

EFEITOS POTENCIAIS DOS FLAVONOIDES CÍTRICOS HESPERIDINA E SUA AGLICONA HESPERETINA EM LINHAGEM CELULAR LEUCÊMICA

*POTENTIAL EFFECTS OF CITRUS FLAVONOIDS HESPERIDIN AND ITS AGLYCON
HESPERINE ON LEUKEMIC CELL LINE*

ROCHA, Isabella Charaba;¹; RODRIGUES, Jaqueline¹; ALVAREZ, Marisa Claudia de Prax²

¹ Graduanda do curso de Biomedicina da Universidade São Francisco; ² Professora Doutora do
Curso de Biomedicina da Universidade São Francisco;

marisa.prax@usf.edu.br

RESUMO: A leucemia é uma doença que afeta as células sanguíneas, em especial os glóbulos brancos. A doença causa diversos problemas na vida do paciente, como comprometimento do sistema imunológico, complicações ósseas e impacto na qualidade de vida, seu tratamento pode ser complexo e apresentar diversos efeitos colaterais, muitas vezes até levar a pessoa a óbito. As células sanguíneas na medula óssea começam a se multiplicar de forma anormal e descontrolada. Foi comprovado que os flavonóides Hesperidina e Hesperetina têm efeito antioxidante que auxiliam a combater danos oxidativos nas células, sendo associados com diversas patologias, incluindo o câncer. Estudos mostram que os compostos citados auxiliam na inibição da proliferação de células tumorais, sendo uma alternativa para o tratamento da leucemia. Para avaliar os efeitos dos compostos nas células leucêmicas, foram utilizadas técnicas como MTT, Avaliação de Apoptose por Citometria de Fluxo, Ciclo Celular e Avaliação da Produção de ROS e NO. Concluiu-se que os estudos preliminares sugerem que esses compostos têm a capacidade de reduzir a viabilidade celular, induzir a apoptose, aumentar a produção de óxido nítrico e interromper o ciclo celular.

Palavras-chave: Leucemia; compostos naturais; flavonóide; hesperidina; hesperetina.

ABSTRACT. Leukemia is a disease that affects blood cells, especially white blood cells. The condition causes several issues in the patient's life, such as compromising the immune system, bone complications, and impacting the quality of life. Its treatment can be complex and present various side effects, often leading to the individual's demise. Blood cells in the bone marrow begin to multiply abnormally and uncontrollably. It has been proven that the flavonoids Hesperidin and Hesperetin have antioxidant effects that help combat oxidative damage in cells, being associated with various pathologies, including cancer. Studies show that the mentioned compounds assist in inhibiting the proliferation of tumor cells, providing an alternative for leukemia treatment. To assess the effects of these compounds on leukemia cells, techniques such as MTT, Flow Cytometry Apoptosis Assessment, Cell Cycle, ROS, and NO Production Assessment were used. It was concluded that preliminary studies suggest that these compounds have the ability to reduce cell viability, induce apoptosis, increase nitric oxide production, and interrupt the cell cycle.

Keywords: Leukemia; natural compounds; flavonoid; hesperidin; hesperetin.



INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) (2022) “A leucemia é uma enfermidade maligna que afeta os glóbulos brancos e geralmente surge de causas desconhecidas. Sua principal característica é a proliferação excessiva de células doentes na medula óssea, resultando na substituição das células sanguíneas normais”. As leucemias agudas correspondem a neoplasias malignas de células hematopoéticas imaturas, enquanto as leucemias crônicas se caracterizam pela transformação de células hematopoéticas parcialmente maduras (NEMCOV; D’ALESSANDRO; REISZ, 2019).

O câncer é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo, e os tratamentos convencionais, como radioterapia e quimioterapia, muitas vezes acarretam efeitos adversos significativos na saúde dos pacientes. No entanto, os componentes bioativos presentes em produtos naturais desempenham um papel importante no manejo de doenças, intervindo na inibição e ativação de processos biológicos, tais como a inflamação e as moléculas de sinalização celular. Embora não possam substituir integralmente os medicamentos, esses produtos naturais podem ser utilizados de maneira eficaz como complementos ou terapias de suporte (HUSAIN; YOUSIF; ANWAR, 2023).

