

Duarte Sarreira Pina

**Quercetina, um flavonóide com potencial impacto no
cancro renal?**

**Orientador: Prof. Doutor João Guilherme Costa
Co-orientadora: Prof^ª. Doutora Ana Sofia Fernandes**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

Lisboa

2022

Duarte Sarreira Pina

Quercetina, um flavonóide com potencial impacto no cancro renal?

Dissertação defendida em provas públicas para obtenção do Grau de Mestre no Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 27/06/2022, perante o Júri, nomeado pelo Despacho nº54/2022, de 14 de Março, com a seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof.^a Doutora Marisa Nicolai

Orientador:

Prof.^a Doutor João Guilherme Costa

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

Lisboa

2022

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Prof. Doutor João Guilherme Costa e à Co-Orientadora, Prof. Doutora Ana Sofia Fernandes, pela disponibilidade, apoio e compreensão, não só durante o desenvolvimento desta dissertação, bem como em todo o meu período académico. Agradeço também a todo corpo da ECTS que garantem o sucesso do curso e o bom nome da instituição.

Um agradecimento especial à minha família, pelo apoio incondicional que me deram, força e motivação, pois sem esta não seria possível alcançar este objetivo. Sou-lhes eternamente grato.

Aos meus amigos Beatriz Santos, Jéssica Castelo, Joana Duarte e Miguel Camilo, obrigado pela nossa caminhada conjunta neste curso. Foram muitas horas de estudos juntos e partilhámos grandes momentos de lazer que sem dúvida ficarão marcados no percurso de vida de cada um. Votos de sucesso pela vida fora!

Ao Bernardo Carreira, Catarina Moura, Francisco Brás, Manuel Louro e Tiago Almeida, amigos de longa data, um obrigado pelo apoio no estudo e pela força para conseguir alcançar os objetivos a que me proponho.

Agradeço também a todos os restantes amigos pertencentes “à malta do bem” que também acompanharam a minha caminhada.

Muito obrigado!

Resumo

O cancro é uma doença que tem vindo a afetar cada vez mais pessoas em todo o mundo. Caracterizado pelo crescimento anormal das células, desrespeitando o seu ciclo e crescimento natural. É sabido através de agências de estatística que a incidência do cancro renal, em particular, tem vindo a aumentar, sendo um dos tipos de cancro mais frequentes em Portugal. No que respeita ao seu tratamento, têm vindo a ser realizadas investigações na tentativa de descobrir novos tratamentos farmacológicos, de forma a aumentar a sobrevivência dos doentes. Neste sentido, têm sido exploradas novas classes de compostos, como alguns compostos bioativos presentes na dieta, os quais têm revelado propriedades interessantes, como a ação antitumoral. A quercetina, pertencente à classe dos flavonóides é um desses compostos bioativos com diversas propriedades, incluindo essa atividade antitumoral.

Neste sentido, no âmbito desta dissertação estudou-se experimentalmente o impacto da quercetina no cancro renal. Para isso, foi utilizado como modelo «in vitro», as células 786-O, células tumorais renais humanas e o ensaio do cristal violeta para avaliar o impacto deste composto na viabilidade celular (entre 24 e 48 h). A quercetina foi testada em diferentes concentrações (1,5; 2,5; 5; 7,5 e 10 μM) isoladamente e posteriormente em combinação com a cisplatina (25 μM), fármaco antitumoral amplamente utilizado.

A quercetina não demonstrou efeito antitumoral, nas condições experimentais e no modelo celular utilizados. No entanto, deverão ser realizados mais estudos e continuar a avaliar-se o seu potencial contra o cancro renal.

Palavras-Chave: Cancro Renal; Quercetina; Cisplatina; células 786-O; citotoxicidade

Abstract

Cancer is a disease that has been affecting more and more people all over the world. Characterized by the abnormal growth of cells, disrespecting their cycle and natural growth. It is known through statistical agencies that the incidence of renal cancer, in particular, has been increasing, being one of the most frequent types of cancer in Portugal. As regards its treatment, research has been carried out in an attempt to discover new pharmacological treatments to increase patient survival. In this sense, new classes of compounds have been explored, such as some bioactive compounds present in the diet, which have revealed interesting properties, such as antitumour action. Quercetin, belonging to the flavonoid class, is one of these bioactive compounds with several properties, including antitumour activity.

In the scope of this dissertation the impact of quercetin on kidney cancer was experimentally studied. To this end, 786-O cells, human renal tumour cells, were used as an "in vitro" model and the crystal violet assay was used to evaluate the impact of the compounds on cell viability (between 24 and 48 h). Quercetin was tested at different concentrations (1.5; 2.5; 5; 7.5 and 10 μM) alone and subsequently in combination with cisplatin (25 μM), a widely used antitumour drug.

Quercetin showed no antitumour effect under the experimental conditions and in the cell model used. However, further studies should be carried out and its potential against renal cancer should continue to be evaluated.

Keywords: Kidney Cancer; Cisplatin; Quercetin; 786-O cells; cytotoxicity

Índice de Abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AINES - Anti-inflamatórios não esteroides

BCI₂ - Família de genes dos mamíferos

CO₂ - Dióxido de Carbono

CV - Cristal Violeta

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

ESMO – *European Society of Medical Oncology*

IL-1 β - Interleucina 1 beta

iNOS - Óxido nítrico-sintase induzida

LRA - Lesão Renal Aguda

MAT - Microangiopatia trombótica

mg/Kg - micrograma por quilograma (unidade de medida)

mL - Mililitro

ROS - Espécies reativas de oxigénio

TGF- β 1 - Fator de crescimento beta 1

TNF - α - Fator necrose tumoral

UV – Ultra-Violeta

μ M - Micromolar

μ mol/L - Micromol por litro

% - Percentagem

°C - Graus Celsius

Índice

INTRODUÇÃO	1
1. O CANCRO:	1
1.1. CANCRO RENAL	3
<i>1.1.1. Cisplatina</i>	<i>5</i>
1.2. COMPOSTOS BIOATIVOS	6
<i>1.2.1. Quercetina</i>	<i>8</i>
2. OBJETIVO	11
3. TRABALHO EXPERIMENTAL	12
3.1. CÉLULAS 786-O	12
<i>3.1.1. Assepsia</i>	<i>13</i>
<i>3.1.2. Contagem celular</i>	<i>13</i>
<i>3.1.3. Passagem Celular</i>	<i>14</i>
3.2. ENSAIO	15
<i>3.2.1. Ensaio do Cristal Violeta (CV):</i>	<i>19</i>
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4. CONCLUSÃO	27
5. BIBLIOGRAFIA	28

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Metabolitos da Quercetina, Construída a partir de informação disponível em (Almeida et al., 2018; Phenol-Explorer Database on polyphenol content in food, 2020).....	9
Tabela 2 - Tabela de viabilidade celular (%) para as diferentes concentrações de quercetina estudadas, 1ºEnsaio - Experiência 1).....	20
Tabela 3 - Tabela de viabilidade celular (%) às diferentes concentrações de quercetina estudadas, 2ºEnsaio - Experiência 1).....	21

Índice de Figuras

Figura 1 - As marcas do Cancro – Hallmarks of cancer, imagem reproduzida de (Hanahan & Weinberg, 2011)	2
Figura 2 - Primeira linha de tratamento sistémico, imagem reproduzida de (Escudier et al., 2019).....	4
Figura 3 - Representação da Molécula de Cisplatina, Reproduzido de (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database, 2020).....	6
Figura 4 - Divisão dos Compostos Bioativos, esquema reproduzido de (Henriques Círico, 2022).....	7
Figura 5 - Estrutura Química da Quercetina, Reproduzido de (Phenol-Explorer Database on polyphenol content in food, 2020).....	8
Figura 6 - Imagem da linha celular 786-O, imagem reproduzida de (Biohippo, 2021)	12
Figura 7 - Câmara de fluxo laminar (Telstar, 2022).....	13
Figura 8 - Vista ao microscópio da zona de contagem da câmara de Neubauer, Reproduzido de (Jayme Garcia Arnal Barbedo, 2013)	14
Figura 9 - Esquema representativo da placa de 96 poços e dos compostos adicionados, no primeiro ensaio.	16
Figura 10 - Esquema representativo da placa de 96 poços e dos compostos adicionados, no segundo ensaio.....	17
Figura 11 – Esquema representativo dos ensaios realizados: à esquerda as concentrações trabalhadas da 1ª experiência e à direita a 2ª experiência.....	18
Figura 12 - Gráfico referente à viabilidade celular (%) das diferentes concentrações de quercetina, método de CV, 24h de exposição, linha celular 786-O, 1º ensaio da experiência 1	21
Figura 13 - Gráfico referente à viabilidade celular (%) das diferentes concentrações de quercetina, método de CV, 24h de exposição, linha celular 786-O, 2º ensaio da experiência 1	22
Figura 14 – Gráfico referente à médio da viabilidade celular (%) das diferentes concentrações de quercetina, método de CV, 24h de exposição, linha celular 786-O, experiência 1	22
Figura 15 - Esquema representativo da placa de 96 poços e dos compostos adicionados, no segundo ensaio.....	24
Figura 16 – Gráfico referente à viabilidade celular (%) dos compostos utilizados, método de CV, 24h de exposição, linha celular 786-O, experiência 2	25

Introdução

1. O Cancro:

O cancro é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, tendo em Portugal, no ano de 2019 atingido cerca de 29 000 pessoas (Statistics, 2021). Deste valor anual, cerca de 17 000 foram do sexo masculino e 12 000 foram do sexo feminino. Isto traduz uma maior incidência de cancro em indivíduos do sexo masculino. Há vários tipos de cancro, sendo os mais frequentes em Portugal o do cólon, reto, ânus, estômago e mama. O aparecimento num determinado local, não impede que o mesmo cancro se espalhe para outros locais do organismo, pois estas células têm uma maior capacidade de se deslocar, provocando assim uma metastização (Statistics, 2021).

