

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA



Fabiana Alves Casanova

**EFEITO DO RESVERATROL EM ASSOCIAÇÃO COM MELFALAN EM CÉLULAS
DE CÂNCER DE MAMA**

Rio de Janeiro

2012

Fabiana Alves Casanova

**EFEITO DO RESVERATROL EM ASSOCIAÇÃO COM MELFALAN EM CÉLULAS
DE CÂNCER DE MAMA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof.^a Eliane Fialho de Oliveira

Rio de Janeiro

2012

CASANOVA, Fabiana Alves

Efeito do Resveratrol em Associação com Melfalan em Células de Câncer de Mama / Fabiana Alves Casanova. – Rio de Janeiro
161 f. il.

Tese: Doutorado em Ciências (Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, 2012.

Orientadora: Eliane Fialho de Oliveira.

1. Resveratrol 2. Melfalan. 3. Câncer de mama. 4. Proteoma. – Teses. I. Fialho de Oliveira, Eliane. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica. III. Título.

Fabiana Alves Casanova

EFEITO DO RESVERATROL EM ASSOCIAÇÃO COM MELFALAN EM CÉLULAS
DE CÂNCER DE MAMA

Tese submetida ao Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Banca Examinadora:

Prof. Thomas Prates Ong

Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP.

Prof^a. Marcia Alves Marques Capella

Professora Associada do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Prof. Robson de Queiroz Monteiro

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ

Prof. Mário Alberto Cardoso da Silva Neto

Professor Associado do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ
Suplente Interno

Prof^a. Cláudia Vitória de Moura Gallo

Professor Associado do Departamento de Genética, UERJ
Suplente Externo

Prof^a. Eliane Fialho de Oliveira

Professora Associada do Instituto de Nutrição Josué de Castro, UFRJ
Orientadora

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Alimentos Funcionais e Sementes do Instituto de Nutrição Josué de Castro, no Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais Gregorio Weber do Instituto de Bioquímica Médica e no Centro Nacional de Bioimagem (Cenabio), ambos no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Prof^a. Eliane Fialho de Oliveira, na vigência de auxílios financeiros concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Fundação do Câncer, no período de agosto de 2007 a setembro de 2012.

Dedico esta tese aos meus pais,

Nilton e Ivaneide

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a. Eliane Fialho, pelo exemplo de pessoa e profissional. Durante 10 anos de convivência, só tenho a agradecer por todo conhecimento que recebi e por todas as chances que me foram dadas. Você é responsável significativamente ($P < 0,0001$) por eu chegar até aqui hoje. Por isso, Lili, muito obrigada por acreditar em mim!

Ao Prof. Jerson Lima da Silva, à Prof^a. Márcia Soares e ao Prof. Mário Alberto, que colaboraram com este trabalho, disponibilizando equipamentos e instalações do laboratório.

Ao Prof. Mário Alberto, por suas sugestões pertinentes que engrandeceram este trabalho.

A todos do laboratório do Prof. Jerson Lima da Silva, pelo agradável convívio, pelo apoio e pelos papos a caminho da sala de cultura.

A todos do laboratório da Prof^a. Russolina Zingali, pelas dúvidas esclarecidas e pelo auxílio nas análises proteômicas.

Ao Prof. Robson e a todos do seu laboratório, pela ajuda, pelos “empréstimos” e pela “hospedagem” das minhas células na incubadora de vocês.

Aos professores Thomas Ong, Márcia Capella e Robson Monteiro, por terem aceitado gentilmente o convite para participar da banca avaliadora.

À Prof^a. Cláudia Gallo, por ter aceitado a participar como suplente da banca.

À Chris, Dani, Julia, Lu, Paulinha e Renatinha, por me ouvirem, por falarem o que não quero escutar, por me ouvirem mais um pouco, por me fazerem rir, pela companhia de caminhada no corredor, por sofrerem minhas angústias, por me

fazerem rir mais um pouco, por me fazerem esquecer os problemas, por me ajudarem sempre que preciso. Vocês são vips para mim!!!

A minha aluna de IC, Júlia, ops, Julia, ou melhor, Juliete, pelo seu grande coração que faz com que ela tente levar as situações da forma mais justa possível. Por sua dedicação total e entusiasmo pelo projeto. Por me fazer questionar mais! Por sua amizade e carinho! Tenho certeza que todos gostariam de ter uma aluna e uma amiga como você (por isso que ficam tentando roubar você de mim)!

À Carolzinha, por toda ajuda e desempenho no projeto. Por todas as confusões engraçadas durante os experimentos. Por sua preocupação de não me deixar na mão após sua saída... e por sua amizade!

À Dani, por sua amizade que vem desde a faculdade. Iniciamos juntas o doutorado e enfrentamos juntas todos os obstáculos de um novo projeto. Em momentos de crise, você sempre estava lá, me apoiando e me erguendo para não me deixar cair. Muito obrigada por todos os conselhos e toda a força que tem me dado sempre.

À Chris Angel, por ser minha parceira de todas as horas. Embora todos concordem que sua característica mais marcante é sua alegria contagiante, para mim a grande diferença é ela conseguir captar meus pensamentos sem eu precisar falar. Por me acalmar quando estou, como você diz, “borbulhando”! Pelas conversas no laboratório sobre a vida e o que será do amanhã... responda quem puder, porque o nosso destino será como Deus quiser. Sua amizade me fortalece! Muito obrigada!

À Lu, minha amiga proteômica, por sua calma em resolver os problemas. Por sua calma em me ajudar nos experimentos. Por sua calma em me ouvir no desespero e na alegria. Por sua calma em falar o que não quero ouvir. Por sua calma mesmo quando está irritada. Por sua calma... e por sua risada contagiante (principalmente por telefone).

À Re... natinha, por sua transparência nos seus sentimentos. Por seu jeito prestativo e amigo. Por recla... rear minhas ideias diante de momentos estressantes, compartilhando suas experiências. Te adoro!

À Paulinha, por sua atenção, carinho e amizade. Por retornar ao laboratório após ser abduzida, e ter deixado em seu lugar uma Paulinha diferente, porém sempre companheira. Por saber que posso contar com você!

Ao Vagner, por toda nossa jornada juntos, desde a IC. Por ter contribuído na minha vida profissional e por nunca ter “cortado o cordão umbilical” com o Labafs.

Ao Daniel, por sua sinceridade extrema. Você fala a verdade com tom de mentira de forma engraçada! Pela sua presença notória que anima a todos por onde passa. Você faz falta no laboratório!

À Kenia, por todas as suas peculiaridades estranhas que animam nosso laboratório. Sempre presente em todas as festinhas do grupo devido ao seu radar de comida ligado. Admiro sua determinação e tranquilidade em levar a vida!...Mas, Kenia, você não é morena.

À Denise, nossa 1ª subchefe, por suas palavras sábias e tão sofisticadas. Por ser gente como a gente. Pelas conversas no final do expediente, e no meio, e no início. Por torcer e ficar feliz com minhas conquistas, assim como, sofrer junto minhas decepções.

A todos do Labafs e laboratórios anexos, Paula, Betina, Ana Luisa, Bianca, Lemuel, Flávia, Heloise, Eliza, Yasmin, Patrícia, Carol, Marcelo, pela companhia do dia a dia, pelos almoços no RU, pelas conversas divertidas no laboratório. A todos, muito obrigada!

À Profª. Vera Lúcia Valente Mesquita e à Profª. Maria Lúcia Mendes Lopes, pela convivência e aprendizado.

A CAPES, FAPERJ e Fundação do Câncer, pelos auxílios financeiros recebidos, essenciais para a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos, que sempre me apoiaram, pelos conselhos, pela compreensão e diversão.

Ao quarteto fantástico e o surfista prateado (meu pai, minha mãe, meu tio Gerson, meu padrinho Vagner e meu primo Rafael), assim como todos os envolvidos neste grande grupo (Bianca, minha madrinha Paula, minha tia Ester, Pedrinho, Juquinha), pela torcida, pela amizade, pela compreensão da minha ausência e por toda a diversão nos finais de semana. Vocês são grandes pescadores!!!

A todos meus familiares, pelo carinho e por mostrarem a importância do convívio familiar.

Ao Bruno, meu noivo, por sempre estar disposto a me ajudar, pelo seu carinho e principalmente sua paciência no final desta tese. Por sua compreensão, palavras de incentivo e pela presença em minha vida. Obrigada por tudo!

A minha irmã Renata, pela compreensão, paciência e amizade. Não se preocupe, a distância não vai nos separar. Você sempre será minha irmã preferida! Obrigada por tudo!

Aos meus pais, por terem acreditado em mim mais do que eu mesma. Por me amarem tanto, por terem se esforçado pela minha educação e criação, sempre me incentivando e apoiando. Palavras não transmitem o quanto agradeço vocês por tudo. Amo vocês!

A Deus, pela minha vida e por tudo e todos que me cercam. Por ter me dado forças, saúde e todo o resto para conseguir enfrentar os obstáculos, e assim, poder chegar até aqui. OBRIGADA!

*“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez.”*

George B. Shaw

RESUMO

Melfalan é um agente quimioterápico usado na terapia de câncer de mama. No entanto, este composto produz efeitos colaterais que limitam suas aplicações clínicas. A combinação de fitoquímicos quimiopreventivos com quimioterápicos tem sido utilizada para sensibilizar células de câncer à quimioterapia. Essa estratégia pode minimizar os efeitos colaterais provocados pelo tratamento. Entre os quimiosensibilizadores potenciais estão os compostos bioativos como o resveratrol (RSV). O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos antitumorais do RSV em associação com melfalan nas células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. Tanto RSV quanto o melfalan reduziram a viabilidade das células MCF-7 e MDA-MB-231. O RSV apresentou um menor efeito citotóxico nas células PBMC do que nas células de câncer de mama. Além disso, o RSV potencializou o efeito citotóxico do melfalan em células de câncer de mama. A sequência dos tratamentos influenciou no efeito antitumoral, uma vez que o tratamento com RSV seguido do melfalan provocou uma maior redução na viabilidade celular do que no tratamento com melfalan seguido do resveratrol. O RSV potencializou a apoptose induzida pelo melfalan. Este efeito pode estar relacionado com o aumento dos níveis de p53, diminuição de procaspase 8 e ativação das caspases 7 e 9. Baseada na análise de citometria de fluxo, 50 μ M de RSV foi capaz de promover um acúmulo de células na fase S, assim como a sua associação com melfalan, sugerindo um bloqueio nesta fase do ciclo celular. Para testar o papel do ciclo celular na citotoxicidade do melfalan, as células foram bloqueadas nas fases G1, S ou G2/M usando inibidores específicos do ciclo celular e tratadas com melfalan. Estas combinações de drogas também potencializaram o efeito do melfalan em diminuir a viabilidade das células MCF-7. Estes resultados sugerem que o bloqueio do ciclo celular induzido pelo RSV pode ser um dos mecanismos desta molécula em sensibilizar as células MCF-7 ao tratamento com melfalan. Ensaios de imunodeteção contra proteínas do ciclo celular foram realizados. O tratamento, tanto com RSV quanto com melfalan, aumentou os níveis da proteína checkpoint 2, e a associação dos compostos intensificou este aumento. Não foi observado mudanças dos níveis de cdc25A e ciclina E. No entanto, o RSV e sua associação com melfalan diminuíram os níveis de ciclina A. Enquanto que a expressão de CDK2 não foi alterada pelos tratamentos, sua forma ativa (CDK2 fosforilada em resíduos de treonina 160) foi diminuída pelo tratamento com RSV e sua associação com melfalan. Por isso, a atividade da CDK7, quinase que fosforila a CDK2 em treonina 160 foi analisada. RSV inibiu a atividade da CDK7, confirmando a sugestão acima. O mesmo efeito foi encontrado nas células tratadas com a associação do RSV com melfalan. Com o intuito de investigar outras vias de sinalização celular que poderiam estar sendo afetadas pelo tratamento com RSV e melfalan nas células MCF-7, o perfil protéico destas células tratadas com estes compostos foi estudado. O perfil protéico das células MCF-7 foi alterado pelos tratamentos com RSV, melfalan ou associação dos compostos. Foram identificadas 60 proteínas no extrato de células controle; 75 proteínas no extrato de células tratadas com RSV; 47 proteínas no extrato de células tratadas com melfalan; e 56 proteínas no extrato de células tratadas com a associação de RSV com melfalan. Estes resultados obtidos em cultura de células indicam o potencial para pesquisa clínica ao subsidiar o uso de agente adjuvante durante a terapia de câncer de mama com melfalan ou outro quimioterápico.