Vários são os fatores genéticos e ambientais que podem causar os cânceres, como tabagismo, dieta, radiação, sedentarismo, alimentação, etc. O estresse oxidativo também tem papel muito importante na fisiopatologia de diferentes tipos de cânceres, o seu desequilíbrio pode causar danos às células podendo causar a doença. (DEVI; RAJAVEL; NABAVI; SETZER; AHMADI; MANSOURI, 2015).

As células cancerígenas em seu estado proliferativo se dividem sem nenhuma restrição escapando assim da morte celular. (OLIVEIRA; SANTOS; FERNANDES, 2019).

Embora terapias com produtos naturais não substituam o tratamento medicinal, elas são muito eficazes como terapia de suporte a pacientes em tratamento ou manejo do câncer. (DEVI; RAJAVEL; NABAVI; SETZER; AHMADI; MANSOURI, 2015).

Os flavonóides constituem uma classe de compostos fitoquímicos de origem natural que apresentam propriedades terapêuticas, desempenhando um papel crucial na prevenção de uma variedade de condições patológicas (ORTIZ et al., 2022). Tanto a hesperidina (HD) quanto a hesperetina (HT) são tipos de flavonoides cítricos, reconhecidos por suas diversas atividades biológicas. A hesperidina é abundante em frutas cítricas. De maneira similar, a hesperetina, um metabólito da hesperidina, pode ser observada em uma ampla gama de materiais vegetais (Wdowiak et al., 2022).

Os flavonóides como a hesperidina tem importantes propriedades oxidantes, anti-inflamatórias, fator cardio preventivo e hepatoprotetoras (DEVI; RAJAVEL; NABAVI; SETZER; AHMADI; MANSOURI, 2015).

Este estudo tem como objetivo realizar testes envolvendo as flavonoides HD e sua aglicona HT em células de leucemia, uma vez que esses compostos possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, cardioprotetoras e hepatoprotetoras importantes.

METODOLOGIA

Esta pesquisa experimental abordou o impacto dos compostos naturais Hesperidina e Hesperetina em linhagens celulares leucêmicas, especificamente HL60 e K562, desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, Unicamp. Além das análises



experimentais, o estudo incluiu revisões bibliográficas utilizando plataformas como PubMed, Scielo e Lilacs, com palavras-chave como Leucemia, compostos naturais, flavonóide, hesperidina e hesperetina.

Ensaio de redução do MTT:

O procedimento de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) é uma abordagem colorimétrica que avalia de maneira indireta a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular (Ferreira; Vieira, 2020).

Para a condução do experimento, empregaram-se linhagens celulares humanas leucêmicas. Essas linhagens incluem HL60 e K562.

Foram realizadas a incubação das células em conjunto com os compostos Hesperidina e Hesperetina em uma placa de fundo redondo com 96 poços. O período de incubação foi de 24 e 48 horas.

Após o período de incubação, foi introduzido 10µl de MTT em cada poço. O MTT foi previamente diluído em PBS, com a proporção de 0,005g de MTT para cada 1ml de PBS. Posteriormente, as placas foram submetidas a uma nova incubação em uma estufa a 37°C, pelo período de 4 horas. Durante esse intervalo, ocorreu a redução do MTT para o Formazan, que se manifestou como uma coloração roxa.

Na sequência, foi adicionado 100µl da solução reveladora em cada poço. Essa solução consiste em uma mistura de HCL 0,1, água destilada e álcool isopropílico. Para a etapa final do experimento, a leitura dos resultados foi efetuada por meio de espectrofotometria em um leitor ELISA, com a medição realizada a um comprimento de onda de 570nm.

Avaliação da apoptose por citometria de fluxo:

Para realização desse experimento foram utilizados a Anexina V e o Iodeto de Propídio (PI). A Anexina V é usada para detectar células apoptóticas por sua capacidade de se ligar à fosfatidilserina, um marcador de apoptose quando está na camada externa da membrana plasmática. O PI é uma substância que apresenta a capacidade de intercalar-se em curtas sequências de bases nucleotídicas e de produzir uma coloração quando estimulada por um laser de argônio.