Para o desenvolvimento da doença há alguns fatores de risco que já se encontram estudados, sendo estes divididos em dois grupos: I) controláveis, no qual se incluem a exposição ambiental, estilos de vida (como por exemplo hábitos tabágicos, alimentação e atividade física) e também algumas infeções por determinados vírus, bactérias ou alguns parasitas;II) não controláveis que incluem a idade, predisposição genética e etnia (L. P. C. o Cancro, 2021a; SNS24, 2021b).

A fisiopatologia do cancro é caracterizada pelo crescimento abruuto de células. Este crescimento é causado por uma replicação excessiva das mesmas, permitindo que sejam introduzidas novas mutações, que por sua vez podem conduzir ao surgimento de novas funções celulares, bem como garantir uma maior capacidade de sobrevivência das mesmas. Desta forma, devido ao aparecimento das células imortalizadas, quebra-se o ciclo normal das células, que não sofrem apoptose, desenvolvendo-se uma massa anormal de células designado de tumor (Adams & Cory, 2007; L. P. C. o Cancro, 2021b).

Existem dois tipos de tumores, os benignos e os malignos. Estes últimos, são também comumente designados por cancros ou neoplasias. Os tumores benignos têm o crescimento em volume como os malignos, sendo que não conseguem realizar o processo de invasão celular de órgãos vizinhos, ou seja, não têm a capacidade de metastizar. Apesar de haver tumores malignos que têm o seu processo invasivo localmente, sem metastizar. Desta forma, o tumor benigno não desempenha tanto perigo para a saúde como o maligno (Patel, 2020; SNS24, 2021a).

Os erros genéticos podem desempenhar diferentes papéis ao afetar o crescimento,

a divisão e a morte celular. Isto é, as células podem crescer abruptamente, ficando com dimensões anormais e desta forma criar uma massa estranha ou ter o seu ciclo de vida normal afetado, ou seja, as células ao chegarem ao seu suposto final de ciclo não realizam a apoptose. Assim, as células mantêm a sua atividade e funções anteriores, criando-se assim um número total anormal de células nesse local (L. P. C. o Cancro, 2021b).

Há vários mecanismos, como se pode observar na Figura 1, que são utilizados pelas células tumorais para que o cancro ocorra de uma forma mais acelerada, como por exemplo a indução da angiogénese, promoção do crescimento de novos vasos sanguíneos para que o aporte de oxigénio e nutrientes chegue de uma forma mais direta ao tumor (Hanahan & Folkman, 1996). Outro mecanismo, já referido anteriormente, é a capacidade de metastizar e invadir os tecidos adjacentes, designada muitas vezes de cascata de invasão-metástase (Talmadge & Fidler, 2010). Este mecanismo está relacionado com o processo de angiogénese de forma a criar os novos aportes para aquele local, garantindo uma libertação de marcadores que irão promover o crescimento das células neoplásicas no local, sinalizando o local para outras células tumorais que se encontrem em circulação (Hanahan & Weinberg, 2011).

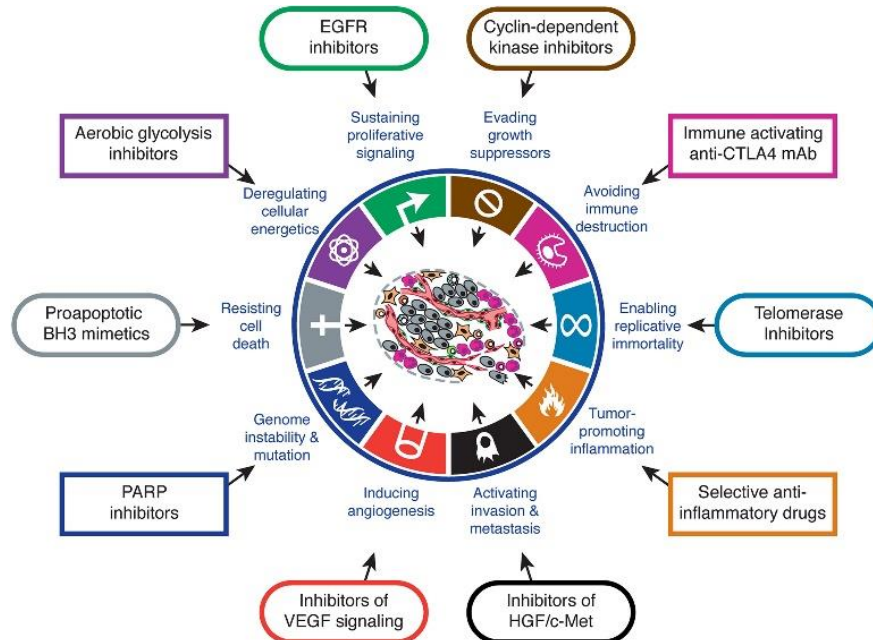


Figura 1 - As marcas do Cancro – *Hallmarks of cancer*, imagem reproduzida de (Hanahan & Weinberg, 2011)

Outro processo que se encontra alterado nas células tumorais é o apoptótico, desencadeado para que ocorra a morte das células programada, sendo uma particularidade das células cancerígenas a capacidade de desativarem esta função.

Deste modo, os sinais que a célula recebe para começar a desempenhá-la são bloqueados e as mesmas não iniciam o processo apoptótico (Hanahan & Weinberg, 2011).

Existe também um processo de progressão tumoral realizado através das células necróticas e do seu processo pós-inflamatório, desempenham o papel de fagocitar e rebentar. Neste local espalham-se fragmentos de células cancerígenas que ativam o processo inflamatório, originando uma angiogénese que leva à metastização e invasão dos tecidos (Hanahan & Weinberg, 2011).

É possível também, segundo a literatura, observarem-se outros mecanismos das células tumorais (Hallmarks) como a desregulação celular energética, a proliferação sinalizada, a desativação dos recetores de fator de crescimento e a destruição imunitária evitada (Hanahan & Weinberg, 2011)

1.1. Cancro renal

O cancro renal tem vindo a ser um dos cancros com maior prevalência nos últimos anos, encontrando-se atualmente no top 10 de cancros com maior incidência tanto em homens como mulheres (American Cancer Society, 2021). Segundo os últimos dados disponíveis, nos Estados Unidos da América são diagnosticadas com esta patologia 76080 pessoas, destas 48780 são homens e 27300 são mulheres, o que dá uma prevalência de 1 para cada 46 nos homens e 1 para 80 nas mulheres (American Cancer Society, 2021; Kris Maes, 2019).

O cancro renal é uma doença que afeta pessoas de idade já mais avançada, não sendo normal uma incidência em pessoas com menos de 45 anos de idade. A faixa etária mais comum para sofrer com a patologia é dos 65 aos 74 anos. Para além da idade avançada existem outros fatores que contribuem para o aparecimento deste tipo de cancro, como o tabagismo, obesidade, pressão arterial elevada, histórico familiar de cancro renal, local de trabalho com exposição a materiais tóxicos/radioativos, utilização de algumas classes de medicamentos como os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) (American Cancer Society, 2021; Kris Maes, 2019; Rauf et al., 2018).

Como podemos observar com os dados mencionados anteriormente, este tipo de cancro tem uma incidência elevada, no entanto é bastante silencioso, o que prejudica o seu diagnóstico precoce, visto só se conseguir ter perceção da doença quando esta se encontra num estadio mais avançado. Desta forma é necessário desenvolver uma

melhor terapêutica para o tratamento do mesmo e descobrir que novos compostos podem ser benéficos neste processo (Michael B Atkins, 2021).

O tratamento do cancro define-se pelo estadio em que se encontra a patologia, podendo ser removido cirurgicamente, usar-se tratamentos farmacológicos, sendo que estes podem ser com anticorpos monoclonais, quimioterapia (ex: agentes citotóxicos), radioterapia ou tratamentos localizados como crioterapia ou ablação por radiofrequência (Carvalho & Fernandes, 2011; *Renal Cancer*, 2021).

Segundo as guidelines da *European Society for Medical Oncology* (ESMO), dependendo do risco associado ao tipo de carcinoma, é escolhida a terapêutica, sendo que hoje em dia a utilização da mesma é feita de uma forma mais direcionada, promovendo um ataque mais incisivo sobre as células tumorais e evitando o dano nas células não lesadas adjacentes. Esta consiste na utilização de anticorpos monoclonais que vão ter atividade em células específicas. Na figura seguinte (Figura2), é possível observar um esquema representativo do tratamento de primeira linha indicado nas guidelines da ESMO (Escudier et al., 2019; Powles, 2021).

