cellular mechanism. For example, Lin et al. (2003) studying the expression of MRP1 and MDR1 genes in immortalized mouse embryonic fibroblasts, suggested the existence of a compensatory mechanism by which the loss of one transporter can be functionally compensate by another in the transport of common drug substrates. However, a loss of protein function can increase transcription of its own gene as a compensatory effect as well.

Finally, according to results obtained in this work, it was possible to demonstrate that quercetin exerted antiproliferative effect and cell death by apoptosis and necrosis on studied independent of the MDR phenotype, possibly through DNA damage. As an interactive effect, QUE was shown to inhibit P-gp activity, which could lead to a new approach in chemo treatment. This conclusion permits to suggest an anti-MDR action of QUE, which is quite relevant due the search for compounds with this property.

## 5. Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## 6. Acknowledgments

This work was supported by the Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada (FURG) and we also thank the Brazilian agency CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior). We are thankful to Anahy Fazio and Milene Medeiros for help on manuscript. We would like to thank Vivian M. Rumjanek e ao Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) for providing us the cells line.

## 7. References

- Ambudkar S.V., Kim I.W., Sauna Z.E., 2006. The power of the pump: Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur J Pharm Sci* 27, 92-400
- Boots A.W., Li H., Schins R.P., Duffin R., Heemskerk J.W., Bast A., Haenen G.R., 2007. The quercetin paradox. *Toxicol Appl Pharmacol* 222, 89–96

- Borska S., Chmielewska M., Wysocka T., Drag-Zalesinska M., Zabel M., Dziegiel P., 2012. In vitro effect of quercetin on human gastric carcinoma: targeting cancer cells death and MDR. *Food Chem Toxicol* 50, 3375–83
- Chung S.Y., Sung M.K., Kim N.H., Jang J.O., Go E.J., Lee H.J., 2005. Inhibition of P-glycoprotein by natural products in human breast cancer cells. *Arch Pharm Res* 28,823–828
- Deininger M.W.N., Goldman J.M. and Melo J.V., 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96, 3343-3356
- Fernandes J., Castilho R.O., da Costa M.R., Wagner-Souza K., Kaplan M.A.C. and Gattass C.R., 2003. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. *Cancer Lett.* 190, 165-169
- Ford J.M., Hait W.N., 1990. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev* 42, 155-199
- Ferry D.R., Smith A., Malkhandi J., Fyfe D.W., deTakats P.G., Anderson D., Baker J., Kerr D.J., 1996. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 4, 659-68
- Gottesman M.M. and Pastan I., 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62, 385-427
- Huang S.L., Hsu C.L., Yen G.C., 2006. Growth inhibitory effect of quercetin on SW 872 human liposarcoma cells . *Life Sci* 79, 203–209
- Ikegawa T., Ohtani H., Koyabu N., Juichi M., Iwase Y., Ito C., Furukawa H., Naito M., Tsuruo T., Sawada, Y., 2002. Inhibition of P-glycoprotein by flavonoid derivatives in adriamycin-resistant human myelogenous leukemia (K562/ADM) cells. *Cancer Lett* 177, 89–93
- Kang T.B., Liang N.C., 1997. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 54, 1013-1018
- Klappe K., Hummel I., Hoekstra D., Kok J.W., 2009. Lipid dependence of ABC transporter localization and function. *Chem Phys Lipids* 161, 57-64

- Konca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowskab H., Kuszewski T., Gozdz S., Koza Z., Wojcik A., 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat Res* 534, 15-20
- Kosmider B., Zyner E., Osiecka R., Ochocki J., 2004. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt (II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. *Mutat Res* 563, 61-70
- Lee T.J., Kim O.H., Kim Y.H., Lim J.H., Kim S., Park J.W., Kwon T.K., 2006. Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. *Cancer Lett* 240, 234–242
- Lin Z.P., Johnson D.R., Finch R.A., Belinsky M.G., Kruh G.D., Sartorelli A.C., 2003. Comparative study of the importance of multidrug resistance associated protein 1 and P-glycoprotein to drug sensitivity in immortalized mouse embryonic fibroblasts. *Mol Cancer Ther* 1, 1105-1114
- Lozzio C.B., Lozzio B.B., 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334
- Patil Y., Sadhukha T., Ma L., Panyam J., 2009. Nanoparticle-mediated simultaneous and targeted delivery of paclitaxel and tariquidar overcomes tumor drug resistance. *J Control Release* 136, 21-29
- Peer D., Margalit R., 2006. Fluoxetine and reversal of multidrug resistance. *Cancer Lett* 237, 180-187
- Ribble D., Goldstein N.B., Norris D.A., Shellman Y.G., 2005. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol* 10, 5-12
- Robaszekiewicz A., Balcerczyk A., Bartosz G., 2007. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int* 31, 1245-1250
- Rumjanek V.M., Lucena M., Campos M.M., Marques-Silva V.M., Maia R.C., 1994. Multidrug resistance in leukemias: the problem and some approaches to its circumvention. *Cienc Cult* 46, 63-69