ABSTRACT

Melphalan is a chemotherapeutic agent used in breast cancer therapy; however, MEL's side effects limit its clinical applications. The combination of cancer chemopreventive phytochemicals with chemotherapeutic agents has been shown to sensitize cancer cells to chemotherapy. This strategy can minimize the side effects of the treatment. Among the potential chemosensitizers are bioactive compounds such as resveratrol (RSV). The aim of this study was to investigate the antitumor effects of the RSV in combination with melphalan in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. Both RSV and melphalan reduced the viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells. RSV showed a lower cytotoxic effect in PBMC cells than in the breast cancer cells. In addition, RSV increased the cytotoxic effect of melphalan in breast cancer cells. The sequence of the treatments affected the anti-tumor effect, since the treatment with RSV followed by melphalan promoted a greater reduction in cell viability than in the treatment with melphalan followed by RSV. RSV increased the melphalan-induced apoptosis. This effect may be related to the enhancement of p53 levels, the decrease of procaspase 8 and the activation of caspases 7 and 9. Based on the flow cytometric analysis, 50 μ M of RSV was able to promote an accumulation of cells in S phase, as well as their combination with melphalan, suggesting cell cycle arrest in this phase. To test the role of cell cycle progression in increasing melphalan's cytotoxicity, cells were arrested in the G1, S, or G2/M phase using the specific cell cycle inhibitors and treated concomitantly with melphalan. These combinations of drugs also potentiated the ability of melphalan to decrease the viability of MCF-7 cells. These findings suggest that RSV-induced cell cycle arrest in S phase could be one of the mechanisms of RSV to sensitize MCF-7 cells for treatment with melphalan. Immunodetection assays against cell cycle proteins were performed. The treatment with RSV or MEL increased the levels of p-Chk2. The increase became pronounced in the combined treatments of the compounds. No change was observed in the cdc25A and cyclin E levels. However, RSV and its association with melphalan decreased levels of cyclin A. While CDK2 expression was not altered by the treatments, its active form (CDK2 phosphorylated at threonine residue 160) was decreased by treatment with RSV and its association with melphalan. Therefore, the activity of CDK7, kinase which phosphorylates CDK2 at threonine 160, was analyzed. RSV inhibited the activity of CDK7, confirming the above suggestion. The same effect was found in cells treated with RSV in combination with melphalan. To investigate other signaling pathways that could have been affected by treatment with RSV and melphalan in MCF-7 cells, the protein profile of these cells treated with these compounds was studied. The protein profile of MCF-7 cells was altered by treatment with RSV, melphalan or combination of compounds. Sixty proteins were identified in the extract from control cells; 75 proteins in extracts from cells treated with RSV; 47 proteins in extracts from cells treated with melphalan and 56 proteins in extracts from cells treated with the combination of RSV with melphalan. These results obtained with cells cultures indicate the potential for clinical trials research with the use of adjuvant agent during breast cancer therapy with melphalan or other chemotherapeutic agent.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma.	26
Figura 2. Fases da carcinogênese.	28
Figura 3. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose.	33
Figura 4. Os estágios do ciclo celular.	35
Figura 5. Estrutura química do melfalan	38
Figura 6. Alimentos funcionais quimiopreventivos e seus compostos bioativos.	41
Figura 7. Efeitos benéficos do resveratrol.	44
Figura 8. Análise de proteínas por espectrometria de massa (EM).	55
Figura 9. Efeito do resveratrol na viabilidade das células MCF-7 e MDA-MB-231.	79
Figura 10. Efeito do resveratrol na viabilidade das células VERO e PBMC.	81
Figura 11. Efeito do melfalan na viabilidade das células MCF-7 e MDA-MB-231: ensaio de redução de MTT.	83
Figura 12. Efeito da associação do resveratrol com melfalan sobre as células MCF-7 e MDA-MB-231.	84
Figura 13. Efeito da sequência do tratamento de resveratrol e melfalan sobre a viabilidade celular.	85
Figura 14. Efeito do resveratrol isolado (A) e da combinação do resveratrol com melfalan (B) na apoptose das células MCF-7.	87
Figura 15. Efeitos do resveratrol e melfalan nos níveis da p53 e da ativação de caspases.	89

Figura 16. Efeito do resveratrol e do melfalan no ciclo de divisão celular das células MCF-7.	90
Figura 17. Efeito da associação do resveratrol com melfalan no ciclo de divisão celular das células MCF-7.	91
Figura 18. Efeito de inibidores específicos do ciclo celular sobre citotoxicidade induzida pelo melfalan nas células MCF-7.	93
Figura 19. Efeitos do resveratrol e melfalan nos níveis da fosfo- <i>checkpoint 2</i> e <i>cdc25A</i> .	95
Figura 20. Efeitos do resveratrol e melfalan nos níveis da ciclina E, ciclina A e p21.	96
Figura 21. Efeitos do resveratrol e melfalan nos níveis da CDK2 e de sua forma fosforilada (Thr160).	98
Figura 22. Efeito do resveratrol e melfalan na atividade da CDK7.	99
Figura 23. Efeito do resveratrol no perfil protéico das células MCF-7: SDS-PAGE.	100
Figura 24. Efeito do resveratrol em combinação ou não com melfalan sobre o perfil protéico das células MCF-7: SDS-PAGE.	102
Figura 25. Eletroforese bidimensional das células MCF-7: gradiente de pH 3-10.	107
Figura 26. Efeito do resveratrol no perfil protéico das células MCF-7: Eletroforese bidimensional.	108
Figura 27. Esquema do efeito do resveratrol e sua associação com melfalan nos níveis de proteínas relacionadas à progressão do ciclo celular na fase S das células MCF-7.	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas identificadas nas células MCF-7 tratadas com resveratrol, melfalan ou com associação dos dois compostos. 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
ACN	Acetonitrila
ADA	Associação Dietética Americana
APAF-1	Fator de ativação de proteases apoptóticas (do inglês, <i>apoptosis protease activating fator-1</i>)
ATM	Ataxia telangiectasia mutada (do inglês, <i>Ataxia telangiectasia mutated</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	do inglês, <i>ATM and Rad 3-related</i>
Bak	Proteína Bak (do inglês, <i>Bcl-2-homologous antagonist/killer</i>)
Bax	Proteína Bax (do inglês, <i>Bcl-2 associated X protein</i>)
Bcl-2	Proteína Bcl-2 (do inglês, <i>B-cell lymphoma-2</i>)
Bcl-xL	Proteína Bcl-xL (do inglês, <i>B-cell lymphoma-extra large</i>)
Bim	do inglês, <i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
Caspase	Cisteinil-aspartato proteases (do inglês, <i>cysteine-dependent aspartate-specific proteases</i>)
Cdc25A	do inglês, <i>Cell division cycle 25A</i>
CDK	Ciclin dependent kinases
CHAPS	do inglês, <i>3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate</i>
CYP	Citrocromo P450
DMBA	do inglês, <i>7,12-dimethylbenz(a)anthracene</i>

DMEM	do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EF-1 α	Fator de alongamento 1 α
EGTA	Ácido etileno glicol tetracético
ESI	Ionização por eletropulverização
G1	do inglês, <i>Gap phase 1</i>
G2	do inglês, <i>Gap phase 2</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HEPES/KOH	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico – hidróxido de potássio
hnRNP C1/C2	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea C1/C2
HSP27	do inglês, <i>heat shock protein 27</i>
IGF-1	Fator de crescimento insulina- <i>like</i> 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IPG	do inglês, <i>Immobilized pH gradient</i>
M	Mitose
m/z	Relação entre a massa e a carga
MALDI	Ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz
MCF-7	Células humanas de adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	Células humanas de adenocarcinoma de mama metastático
MDM2	do inglês, <i>Murine double minute gene 2</i>

MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MRP1	Proteína associada a resistência a multidrogas
MS	Espectrometria de massa
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio
NaF	Fluoreto de sódio
NAPDH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NCBI	do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF- κB	do inglês, <i>Factor nuclear kappa B</i>
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônio
PBMC	Células mononucleadas de sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salino
P-gp	P-glicoproteína
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
PUMA	do inglês, <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
Q	Quadrupolo
RNA	Ácido ribonucléico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rTNF	Receptores do fator de necrose tumoral (do inglês, <i>tumor necrosis factor receptor</i>)
S	Fase de síntese de DNA
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
STAT3	do inglês, <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>

TEMED	N, N, N', N', -tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TOF	Tempo de vôo
TRAIL	do inglês, <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
UEMP-CCS	Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica-Centro de Ciências da Saúde
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VERO	Células de rim de macaco verde

SUMÁRIO

1. Introdução	23
1.1. Câncer	24
1.1.1. Câncer de mama	26
1.1.2. Aspectos celulares e moleculares da carcinogênese	27
1.1.3. Morte celular por apoptose	30
1.1.4. Ciclo celular	34
1.1.5. Tratamentos do câncer	36
1.2. Nutrição e câncer	38
1.3. Resveratrol	41
1.3.1. Metabolismo e biodisponibilidade	42
1.3.2. Efeitos benéficos do resveratrol à saúde	43
1.3.3. Efeito antitumoral do resveratrol	45
1.3.4. Resveratrol e quimioterapia	50
1.4. Proteoma	53
1.4.1. Eletroforese bidimensional	55
1.4.2. Espectrometria de massa	56
1.4.3. Aplicações da proteômica no câncer	59
1.5. Justificativa	60
2. Objetivos	61
2.1. Objetivo geral	62
2.2. Objetivos específicos	62
3. Material e métodos	64
3.1. Reagentes	65
3.2. Culturas de células e tratamentos	65
3.3. Ensaio de viabilidade celular por redução de MTT	66
3.4. Microscopia de luz transmitida	67
3.5. Análise do ciclo celular e da morte celular por citometria de fluxo	67
3.6. Preparação do extrato protéico das células	68
3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	68
3.8. <i>Western blotting</i>	69

3.9. Ensaio <i>in vitro</i> da quinase CDK7	70
3.10. Análise proteômica (gel 1D)	72
3.10.1. Digestão com tripsina	72
3.10.2. Espectrometria de massa – ESI-Q-TOF	73
3.11. Eletroforese bidimensional	74
3.11.1. Isoeletrofocalização – Primeira dimensão	74
3.11.2. SDS-PAGE – Segunda dimensão	75
3.12. Banco de dados	75
3.11. Análise estatística	76
4. Resultados	77
4.1. Parte I: Efeito da associação do resveratrol com melfalan em linhagens de células epiteliais de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231.	78
4.2. Parte II: Análise proteômica das células MCF-7 tratadas com resveratrol e melfalan.	100
5. Discussão	109
5.1. Efeito da associação do resveratrol com melfalan em linhagens de células epiteliais de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231.	110
5.2. Análise proteômica das células MCF-7 tratadas com resveratrol e melfalan.	115
6. Conclusões	118
7. Referências Bibliográficas	122
8. Apêndices	141
8.1. Apêndice 1: Artigo publicado I	142
8.2. Apêndice 2: Artigo publicado II	154
9. Curriculum vitae	160

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Câncer

O câncer é uma doença caracterizada essencialmente por instabilidade genética e proliferação celular descontrolada. A gênese tumoral é direcionada pelo acúmulo progressivo de mutações no genoma de uma célula, o que promove alterações na expressão ou função de genes essenciais para a manutenção da homeostasia celular. Estas alterações podem induzir a conversão de células normais em células transformadas, as quais teriam perda da capacidade de responder aos sinais de proliferação, diferenciação e morte, adquirindo autonomia de crescimento e tornando-se independente de controles externos (FREITAS e cols., 2010).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322, 2012).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2008), o câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo. Espera-se que a mortalidade por câncer aumente 45% entre os anos de 2007 e 2030, passando de 7,9 para 11,5 milhões de mortes; em parte devido ao crescimento populacional e ao aumento da expectativa de vida. Além disso, estima-se que durante este mesmo período, o número de novos

casos de câncer aumente de 11,3 milhões em 2007 para 15,5 milhões em 2030. Na maioria dos países desenvolvidos, o câncer é a segunda principal causa de morte após as doenças cardiovasculares, porém, dados epidemiológicos indicam que esta tendência está sendo iniciada em países em desenvolvimento, principalmente os da América do Sul, onde mais da metade dos casos de câncer são registrados em países em desenvolvimento. Além disso, devido ao crescimento exponencial, em poucos anos o número de mortes por câncer será mais elevado do que para as doenças cardiovasculares (MATHERS e LONCAR, 2006).