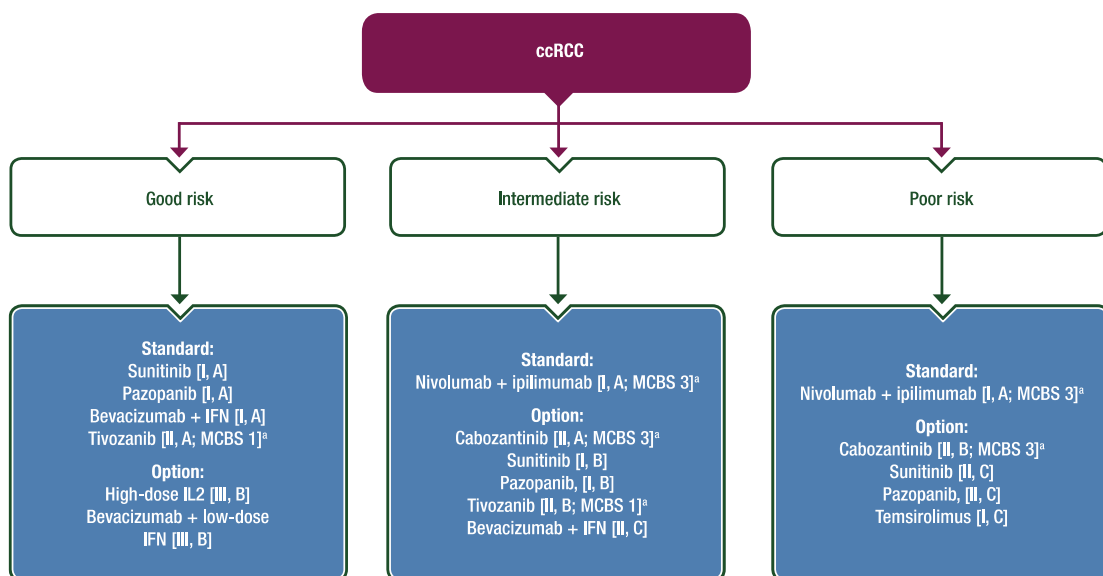


Figura 2 - Primeira linha de tratamento sistémico, imagem reproduzida de (Escudier et al., 2019)

Inicialmente, os tratamentos de primeira linha eram realizados com citotóxicos, nomeadamente da classe das platinas, onde se insere a cisplatina, composto que foi utilizado no estudo experimental e que será abordado na secção (1.1.1), apesar da utilização deste composto poder causar nefrotoxicidade, o mesmo continua a ser utilizado (Michael B Atkins, 2021).

Outro tipo de tratamento é a radioterapia, que consiste na emissão de raios de alta energia, produzidos por um aparelho emissor de forma a matar as células tumorais que se encontram no local onde é incidida a radiação. Esta técnica é realizada, habitualmente, 5 dias por semana durante um período previamente calculado para cada utente, dependendo da fase em que se encontra a doença (L. P. contra o Cancro, 2022).

A cirurgia é o tratamento mais utilizado para o cancro renal, o qual consiste num tratamento localizado designado por nefrectomia. A nefrectomia pode ser dividida em 3 subclasses:

- Nefrectomia Radical: consiste na remoção total do rim afetado, a glândula suprarrenal e o tecido adiposo envolvente, sendo que os gânglios linfáticos dessa região também podem ser removidos;
- Nefrectomia Parcial: consiste na remoção parcial do rim, a zona que se encontra afetada pelo tumor. Esta cirurgia é utilizada quando as dimensões do tumor são inferiores a 4 cm, bem quando o cancro afeta os dois rins;
- Nefrectomia Simples: consiste na remoção total do rim afetado. Este tipo de nefrectomia só é utilizada quando o cancro se encontra no primeiro estadio e apenas num rim (L. P. contra o Cancro, 2022).

1.1.1. Cisplatina

A cisplatina é um agente citotóxico, anteriormente utilizado como primeira linha antes da utilização de terapêuticas direcionadas. É um protótipo do complexo de coordenação da platina, utilizado como agente alquilante (Figura 3). A sua utilização é feita em diferentes tipos de cancro, tendo sempre em atenção as suas características físico-químicas. Este composto tem a seguinte fórmula química: $\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2$ e peso molecular 300,05 g/mol, apresenta solubilidade em água de 1 mg/mL, bem como em DMSO de 10 mg/mL, o solvente utilizado no trabalho experimental, que será apresentado mais à frente (Capítulo 4).

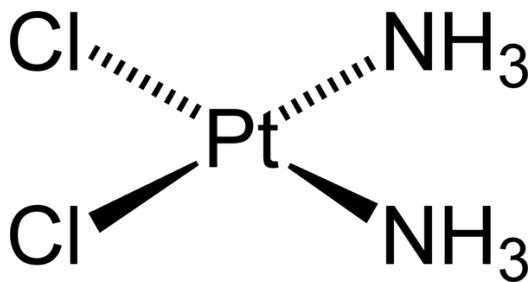


Figura 3 - Representação da Molécula de Cisplatina, Reproduzido de (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database, 2020)

Sendo a cisplatina um dos fármacos mais utilizados no tratamento antitumoral, como referido anteriormente, a sua utilização tem de ser bem ponderada devido à nefrotoxicidade que a mesma apresenta. A cisplatina está associada a lesão renal aguda (LRA), microangiopatia trombótica (MAT), hipomagnesemia, disfunção tubular proximal e anemia que não é proporcional aos efeitos mielossupressores do fármaco. A hidratação é essencial para todos os pacientes de forma a prevenir a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina (Jaime R Merchan, MD, MMScKenar D Jhaveri, 2021).

A cisplatina tem como mecanismo de ação a inibição da síntese de ADN, através da formação de ligações cruzadas intra e intercadeia no ADN, sendo o efeito citotóxico causado pela ligação a todas as bases do ADN, preferencialmente à posição N-7 da guanina e da adenosina. Promove também um aumento da imunogenicidade tumoral. Desta forma podemos dizer que a cisplatina apresenta propriedades imunossupressoras e radiosensibilizantes, sem especificidade para nenhuma fase do ciclo celular (Índice.EU, 2021)

1.2. Compostos Bioativos da dieta

Os compostos bioativos da dieta têm vindo, cada vez mais, a ser estudados, destacando-se os seus efeitos e benefícios para o nosso organismo, bem como a sua biodisponibilidade. Conseguimos observar que estes compostos têm papéis importantes para algumas patologias que vão surgindo, apresentando diversas características benéficas: são antioxidantes, têm propriedades anti-inflamatórias e recentemente conseguiu verificar-se que alguns têm também propriedades anticancerígenas (Santos et al., 2019).

Existem várias classes de compostos bioativos, como se pode verificar através do seguinte esquema representativo:

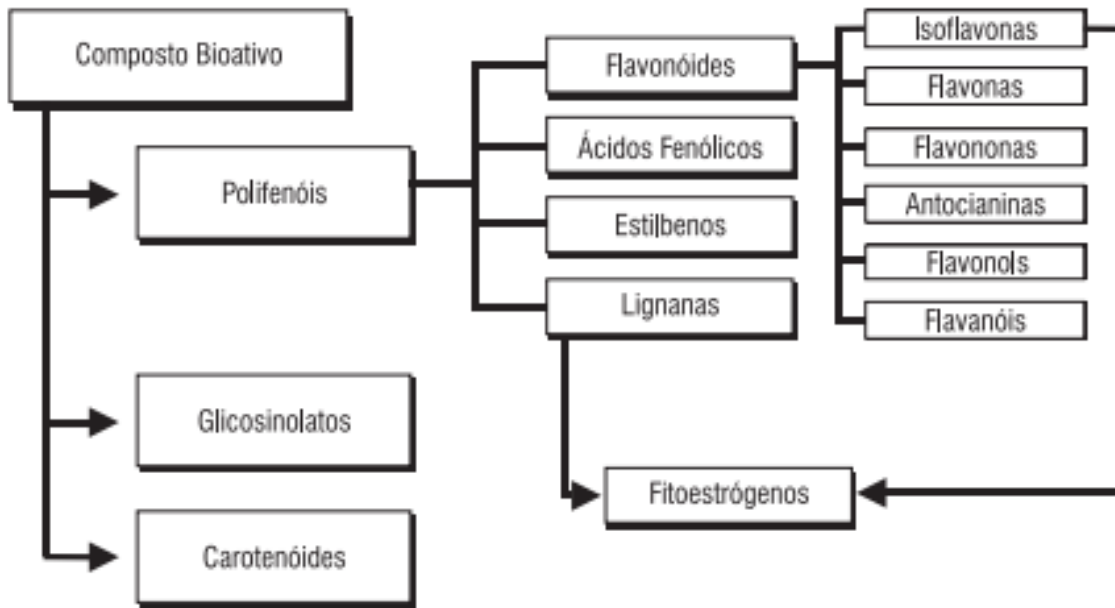


Figura 4 - Divisão dos compostos bioativos presentes na dieta, esquema reproduzido de (Henriques Cirico, 2022)

Das diferentes classes de compostos bioativos que existem foi escolhida a classe dos polifenóis, mais especificamente a subclasse dos flavonóides, onde se insere a quercetina. A quercetina foi o composto utilizado no trabalho experimental para estudar o seu potencial antitumoral.

Os flavonóides são compostos polifenólicos, que têm como principais fontes as frutas (ex: maçã) e legumes (ex: cebola), produtos derivados do cacau, vinho tinto, entre outros alimentos. Esta classe demonstrou, segundo estudos «in vivo» e «in vitro», que têm propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras e anticancerígenas (Kopustinskiene et al., 2020). É cada vez mais frequente encontrar na literatura estudos sobre os efeitos benéficos que os flavonóides têm na saúde humana, incluindo a quercetina, o composto bioativo que estudámos com maior detalhe, como mencionado anteriormente. Apesar de já ser bastante conhecido o seu efeito antioxidante, cada vez mais, é estudado o seu efeito anticancerígeno. No entanto, e apesar de já ter sido estudado para diferentes tipos de cancro, existem poucos estudos sobre o impacto da quercetina no cancro renal (Rauf et al., 2018).

1.2.1. Quercetina

A quercetina é um composto natural, um flavonóide, que tem como fórmula química $C_{15}H_{10}O_7$ e massa molar 302,236 g/mol – Figura 5. (Phenol-Explorer Database on polyphenol content in food, 2020). Este composto tem vindo a ser estudado e tem demonstrado diversas propriedades, entre as quais um efeito anticancerígeno (Brito et al., 2015). No entanto, pouco se sabe sobre o efeito deste composto no cancro renal e por esse motivo optámos por aprofundar o conhecimento nesta área.