Para a condução deste estudo, foram utilizadas placas de 24 poços de fundo plano, na qual as células foram incubadas em conjunto com os compostos Hesperidina e Hesperetina. As linhagens celulares utilizadas serão HL60 e K562.

A incubação foi realizada em uma estufa com temperatura constante de 37°C, com duração de 24 e 48 horas, respectivamente. Ao término deste período, as células deverão ser transferidas para tubos apropriados para uso em citometria. Subsequentemente, será executada uma centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos, a fim de separar as células do meio de cultura. Esse processo resultou na formação de um pellet de células.

Na próxima etapa, o meio de cultura foi removido e os pellets celulares foram ressuspensos individualmente em 500µl de solução salina tamponada com fosfato (PBS) por tubo. Uma nova centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos foi realizada. O sobrenadante foi descartado, e os pellets foram novamente ressuspensos, desta vez em 200µl de Buffer de Ligação de Anexina V (1x) da BD Biosciences. Posteriormente, a cada tubo foi adicionado 0,5µl de Anexina V, seguido por uma incubação no escuro por 15 minutos.

Após a incubação, mais 100µl do mesmo buffer e 1µl de iodeto de propídio (PI) foram acrescentados a cada tubo. Ao finalizar a preparação das amostras, a leitura foi realizada no equipamento Calibur.



Ciclo Celular:

O experimento do ciclo celular é uma técnica que visa analisar e compreender as diferentes fases do ciclo de vida de uma célula, incluindo a fase de crescimento (G1), replicação do DNA (fase S), crescimento adicional (G2) e divisão celular (mitose ou meiose). Para realizar o experimento, as células são marcadas com substâncias que permitem a identificação das fases do ciclo. Isso ajuda a estudar como as células se dividem, regulam seu crescimento e respondem a estímulos externos.

Para condução deste experimento utilizaram-se os reagentes: PBS livre de cálcio e magnésio, Triton 100X, Solução de Iodeto de Propídio (PI, 50µg/mL), Etanol 95% e RNase (10µg/mL). As linhagens celulares utilizadas foram: HL60 e K562.

As células foram cultivadas em meio de cultura com 0,5% de SFB por 6 horas. Após esta etapa foi realizada uma centrifugação e as células foram plaquetadas em placas de 6 poços contendo meio de cultura suplementado com 10% de SFB e os compostos Hesperitina e Hesperidina nas concentrações de 1µM, 150µM e 800µM. Foram adicionadas 2×10^5 células por poço, e o cultivo foi mantido por 24 e 48 horas em estufa a 37°C.

As células foram lavadas duas vezes em PBS para garantir a remoção completa das proteínas do soro. Posteriormente, o pellet foi ressuspensos em 2 mL de PBS.

Em seguida, foram adicionados 900µL de etanol 70%. O período de incubação foi de, pelo menos, 30 minutos. Após esse tempo, as células foram lavadas duas vezes com 15 mL de PBS. Após a centrifugação, observou-se um pellet. O pellet foi então ressuspensionado em 400 µL de solução de tampão de Ciclo Celular (5µL Triton 100X; 1mL PI (50µg/mL); 50µL RNase (10µg/mL); 3,945µL PBS 1X).

As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Em seguida, foram levadas para leitura imediata, sem a necessidade de lavagem. A leitura foi realizada no equipamento Calibur.

Avaliação da Produção de ROS:

O ensaio fundamenta-se na difusão intracelular de DCFDA (diacetato de diclorofluoresceína), o qual é subsequentemente desacetilado por ésteres celulares para formar um composto não fluorescente. Este composto, por sua vez, sofre oxidação por espécies reativas de oxigênio, resultando em DCF (diclorofluoresceína), uma substância altamente fluorescente.

Para condução deste ensaio foi utilizado os reagentes DCFDA (Dichlorofluorescein diacetate), PBS e H₂O₂ 1mM - (9,8µL de H₂O₂ + 88,1µL de H₂O). As linhagens celulares utilizadas foram: HL60 e K562.