Inúmeros fatores estão associados à elevada taxa de morbidade/mortalidade pelo câncer. Dentre eles, incluem-se mudanças de estilo de vida decorrentes do processo crescente de industrialização e aumento da expectativa de vida que levam a maior prevalência de doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, doença de Alzheimer e outros agravos relacionados ao envelhecimento e à obesidade (GUERRA e cols., 2005; MATHERS e LONCAR, 2006). Além disso, o diagnóstico tardio e, conseqüentemente, a maior dificuldade no tratamento do câncer avançado contribui para o aumento nas taxas de mortalidade relacionadas a essa doença (JEMAL e cols., 2011).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem os casos de câncer da pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireóide para o sexo feminino (**Figura 1**) (INCA, 2011).

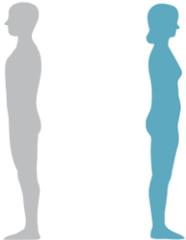
Localização primária					Localização primária		
	casos novos	percentual				casos novos	percentual
			Homens	Mulheres	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2011).

1.1.1. Câncer de mama

O câncer da mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Cerca de 50 mil de casos novos dessa neoplasia serão esperados para o ano de 2012 no Brasil, o que representa 27,9% de todos os tipos de câncer em mulheres (INCA, 2011).

A idade continua sendo o principal fator de risco para o câncer de mama. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta. Contudo, outros fatores de risco já estão bem estabelecidos, como, por exemplo, aqueles relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, multiparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal), história familiar de câncer da mama e alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama). Além desses, a exposição à radiação ionizante, mesmo em baixas doses, também é considerada um

fator de risco, particularmente durante a puberdade (RUSSO e RUSSO, 1995; INCA, 2011). Outro estudo tem avaliado a relação entre a dieta e o risco de câncer de mama e têm demonstrado uma significativa associação, especificamente com a ingestão calórica, o consumo de frutas e vegetais e, em geral, a qualidade da dieta (MCELIGOT e cols., 2009).

No Brasil, o exame clínico anual das mamas e o rastreamento são as estratégias recomendadas para controle do câncer da mama. As recomendações do Ministério da Saúde para detecção precoce e diagnóstico deste câncer baseiam-se no Controle do Câncer de Mama: Documento de Consenso de 2004, que considera, como principais estratégias de rastreamento, o exame clínico anual das mamas a partir dos 40 anos e um exame mamográfico, a cada dois anos, para mulheres de 50 a 69 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados (INCA, 2011).

1.1.2. Aspectos celulares e moleculares da carcinogênese

A célula é a unidade básica de organização de todo sistema biológico. Em organismos multicelulares, seu crescimento é controlado por uma série de mecanismos homeostáticos que determinam o equilíbrio entre proliferação e morte celular. A taxa de proliferação de cada tipo de célula é coordenada pela ação integrada de vários genes, os quais controlam este processo em resposta a estímulos internos e externos (FREITAS e cols., 2010).

A sequência de eventos que leva à transformação de uma célula normal em uma célula neoplásica é chamada carcinogênese. Este é um processo complexo provavelmente envolvendo uma série de mudanças genéticas e epigenéticas ocorrendo em níveis morfológicos, celulares e moleculares podendo ser dividida em três estágios principais: iniciação, promoção, progressão (**Figura 2**) (PITOT, 2007; VINCENT e GATENBY, 2008).



Figura 2. Fases da carcinogênese (Adaptado de BÉLIVEAU e GINGRAS, 2007).

Nas células, a etapa da iniciação é caracterizada por alterações genéticas que ocorrem a partir da exposição a agentes mutagênicos. Tais agentes podem ser físicos (ex. luz ultravioleta e radiações ionizantes), biológicos (ex. vírus) ou químicos (ex. hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e nitrosamina), sendo que todos eles têm a capacidade de promover alterações na composição e na estrutura básica da dupla fita de DNA. Em geral, é necessária a exposição repetida aos carcinógenos para que haja o desenvolvimento de tumores malignos (BÉLIVEAU e GINGRAS, 2007).

As células que sofreram mutação podem exibir uma resposta alterada a seu microambiente e uma vantagem seletiva de crescimento em comparação às células normais que as cercam. No entanto, geralmente, são fenotipicamente idênticas às suas equivalentes que não sofreram o processo de iniciação. Muitos eventos desta fase inicial podem ser revertidos por mecanismos celulares que incluem, por exemplo: destoxificação de carcinógenos, reparo do DNA e eliminação das células que tenham o DNA modificado. Tais mecanismos são essenciais na proteção contra a iniciação do câncer. Para que a iniciação ocorra, é necessário que haja não só a modificação do DNA, mas também a sua replicação e a proliferação celular, de modo que o dano ao DNA inicial possa se fixar nas gerações celulares seguintes (HANAHAN e WEINBERG, 2000; LIU e ROBINS, 2006).

Na etapa de promoção, as células iniciadas se multiplicam formando lesões pré-neoplásicas (displásicas e anaplásicas) sob estímulos promotores. O agente cancerígeno promotor age de forma a selecionar as células iniciadas e dessa forma ocorre a expansão clonal das mesmas, levando a um acúmulo de mutações e aumentando a instabilidade genética (i.e., alterações epigenéticas e genéticas) (PITOT, 2007; VINCENT e GATENBY, 2008).

A etapa seguinte é a progressão onde se tem células com alto grau de anaplasia, desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose e auto-suficiência (i.e., independem de estímulos para crescimento e multiplicação) (VINCENT e GATENBY, 2008). Esta fase é caracterizada por alterações moleculares adicionais, pelo aumento da massa tumoral primária, desprendimento de células do tumor, movimento na direção de tecidos e órgãos adjacentes e penetração de células neoplásicas individuais ou pequenos agrupamentos das mesmas no sistema circulatório, com seu transporte e aprisionamento em órgãos e tecidos distantes.

Tais grupos de células tendem a ficar retidos e costumam fixar-se em novos locais, continuando a crescer e levando à formação de tumores secundários, em um processo conhecido como metástase (FREITAS e cols., 2010).

Pelo menos três classes de genes desempenham papéis importantes no desenvolvimento do tumor: proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA. Mutações, ampliações ou deleções nestes genes podem levar a uma dissociação dos mecanismos biológicos envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação celular. Estes eventos são seguidos por seleção clonal de células com comportamentos cada vez mais agressivos, caracterizadas por sua elevada proliferação e pela sua capacidade para invadir e destruir tecidos normais (TYSNES e BJERKVIG, 2007).

Em geral, nos estágios avançados de desenvolvimento tumoral, as células transformadas apresentam uma série de alterações gênicas que as tornam altamente invasivas e resistentes a medicamentos antitumorais (GRAVITZ, 2011). Essas características associadas aos mecanismos intrínsecos das células neoplásicas, como mecanismos de escape da vigilância imunológica (i.e., perda da expressão de moléculas de complexo principal de histocompatibilidade, baixa expressão de antígenos tumorais, produção de citocinas inibitórias), dentre outros, dificultam o sucesso do tratamento em alguns casos (DIERSSEN e cols., 2006).

1.1.3. Morte celular por apoptose

A apoptose é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo um importante mecanismo de defesa que promove a eliminação de células supérfluas, infectadas, mutadas ou que sofreram algum tipo

de dano, prevenindo processos patológicos como o câncer. Organismos multicelulares podem induzir morte celular por apoptose em resposta a uma série de estímulos intra ou extracelulares (GRIVICICH e cols., 2007).

A apoptose ocorre através da ativação de vias específicas que resultam em uma série de eventos morfológicos bem definidos. Tais alterações incluem condensação citoplasmática e nuclear, fragmentação do DNA, formação de protuberâncias (*blebs*) na membrana plasmática e liberação de pequenas partículas envoltas por membrana contendo componentes celular conhecidas como corpos apoptóticos. Estes são rapidamente identificados pelas células vizinhas ou fagócitos e, geralmente, eliminadas sem indução de inflamação ou tecido cicatricial (WICKMAN e cols., 2012).

A execução da morte celular por apoptose é mediada por uma família de cisteinil-aspartato proteases (caspases) constituída de pelo menos 14 membros. As caspases são sintetizadas como zimogênios inativos que necessitam de ativação para exercer a sua função. A ativação completa é alcançada através de clivagem de um pró-domínio por outras caspases. As caspases envolvidas na apoptose são classificadas em caspases iniciadoras e caspases efetoras. As caspases iniciadoras (caspase-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10 e -14) estão envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. As caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7) são responsáveis pela clivagem de diversos substratos citoplasmáticos e nucleares, produzindo muitos das características morfológicas da morte celular por apoptose (DEGEN e cols, 2000; WEN e cols. 2012). Entre os diversos substratos das caspases é possível citar a proteína *murine double minute gene 2* (MDM2). Ao ser clivada pelas caspases, essa proteína libera a p53 que se transloca para o núcleo, ativando a transcrição de genes pró-apoptóticos (GUIMARÃES e LINDEN, 2004).

Duas principais vias moleculares levam a ativação de caspase e portanto, a apoptose: via extrínseca e via intrínseca (**Figura 3**). Apoptose por via extrínseca é uma forma de morte celular induzida por sinais extracelulares que resultam na interação de ligantes específicos a receptores trans-membrana, coletivamente conhecido como receptores de morte, pertencente à família dos receptores do fator de necrose tumoral (rTNF). Essa interação é capaz de promover a ativação da cascata de sinalização de caspases (FAVOROLO e cols., 2012).

A via intrínseca é ativada em resposta a diversas situações de estresse, incluindo danos no DNA, estresse oxidativo e muitos outros. Em todos os casos, estas múltiplas formas de estresse convergem para a mitocôndria e determinam a permeabilidade da membrana externa mitocondrial, isto por sua vez resulta em dissipação do potencial de membrana mitocondrial e, portanto, na cessação de produção de ATP, bem como liberação de um número de proteínas que contribuem para ativação da caspase. As proteínas da família *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2) são reguladores essenciais deste tipo de apoptose. Elas podem ser classificadas em anti-apoptóticas, tais como Bcl-2 e *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-xL), e pró-apoptóticas, tais como Bax (*Bcl-2 associated X protein*) e Bak (*Bcl-2-homologous antagonist/killer*). As proteínas pró-apoptóticas se oligomerizam para formar poros na membrana mitocondrial, através do qual ocorre liberação de citocromo *c*. No citosol, o citocromo *c* se liga a APAF-1 (*apoptosis protease activating factor-1*), induzindo a formação de um complexo, conhecido como apoptossoma, que requer caspase 9. No apoptossoma, caspase 9 é ativada e clivada, levando a ativação de outras caspases, como a caspase 3 (CHIPUK e GREEN, 2008).