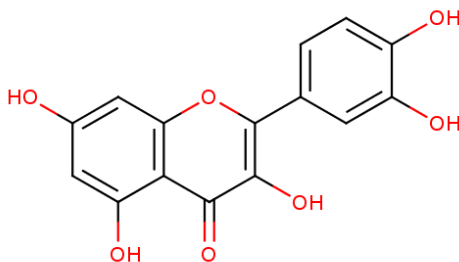


Figura 5 - Estrutura Química da Quercetina, Reproduzido de (Phenol-Explorer Database on polyphenol content in food, 2020)

A quercetina é um composto natural e encontra-se presente em alguns alimentos que ingerimos diariamente. Esta é detetada em maior concentração em alimentos como a cebola e a maçã (Phenol-Explorer Database on polyphenol content in food, 2020). Existem também outras fontes alimentares de quercetina que apresentam concentrações significativas, como por exemplo, o chá preto, vinho tinto, batatas e couves (Sendão, 2008).

A quercetina após ser ingerida, pode manter-se na sua forma inalterada ou ser metabolizada e originar metabolitos, sendo que estes têm demonstrado atividade e diversos benefícios, incluindo um efeito anticancerígeno (Sendão, 2008). Os diversos metabolitos podem ser encontrados na literatura e em bases de dados online (Phenol-Explorer Database on polyphenol content in food, 2020) ou outras publicações

(Almeida et al., 2018). Assim, após consulta dessas fontes, construiu-se a Tabela 1 onde é possível observar os diferentes metabolitos da quercetina.

Tabela 1 - Metabolitos da Quercetina, Construída a partir de informação disponível em (Almeida et al., 2018; Phenol-Explorer Database on polyphenol content in food, 2020)

Quercetina-3'-O-sulfato	Ácido 3-OCH 3-4-hidroxifenilacético
Sulfato de quercetina-7O	Ácido 2-hidroxipuricárico
Quercetina-3'-O-glucuronida	Ácido 3-hidroxipuricárico
Quercetina-4'-O-glucuronidoa	Ácido 4-hidroxipuricárico
Quercetina-3O-glucuronida	Quercetina-3-O-sulfato
Quercetina-7O-glucuronida	Quercetina-3'-O-sulfato
Sulfato de glucuronido de quercetina	Quercetina-3'-O-glucuronido
Isorhamnetin-3O-glucuronido	Quercetin-3O-glucuronide
Isorhamnetin-4'-O-glucuronido	Quercetina glucuronido
Quercetina diglucuronido	Sulfato de quercetina-glucuronido
Metilo quercetina diglucuronido	Isorhamnetina-3-O-glucuronida
Metilo quercetina glucuronido	Diglucuronido de quercetina
Quercetina glucosidesulfato	Diglucuronido de metil quercetina
Quercetina glucosideglucuronido	Glucuronido de metil-quercetina
Quercetina glutationa	Sulfato de glucósido de quercetina
Ácido 3-hidroxifenilacético	Glucósido glucosido de quercetina
Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético	Ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético
Ácido gálico	Ácido di-hidro-p- cumárico
Ácido di-hidrocafeico	Ácido ferúlico

A quercetina, anteriormente era estudada de forma a verificar a possibilidade da mesma ser utilizada como suplemento para combater infeções, hipercolesterolemia, doenças cardiovasculares e também devido ao seu poder antioxidante (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database, 2020). Apesar de todas as características já conhecidas desta classe de compostos, ainda é necessário obter mais resultados sobre a sua efetividade no cancro, quer do ponto de vista nutricional, quer farmacológico, de forma a perceber quão benéfica poderá ser a sua utilização em doentes com esta patologia, bem como a segurança da sua utilização.

A utilização como suplementação nutricional tem sido bem tolerada e ainda não foram descritas alterações enzimáticas, alterações provocadas a nível hepático que possam indicar uma possível toxicidade. Este sinal é indicativo que às concentrações utilizadas existe uma demonstração da sua segurança (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database, 2020).

Em alguns estudos para avaliar o impacto da quercetina no cancro, foram estudados quais os metabolitos ativos que a quercetina originava aquando da sua metabolização, qual o seu tempo de semi-vida e também a sua biodisponibilidade.

Pois, há muito tempo era sabido que quando se administrava quercetina por via intravenosa em roedores, a mesma após ser administrada era rapidamente metabolizada e a sua excreção ocorria de uma forma quase imediata, o que levava a não haver acumulação nos tecidos do organismo. Por isso, pensava-se que a mesma ao ser administrada oralmente não seria absorvida pelo sistema gastrointestinal, sendo a sua excreção feita nas fezes. Mas com o aumento dos estudos chegou-se à conclusão que era absorvida pelo sistema gastrointestinal sofrendo depois uma metabolização (Murakami et al., 2008).

A quercetina tem vindo a ser utilizada de forma a demonstrar as propriedades anticancerígenas, deste modo, têm vindo a ser desenvolvidos mais estudos pois é uma área pouco trabalhada. No entanto, já foram obtidos alguns dados para vários tipos de cancro, nomeadamente do cólon, mama e ovário (Reyes-Farias & Carrasco-Pozo, 2019).

Os estudos «in vitro» realizados anteriormente decorreram a diferentes tempos de exposição (24 a 120 horas) (Reyes-Farias & Carrasco-Pozo, 2019). No caso do cancro renal, a quercetina demonstrou num estudo anterior, a capacidade de proteger contra a nefrotoxicidade induzida pela doxorubicina, agente citotóxico, promovendo um aumento do seu efeito citotóxico, mas evitando que houvesse esse efeito nos tecidos adjacentes, impedindo que houvesse maior zona afetada pelos efeitos do fármaco (Heeba & Mahmoud, 2014). Nesse mesmo estudo ocorreu também uma promoção para uma diminuição da expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) e caspase-3 (Heeba & Mahmoud, 2014). Desta forma o co-tratamento de um paciente com quercetina poderá ser benéfico, pois é possível evitar alguns dos efeitos indesejados provocados por algumas classes de fármacos.

2. Objetivo

Os objetivos que foram delineados com a realização desta dissertação, foram os seguintes:

- 1) Realização de uma breve revisão da literatura sobre o cancro e o cancro renal, de forma a obter informação atualizada sobre como esta patologia tem impacto a nível de saúde pública, características fisiopatológicas e as opções terapêuticas. Adicionalmente, pretendeu-se fazer uma breve revisão sobre compostos bioativos, com destaque para a quercetina e os seus potenciais benefícios para a saúde humana;
- 2) Pesquisa em bases de dados (ex: Phenol-Explorer) sobre os metabolitos da quercetina e a suas fontes alimentares, de forma a verificar quais os compostos que a mesma formava no organismo (metabolitos) e a partir de quais compostos era formada;
- 3) Realização de um estudo experimental «in vitro» sobre o potencial antitumoral da quercetina, em células tumorais renais humanas (786-O) através do ensaio do cristal violeta. Este estudo dividiu-se em duas fases, na primeira estudou-se o impacto da quercetina isoladamente e numa segunda fase, realizou-se um estudo comparativo da ação da quercetina com a cisplatina, e também um estudo do impacto da associação dos dois compostos no cancro renal.

3. Trabalho Experimental

3.1. Células 786-O

As células escolhidas foram as 786-O, células tumorais renais humanas, foram adquiridas à ATCC, são células provenientes de um indivíduo do sexo masculino com 58 anos e foram obtidas a partir de um adenocarcinoma primário de células claras. Estas apresentam uma forma bastante particular quando vistas ao microscópio, sendo que estas são finas e alongadas e têm um tempo de duplicação de aproximadamente de 18 horas (786-O [786-0] / ATCC, 2022).

As células não devem manter o seu meio de cultura por mais do que três/quatro dias, pois este fica sem os nutrientes necessários para o melhor crescimento das mesmas. A contabilização dos dias é importante, uma vez que após esse período o meio perde os seus nutrientes, ficando, deste modo saturado dos resíduos produzidos pelas células, acidificado, o que poderá provocar um abrandamento da divisão celular. As condições ideais para o crescimento das mesmas são o meio trocado no período respeitado, uma temperatura de 37 °C e uma atmosfera com 5% de CO₂.

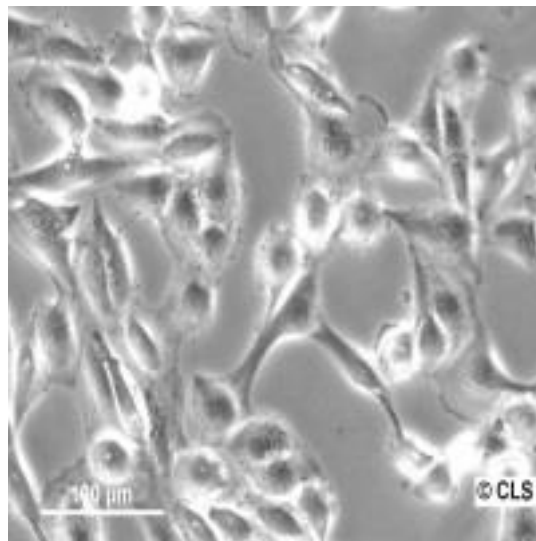


Figura 6 - Imagem da linha celular 786-O, imagem reproduzida de (Biohippo, 2021)

3.1.1. Assepsia

Todo o manuseamento das células, bem como a realização das passagens celulares, preparação para a contagem celular, a inoculação das mesmas e a adição dos diferentes compostos foram realizadas em ambiente controlado estéril, trabalhando-se em câmara de fluxo laminar.