As células foram cultivadas em placas de 6 poços contendo meio de cultura suplementado SFB e os compostos Hesperitina e Hesperidina nas concentrações de 1µM, 150µM e 800µM. Foram adicionadas 2×10^5 células por poço, e o cultivo foi mantido por 24 e 48 horas em estufa a 37°C.

Após o tratamento, as células foram coletadas em um tubo de citometria. Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 1.500 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente, e descartou-se o sobrenadante. O pellet resultante foi ressuspensionado em 100 µL de PBS, e 0,5 µL de DCFDA a 10 mM foram adicionados a cada tubo. Observação: No tubo de controle positivo, também foram adicionados 10-50 µL de H₂O₂ a 1 mM (ajustado para cada tipo de célula). Após isso, os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos. Ao final do período de incubação, adicionou-se 200 µL de PBS, totalizando um volume final de 300 µL, e a amostra foi imediatamente adquirida no equipamento Calibur.



Avaliação de Produção de NO:

A diclorofluoresceína é um composto não fluorescente. Na presença de NO, é convertida a um composto fluorescente, o benzotriazol.

Para condução deste experimento foram utilizados os reagentes DAF-FM (Difluorofluorescein) e PBS. As linhagens celulares utilizadas foram: HL60 e K562.

As células foram cultivadas em placas de 6 poços contendo meio de cultura suplementado SFB e os compostos Hesperitina e Hesperidina nas concentrações de 1 μ M, 150 μ M e 800 μ M. Foram adicionadas 2x10⁵ células por poço, e o cultivo foi mantido por 24 e 48 horas em estufa a 37°C.

Após o tratamento, as células foram coletadas em tubos de citometria. Posteriormente, ocorreu uma centrifugação a 1.500 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado. O pellet resultante foi ressuspensão em 100 μ L de PBS, e 1 μ L da solução de trabalho de DAF-FM foi adicionado a cada tubo, resultando em uma concentração final de 2,5 μ M. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos.

Após o período de incubação, adicionou-se 2 mL de PBS, seguido de uma nova centrifugação a 1.500 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente, e o descarte do sobrenadante. Posteriormente, o pellet foi ressuspensão em 300 μ L de PBS, e aguardou-se de 15 a 30 minutos antes de adquirir a amostra. Esse período de espera permitiu a completa deesterificação intracelular do diacetato. A leitura dos resultados foi feita no equipamento Calibur.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células cancerígenas, têm a capacidade de se reproduzir sem restrição e de forma descontrolada, escapando assim da morte celular, o que é uma das principais características que as tornam perigosas (OLIVEIRA; SANTOS; FERNANDES. 2019).

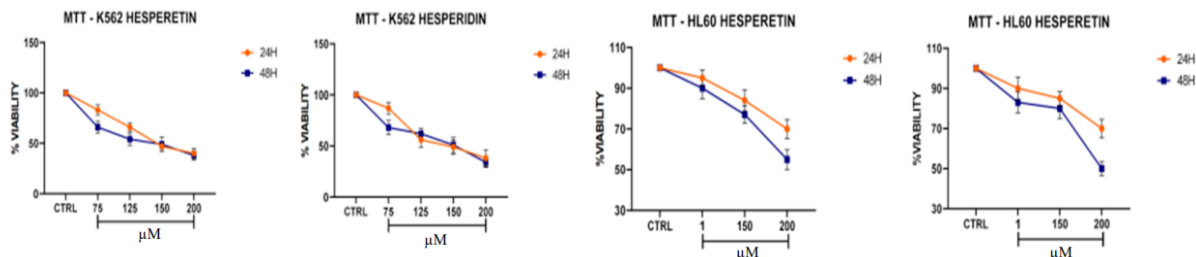
As flavanonas cítricas são compostos químicos encontrados em frutas cítricas. Esses compostos pertencem à classe dos flavonoides e têm sido estudados por seu potencial benefício à saúde, incluindo a possível atividade anticancerígena, elas também possuem ação antioxidante ajudando a neutralizar os radicais livres do organismo, ação quimiopreventiva que sugerem que as flavanonas ajudam a prevenir o desenvolvimento do câncer, ação anti-inflamatória, ação antiangiogênica e ação citostática e citotóxica, agindo assim impedindo o crescimento e a divisão de células cancerígenas (OLIVEIRA; SANTOS; FERNANDES. 2019).