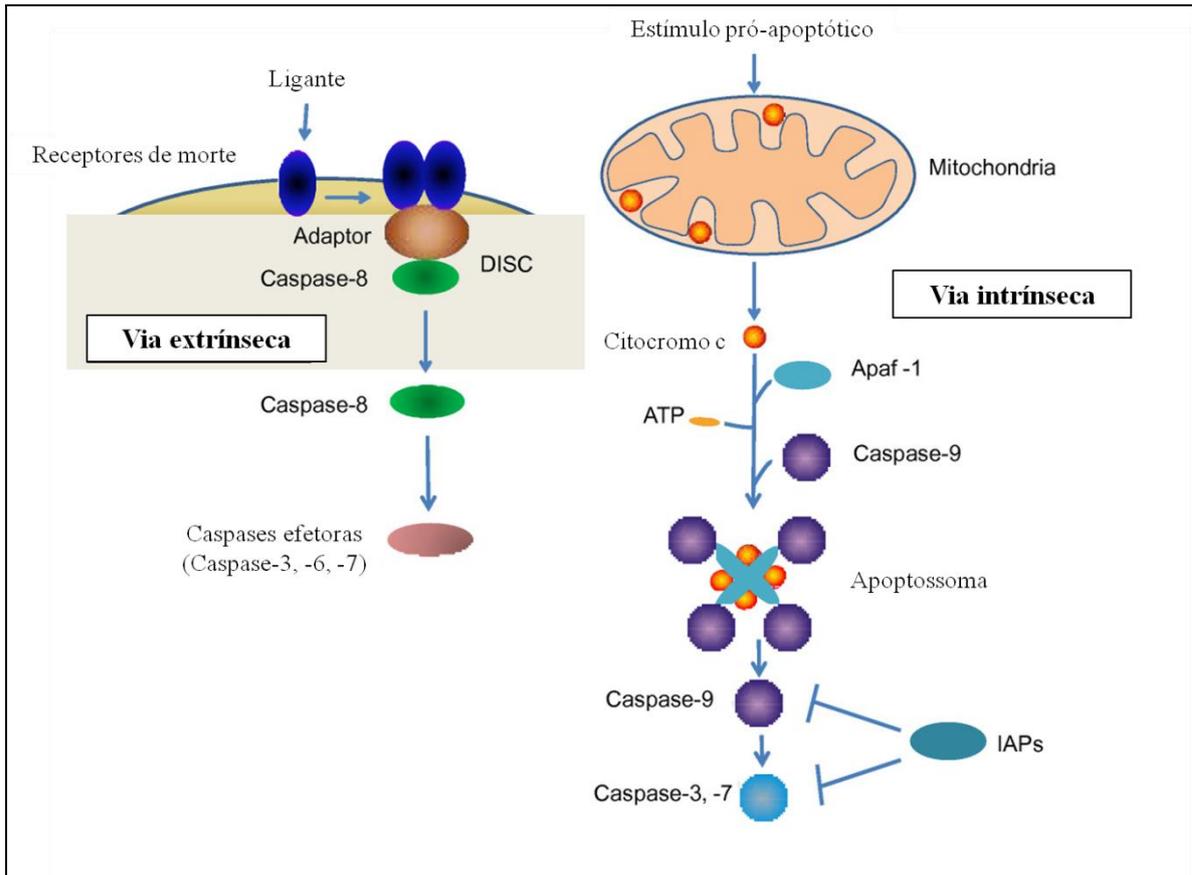


Figura 3. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose.

As duas vias principais de apoptose são ilustradas. A via extrínseca é iniciada pela ligação do ligante aos receptores de morte da membrana plasmática. A via intrínseca é também chamada via mitocondrial. Ambos os caminhos levam à ativação de caspases (adaptado de LI e SHENG, 2012).

Com base no seu papel na manutenção da homeostase celular, não é surpresa que alterações na apoptose desempenham um papel importante no desenvolvimento de câncer. Além disso, defeitos nas vias apoptóticas são responsáveis pela resistência à terapia e novas abordagens terapêuticas estão sendo estudadas com o objetivo de reativar essas vias (BURZ e cols., 2009).

1.1.4. Ciclo celular

O ciclo celular é uma seqüência recorrente de eventos que inclui duplicação do conteúdo da célula e subsequente divisão celular. Tradicionalmente, o ciclo celular em células eucarióticas tem sido dividido em 4 fases: *Gap phase 1* (G1); síntese de DNA (S); *Gap phase 2* (G2), durante a qual a célula se prepara para divisão; e mitose (M) durante a qual os cromossomos se separam e a célula se divide (MEERAN e KATIYAR, 2008).

A progressão do ciclo celular de uma fase para outra é regulada pela ativação e inativação seqüencial de muitos *checkpoints* que monitoram o estado da célula. *Checkpoints* são definidos operacionalmente como um produto de gene ou subconjunto de produtos de gene que quando mutados conferem independência no processo celular (MCDONALD e EL-DEIRY, 2000). Em razão de garantir a correta progressão do ciclo celular, as células passam por inúmeros *checkpoints* internos para verificar a finalização correta de um passo antes de seguir para outro. Entre estes, a mudança de fases do ciclo é regulada pelos complexos de quinases dependentes de ciclina (CDKs), que são ativadas quando estão ligadas a proteínas regulatórias (ciclina). Diferentes membros da família de CDK, em associação com diferentes ciclina, representam a chave regulatória de vários pontos do ciclo celular (SANTAMARIA e ORTEGA, 2006) (**Figura 4**).

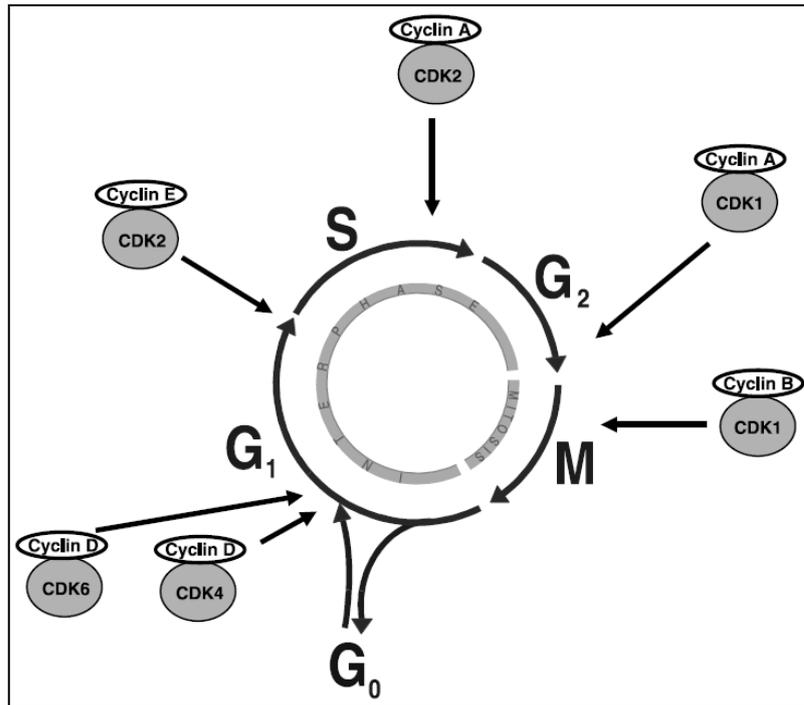


Figura 4. Os estágios do ciclo celular.

O sítio de atividade dos complexos CDK/ciclina está também indicado (extraído de VERMEULEN e cols., 2003).

Além da ligação a ciclinas, a atividade de CDK é também regulada por fosforilação em resíduos conservados de treonina e tirosina. A ativação completa da CDK1 requer a fosforilação da treonina 161 (treonina 172 na CDK4 e treonina 160 na CDK2), realizada pelo complexo CDK7-ciclina H, também chamado de CAK. Estas fosforilações induzem mudanças conformacionais que intensificam as ligações das ciclinas as CDKs. As quinases Wee1 e Myt1 inativam CDKs via fosforilação em tirosina 15 e/ou treonina 14. A defosforilação destes sítios pela enzima Cdc25A (*cell division cycle 25A*) é necessária para a ativação da CDK e a progressão do ciclo celular (VERMEULEN e cols., 2003).

Em resposta a estresse genotóxico, a atividade das quinases *checkpoint 1* e *checkpoint 2* é aumentada, promovendo assim o aumento da fosforilação da Cdc25A, que quando fosforilada é degradada. Como consequência, os complexos

CDK2/ciclina E ou A são inibidos. Apesar da fosforilação simultânea da Cdc25A e p53 pelas quinases *checkpoint*, o impacto deste evento sobre a maquinaria do ciclo celular é mais rápido pela cascata de degradação da Cdc25A (BARTEK e cols., 2004). A fosforilação da p53, uma proteína supressora de tumor, em serina 15 pela ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) ou ATR (*ATM and Rad 3-related*) e em serina 20 pelo *checkpoint 1* promove acúmulo desta proteína no núcleo por inibir sua degradação e translocação para fora do núcleo. O alvo transcripcional da p53 é a p21, um inibidor de CDKs, que silencia o complexo CDK2/ciclina E e, assim, inibe a transição G1/S (WAHL e CARR, 2001). Este fato permite o reparo do DNA ou a indução de vários fatores pro-apoptóticos (MICHAEL e OREN, 2002).

Como descrito, as células tem desenvolvido vários mecanismos de defesa que as protegem contra os ataques constantes a seu DNA. No entanto, os processos de reparo do DNA não são perfeitos. Assim, o rompimento da regulação normal da progressão e divisão do ciclo celular é um importante evento no desenvolvimento do câncer. Conseqüentemente, proteínas regulatórias do ciclo celular tem se tornado alvos na terapia do câncer (VERMEULEN e cols., 2003).

1.1.5. Tratamentos do câncer de mama

O tratamento do câncer é realizado por meio de diversos tratamentos e por um longo período, geralmente anos. Os principais tratamentos são a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia e a hormonioterapia. A quimioterapia pode ser a primeira modalidade no tratamento de um tumor primário de mama de grande porte (acima de 3 cm), localmente avançado (HARMER, 2008). Vale ressaltar que a quimioterapia não melhora a sobrevida do paciente, mas permite que o tumor não

progrida, possivelmente resultando em cirurgia de conservação da mama, uma forma segura e eficaz para melhorar a qualidade de vida da mulher (STEBBING e GAYA, 2001).

A quimioterapia para câncer de mama é realizada geralmente com uma combinação de drogas. A combinação é usada porque as células de câncer são sensíveis a determinados medicamentos e em diferentes pontos do ciclo celular, como: divisão celular e reprodução celular. O quimioterápico, entretanto, não pode distinguir entre células normais e malignas. Isto significa que o medicamento não atua apenas nas células cancerosas, mas também nas células normais, como as da medula óssea, trato gastrointestinal, pele, dentre outras. Este processo resulta nos conhecidos efeitos colaterais desses medicamentos (MCCOY, 2003). Os quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer de mama são doxorubicina, taxol, ciclofosfamida, tamoxifeno, gemcitabina, melfalan, entre outros.

O melfalan, também conhecido como mostarda L-fenilalanina, é uma fenilalanina derivada da família de mostarda nitrogenada usada na terapia do câncer (**figura 5**). Esta droga foi sintetizada pela primeira vez em 1953. Inicialmente, melfalan era usado contra mieloma múltiplo, mas depois também demonstrou ser efetivo no tratamento de pacientes com câncer de ovário e de mama, entre outros. Sistemáticamente, melfalan é usado no tratamento de pacientes com mieloma múltiplo, câncer de ovário, câncer de mama, melanoma e câncer colorretal (ROTHBARTH e cols., 2002). Localmente, esta droga é empregada em perfusão isolada de membro (melanoma de membro superior ou inferior) (VERHOEF e cols., 2007), ou do fígado (metástase confinada ao fígado) (VAHRMEIJER e cols., 2000).