Figura 7 - Câmara de fluxo laminar (Telstar, 2022)

Para todos os processos, começava-se pela higienização da câmara de fluxo laminar, a mesma era colocada durante cerca de 15 minutos sob radiação Ultra-Violeta (UV), depois deste tempo era iniciado o fluxo de ar que demorava cerca de 3 minutos até ficar estabilizado. Quando o fluxo se encontrava estabilizado a câmara era pulverizada com etanol a 70°. Todo o material que entrava para a câmara de fluxo era primeiramente pulverizado com etanol a 70° para garantir que não se encontrava contaminado.

O material utilizado encontrava-se todo esterilizado antes de entrar para a câmara, as pontas para as micropipetas e outros materiais que possam ser reutilizados ou não embalados individualmente, eram autoclavados e posteriormente pulverizados com etanol 70° para entrarem na câmara.

3.1.2. Contagem celular

A contagem celular é um processo fulcral para o desenvolvimento de toda a

experiência, pois, como referido anteriormente, as células necessitam de uma certa confluência (cerca de 80%) para se encontrarem numa fase exponencial do seu crescimento, que permitirá a realização das experiências nas condições ideais.

Para a realização dos ensaios foram necessárias cerca de 600 000 células, este número deve-se ao facto de que para cada ensaio que é realizado, por norma, são efetuados em triplicado de forma a garantir a reprodutibilidade da experiência. Para garantir que as células eram suficientes para a realização do ensaio, era retirada um pequeno volume da suspensão celular, cerca de 10 μ L e era adicionado a uma câmara de *Neubauer*, onde era colocada uma lamela posteriormente por cima. Terminado este processo, a câmara de *Neubauer* era observada ao microscópio e procedia-se à contagem das células. A câmara de *Neubauer* tem a particularidade de estar dividida em dois lados, tendo cada um dos lados um nova divisão, uma cruz, que faz a divisão por quadrante (Jayme Garcia Arnal Barbedo, 2013). No processo de contagem é necessário ter-se muita atenção de forma a evitar a contagem em duplicado das células. São também escolhidos dois lados do quadrante em que se contam as células no limite do campo sendo que nos outros lados essa contagem não é feita.

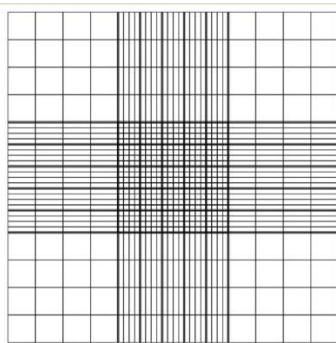


Figura 8 - Vista ao microscópio da zona de contagem da câmara de Neubauer, Reproduzido de (Jayme Garcia Arnal Barbedo, 2013)

3.1.3. Passagem Celular

Os reagentes utilizados na experiência foram o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), proveniente da *Biowest*, a tripsina da *Sigma*, o verseno preparado em laboratório, o dimetilsulfóxido (DMSO), o etanol, o ácido acético, o cristal de violeta (CV) e a cisplatina da *Sigma*. Os reagentes eram utilizados na câmara de fluxo laminar e todo o material encontrava-se esterilizado para não ocorrer qualquer tipo de contaminação.

As células eram mantidas habitualmente em frascos de cultura T₂₅, sendo que

apenas previamente aos ensaios do cristal de violeta (CV) é que se utilizavam os T₇₅, de modo a garantir-se o número de células suficiente. As células encontravam-se aderidas ao frasco T₂₅, sendo que antes de se proceder à remoção do mesmo com a tripsina, realizava-se o processo de lavagem das células com verseno, cerca de 1 mL. De seguida, adicionava-se 500 µL de tripsina e deixava-se atuar durante cerca de 3 minutos. Normalmente no passo da tripsina a espera é feita na incubadora a 37 °C para garantir que as células se destacam mais facilmente. Após este período de espera, colocávamos 5 mL de meio de cultura num novo frasco de cultura e adicionávamos 1,5 mL ao frasco que continha as células que iríamos transferir. Posto isto, faltava apenas transferir o volume de suspensão celular para a passagem das células.

Para os cálculos da quantidade a transferir, tivemos por base a observação microscópica, de maneira a perceber a confluência em que as células se encontravam. Utilizámos a seguinte fórmula, $\frac{2}{2d}$ em que o número 2 aparece proveniente dos 2 mL, provenientes do remanescente que fica no frasco para a passagem celular, e o d , representação dos dias até à próxima passagem.

3.2. Ensaio de Viabilidade – Ensaio do Cristal Violeta

O ensaio que foi utilizado para a avaliação do impacto do composto na viabilidade celular foi o ensaio do cristal violeta (CV). Este teste avalia a biomassa celular através da espectrofotometria, sendo que uma maior absorvância indica uma maior presença de células, e consequentemente menor toxicidade (Feoktistova et al., 2016). O ensaio foi realizado em placas de cultura de 96 poços.

No decorrer do primeiro ensaio, no qual foi estudado o impacto da quercetina isoladamente, utilizou-se como controlo negativo o PBS e como controlo positivo (uma substância que sabemos que provoca a morte celular) DMSO 5% . Para além destes, foram preparadas diversas concentrações de quercetina, para testar e avaliar o seu potencial efeito sobre a viabilidade celular. Usaram-se as seguintes concentrações 1,5; 2,5; 5; 7,5 e 10 µM, sendo que foram sempre utilizados replicados internos, de forma a garantir que não ocorriam quaisquer tipos de erros na pipetagem ou o esquecimento de adicionar um dos compostos a um poço, por exemplo. Neste primeiro ensaio foram realizados oito replicados internos, usando-se uma coluna da placa, para cada composto. Para além dos replicados internos, idealmente os ensaios

ocorrem com um mínimo de triplicado, tendo apenas sido possível realizar um duplicado no decorrer desta experiência.

Para a preparação das placas é necessário ocorrer o *seeding* das células, sendo que, após este processo a placa fica em repouso na incubadora, onde o CO₂ e a temperatura são controlados durante 24h. Depois disso, são adicionados os diversos compostos e os controlos, sendo que este passo pode ocorrer em diferentes tempos de exposição. No ensaio realizado, as células foram expostas durante 24h. Após o tempo de exposição, é feita a lavagem das placas, com remoção dos compostos e realizado o ensaio do cristal violeta (CV). Posteriormente a esta coloração, faz-se a leitura das placas num espectrofotómetro para leitura de placas e analisa-se os resultados obtidos. A leitura da absorvância dos poços no espectrofotómetro foi realizada no equipamento *Synergy HTX* da *BioTek*, este equipamento efetua inicialmente uma agitação da placa. Os poços com maior absorvância correspondem a uma maior viabilidade celular. Após terminar a leitura, os valores obtidos foram inseridos no software *Excel*, que possibilitou o tratamento dos resultados obtidos.

A análise foi feita do seguinte modo, primeiramente removeu-se o valor do branco (ácido acético) e depois calcularam-se a média e o desvio padrão. Procedendo de seguida à criação de gráficos que demonstram a percentagem de sobrevivência celular obtida após exposição aos compostos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SOLVENTE	Q1	Q2,5	Q5	Q7,5	Q10	SOLVENTE	-	-	-	SOLVENTE	CONTROLO +
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 9 - Esquema representativo da placa de 96 poços e dos compostos adicionados, no primeiro ensaio.

Após a realização da primeira experiência com quercetina e DMSO 5%, procedeu-se à realização de um novo ensaio, desta vez com quercetina 10 µM, DMSO 5% e cisplatina 25 µM. Para termo de comparação, o decorrer da experiência procedeu-se da mesma forma que a anterior, em placas de 96 poços, descartando-se os poços mais

externos.

Assim sendo, procedeu-se à utilização dos compostos de igual forma à 1ª experiência, tendo apenas sido alterada a concentração de quercetina que passou a ser unicamente de 10 µM. Utilizou-se também um novo composto, a cisplatina a 25 µM e uma combinação de quercetina 10 µM com cisplatina 25 µM. Este ensaio foi realizado com quatro replicados internos e efetuado em triplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		DMSO 5 %	Control Negativo DMSO 0.5 % PBS	Quercetina 10 µM									
B													
C													
D													
E		CIS. 25 µM	Controlo Negativo DMSO 0.5 % PBS	Quercetina 10 µM Cisplatina 25 µM									
F													
G													
H													

Figura 10 - Esquema representativo da placa de 96 poços e dos compostos adicionados, no segundo ensaio.

De seguida (Figura 10) é apresentado um esquema representativo do que foi efetuado em casa ensaio, identificando os compostos e as concentrações estudadas.