Partindo deste princípio, ao analisar os resultados dos ensaios realizados durante a pesquisa foi possível identificar evidências promissoras que oferecem informações importantes para o âmbito da saúde.

O ensaio MTT foi utilizado para determinar se a hesperidina e a hesperetina eram citotóxicas para as linhagens celulares K562 e HL60. De acordo com os resultados, tanto a hesperidina quanto a hesperetina reduziram consideravelmente a viabilidade celular em comparação com o grupo de controle (fig. 1). Em 24 e 48 horas de tratamento, a IC₅₀ para HD e HT nas linhagens celulares K562 e HL60 foram de 150 μ M e 200 μ M, respectivamente.

Figura 1 - Ensaio MTT para a estimativa da viabilidade das células de leucemia HL-60 e K562 após o tratamento com Hesperidina e Hesperetina em concentrações indicadas.

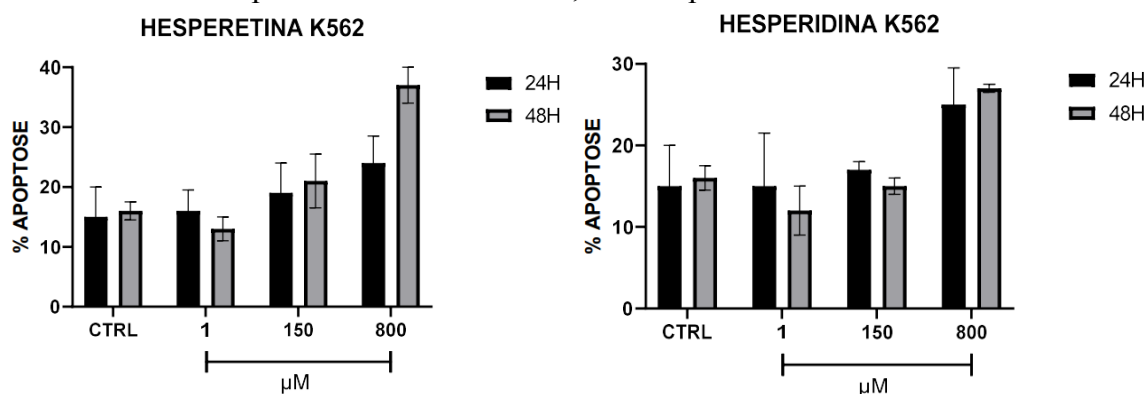




Fonte: O próprio autor.

Na avaliação de apoptose Ambos os compostos foram encontrados para induzir a morte celular programada em concentrações de 1 μM, 150 μM e 800 μM, ao longo de exposições de 24 e 48 horas (fig. 2), confirmado por análise de citometria de fluxo. Notavelmente, foi observado que tanto a Hesperidina quanto a Hesperetina induziram a apoptose, nas mesmas concentrações e durações de exposição. Esses resultados iniciais sugerem o potencial da Hesperidina e da Hesperetina como agentes eficazes na indução do processo de apoptose, o que justifica investigações adicionais.

Figura 2 - Hesperidina e Hesperetina desencadearam a apoptose na linhagem celular K562. Resultados dos compostos sob a célula K562, nos tempos de 24 e 48 horas.