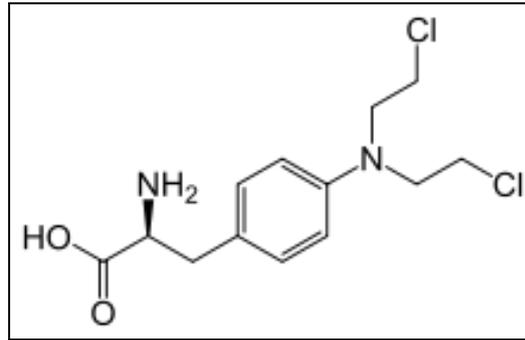


Figura 5. Estrutura química do melfalan.

Melfalan exerce seu efeito citotóxico por meio da formação de ligações cruzadas entre ou intra-fitas de DNA, assim como entre DNA-proteína, pela alquilação via os dois grupos cloroetil da molécula. Sítios comuns de alquilação no DNA incluem a posição N-7 da guanina, posições N-1, N-3 e N-7 da adenina, posição N-3 da citosina e posição O-4 da timidina. Assim como outras drogas da família de mostarda nitrogenada, melfalan afeta as células em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico. Especialmente em altas doses, melfalan mostra uma variedade de efeitos colaterais. O mais comum destes efeitos é a supressão da medula óssea, incluindo leucopenia e trombocitopenia (ROTHBARTH e cols., 2002).

1.2. Nutrição e câncer

Pesquisas afirmam que mais do que dois terços dos cânceres humanos poderiam ser prevenidos por meio de mudanças no estilo de vida. Entre os casos de câncer relacionados a fatores ambientais, a dieta inadequada contribui com cerca de 30%, seguida pelo tabaco (30%), fatores genéticos (15%) e outros fatores de risco (BÉLIVEAU e GINGRAS, 2007). Dessa forma, muitos componentes dietéticos podem aumentar o risco de desenvolver câncer. No entanto, também existem

inúmeras evidências provenientes de estudos populacionais assim como laboratoriais/experimentais que provam uma relação inversa entre o consumo regular de frutas, legumes e verduras e o risco de desenvolver cânceres específicos (RIBOLI e NORAT, 2003; SURH, 2003; BOEING e cols., 2012).

Em 2004, DONALDSON verificou que uma dieta equilibrada pode ser capaz de reduzir em 60 a 70% a incidência de câncer de mama. Uma dieta rica e variada, que contém frutas, legumes e verduras, é recomendada como prioridade global para a prevenção do câncer, sugerindo a ingestão de pelo menos cinco porções de vegetais por dia (COSTA e ROSA, 2010). No entanto, é necessária uma avaliação precisa dos mecanismos de ação dos componentes dos vegetais na prevenção do câncer para que, posteriormente, estes sejam testados em ensaios de intervenção em humanos e utilizados como suplementos.

Estes componentes presentes nos alimentos, capazes de atuar no metabolismo e na fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos para a saúde são chamados de compostos bioativos ou fitoquímicos (SGARBIERI e PACHECO, 1999). Estes compostos são metabólitos secundários presentes em plantas e são considerados ingredientes não-nutricionais, porém de vital importância para a saúde humana, uma vez que podem agir como antioxidantes, reduzindo o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (PATIL e cols., 2009), como o câncer. Os fitoquímicos quimiopreventivos são encontrados em diversos alimentos, chamados de alimentos funcionais, e são compostos pertencentes a diferentes classes estruturais (**Figura 6**) (SURH, 2003).

Para a Associação Dietética Americana (ADA), os alimentos funcionais incluem alimentos integrais, fortificados, enriquecidos ou restauradores, que apresentam, potencialmente, efeitos benéficos para a saúde, quando consumidos

como parte de uma dieta variada. Para produzir o efeito desejado, as substâncias fisiologicamente ativas devem estar presentes nos alimentos funcionais, em quantidades suficientes e adequadas. No entanto, os níveis ótimos de ingestão destes compostos não foram ainda determinados (ADA, 2009).

A definição de Alimentos Funcionais pela ANVISA engloba duas alegações: *alegação de propriedade funcional* é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano; e *alegação de propriedade de saúde*: é aquela que afirma, sugere ou implica a existência da relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde. Deste modo, o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.

condições de estresse, como infecção, sendo considerado uma fitoalexina (SOLEAS e cols., 1997).

O resveratrol é um composto da classe dos estilbenos com uma estrutura química constituída por dois anéis aromáticos ligados por uma ponte metila e ligações de três grupos hidroxila inseridos nos anéis. Esta estrutura é sintetizada naturalmente sob duas formas isômeras: *trans* e *cis* resveratrol. O isômero *trans* é encontrado em maiores quantidades e é a forma biologicamente ativa. No entanto, este isômero é fotossensível, podendo ser convertido na presença de luz, em *cis*-resveratrol, perdendo assim a sua atividade biológica. (LATRUFFE e cols, 2002; SIGNORELLI e GHIDONI, 2005). Além disso, existem derivados glicosilados e sulfatados do resveratrol que também possuem atividade biológica importante sobre uma variedade de modelos experimentais (JANG e cols., 1997).

1.3.1. Metabolismo e biodisponibilidade

O resveratrol está presente nos alimentos na forma *cis*- e *trans*- resveratrol, mas principalmente nas formas glicosiladas. Uma vez que as células intestinais são capazes de absorver somente a forma aglicona do resveratrol, o processo de absorção requer a ação de glicosidases. Por isso, a quantidade relativa da forma aglicona e glicosídica do resveratrol pode modular a taxa de absorção deste composto. Além disso, os níveis de expressão e a atividade diferente das glicosidases intestinais podem explicar as diferenças na taxa de absorção observadas em humanos e ratos (DAY e cols., 1998).

Em humanos, a absorção do resveratrol é em torno de 75% e ocorre principalmente através da difusão transepitelial. A conversão do resveratrol em

conjugados hidrofílicos facilita sua entrada na corrente sanguínea e sua excreção. Estudos *in vivo* em animais mostraram que, após a administração oral do resveratrol, ocorre um pico de concentração deste composto no plasma, que com o tempo diminui até o surgimento de um segundo pico de concentração. Este pico secundário foi devido à circulação êntero-hepática deste composto (SIGNORELLI e GHIDONI, 2005; WALLE, 2011). A excreção renal é a maior rota de eliminação do resveratrol. A excreção total na urina e nas fezes deste composto após a administração oral em humanos foi de 71 a 98% (AMRI e cols., 2012).

Dados obtidos por meio de experimentos de farmacocinética, realizados tanto em modelos animais como em humanos, revelaram que o resveratrol parece ser rapidamente metabolizado pelo organismo, apresentando um meia-vida curta (~8-14 min) e, portanto, baixa biodisponibilidade (ASENSI e cols., 2002; WALLE e cols., 2004). Outros estudos já demonstraram que metabólitos do resveratrol podem ser detectados no plasma entre o período de 12-72 h após a administração (VITRAC e cols., 2003; PERVAIZ e HOLME, 2009).

1.3.2. Efeitos benéficos do resveratrol na saúde

Recentemente, vários estudos vêm associando ao resveratrol um grande número de propriedades benéficas à saúde humana (MARKUS e MORRIS, 2008; SAIKO e cols., 2008; GOSWAMI e DAS, 2009). Dentre estas, o *trans*-resveratrol tem demonstrado atuar na prevenção de uma variedade de doenças, como doença cardiovascular, diabetes, doença neurológica e câncer (**Figura 7**) (FREMONT, 2000; BAUR e cols., 2006; ATES e cols., 2007).

Estudos têm demonstrado que o resveratrol diminui o estresse oxidativo e atenua a inflamação, e estes mecanismos estão relacionados a muitos dos seus efeitos benéficos. Com relação a sua propriedade anti-inflamatória, resveratrol é um efetivo inibidor da atividade da ciclooxigenase *in vivo*, enzima crucial na produção de moléculas pró-inflamatórias (KHANDUJA e cols., 2004). Além disso, resveratrol neutralizou o aumento dos níveis de marcadores bioquímicos pró-inflamatórios, tais como TNF α (fator de necrose tumoral α), IL-1 β (interleucina 1 β), IL-6 (interleucina-6), em quase todos os modelos estudados (PALSAMY e SUBRAMANIAN, 2010; SANCHEZ-FIDALGO e cols, 2010; VANG e cols., 2011).

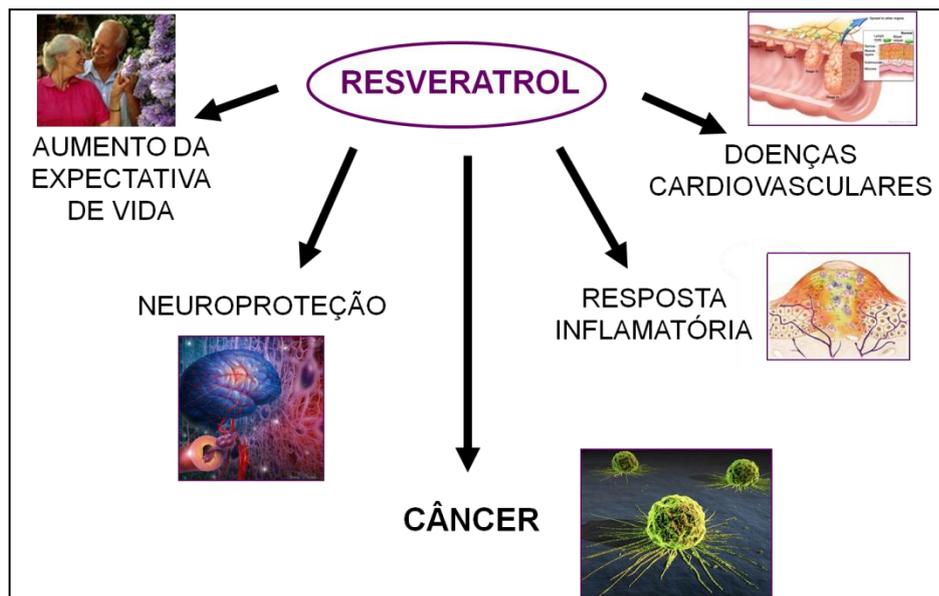


Figura 7. Efeitos benéficos do resveratrol.

Dados epidemiológicos tem revelado uma correlação inversa entre o consumo de vinho e a incidência de doenças cardiovasculares. Tal resultado foi parcialmente atribuído à presença de resveratrol no vinho. Este composto protege o sistema cardiovascular através de inúmeros mecanismos incluindo inibição de resposta

inflamatória, promoção de vasodilatação, propriedades anti-ateroscleróticas, inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade e supressão da agregação plaquetária (LI e cols., 2012).

Com relação à ação do resveratrol no diabetes, estudos em animais evidenciam que este composto bioativo pode melhorar a ação da insulina no diabetes melito tipo II. A sua habilidade em aumentar a sensibilidade da insulina foi estudada em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica e manifestando resistência à insulina. A ingestão de resveratrol (0,5 ou 0,75 mg/kg) por estes animais aumentou significativamente a ação da insulina. Além disso, outro estudo mostrou resveratrol foi capaz de estimular a captação de glicose na ausência de insulina. Este estímulo na captação de glicose pelo resveratrol foi relacionado com a ação aumentada do transportador de glicose GLUT4 na membrana plasmática (SU e cols, 2006; SZKUDELSKI e SZKUDELSKA, 2011).

Evidências experimentais e epidemiológicas tem documentado que o resveratrol pode exercer efeito protetor contra diversas desordens neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e Parkinson. Este polifenol produz estes efeitos benéficos não somente devido seu potencial antioxidante, mas também através da modulação de diferentes vias como processos anti-apoptóticos e síntese/degradação do peptídeo amilóide β (RICHARD e cols., 2011; YU e cols., 2012).

1.3.3. Efeito antitumoral do resveratrol

Em 1997, foi relatado pela primeira vez, que o resveratrol teria ação contra o câncer, sugerindo, portanto, que este composto poderia ser uma ferramenta

terapêutica promissora a ser testada neste contexto. A partir deste ano, o número de trabalhos relacionados a esta linha de pesquisa tem crescido progressivamente (BAUR e SINCLAIR, 2006).