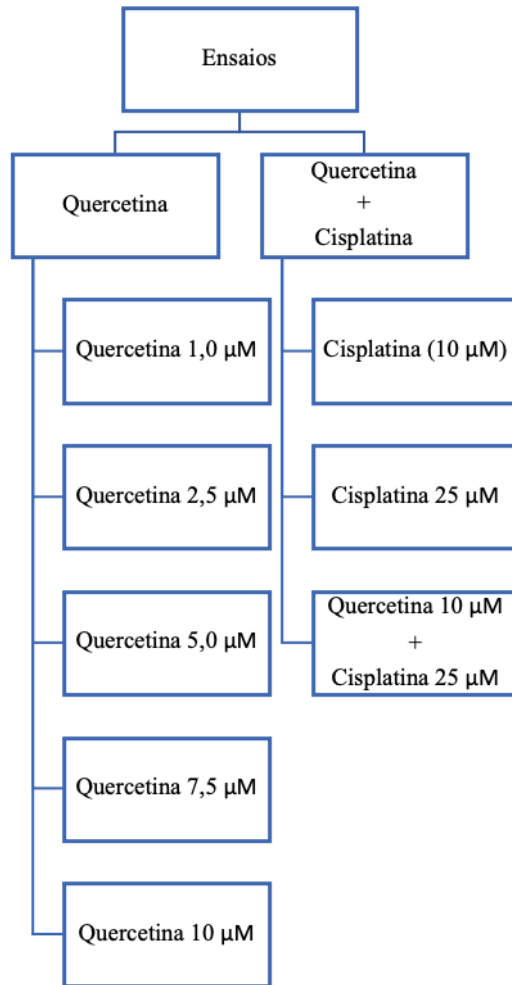


Figura 11 – Esquema representativo dos ensaios realizados: à esquerda as concentrações trabalhadas da 1ª experiência e à direita a 2ª experiência

3.2.1. Ensaio do Cristal Violeta (CV):

Após inoculação das células e da incubação destas com os compostos em estudo (24/48 horas), realizou-se o protocolo do CV, que apresenta as seguintes etapas:

1. Colocar PBS 1X 37 °C e etanol 96% no frigorífico
2. Verter a placa de 96 poços sobre papel absorvente cuidadosamente
3. Lavar com PBS 1X (~3 gotas) cada poço
4. Verter a placa novamente sobre papel absorvente cuidadosamente
5. Retirar o excesso de PBS 1X
6. Adicionar 100 µL de etanol 96% frio a cada poço
7. Incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente
8. Verter a placa novamente sobre papel absorvente
9. Deixar a placa secar completamente
10. Adicionar 100 µL de solução de cristal violeta 0,1% em 10% de etanol
11. Incubar 5 minutos à temperatura ambiente
12. Verter a placa novamente sobre papel absorvente
13. Imergir a placa várias vezes em água até remover o excesso de cristal violeta
14. Verter a placa novamente sobre papel absorvente
15. Deixar a placa secar totalmente (~15 min)
16. Adicionar 200 µL ácido acético 1% em 96% de etanol a cada poço
17. Ressuspender várias vezes cuidadosamente
18. Ler a absorvância a 595 nm

3.3. Resultados e Discussão

Os ensaios de viabilidade foram realizados utilizando o ensaio do cristal violeta (CV), através deste método foram obtidos os resultados de viabilidade celular das concentrações de quercetina estudadas (1,5-10 μM). Os resultados obtidos de viabilidade celular foram de aproximadamente 100% para todas as concentrações estudadas. Estes podem ser observados através das Tabelas 2 e 3, juntamente com as Figuras 12, 13 e 14. Os valores elevados de viabilidade celular, indicam que nas concentrações testadas durante o período em que decorreu o ensaio (24 horas) não ocorreu morte celular.

Os resultados obtidos divergiram com alguns resultados descritos na literatura, onde foi descrita morte celular com a utilização da quercetina. No entanto, nessas experiências, as linhas celulares utilizadas foram HCT-15 e RKO, e para além disso, utilizaram-se concentrações diferentes, compreendidas entre 5 e 300 μM e um período de exposição entre as 24 e 120 h, dependendo da concentração estudada (Reyes-Farias & Carrasco-Pozo, 2019).

Tabela 2 - Tabela de viabilidade celular (%) para as diferentes concentrações de quercetina estudadas, 1ºEnsaio - Experiência 1)

Quercetina [μM]	Viabilidade (%)	DP %
0,0	100,00	-
1,0	100,96	0,68
2,5	103,61	2,56
5,0	103,38	2,39
7,5	102,62	1,85
10,0	105,69	4,02

A tabela anterior (Tabela 2), tem os resultados obtidos no primeiro ensaio da experiência 1, sendo possível verificar que a viabilidade celular se situou sempre perto de 100 %, o que não reflete uma eficácia deste composto durante o período das 24h a que as células foram expostas. De seguida, na Figura 11 podemos observar o gráfico correspondente aos resultados desta tabela.

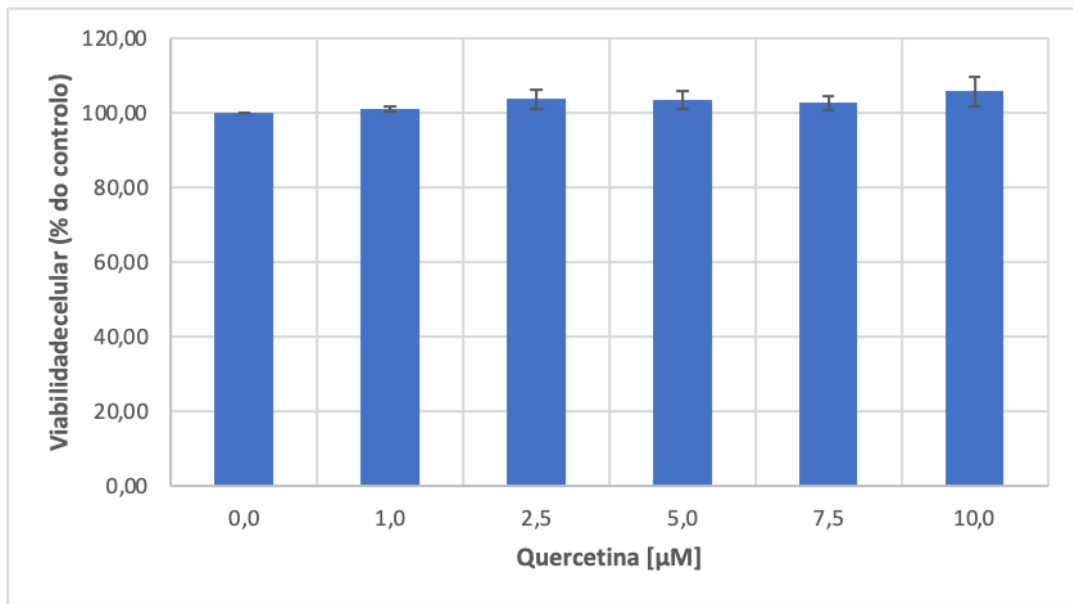


Figura 12 - Gráfico referente à viabilidade celular (%) das diferentes concentrações de quercetina, método de CV, 24h de exposição, linha celular 786-O, 1º ensaio da experiência 1.

Esta experiência contou com mais um ensaio independente, no qual os resultados obtidos vão ser apresentados na tabela seguinte (Tabela 3), onde posteriormente foi transformado num gráfico para ser mais facilmente visualizado.

Tabela 3 - Tabela de viabilidade celular (%) às diferentes concentrações de quercetina estudadas, 2ºEnsaio - Experiência 1).

Quercetina [µM]	Viabilidade (%)	DP %
0,0	100,00	-
1,0	98,08	1,36
2,5	109,51	6,72
5,0	107,32	5,18
7,5	116,75	11,84
10,0	114,20	10,04

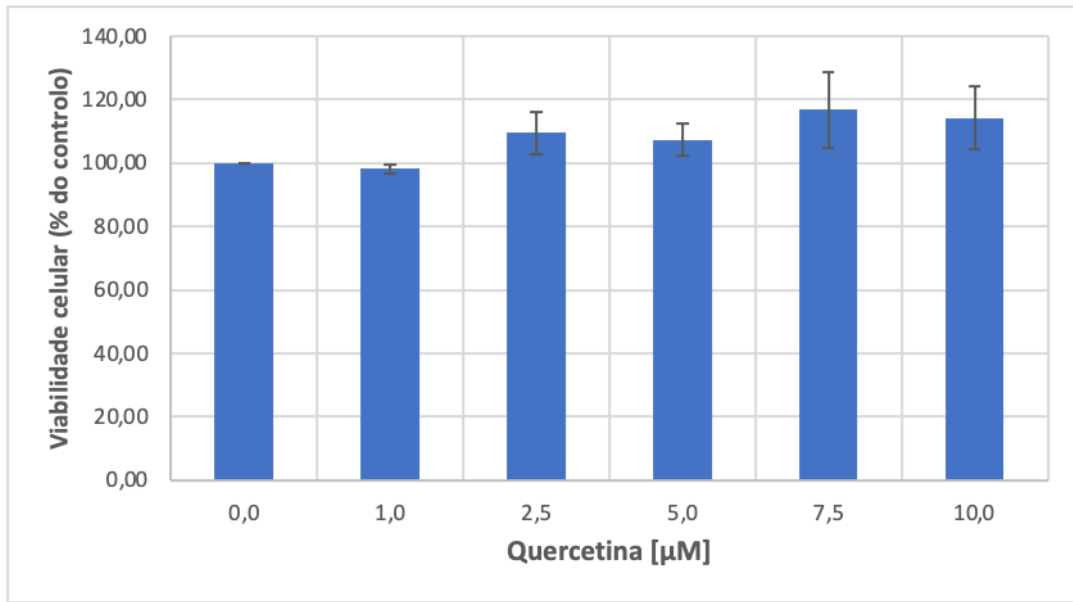


Figura 13 - Gráfico referente à viabilidade celular (%) das diferentes concentrações de quercetina, método de CV, 24h de exposição, linha celular 786-O, 2º ensaio da experiência 1.

Foi então possível fazer uma média dos resultados obtidos e assim construir um gráfico que demonstra a percentagem (%) de viabilidade celular obtida de cada concentração estudada do composto.