Rumjanek V.M., Trindade G.S., Wagner-Souza K., Meletti-de-Oliveira M.C., Marques-Santos L.F., Maia R.C., Capella M.A.M., 2001. Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *Acad Bras Cien* 73, 57-69

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Scheider E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191

Steinert S.A., Streib-Montee R., Leather J.M., 1998. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat Res* 399, 65-85

Suematsu N., Hosoda M., Fujimori K., 2011. Protective effects of quercetin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 504, 223-7

Trindade G.S., Capella M.A.M., Capella L.S., Affonso-Mitidier O.R., Rumjanek V.M., 1999. Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. *Photochem Photobiol* 69, 694-699

Trindade G.S., Farias S.L.A., Rumjanek V.M., Capella M.A.M., 2000. Methylene blue reverts multidrug resistance: sensitivity of multidrug resistant cells to this dye and its photodynamic action. *Cancer Lett* 14, 161-167

Uchiumi T., Kohno K., Tanimura H., Matsuo K., Sato S., Uchida Y., Kuwano M., 1993. Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ* 4, 147-157

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCT data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 18, 3-7

Votto A.P.S., Renon V.P., Yunes J.S., Rumjanek V.M., Capella M.A.M., Neto V.M., Sampaio F.M., Geracitano L.A., Monserrat J.M., Trindade G.S., 2007. Sensitivity to microcystins: A comparative study in human cell lines with and without multidrug resistance phenotype. *Cell Biol Int* 11, 1359-66



Votto A.P.S., Domingues B.S., Souza M.M., Silva Júnior F.M.R., Caldas S.S., Filgueira D.M.V.B., Primel E.G., Vallochi A.L., Furlong E.B., Trindade G.S., 2010. Toxicity mechanisms of onion (*Allium cepa*) extracts and compounds in multidrug resistant erythroleukemic cell line. *Biol Res.* Feb 43,429-37

Wang P., Zhang K., Zhang Q., Mei J., Chen C.J., Feng Z.Z., Yu D.H., 2012. Effects of quercetin on the apoptosis of the human gastric carcinoma cells. *Toxicol in Vitro* 26, 221–228

Zhang H., Zhang M., Yu L., Zhao Y., He N., Yang X., 2012. Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 50, 1589–1599

## CONCLUSÕES GERAIS

- A Quercetina demonstrou efeitos de inibição de proliferação e citotoxicidade de maneira concentração e tempo dependentes nas linhagens celulares K562 (não-MDR) e Lucena (MDR), desconsiderando o fenótipo MDR;
- A QUE causou morte celular por apoptose e necrose em ambas linhagens celulares;
- A QUE causou um aumento na produção de ROS em ambas linhagens celulares;
- A QUE causou dano de DNA em ambas linhagens celulares;
- A QUE inibiu a atividade da P-gp na linhagem celular Lucena;
- A QUE aumentou a expressão relativa do gene MDR1 em ambas linhagens celulares;
- A sensibilidade de ambas as linhagens celulares, desconsiderando o fenótipo MDR, pode ter sido causada por dano de DNA e inibição da P-gp.
- É possível sugerir que a QUE possui um efeito Anti-MDR.