Estudos mostram que o resveratrol é capaz de inibir o desenvolvimento do tumor nos três diferentes estágios: iniciação, promoção e progressão (JANG e cols., 1997). Essa fitoalexina é um potente inibidor do crescimento de várias linhagens tumorais *in vitro* e da carcinogênese *in vivo* (NILES e cols., 2003). Já tem sido mostrado o seu efeito em células tumorais de cólon (SCHNEIDER e cols., 2000), mama (POZO-GUISADO e cols., 2002; LE CORRE e cols., 2005; FILOMENI e cols., 2007), próstata (DAMIANAKI e cols., 2000; KAMPA e cols., 2000), células leucêmicas (DORRIE e cols., 2001) e melanoma (NILES e cols., 2003).

Somando-se aos estudos *in vitro*, já foi observado *in vivo*, que a administração de 625mg de resveratrol/kg de ração durante 28 semanas, suprimiu a progressão do câncer de próstata em camundongos (transgênicos para adenocarcinoma de próstata) (HARPER e cols., 2007). Quando injetado intraperitonealmente, resveratrol (2,5 ou 10 mg/kg) reduziu o crescimento de carcinoma de pulmão metastático em camundongos (KIMURA e OKUDA, 2001; ATHAR e cols., 2007). Estudos em animais mostraram que a administração oral de resveratrol (1 mg/kg) diminuiu o número e o tamanho de tumores no esôfago e no estômago (LI e cols., 2002; ZHOU e cols., 2005). Diversos estudos têm mostrado que pequenas doses de resveratrol reduziu ou preveniu o desenvolvimento de tumores intestinais em ratos (ATHAR e cols., 2007). WHITSETT e colaboradores (2006) mostraram que 1 g/kg de resveratrol na dieta suprimiu o câncer de mama induzido por DMBA (*7,12-dimethylbenz(a)anthracene*) em ratos.

Apesar de existirem dados disponíveis sobre o efeito anticarcinogênico do resveratrol tanto *in vitro* como *in vivo*, poucos ensaios clínicos têm sido conduzidos (CUCCIOLLA *et al.*, 2007). Dois estudos clínicos foram recentemente publicados e mostraram que 2,5 g de resveratrol por dia durante 29 dias demonstrou reduzir significativamente os níveis de IGF-1 (fator de crescimento insulina-*like* 1) e IGF-1 ligado a proteína-3, indicando um possível efeito quimiopreventivo (BROWN e cols., 2010), enquanto que doses diárias de 0,5 e 1 g de resveratrol durante 29 dias promoveu uma redução de proliferação celular em tecido de câncer de cólon (PATEL e cols., 2010). A maioria dos estudos clínicos disponíveis com resveratrol em humanos foca na biodisponibilidade, farmacocinética e metabolismo deste composto (ALMEIDA e cols., 2009; LA PORTE e cols., 2010).

Os mecanismos envolvidos nesta ação quimiopreventiva e quimioterapêutica do resveratrol vêm sendo elucidados ao longo dos anos. Entre estes, sugere-se atividade antioxidante (JOE e cols., 2002), indução de enzimas da fase II (ZAHID e cols., 2008), indução da apoptose (MICHELS e cols., 2006), efeito antiproliferativo (ALKHALAF e JAFFAL, 2006) e modulação do ciclo celular (ATHAR e cols., 2009).

Um dos mecanismos pelo qual o resveratrol exerce efeitos quimiopreventivos é a modulação da ativação de carcinógenos e de enzimas detoxificadoras. Muitos carcinógenos químicos sofrem metabolismo oxidativo por enzimas de fase I, especialmente aquelas que pertencem à família do citocromo P450 (CYP), e são convertidos em intermediários polares, que são subsequentemente eliminados por reações de conjugação catalisadas por enzimas de fase II. Na ausência de enzimas de fase II, os carcinógenos metabolicamente ativos são mais propensos a atacar o DNA celular, iniciando assim a tumorigênese (KUNDU e SURH, 2008).

JANG e colaboradores (1997) mostraram que resveratrol diminuiu a incidência de formação de tumor em camundongos tratados com DMBA. Uma vez que DMBA requer bioativação pelas enzimas CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 (SHOU e cols., 1996), a atividade antitumoral do resveratrol *in vivo* inclui prevenção da fase de iniciação da carcinogênese através da inibição das enzimas de fase I. Por outro lado, resveratrol aumenta a expressão e/ou a atividade de enzimas da fase II, incluindo glutathione S-transferase, glutathione peroxidase e NADPH:quinona oxidoreductase, as quais possuem atividade antioxidante/destoxicadora (KUNDU e SURH, 2008).

O papel do resveratrol sobre o estado redox intracelular é descrito em muitos estudos. Assim como outros polifenóis, este composto atua como um importante antioxidante celular e seus efeitos são dependentes da concentração utilizada e do tipo de célula. No entanto, é proposto que o resveratrol também possa atuar como um agente pró-oxidante, sendo este um dos mecanismos de ação antineoplásicos envolvidos na morte de células tumorais. Do mesmo modo, já foi demonstrado que o resveratrol diminui o potencial de membrana mitocondrial e aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), promovendo apoptose (AZMI e cols., 2006).

Estudos relatam que o resveratrol é capaz de induzir a apoptose em diversas culturas de células de câncer, em tumores induzidos quimicamente, e em tumores transplantados em camundongos nude, através da ativação de vias extrínsecas e intrínsecas da maquinaria de morte celular (GARVIN e cols., 2006; FILOMENI e cols., 2007; KALRA e cols., 2008). Da mesma forma, o pré-tratamento de células de câncer de próstata humano (PC-3 e DU-145) com resveratrol resultou em morte celular mediada por TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), Fas ou TNF- α (GILL e cols., 2007). Além disso, a apoptose mediada pelo resveratrol tem sido

associada com ativação da p53, indução da expressão de moléculas pró-apoptóticas, como Bax, Bak, PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) e Bim (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*), e inibição da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl2 e Bcl-XL (ATHAR e cols., 2009).

Com relação ao seu efeito na divisão celular, estudos indicam que o resveratrol pode atuar nas diferentes fases do ciclo celular (ATHAR e cols., 2009). KUWAJERWALA e colaboradores (2000) mostraram que o tratamento de células de câncer de próstata LNCaP com resveratrol induziu as células a entrarem na fase S, mas a progressão desta fase foi limitada pelo efeito inibitório do resveratrol na síntese de DNA. Em 2003, LIANG e colaboradores observaram que o resveratrol promoveu um bloqueio na fase G2 em células de câncer de cólon por meio da inibição da CDK7 e CDK1. Em outra linhagem de câncer de cólon, o resveratrol promoveu diminuição dos níveis do complexo ciclina D1/CDK4, proteínas regulatórias na progressão da fase G1 (WOLTER e cols., 2001).

O resveratrol é considerado um fitoestrógeno devido sua similaridade estrutural com dietilestilbestrol, um estrogênio sintético. Dessa forma, o resveratrol é capaz de se ligar a receptores de estrogênio, podendo atuar tanto como agonista ou antagonista, originando respostas contrárias dependendo da concentração, da competição e da expressão de receptores de estrogênio nas células. SAKAMOTO e colaboradores (2010) demonstraram que o resveratrol induziu apoptose e reduziu a razão Bcl2/Bax em células MCF-7. No entanto, quando reduziram a expressão do receptor de estrogênio α através do ensaio de RNA de interferência, esta redução na razão Bcl2/Bax mediada pelo resveratrol foi revertida.

O resveratrol também atua inibindo a angiogênese, que é um processo de formação de novos vasos sanguíneos, sendo essencial para o crescimento do

tumor. O resveratrol tem mostrado reduzir a produção de citocinas angiogênicas, incluindo VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e interleucina-8 (DULAK, 2005). Além disso, o resveratrol inibe a expressão e atividade de metaloproteinase-2 e -9 de matriz, enzimas relacionadas com degradação proteolítica da matriz extracelular e metástase do tumor (KUNDU e SURH, 2008; TANG e cols., 2008).

1.3.4. Resveratrol e quimioterapia

A quimioterapia é frequentemente utilizada como o regime principal no tratamento da maioria dos tipos de câncer. No entanto, o desenvolvimento de resistência do tumor à quimioterapia (quimiorresistência) apresenta um grande obstáculo na terapia do câncer (HIGGINS, 2007). A utilização de fitoquímicos quimiopreventivos em combinação com agentes quimioterápicos tem demonstrado ser uma abordagem pragmática para superar quimiorresistência e sensibilizar as células de câncer a apoptose ou parada do crescimento, enquanto minimiza os efeitos colaterais resultantes da terapia convencional (GARG e cols., 2005). Entre os potenciais quimiosensibilizadores, pode-se citar os compostos bioativos, como resveratrol.

Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que o resveratrol pode sensibilizar as células tumorais a agentes quimioterapêuticos modulando vias apoptóticas, regulando transportadores de drogas e proteínas envolvidas na proliferação de células tumorais. Além disso, resveratrol também tem demonstrado superar a quimiorresistência pela inibição de NF- κ B (*factor nuclear kappa B*) e STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) (ATHAR e cols., 2009;. GUPTA e cols., 2011).

CHAN e colaboradores (2008), utilizando células de câncer de cólon humano HCT116, mostraram que o resveratrol exerceu efeitos sinérgicos com fluorouracil de uma maneira caspase-6 dependente. Resveratrol também tem mostrado melhorar a sensibilidade das células tumorais por bloquear as células em diferentes fases do ciclo celular e por reduzir a expressão de genes envolvidos na proliferação celular. GATOUILLAT e colaboradores (2010) mostraram que o resveratrol aumenta a citotoxicidade induzida por doxorubicina em um melanoma B16 resistente à quimioterapia por diminuir a expressão de ciclina D1. O tratamento combinado com resveratrol também foi associada com um aumento no bloqueio do ciclo celular na fase G1/S.

HORVATH e colaboradores (2005) mostraram uma ação sinérgica do resveratrol com tiazofurin em células de leucemia. Em 2004, FULDA e DEBATIN observaram que o resveratrol foi capaz de aumentar a sensibilidade de células de neuroblastoma a apoptose induzida por diferentes quimioterápicos.

Em algumas células tumorais, o resveratrol tem eliminado a quimiorresistência através da diminuição da atividade de transportadores de drogas de membrana, tais como a glicoproteína P (P-gp) e a proteína associada a resistência a multidrogas (MRP1). Um estudo mostrou que o resveratrol induziu o acúmulo de daunorrubicina em células de carcinoma resistente a multidroga KB-C2 em uma maneira dose dependente (NABEKURA e cols., 2005). Em um recente estudo, QUAN e colaboradores (2008) examinaram o potencial de resveratrol em superar a quimiorresistência das células de carcinoma epidermóide oral KBv200 a vincristina, adriamicina e paclitaxel. Resveratrol produziu um efeito sinérgico quando combinado com os quimioterápicos e reverteu o fenótipo de resistência a multidroga

das células KBv200. A reversão do fenótipo de quimiorresistência foi associada com uma diminuição na expressão da P-gp.

Em alguns casos, o resveratrol tem demonstrado superar a quimiorresistência por mais do que um mecanismo. Por exemplo, a reversão da quimiorresistência das células KBv200 a vincristina, adriamicina e paclitaxel por resveratrol demonstrou não ser devido apenas a diminuição da expressão de P-gp, mas também devido a diminuição na expressão de Bcl-2 (QUAN e cols., 2008). Um outro estudo utilizando células de câncer de pulmão mostrou que resveratrol tem potencial para melhorar o potencial quimioterápico de paclitaxel através do aumento de sua ação proapoptótica e antiproliferativa (KUBOTA e cols., 2003).

Estudo *in vivo*, em modelo xenográfico de câncer de pâncreas induzido em camundongos nude, mostrou que resveratrol significativamente suprimiu o crescimento do tumor e este efeito foi aumentado por gemcitabina. Os resultados demonstraram que o resveratrol pode potencializar os efeitos de gemcitabina através da supressão de marcadores de proliferação, invasão, angiogênese e metástase (HARIKUMAR e cols., 2010). LIN e colaboradores (2012) demonstraram que o resveratrol pode aumentar o efeito antitumoral mediado por temozolomida em glioblastoma *in vitro* e *in vivo*.