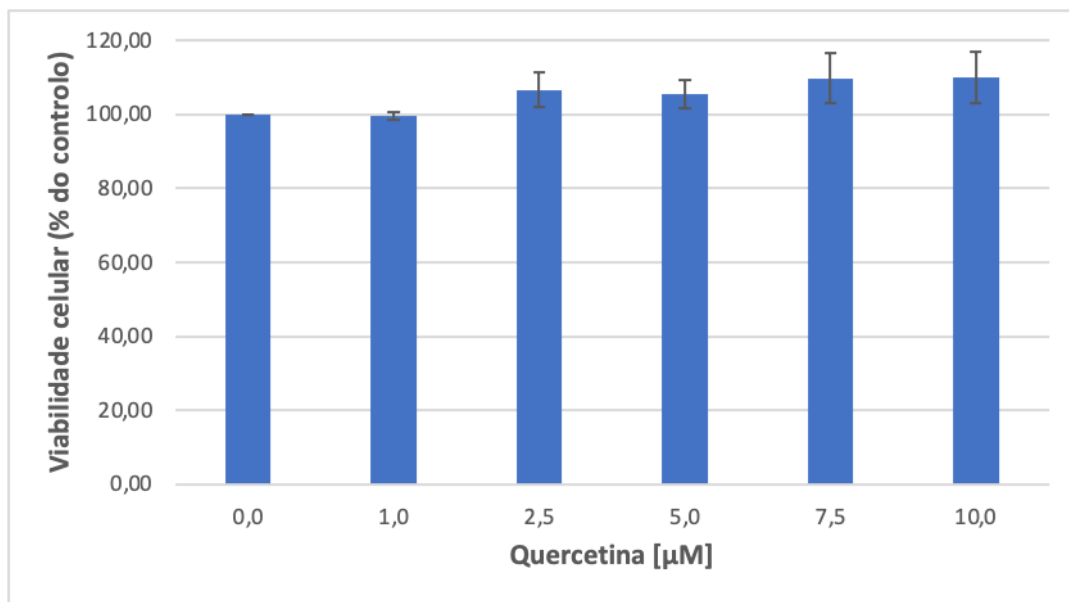


Figura 14 – Gráfico referente à média da viabilidade celular (%) das diferentes concentrações de quercetina, método de CV, 24h de exposição, linha celular 786-O, experiência 1.

Como podemos verificar, não ocorreu qualquer mudança significativa na viabilidade celular com o aumento das concentrações de quercetina, o que nos indica

que as concentrações não foram suficientes para causar um efeito citotóxico.

Para se observar um efeito anticancerígeno nas células renais seriam necessárias possivelmente concentrações mais elevadas ou um maior tempo de exposição à quercetina. Extrapolando estes resultados para a quercetina obtida pela dieta ou ingerida oralmente, são necessárias concentrações renais mais elevadas para se observar um potencial efeito antitumoral. É assim importante, obter os dados da farmacocinética deste composto, nomeadamente sobre a excreção urinária, assim como sobre os seus metabolitos e respetiva eliminação e concentração urinária. Segundo os dados disponíveis na literatura, para uma experiência em que foi administrada oralmente aos participantes quercetina, e se estudaram os seus níveis plasmáticos. A administração feita foi de 200 mg de quercetina, sendo que a concentração plasmática após a administração passou para 1 $\mu\text{mol/L}$ e só ao fim de 2 horas é que teve um aumento para 3,54 $\mu\text{mol/L}$ (Phenol-Explorer Database on polyphenol content in food, 2020). Outros dados disponíveis na literatura, referem que a quercetina é um composto fitoquímico que se encontra presente através da ingestão de alimentos, como referido até aqui. O que os autores do artigo “*Quercetin: a natural compound for ovarian cancer treatment*” demonstram, são resultados «*in vivo*» e «*in vitro*» de como a quercetina se comporta em células de cancro do ovário. Os resultados obtidos foram bastante interessantes, por exemplo com a administração de 80 mg/kg duas vezes por semana, modelo «*in vivo*», promoveu a apoptose, através de diferentes mecanismos e vias celulares. Quanto ao modelo «*in vitro*», com 10 μM de quercetina, conseguiu-se aumentar a atividade TGF beta 1, sendo que esta proteína pode induzir a apoptose (Shafabakhsh & Asemi, 2019). Assim, consegue-se verificar algumas das características benéficas que podem resultar através da utilização da quercetina.

Noutros dados disponíveis na literatura, é demonstrado que a quercetina também pode ser utilizada em conjugação com um outro antineoplásico, uma vez que a mesma, devido aos seus efeitos antioxidantes, consegue realizar uma proteção para que não ocorra nefrotoxicidade (Sánchez-González et al., 2017). A quercetina é dos flavonóides mais importantes na dieta humana devido aos efeitos descritos como sinalização celular, efeitos pró-apoptóticos, anti-proliferativos, antioxidantes e supressão do crescimento. (Brito et al., 2015).

É possível observar-se na literatura duas abordagens diferentes para a utilização e

o estudo da quercetina, uma relacionada com o aporte nutricional através da ingestão ou administração do composto em níveis encontrados habitualmente nas fontes alimentares e a outra com uma abordagem farmacológica, usando-se concentrações mais elevadas de quercetina.

Na etapa seguinte do trabalho experimental, estudou-se o impacto da combinação da quercetina com cisplatina, agente antitumoral amplamente utilizado. Para o ensaio utilizaram-se diferentes compostos e concentrações, como ilustrado no seguinte esquema (Figura 15). A quercetina testou-se à concentração 10 μM , a cisplatina isoladamente (25 μM) e uma combinação de quercetina 10 μM com cisplatina 25 μM . Todos os compostos foram testados com 4 replicados e as células foram expostas durante 48h.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		DMSO 5 %	Controlo Negativo DMSO 0.5 % PBS	Quercetina 10 μM	-	-	-	Controlo Negativo DMSO 0.5 % PBS				
B												
C												
D												
E		Cisplatina 25 μM	Controlo Negativo DMSO 0.5 % PBS	Quercetina 10 μM Cisplatina 25 μM	-	-	-	Cisplatina 25 μM				
F												
G												
H												

Figura 15 - Esquema representativo da placa de 96 poços e dos compostos adicionados, no segundo ensaio.

As placas foram previamente analisadas no espectrofotómetro e os seus dados passados para o *Excel*. Depois foram realizados todos os cálculos necessários, tais como as médias obtidas para cada ensaio e a respetiva média feita dos três ensaios realizados. Através destes resultados foi possível obter a viabilidade dos compostos por comparação com o controlo, tendo sido expressos os valores e a percentagem (%) obtidos, o mesmo pode ser observado em seguida na Figura 15.

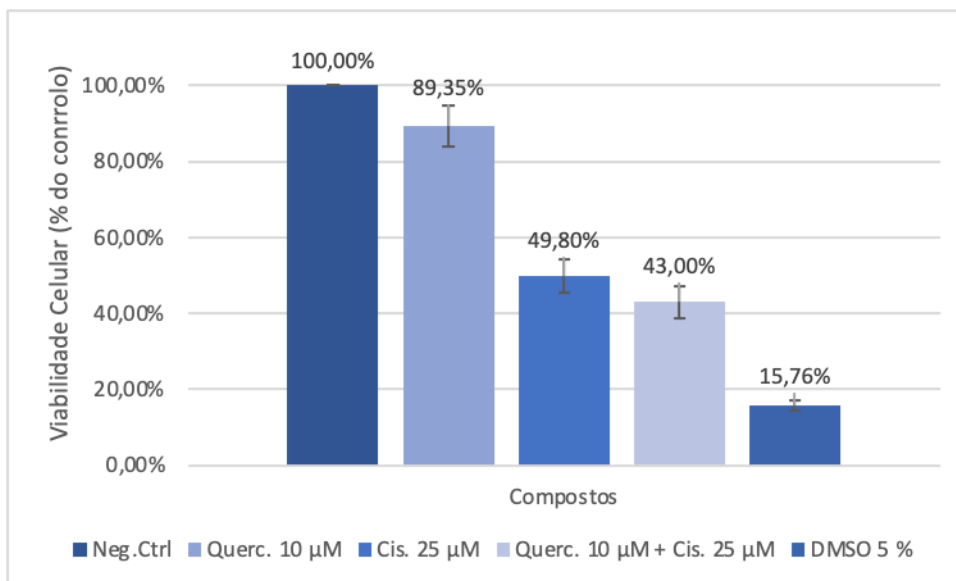


Figura 16 – Gráfico referente à viabilidade celular (%) dos compostos utilizados, método de CV, 24h de exposição, linha celular 786-O, experiência 2.

Através da observação do gráfico anterior (Figura 16), é possível verificar os valores de viabilidade obtidos, tendo sido para a quercetina enquanto composto isolado, registada uma viabilidade celular de aproximadamente 90 % e para a cisplatina isolada de aproximadamente 50 %. É possível também observar, que ao associar os dois compostos, a quercetina e a cisplatina, ocorreu uma diminuição da viabilidade celular para cerca de 43 %, um valor semelhante ao observado para a exposição à cisplatina isoladamente.

Na literatura, encontram-se publicados resultados sobre a associação de diferentes compostos fenólicos. Num estudo realizado por Rauf et al, utilizando o modelo deste estudo (a linha celular de 786-O) e uma associação (1:1) de quercetina e do seu metabolito ativo hiperosídeo, conduziu a uma diminuição de 2,25 vezes das espécies reativas de oxigénio (ROS) e um aumento de cerca de 3 vezes da capacidade antioxidante nas mesmas células (Rauf et al., 2018). Este facto, levanta a possibilidade de se considerar futuramente, não só o estudo da atividade dos metabolitos da quercetina, mas também a associação da quercetina com outros compostos bioativos, nomeadamente polifenólicos.

Para além da possibilidade de um efeito anticancerígeno a quercetina tem a capacidade antioxidante podendo, desta forma ter efeitos protetores para células não tumorais, através de uma ação antioxidante, contribuindo assim para uma redução da

nefrotoxicidade.

Os resultados obtidos com a realização destas duas experiências não demonstraram a atividade anticancerígena da quercetina como se encontrava descrita na literatura. Estes resultados podem ser justificados por se ter trabalhado com uma concentração menor da quercetina, ou então por se ter estudado um menor tempo de exposição celular ao composto.

4. Conclusão

Com a realização desta dissertação conclui-se que o cancro tem vindo cada vez mais a tomar proporções maiores, afetando assim a vida de milhares de pessoas todos os anos. Em particular o cancro renal, que tem tido uma incidência maior ao longo destes últimos anos, tendo desta forma obtido um lugar de destaque em comparação com outros tipos de cancro.