## REFERÊNCIAS

- Alberts B. et al., 2010. *Biologia Molecular da Célula*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed. 1205.p.
- Ambudkar S.V., Kim I.W., Sauna Z.E., 2006. The power of the pump: Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur J Pharm Sci* 27, 92-400
- An D., Zhang Q., Wu S., Wei J., Yang J., Dong F., Yan X., Guo C., 2010. Changes of metabolic profiles in urine after oral administration of quercetin in rats. *Food Chem Toxicol* 48, 1521-7
- Bonaccorsi P., Caristi C., Gargiulli C., Leuzzi U., 2008. Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC–DAD–ESI–MS–MS, *J. Food Chemistry* 107, 1668-1673
- Braga F., Ayres-Saraiva D., Gattass C.R., Capella M.A., 2007. Oleanolic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1 (P-glycoprotein): Possible use in cancer chemotherapy. *Cancer Lett* 248, 147-52
- Chang H.S., Yamato O., Yamasaki M., Ko M., Maede Y., 2005. Growth inhibitory effect of alk(en)yl Thiosulfates derived from onion and garlic in human immortalized and tumor cell lines. *Cancer Lett* 223, 47-55.
- Chen C., Zhou J., Ji C., 2010. Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance, *Life Sci* 87, 333-8. Review
- Chieli E., Romiti N., Rodeiro I., Garrido G., 2009. In vitro effects of *Mangifera indica* and polyphenols derived on ABCB1/P-glycoprotein activity. *Food Chem. Toxicol* 47, 2703-2710
- Chung S.Y., Sung M.K., Kim N.H., Jang J.O., Go E.J., Lee H.J., 2005. Inhibition of P-glycoprotein by natural products in human breast cancer cells. *Arch Pharm Res* 28,823–828
- Contran R.S., Kumar, V., Collins, T., 2000. *Neoplasias*. Robbins: *Patología Estructural e Funcional*. 6.ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara- Koogan. p.233-295.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516

Erlund I., 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research* 24, 851–874

Erokhina M., Stavrovskaja A., Onishchenko G., 1997. Reorganization of elements of the cytoskeletal and vacuolar systems in tumor cells in the early stage of developing multiple drug resistance. *Tsitologiya* 39,1038-45.

Failace R., Hematograma. 5. Ed. Porto Alegre: artmed 2009. 347 p.

Ferguson P.J., Brisson A.R., Koropatnick J., Vincent M.D., 2009. Enhancement of cytotoxicity of natural product drugs against multidrug resistant variant cell lines of human head and neck squamous cell carcinoma and breast carcinoma by tesmilifene. *Cancer Lett* 274, 279-89

Fernandes J., Weinlich R., Castilho R.O., Kaplan M.A., Amarante-Mendes G.P., Gattass C.R., 2005. Pomolic acid triggers mitochondria-dependent apoptotic cell death in leukemia cell line. *Cancer Lett* 219, 49-55

Ferry D.R., Smith A., Malkhandi J., Fyfe D.W., Takats P.G., Anderson D., Baker J., Kerr D.J., 1996. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res.* 4, 659-68

Fong WF, Wang C, Zhu GY, Leung CH, Yang MS, Cheung HY (2007). Reversal of multidrug resistance in cancer cells by *Rhizoma Alismatis* extract. *Phytomedicine*. Feb;14(2-3):160-5

Ford J.M., Hait W.N., 1990. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev* 42, 155-199

Gottesman M.M. and Pastan I., 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62, 385-427

Gottesman M.M., Ling V., 2006. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: The early years of P-glycoprotein research. *FEBS Lett* 580, 998-1009

Hanahan D., Weinberg R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70

Harborne J.B., 1986. Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog Clin Biol Res* 213,15-24

Herreiras T., 2009. Efeitos de flavonóides sobre o metabolismo mitocondrial e suas implicações na viabilidade e apoptose de células de melanoma. 146 f. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná.

Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Katan M.B., 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 41, 2379-2383

Hoffbrand A.V. e Moss A.H., 2012. Fundamentos de hematologia. 6.ed. Porto Alegre: artmed. 191.p.