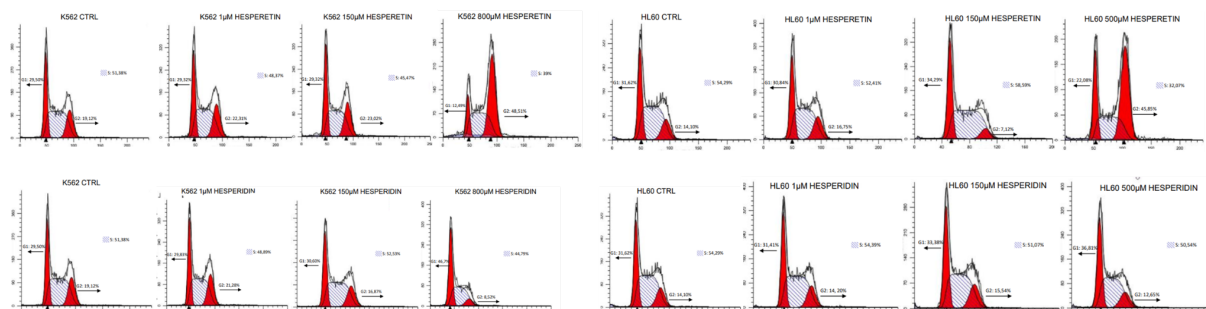


Fonte: O próprio autor.

A regulação precisa do ciclo celular é um passo importante na prevenção do câncer. De acordo com os resultados baseados na citometria de fluxo, HD e HT têm a capacidade de interromper o avanço do ciclo celular regular. Os resultados demonstraram que a Hesperetina induziu a parada do ciclo celular na fase G2/M em doses crescentes (fig. 3). Surpreendentemente, o tratamento com Hesperidina causou a parada do ciclo celular na fase G0/G1.

Figura 3 - Experimento ciclo celular. A análise foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o instrumento Calibur.