No entanto, nem todos quimioterápicos quando associados com resveratrol respondem de forma a potencializar seus efeitos citotóxicos. MAO e colaboradores (2010) mostraram que o resveratrol inibe os efeitos do taxol em células de câncer de bexiga, uma vez que previne as células de entrarem em mitose, fase na qual o taxol exerce sua ação. O efeito de sensibilização de resveratrol sobre a morte celular induzida pelo paclitaxel em células de câncer de mama foi investigado por FUKUI e colaboradores (2010). Resveratrol reduziu fortemente a suscetibilidade das células

MDA-MB-435s, MDA-MB-231 e SKBR-3 a morte celular induzida pelo paclitaxel, mas este efeito não foi observado em células MCF-7. Além disso, o resveratrol suprimiu o acúmulo de ROS e, posteriormente, a inativação da família de proteína antiapoptótica Bcl-2 induzida pelo paclitaxel. Dessa forma, são necessários mais estudos para que se possa estabelecer associações entre resveratrol e quimioterápicos que sejam eficazes no tratamento do câncer.

1.4. Proteoma

Proteoma é o conjunto de todas as proteínas expressas pelo genoma de um organismo. O proteoma celular é muito complexo, formado por um grande número de proteínas que variam conforme o contexto, momento ou evento metabólico que é submetido o organismo (LOPEZ, 1999).

O estudo em larga escala da expressão gênica de proteínas é conhecido como proteômica. A proteômica envolve o isolamento sistemático, identificação, quantificação e sequenciamento de proteínas expressas em uma organela, célula, ou tecido de um organismo, como também a determinação de seu estado de ativação, interação, alteração e suas propriedades (AEBERSOLD e MANN, 2003).

Esses estudos podem levar a três vertentes básicas de elucidação de eventos, com implicações diretas em vários campos da biologia, da biotecnologia e da ciência médica: (1) a descoberta de vias metabólicas nas diversas etapas celulares, gerando conhecimento sem precedentes na biologia celular e na bioquímica; (2) a identificação de novas moléculas bioativas em extratos biológicos naturais, levando ao desenvolvimento de novos medicamentos; e (3) a caracterização de marcadores biológicos. A capacidade de identificar essas

moléculas pode se tornar extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução do tratamento (ROCHA e cols., 2005).

As seguintes etapas são cruciais na proteômica para elucidar a função de um determinado gene: preparo da amostra, separação e identificação de proteínas, determinação da seqüência parcial de aminoácidos e bioinformática. O modelo experimental e o cuidado no preparo da amostra são vitais para a obtenção de resultados reprodutíveis, principalmente na proteômica comparativa. Para separação das proteínas, um dos principais métodos utilizados é a eletroforese uni ou bidimensional na presença de dodecil sulfato de sódio (1D ou 2D-SDS-PAGE). Além desses métodos, existem outras alternativas, como a cromatografia líquida de alta eficiência, por meio da utilização de colunas de fase reversa, afinidade, filtração em gel, troca iônica, dentre outras. Atualmente, as principais técnicas usadas na proteômica são a eletroforese bidimensional (2D) e a espectrometria de massa (**Figura 8**) (BODZON-KULAKOWSKA, 2007; FIALHO e cols. 2008).

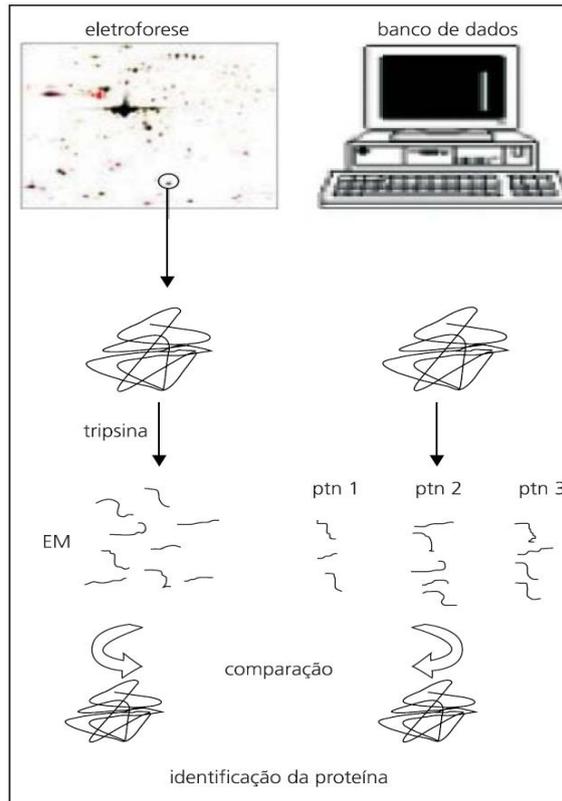


Figura 8. Análise de proteínas por espectrometria de massa (EM).

Em um gel bidimensional diversos *spots* são corados. Tais *spots* são extraídos, as proteínas são tripsinizadas e seus fragmentos são analisados por EM. Por meio da bioinformática as seqüências obtidas são comparadas às armazenadas no banco de dados (adaptado de CARBONARO, 2004).

1.4.1. Eletroforese bidimensional (2D)

Para muitas aplicações em proteômica, a eletroforese unidimensional (1D) é um método de escolha para resolver misturas de proteínas. As proteínas são separadas baseadas na massa molecular. É uma técnica reprodutível, e pode ser usada para proteínas com uma massa molecular entre 10 a 300 kDa, sendo utilizada principalmente para verificação da pureza de proteínas. Para misturas mais complexas, como lisados de células, usa-se a eletroforese 2D. As proteínas são

separadas por duas distintas propriedades, primeiramente de acordo com a carga, e na segunda pela massa molecular (BODZON-KULAKOWSKA, 2007). Desde que O'FARRELL e KLOSE (1975) demonstraram que era possível separar proteínas baseando-se no seu ponto isoelétrico e sua massa molecular pela eletroforese em gel de poliacrilamida, a eletroforese 2D tem sobrevivido como o caminho mais eficiente para a separação de misturas de proteínas complexas. Além disso, a eletroforese 2D providencia informações sobre mudanças na proteína em seu nível de expressão, isoformas e modificações pós-traducionais (MUKHERIJ, 2005).

Uma aplicação da eletroforese 2D no estudo de expressão de proteínas consiste na comparação quantitativa e qualitativa de duas amostras. O aparecimento ou desaparecimento de *spots* pode fornecer informações sobre expressão de proteínas diferenciais, enquanto que a intensidade dos *spots* fornece informações quantitativas sobre o nível de expressão dessas proteínas. Pode ser utilizada no fracionamento de extratos protéicos de organismos, células, tecidos ou fluidos corporais; e aplicada também para o mapeamento das proteínas de organismos, organelas celulares e complexos protéicos (GRAVES e HAYSTEAD, 2002).

1.4.2. Espectrometria de massa

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica que mede a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gasosa (GROSS, 2004). De uma maneira geral, um espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector que registra o número de íons. Na fonte de ionização, as moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gasosa. No analisador de massas, os íons formados são separados de acordo com

suas relações m/z e posteriormente detectados (usualmente por elétron multiplicador). As duas técnicas mais usadas para volatilizar e ionizar as proteínas ou peptídeos são ionização por eletropulverização (ESI) e ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI). Em ambos os métodos, os peptídeos são convertidos a íons pela adição ou perda de um ou mais prótons (FENN e cols., 1989; AEBERSOLD e MANN, 2003).

A ESI foi desenvolvida por FENN e colaboradores no final dos anos 80, os quais usaram uma descarga elétrica na ionização de biomoléculas. Na análise por ESI, a amostra é dissolvida em um solvente volátil e ao passar por um estreito tubo capilar metálico, ao qual é aplicada uma voltagem, é gerado um aerossol de analito e solvente. Com a evaporação do solvente originam-se íons contendo um ou mais prótons. Os íons são subseqüentemente submetidos a alto vácuo, acelerados por meio de um campo elétrico para o analisador de massas do MS e separados de acordo com a razão m/z (BODZON-KULAKOWSKA, 2007).

Um grande número de compostos pode ser analisado por ESI-MS, o único requerimento da técnica é que a molécula seja suficientemente polar para receber as cargas. Além disso, a ESI é tolerante a baixas concentrações de tampões, sais e detergentes. Estes compostos interferem na análise causando supressão dos íons formados ou uma determinação ambígua das massas quando combinados com o analito (ASHCROFT, 2003; BODZON-KULAKOWSKA, 2007).

Os analisadores de massas, como o próprio nome indica, têm como função básica separar os íons formados de acordo com suas relações m/z . Diversos analisadores de massas são utilizados, tais como, quadrupolo (Q), *ion-traps*, de tempo de voo (TOF), entre outros (AEBERSOLD e MANN, 2003).

Estes analisadores podem ser usados individualmente e de maneira independente ou acoplados entre si, dando origem a equipamentos classificados como híbridos, os quais fazem uso das vantagens inerentes a cada analisador. Tais equipamentos permitem que experimentos em seqüência (*tandem*) sejam realizados, isto é, sendo possível determinar a seqüência de aminoácido de um peptídeo específico (STEEN e MANN, 2004).

O analisador quadrupolo funciona com quatro barras, duas positivas e duas negativas alternadas. A trajetória dos íons que passam através destas barras é alterada constantemente, devido à alta voltagem que o sistema é submetido. Para uma dada condição de corrente e voltagem, somente íons com uma determinada razão m/z (íons ressonantes) seguirão direcionados para diante e não ressonantes serão desviados para fora. O espectro de massas é obtido variando-se gradualmente a corrente e voltagem para selecionar todos os íons presentes e enviá-los para a câmara de colisão.

No analisador por TOF, os íons são acelerados até um tubo de vôo sob vácuo. Os íons se movem dentro do tubo em direção ao detector, com uma velocidade proporcional à sua razão m/z . O TOF é afetado pela energia inicial dos íons antes de serem acelerados devido à aplicação de voltagem, e assim adquirem velocidades proporcionais à sua razão m/z . No modo Q-TOF, os íons são inicialmente selecionados no quadrupolo, fragmentados em uma célula de colisão e as massas dos fragmentos dos íons são determinados pelo segundo analisador TOF (DOMON e AEBERSOLD, 2006).

1.4.3. Aplicações da proteômica no câncer

Recentemente, o termo oncoproteômica tem sido usado para descrever a aplicação da proteômica na oncologia. Os recentes avanços nas tecnologias de proteômica abriram a perspectiva de identificação de biomarcadores de câncer a partir de perfis de expressão de proteínas. Até o momento, uma série de estudos clínicos tem sido publicado utilizando tecnologias proteômicas para detectar câncer em estágio precoce (LI e cols., 2005; WARD e cols. 2006). RUI e colaboradores (2003), utilizando eletroforeses 2D e tecnologia MS, identificaram dois potenciais biomarcadores, Hsp27 (*heat shock protein 27*) e 14-3-3 sigma, para a detecção precoce de câncer da mama a partir do soro.

A identificação de proteínas, umas das moléculas responsáveis pela carcinogênese, fornece uma nova estratégia para o tratamento do câncer por focalização de proteínas específicas. Proteômica pode identificar proteínas candidatas que são responsáveis pelo crescimento do tumor e pode revelar muitas moléculas anteriormente não reconhecidas responsáveis pelo crescimento de células cancerosas *in situ* e pela produção de metástases. As aplicações das tecnologias proteômicas no tratamento do câncer podem ser amplamente utilizadas como preditivo da resposta ao tratamento, ou para identificar novos alvos para o tratamento do câncer (CHUTHAPISITH e cols., 2007).

VERRILLS e colaboradores (2006), utilizando a tecnologia proteômica, recentemente documentaram um novo papel para proteínas do citoesqueleto em leucemia resistente à vincristina, destacando um novo alvo para o tratamento de leucemia. Além da identificação de proteínas-alvo, proteômica pode ser empregada

na fase de validação antes de desenvolver uma nova droga, incluindo a análise de proteínas e estudo das interações de proteínas.