Hollman P.C.H., Vries J.H.M., Leeuwen S.D., Mengelers M.J.B., Katan M.B., 1995. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 62, 1276-1282

Huang S.L., Hsu C.L., Yen G.C., 2006. Growth inhibitory effect of quercetin on SW 872 human liposarcoma cells . *Life Sci* 79, 203–209

Huang S.L., Hsu C.L., Yen G.C., 2006. Growth inhibitory effect of quercetin on SW 872 human liposarcoma cells. *Life Sciences* 79, 203–209

Ikegawa T., Ohtani H., Koyabu N., Juichi M., Iwase Y., Ito C., Furukawa H., Naito M., Tsuruo T., Sawada, Y., 2002. Inhibition of P-glycoprotein by flavonoid derivatives in adriamycin-resistant human myelogenous leukemia (K562/ADM) cells. *Cancer Lett* 177, 89–93

Instituto Nacional do Câncer (INCA), Tipos de Câncer. Disponível site <http://www.inca.gov.br>, acessado em 10 de fevereiro de 2014.

Ishisaka A., Ichikawa S., Sakakibara H., Piskula M.K., Nakamura T., Kato Y., Ito M., Miyamoto K., Tsuji A., Kawai Y., Terao J., 2011. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radic Biol Med* 51, 1329-36

Kang T.B., Liang N.C., 1997. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 54, 1013-1018

Kartner N, Ling V (1989). Multidrug resistance in cancer. *Sci Am.* Mar;260(3):44-51.

Klappe K., Hummel I., Hoekstra D., Kok J.W., 2009. Lipid dependence of ABC transporter localization and function. *Chem Phys Lipids* 161, 57-64

Kleemann R., Verschuren L., Morrison M., Zadelaar S., van Erk M.J., Wielinga P.Y., Kooistra T., 2011. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. *Atherosclerosis* 218, 44-52

Liu Y.L., Tang L.H., Liang Z.Q., You B.G., Yang S.L., 2010. Growth inhibitory and apoptosis inducing by effects of total flavonoids from *Lysimachia clethroides* Duby in human chronic myeloid leukemia K562 cells. *Jour. of Ethno* 131, 1-9

Lopes E.C., Garcia M., Benavides F., Shen J., Conti C.J., Alvarez E., Hajos S.E., 2003. Multidrug resistance modulators PSC 833 and CsA show differential capacity to induce apoptosis in lymphoid leukemia cell lines independently of their MDR phenotype. *Leuk Res* 27, 413-23

Lozzio C.B., Lozzio B.B., 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334

Maia R.C., Silva E.A., Harab R.C., Lucena M., Pires V., Rumjanek V.M., 1996. Sensitivity of vincristine-sensitive K562 and vincristine-resistant K562-Lucena 1 cells to anthracyclines and reversal of multidrug resistance. *Braz J Med Biol Res.* 29, 467-72

Maia R.C., Wagner K., Cabral R.H., Rumjanek V.M., 1996. Heparin reverses Rhodamine 123 extrusion by multidrug resistant cells. *Cancer Lett.* 23, 101-108

Marques D.S., Sandrini J.Z., Boyle R., Marins L.F., Trindade G.S., 2010. Relationships between multidrug resistance (MDR) and stem cell markers in human Chronic Myeloid Leukemia cell lines. *Leukemia Res*, 34, 757-762

Marques-Silva, V.M., 1996. Efeito de Moduladores da Diferenciação Celular no Processo de Resistência à Múltiplas Drogas. Tese de Doutorado, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil.

Moon Y.J., Wang X., Morris M.E., 2006. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* 20, 187-210

- Neyfakh A.A., 1988. Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Exp Cell Res* 174, 168-76
- Nowell P.C., Hungerford D.A., 1960. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132:1497
- Pachú C.O., 2003. Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos. Tese de doutorado. Universidade Federal de Campina Grande
- Paolillo R., Carratelli C.R., Rizzo A., 2011. Effect of resveratrol and quercetin in experimental infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Int Immunopharmacol* 11, 149-56
- Patil Y., Sadhukha T., Ma L., Panyam J., 2009. Nanoparticle-mediated simultaneous and targeted delivery of paclitaxel and tariquidar overcomes tumor drug resistance. *J Control Release* 136, 21-29
- Peer D., Margalit R., 2006. Fluoxetine and reversal of multidrug resistance. *Cancer Lett* 237, 180-187
- Peterson J. and Dwyer J., 1998. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research* 18, 1995- 2018
- Prakash D, Singh NB, Upadhyay G (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). *Food Chemistry*, 102(4), 1389-1393.
- Ribble D., Goldstein N.B., Norris D.A., Shellman Y.G., 2005. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol* 10, 5-12
- Riedl, S.J. and Y. Shi, 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 897-907.
- Robaszekiewicz A., Balcerczyk A., Bartosz G., 2007. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int* 31, 1245-1250
- Rowley J.D., 1973. A new consistent chromosome abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290-3