O tratamento para o cancro tem cada vez mais vindo a ser estudado, de forma que os doentes consigam ter uma maior taxa de sobrevida. Os tratamentos são dependentes do estadio em que a doença se encontra, podendo incluir quimioterapia, radioterapia ou cirurgia, com ablação do tumor.

Como novas abordagens ao tratamento, têm vindo a ser estudados compostos bioativos, onde se inclui a quercetina. Estes compostos estão presentes na nossa dieta e em certas concentrações conseguem obter resultados benéficos para o combate desta doença. Foi também reportado, em inúmeros estudos os benefícios da ingestão destes compostos, pois os mesmos detêm propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas.

De forma a obter mais dados sobre as propriedades benéficas dos polifenóis e em particular da quercetina, foi realizada uma revisão da literatura, bem como a realização de ensaios experimentais para avaliar o seu potencial antitumoral num modelo de carcinoma renal humano. A quercetina, nas condições experimentais estudadas não demonstrou atividade antitumoral. No entanto, este trabalho poderá ter relevância para a comunidade científica, pois com a divulgação destes mesmos dados, tanto as concentrações trabalhadas, será possível que outros investigadores continuem o trabalho começado e obtenham novos dados e que todos estes resultados obtidos consigam trazer uma nova visão para o tratamento do cancro.

5. Referências Bibliográficas

- 786-O [786-0] | ATCC. (2022, fevereiro 21). <https://www.atcc.org/products/crl-1932#detailed-product-information>
- Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324–1337. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>
- Almeida, A. F., Borge, G. I. A., Piskula, M., Tudose, A., Tudoreanu, L., Valentová, K., Williamson, G., & Santos, C. N. (2018). Bioavailability of Quercetin in Humans with a Focus on Interindividual Variation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 714–731. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12342>
- American Cancer Society. (2021, novembro 08). *Key Statistics About Kidney Cancer*. ABOUT KIDNEY CANCER. <https://www.cancer.org/cancer/kidney-cancer/about/key-statistics.html>
- Biohippo. (2021). *786-O Cell line*. <https://www.ebiohippo.com/en/cell-lines/human-kidney-carcinoma-cell-line-786-o-bhc11100042.html>
- Brito, A., Ribeiro, M., Abrantes, A., Pires, A., Teixeira, R., Tralhao, J., & Botelho, M. (2015). Quercetin in Cancer Treatment, Alone or in Combination with Conventional Therapeutics? *Current Medicinal Chemistry*, 22(26), 3025–3039. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150812145435>
- Cancro, L. P. C. o. (2021a, outubro 18). *História Familiar de Cancro*. <https://www.ligacontracancro.pt/genetica/>
- Cancro, L. P. C. o. (2021b, outubro 18). *O que é o Cancro?* <https://www.ligacontracancro.pt/o-que-e-o-cancro/>
- Cancro, L. P. contra o. (2022, janeiro 17). *MÉTODOS DE TRATAMENTO*. Cancro Renal. <https://www.ligacontracancro.pt/cancro-do-rim-metodos-de-tratamento/>
- Carvalho, A., & Fernandes, I. (2011). *Cancro do rim*. <https://hmsportugal.wordpress.com/2011/11/01/cancro-do-rim/>
- Escudier, B., Porta, C., Schmidinger, M., Rioux-Leclercq, N., Bex, A., Khoo, V., Grünwald, V., Gillessen, S., & Horwich, A. (2019). Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 30(5), 706–720. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz056>
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353–364.

[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80108-7)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation.

Cell, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Heeba, G. H., & Mahmoud, M. E. (2014). Dual effects of quercetin in doxorubicin-

induced nephrotoxicity in rats and its modulation of the cytotoxic activity of

doxorubicin on human carcinoma cells. *Environmental Toxicology*, 165(April),

n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/tox.22075>

Henriques Círico, D. (2022, January 17). *Compostos Bioativos para uma Alimentação*

Saudável | Growth Blog. [https://blog.gsuplementos.com.br/o-nome-dado-a-essas-](https://blog.gsuplementos.com.br/o-nome-dado-a-essas-maravilhas-e-compostos-bioativos-voce-conhece/)

[maravilhas-e-compostos-bioativos-voce-conhece/](https://blog.gsuplementos.com.br/o-nome-dado-a-essas-maravilhas-e-compostos-bioativos-voce-conhece/)

Índice.EU. (2021). *Cisplatina*. Índice EU - Toda a Saúde.

<https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/cisplatina/informacao-geral>

Jaime R Merchan, MD, MMScKenar D Jhaveri, Mde. (2021). *Chemotherapy*

nephrotoxicity and dose modification in patients with kidney impairment:

Conventional cytotoxic agents. UpToDate.

[https://www.uptodate.com/contents/chemotherapy-nephrotoxicity-and-dose-](https://www.uptodate.com/contents/chemotherapy-nephrotoxicity-and-dose-modification-in-patients-with-kidney-impairment-conventional-cytotoxic-agents?search=cisplatina&topicRef=7231&source=see_link#H3902995358)

[modification-in-patients-with-kidney-impairment-conventional-cytotoxic-](https://www.uptodate.com/contents/chemotherapy-nephrotoxicity-and-dose-modification-in-patients-with-kidney-impairment-conventional-cytotoxic-agents?search=cisplatina&topicRef=7231&source=see_link#H3902995358)

[agents?search=cisplatina&topicRef=7231&source=see_link#H3902995358](https://www.uptodate.com/contents/chemotherapy-nephrotoxicity-and-dose-modification-in-patients-with-kidney-impairment-conventional-cytotoxic-agents?search=cisplatina&topicRef=7231&source=see_link#H3902995358)

Jayme Garcia Arnal Barbedo. (2013). *Automatic Object Counting In Neubauer*

Chambers. <https://doi.org/10.14209/sbrt.2013.34>

Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids

as Anticancer Agents. *Nutrients*, 12(2), 457. <https://doi.org/10.3390/nu12020457>

Kris Maes. (2019). *Cancro do rim: como combater?No Title*. Hospital Luz.

[https://www.hospitaldaluz.pt/pt/guia-de-saude/dicionario-de-saude/C/74/cancro-](https://www.hospitaldaluz.pt/pt/guia-de-saude/dicionario-de-saude/C/74/cancro-rim-como-combater)

[rim-como-combater](https://www.hospitaldaluz.pt/pt/guia-de-saude/dicionario-de-saude/C/74/cancro-rim-como-combater)

Michael B Atkins, M. (2021). *Clinical manifestations, evaluation, and staging of renal*

cell carcinoma. UpToDate. [https://www.uptodate.com/contents/clinical-](https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-evaluation-and-staging-of-renal-cell-carcinoma?search=cancro)

[manifestations-evaluation-and-staging-of-renal-cell-carcinoma?search=cancro](https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-evaluation-and-staging-of-renal-cell-carcinoma?search=cancro)

[renal&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_r](https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-evaluation-and-staging-of-renal-cell-carcinoma?search=cancro)

[ank=1](https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-evaluation-and-staging-of-renal-cell-carcinoma?search=cancro)

Murakami, A., Ashida, H., & Terao, J. (2008). Multitargeted cancer prevention by

quercetin. *Cancer Letters*, 269(2), 315–325.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.046>

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. (2020). *PubChem*

- Quercetin*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343>
- Patel, A. (2020). Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncology*, 6(9), 1488.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2592>
- Phenol-Explorer Database on polyphenol content in food. (2020). *Phenol-Explorer*.
<http://phenol-explorer.eu/compounds/291>
- Powles, T. (2021). Recent eUpdate to the ESMO Clinical Practice Guidelines on renal cell carcinoma on cabozantinib and nivolumab for first-line clear cell renal cancer. *Annals of Oncology*, 32(3), 422–423. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.11.016>
- Rauf, A., Imran, M., Khan, I. A., Ur-Rehman, M., Gilani, S. A., Mehmood, Z., & Mubarak, M. S. (2018). Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32(11), 2109–2130.
<https://doi.org/10.1002/ptr.6155>
- Renal Cancer*. (2021, setembro 28). EviQ.
<https://www.eviq.org.au/search?searchtext=renal>
- Reyes-Farias, M., & Carrasco-Pozo, C. (2019). The Anti-Cancer Effect of Quercetin: Molecular Implications in Cancer Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3177. <https://doi.org/10.3390/ijms20133177>
- Santos, D. I., Saraiva, J. M. A., Vicente, A. A., & Moldão-Martins, M. (2019). Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients. In *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds* (pp. 23–54). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814174-8.00002-0>
- Sendão, M. C. (2008). *FLAVONÓIDE QUERCETINA : ASPECTOS GERAIS E*.
February 2015.
- Shafabakhsh, R., & Asemi, Z. (2019). Quercetin: a natural compound for ovarian cancer treatment. *Journal of Ovarian Research*, 12(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0530-4>
- SNS24, G. (2021a, novembro 14). *Cancro*. <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/cancro/#sec-2>
- SNS24, G. (2021b, novembro 14). *Fatores de risco para o cancro*.
<https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/fatores-de-risco-para-o-cancro/#sec-1>
- Statistics, P. (INE). (2021, novembro 20). *Número de casos de Cancro*. INE 2019.
https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCo

d=0008281&selTab=tab0&xlang=pt

Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (2010). AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research*, 70(14), 5649–5669.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>

Telstar. (2022). *Cabina de fluxo de ar laminar vertical - Telstar®*.

<https://www.telstar.com/pt-br/equipamento-para-laboratorios-de-ciencias-da-vida-e-hospitais/cabinas-de-fluxo-de-ar-laminar/cabina-de-fluxo-de-ar-laminar-vertical/>