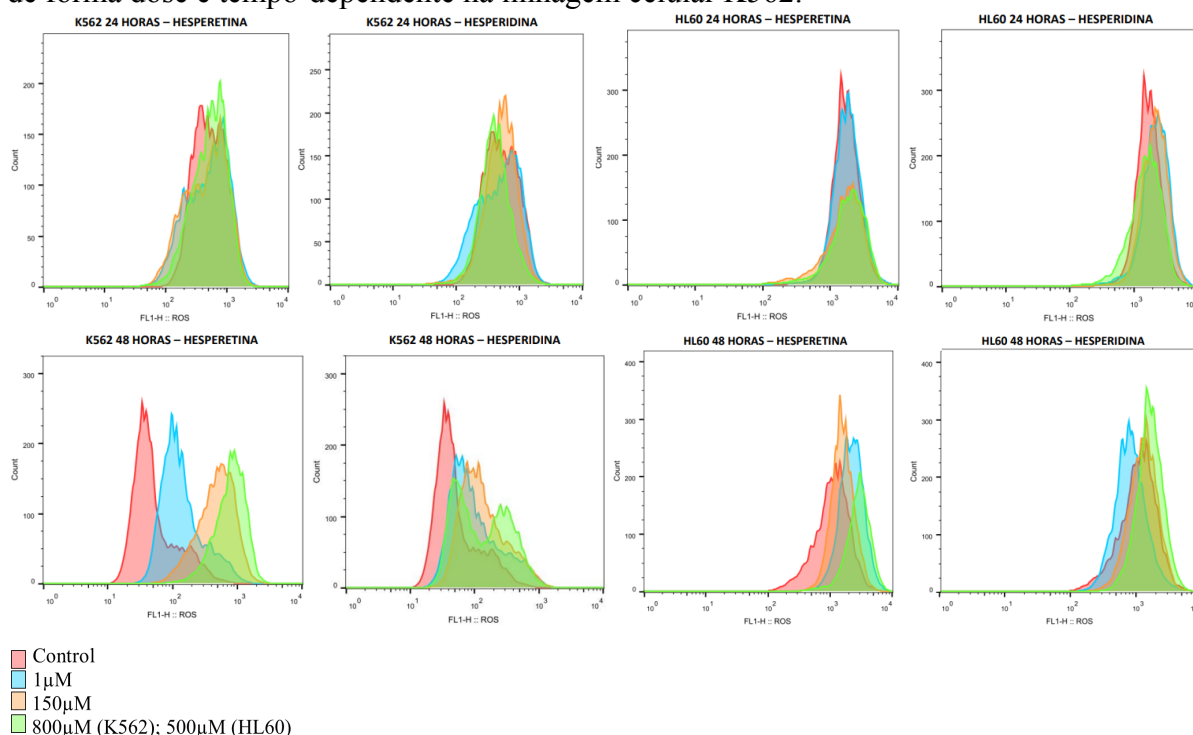




Fonte: O próprio autor.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas altamente ativas que se formam naturalmente em diversos processos celulares. Nas células tumorais, devido a um desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes, é comum a presença de níveis mais elevados de ROS em comparação com células saudáveis. No contexto do metabolismo celular, as ROS desempenham um papel ambivalente. Em concentrações baixas a moderadas, elas funcionam como sinais que estimulam a divisão celular, migração, invasão e formação de novos vasos sanguíneos. No entanto, quando os níveis de ROS atingem valores elevados, podem provocar danos em proteínas, ácidos nucleicos, lipídios, membranas e organelas, levando eventualmente à morte celular (NAKAMURA; TAKADA, 2021). A HT induziu ROS na linha celular K562. Essa produção aumentada foi dependente do tempo e da dose. Nenhum impacto na produção de ROS foi observado na linha celular HL60 (fig. 4). As células foram tratadas com 1, 150, 500 ou 800 μM de Hesperetina ou Hesperidina. Os dados são apresentados como uma mudança relativa (FC) em relação ao controle.

Figura 4 - ROS. A hesperetina aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) de forma dose e tempo-dependente na linhagem celular K562.



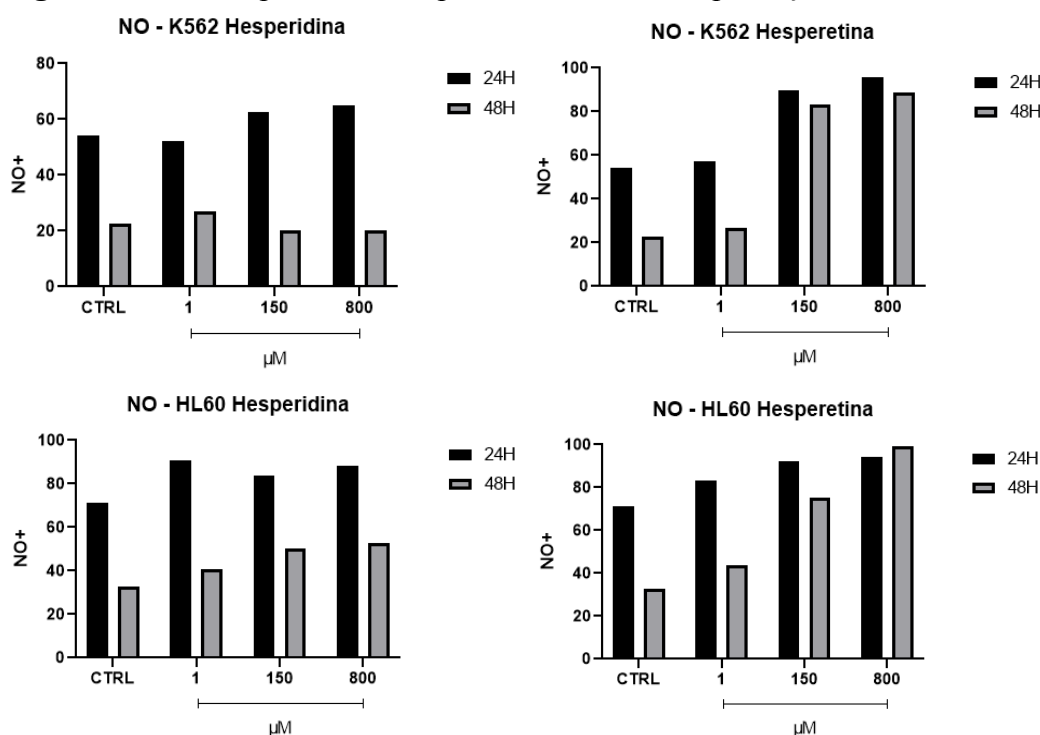
Control
1 μM
150 μM
800 μM (K562); 500 μM (HL60)



Fonte: O próprio autor.