Rumjanek V.M., Lucena M., Campos M.M., Marques-Silva V.M., Maia R.C., 1994. Multidrug resistance in leukemias: the problem and some approaches to its circumvention. *Cienc Cult* 46, 63-69

Rumjanek V.M., Trindade G.S., Wagner-Souza K., Meletti-de-Oliveira M.C., Marques-Santos L.F., Maia R.C., Capella M.A.M., 2001. Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *Acad Bras Cien* 73, 57-69

Schinkel A.H., 1997. The physiological function of drug-transporting P- glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 8, 161-70. Review.

Shih H., Pickwell G.V., Quattrochi L.C., 2000. Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373, 287–294.

Silva L.M., Souza S.P., Moraes N.G., Coelho M.A., Vasconcelos C.F., Maia C.R., 2013. XIAP and P-glycoprotein co-expression is related to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia Research* 37, 1350– 1358.

Simões O.M.C., Schenkel P.E., Gosmann G., Mello P.C.J., Mentz A.L., Petrovick R.P., 2004. *Farmacognosia: da planta ao medicamento – 5ª Edi.rev.ampl.primeira reimpressão*– Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p.1102.

Sonneveld P., Wiemer E., 1997. Assays for the analysis of P-glycoprotein in acute myeloid leukemia and CD34 subsets of AML blasts. *Leukemia* 7,1160-5

Suematsu N., Hosoda M., Fujimori K., 2011. Protective effects of quercetin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 504, 223-7

Thapa M., Kim Y., Desper J., Chang K.O., Hua D.H., 2012. Synthesis and antiviral activity of substituted quercetins. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 353-6

The International Agency for Research on Cancer (IARC) Acesso em 10 de Fevereiro, 2014

Tiirikainen M., .I., Krusius T., 1991. Multidrug resistance. *Ann Med* 23, 509-20.



Uchiumi T., Kohno K., Tanimura H., Matsuo K., Sato S., Uchida Y., Kuwano M., 1993. Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ* 4, 147-157

Vidya P. R., Senthil M.R., Maitreyi S., Ramalingam K., Karunagaran D., Nagini S., 2010. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- $\kappa$ B inhibition. *European Journal of Pharmacology* 649, 84–91

Votto A.P.S., Domingues B.S., Souza M.M., Silva Júnior F.M.R., Caldas S.S., Filgueira D.M.V.B., Primel E.G., Vallochi A.L., Furlong E.B., Trindade G.S., 2010. Toxicity mechanisms of onion (*Allium cepa*) extracts and compounds in multidrug resistant erythroleukemic cell line. *Biol Res* 43,429-37

Votto A.P.S., Renon V.P., Yunes J.S., Rumjanek V.M., Capella M.A.M., Neto V.M., Sampaio F.M., Geracitano L.A., Monserrat J.M., Trindade G.S., 2007. Sensitivity to microcystins: A comparative study in human cell lines with and without multidrug resistance phenotype. *Cell Biol Int* 11,1359-66

Wang P., Zhang K., Zhang Q., Mei J., Chen C.J., Feng Z.Z., Yu D.H., 2012. Effects of quercetin on the apoptosis of the human gastric carcinoma cells. *Toxicol in Vitro* 26, 221–228

World Health Organization (WHO). Tropical diseases: progress in research, 1989-1990. Geneva,1991. p.41-47 ( Programme Report, 10). Acesso em Fevereiro de 2014.

Yoshida M., Sakai T., Hosokawa N., Marui N., Matsumoto K., Fujioka A., Nishino H., Aoike A., 1990. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS letters* 260, 10 - 3

Zaman G.J., Flens M.J., van Leusden M.R., de Haas M., Mulder H.S., Lankelma J., Pinedo H.M., Scheper R.J., Baas F., Broxterman H.J., 1994. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci* 91, 8822-6

Zhang H., Zhang M., Yu L., Zhao Y., He N., Yang X., 2012. Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 50, 1589–1599