O óxido nítrico (NO) desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e na supressão da tumorigênese, dependendo de sua origem e concentração. Em certas situações, o NO pode induzir a retenção do ciclo celular e a apoptose, oferecendo proteção contra o desenvolvimento de tumores. No entanto, o NO também pode levar a atrasos na progressão do ciclo celular, o que permite a correção anormal do DNA e promove o acúmulo de mutações e a heterogeneidade dentro do tumor (KHAN et al., 2020). HT e HD estimularam a produção de NO em ambas as linhagens celulares após 24 horas de tratamento (fig. 5).

Figura 5 - NO. Hesperidina e hesperetina estimulam a produção de óxido nítrico.



Fonte: O próprio autor.

CONCLUSÃO

A Hesperidina e sua aglicona, a Hesperetina, estão entre os bioflavonóides cítricos mais importantes, que possuem uma ampla gama de propriedades farmacológicas. Nossas descobertas preliminares revelam que esses compostos não apenas reduzem a viabilidade celular, mas também induzem a apoptose, estimulam a produção de óxido nítrico e interrompem o ciclo celular em pontos cruciais, incluindo G0/G1 e G2/M. Embora sejam necessários estudos adicionais, os resultados são promissores e sugerem que HT e HD podem servir como terapias adjuvantes para a leucemia, complementando as estratégias de tratamento convencionais. O potencial de combinar HD ou HT com doses mais baixas de medicamentos quimioterápicos oferece esperança para atenuar os efeitos tóxicos associados à quimioterapia.



REFERÊNCIAS

HUSAIN, A. R.; YOUSIF, A. B.; ANWAR, S. Hesperidin, a Bioflavonoid in Cancer Therapy: A Review for a Mechanism of Action through the Modulation of Cell Signaling Pathways. **Molecules**, v. 28, 2023.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). Leucemia. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/leucemia>. Acesso em: 27 de agosto de 2023.

KHAN, Faizan H.; DERVAN, Eoin; BHATTACHARYYA, Dibyangana D.; MCAULIFFE, Jake D.; MIRANDA, Katrina M.; GLYNN, Sharon A. The Role of Nitric Oxide in Cancer: Master Regulator or NOt?. **International Journal of Molecular Sciences**, 2020.

NAKAMURA, H.; TAKADA, K. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. **Cancer Science**, 2021.

NEMCOV, T.; D'ALESSANDRO, A.; REISZ, J. A. Metabolic underpinnings of leukemia pathology and treatment. **Cancer Reports**, v. 2, 2018.

OLIVEIRA, A. L. L.; GOMES, A. P. M. F.; NEVES, C. C. A.; FRADE, D. K. S.; RAMOS, J. C. G.; VIEIRA, M. S.; FREIRE, M. D.; FERREIRA, R. C.; GALDINO, R. G.; SOUSA, S. D.; MANGEON, T. H. L.; MATIAS, V. S. Cultivo de células: da teoria à bancada. João Pessoa: UFPB, 2020. 166 p.

ORTIZ, A. C.; FIDELES, S. O. M.; REIS, C. H. B.; BELLINI, M. Z.; PEREIRA, E. S. B. M.; PILON, J. P. G.; MARCHI, M.; DETEGRIACHI, C. R. P.; FLATO, U. A. P.; TRAZZI, B. F. M.; PAGANI, B. T.; PONCE, J. B.; GARDIZANI, T. P.; VERONEZ, F. S.; BUCHAIM, D. V.; BUCHAIM, R. L. Therapeutic Effects of Citrus Flavonoids Neohesperidin, Hesperidin and Its Aglycone, Hesperetin on Bone Health. **Biomolecules**, 2022.

WDOWIAK, K.; WALKOWIAK, J.; PIETRZAK, R.; BAZAN-WOŹNIAK, A.; CIELECKA-PIONTEK, J. Bioavailability of Hesperidin and Its Aglycone Hesperetin—Compounds Found in Citrus Fruits as a Parameter Conditioning the Pro-Health Potential (Neuroprotective and Antidiabetic Activity)—Mini-Review. **Nutrients**, 2022.

Hesperetin-Compounds Found in Citrus Fruits as a Parameter Conditioning the Pro-Health Potential (Neuroprotective and Antidiabetic Activity)-Mini-Review. **Nutrients**, v. 14, 2022.