1.5. Justificativa

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2008), o câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo, sendo a câncer da mama o tipo de câncer que mais acomete as mulheres. As terapias disponíveis para o tratamento do câncer de mama são cirurgia, radioterapia, hormonioterapia e quimioterapia. Em certos casos, a quimioterapia é usada como o principal tratamento para o câncer (HIGGINS, 2007).

Melfalan é um quimioterápico alquilante utilizado no tratamento de melanoma metastático, leucemia mielóide, câncer de ovário e mama. Em altas doses, melfalan, assim como outros quimioterápicos, pode provocar diversos efeitos colaterais, incluindo leucopenia e trombocitopenia (DOLLERY, 1991).

O uso de fitoquímicos quimiopreventivos, como o resveratrol, em combinação com agentes quimioterápicos tem sido recentemente estudado com o intuito de superar a quimiorresistência das células de câncer e sensibilizá-las à apoptose ou ao bloqueio do crescimento celular, minimizando os efeitos colaterais decorrentes da terapia convencional (GARG e cols., 2005). Dessa forma, torna-se importante elucidar os efeitos e mecanismos bioquímicos da associação de fitoquímicos, como resveratrol, com melfalan em células de câncer de mama.

2. *Objetivos*

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos do resveratrol, em combinação ou não com melfalan, nas células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do resveratrol em combinação ou não com melfalan sobre a viabilidade das células MCF-7 e MDA-MB-231;
- Avaliar o efeito do resveratrol sobre a viabilidade das células não-tumorais VERO e PBMC;
- Na linhagem celular que for observada maior citotoxicidade pelo tratamento com a associação dos compostos:
- Analisar o efeito da sequência de tratamento do resveratrol e melfalan sobre a viabilidade celular;
- Avaliar o efeito do resveratrol em combinação ou não com melfalan na apoptose;
- Investigar possíveis alvos protéicos envolvidos na regulação da apoptose nas células tratadas com resveratrol em combinação ou não com melfalan;
- Investigar o efeito do resveratrol em combinação ou não com melfalan sobre as diferentes fases do ciclo celular;
- Investigar possíveis alvos protéicos envolvidos na regulação do ciclo celular nas células tratadas com resveratrol em combinação ou não com melfalan;

- Analisar o perfil protéico das células tratadas com resveratrol em combinação ou não com melfalan.

3. Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Melfalan, coquetel de inibidores de proteases, iodeto de propídio, RNase A e brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT), *trans*-resveratrol, insulina bovina, óxido de fenilarsina e fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) foram obtidos da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA). Ácido ocadáico foi adquirido da *Roche Applied Science* (Indianapolis, IN, EUA); DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) e penicilina/estreptomicina da *Invitrogen* (Carlsbad, CA, EUA); soro fetal bovino da *Cultilab* (Campinas, SP, BR).

3.2. Culturas de células e tratamentos

As linhagens de células de rim de macaco verde (VERO), células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) e células epiteliais de câncer de mama humano positiva para receptor de estrogênio derivada de um carcinoma *in situ* (MCF-7) e células negativas para receptor de estrogênio derivada de um carcinoma metastático (MDA-MB-231) foram utilizadas neste estudo. A linhagem de células MCF-7 foi cultivada em meio D-MEM suplementado com 2,0 g/L de HEPES, 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino, 5 µg/L de insulina bovina, 100 unidades/mL de penicilina G e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina. As linhagens de células VERO e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio D-MEM suplementado com 2,0 g/L de HEPES, 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino,

100 unidades/mL de penicilina G e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina. As células foram mantidas a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

Para a obtenção de PBMCs, sangue venoso de um doador saudável foi colhido e diluído em tampão fosfato salino (PBS) 1:3. As amostras foram cuidadosamente colocadas sobre uma solução de *Ficoll Hypaque*, seguido por centrifugação a 3000 rpm à temperatura ambiente durante 15 min. As células mononucleadas de sangue periférico (PBMCs) isoladas foram cultivadas no meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

Para o tratamento das células, estas foram contadas e plaqueadas na mesma densidade inicial. Após alcançarem 70 – 80 % de confluência, as células foram tratadas com:

- diferentes concentrações (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 e 500 µM) de *trans*-resveratrol dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO);
- diferentes concentrações (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 e 500 µM) de melfalan dissolvido em etanol-HCl e PBS (1:1);
- diferentes combinações de concentração do melfalan com resveratrol;
- 0,5% de DMSO + 0,5% de etanol-HCl e PBS 1:1 (controle).

Os experimentos com as células tratadas foram realizados em diferentes tempos: 5 minutos, 24 e 48 horas.

3.3. Ensaio de viabilidade celular por redução de MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução de MTT como descrito por MOSSMAN (1983). Após o tratamento, as células foram lavadas com

PBS e incubadas com 0,5 mg/mL de MTT, diluído em PBS, por 3 horas a 37 °C. Após a incubação, a solução de MTT foi retirada e os cristais de formazan produzidos pela atividade de desidrogenases mitocondriais foram dissolvidos em isopropanol ácido 0,04 M. Em seguida, as amostras foram transferidas para *ependorfs* e submetidas à centrifugação por 5 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi submetido à análise espectrofotométrica. A quantidade de MTT reduzido foi calculada baseada na diferença entre a absorbância de 570 e 650 nm (branco), medidas em um leitor de microplacas (*Perkin Elmer Victor3*, Waltham, MA, USA).

3.4. Microscopia de luz transmitida

Após 24h de tratamento, as células foram fotografadas com um aumento de 10x utilizando o microscópio LSM 510 Meta (*Carl Zeiss International*, Oberkochen, Germany). As imagens foram analisadas usando o programa Zeiss LSM Image Browser versão 4.2.

3.5. Análise do ciclo celular e da morte celular por citometria de fluxo

A distribuição do ciclo celular foi analisada por citometria de fluxo, como descrito previamente por POZO-GUISADO (2002). Após 24 e 48h de tratamento, 5×10^5 células foram coletadas, lavadas em PBS, e então ressuspensas em PBS contendo Triton X-100 0,1%, 50 µg/ml de iodeto de propídio e 1 mg/ml de RNase A. Após 30 minutos de incubação no escuro, o conteúdo de DNA foi medido usando FACScan equipado com o programa FACStation running CellQuest (Becton

Dickinson, CA). A porcentagem de células nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular, assim como na fase sub-G1, foi quantificada usando o programa WinMDI versão 2.9.

3.6. Preparação do extrato protéico das células

Para o preparo dos extratos celulares, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS e lisadas em nitrogênio líquido. Em seguida, tampão de lise contendo Tris-HCl 5 mM pH 7,4, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, fluoreto de sódio (NaF) 5 mM, óxido de fenilarsina 1 mM, ácido ocadáico 1 μ M, PMSF 1 mM e coquetel de inibidores de proteases (aprotinina A, leupeptina, bestatina, pepstatina A e E-64) em concentração final de 1mM, foi acrescentado e, com auxílio de um instrumento apropriado, as células foram raspadas da superfície das placas. O extrato obtido foi congelado e descongelado, sonicado por 10 minutos e centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante obtido da centrifugação foi considerado como o extrato protéico das células. Após sua obtenção, o extrato foi armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização dos experimentos. A concentração de proteínas foi determinada de acordo com LOWRY e colaboradores (1951), utilizando albumina bovina sérica 0,1 g% como padrão.

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Quantidades iguais das amostras de extratos protéicos celulares (100 μ g) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) (LAEMMLI, 1970). O gel de corrida em condições

desnaturantes continha Tris-HCl 375 mM, SDS 0,1 g%, acrilamida 9,7 g%, bisacrilamida 0,3 g%, persulfato de amônio 0,033 g%, N, N, N', N', - tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0,055 % (v/v), pH 8,8. O gel de empacotamento continha Tris-HCl 83 mM, SDS 0,07 g%, acrilamida 3,2 g%, bisacrilamida 0,09 g%, persulfato de amônio 0,073 g%, TEMED 0,123 % (v/v), pH 6,8. O tampão de corrida continha Tris-HCl 24,7 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1 g%, pH 8,3. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra contendo Tris-HCl 62,5 mM, glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,001 g%, SDS 2 g%, β - mercaptoetanol 10%. Os padrões de massa molecular utilizados foram: β -galactosidase (118 kDa), albumina de soro bovino (90 kDa), ovoalbumina (50 kDa), anidrase carbônica (34 kDa), β -lactoglobulina (26 kDa) e lisozima (19 kDa). Após as corridas, utilizando corrente constante de 15 mA, os géis foram corados. Para isto, os géis foram fixados por 20 minutos em solução aquosa de etanol 30% (v/v) e ácido ortofosfórico 2% (v/v). Após esse período, a solução foi desprezada e os géis lavados com uma solução de ácido ortofosfórico 2% (v/v), sob agitação. Em seguida, os géis foram corados *overnight*, sob agitação, com solução contendo sulfato de amônio 15%, etanol 18%, ácido ortofosfórico 2% e Coomassie brilliant blue G-250 0,002%. Posteriormente, os géis foram descorados em água deionizada.

3.8. Western Blotting

Após eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas do gel para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF). A eletrotransferência foi realizada em tampão Tris-glicina 25 mM e metanol 20% (v/v), pH 8,3 a 210 mA por 90 minutos a 4 °C (TOWBIN e cols., 1979) utilizando-se o sistema de transferência da Bio-Rad.

A membrana foi então bloqueada com Tris-HCl 0,01 M pH 7,6 contendo cloreto de sódio (NaCl) 0,15 M, 5% de albumina sérica bovina fração V e 0.1% de Tween 20 (TBS-Tween-Albumina) por 18 horas a 4 °C. Após 18 horas, o tampão de bloqueio foi desprezado e a membrana incubada com anticorpo primário numa diluição de 1:1.000 por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada 5x com TBS-Tween e incubada por 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário (anti-IgG coelho/camundongo) conjugado a peroxidase (1:5.000). A membrana foi então lavada 5x por 5 minutos com TBS-Tween e 2x com TBS. A imunodeteção das bandas foi visualizada por quimioluminescência, utilizando o kit *ECL Western Blotting Detection System* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram utilizados como controle interno para verificação do carregamento de proteínas no gel. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-p53 (#DO-1), anti-procaspase 8 (#SC7890) e anti-GAPDH (#0411) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anti-caspase 9 (#9502), anti-caspase 7 (#9492), anti-fosfo-Chk2 (Thr68) (#2661), anti-p21 (#2947), anti-Cdc25A (#3252), anti-CDK7 (#2916), anti-CDK2 (#2546), anti-fosfo-CDK2(#2561), anti-ciclina A (#4656) e anti-ciclina E (#4132) (Cell Signaling Technology, CA, EUA). A quantificação das bandas foi determinada por análise densitométrica, utilizando o programa *ImageJ* versão 1.43p (NIH, EUA).

3.9. Ensaio *in vitro* da quinase CDK7

Para analisar a atividade da quinase CDK7, 200 µL dos lisados celulares (contendo 200 µg de proteína celulares totais) foram inicialmente incubados com 20

μ L de proteína A/G-agarose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) por 30 min. Os sobrenadantes foram coletados após microcentrifugação a 2000 rpm, por 2 min, e incubados *overnight* com o anticorpo primário (anti-CDK7), sob agitação, a 4 °C. Após a incubação, 20 μ L da proteína A/G agarose foram acrescentados e uma nova incubação foi realizada por 3 horas nas mesmas condições (PAN e cols., 2010).

Os imunocomplexos de CDK7 formados foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem contendo ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico – hidróxido de potássio (HEPES-KOH) 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, ácido etileno glicol tetracético (EGTA) 2.5 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM, β -glicerofosfato 80 mM, NaF 1 mM, ortovanadato de sódio 0.1 mM, Tween 20 0.1%, glicerol 10%, PMSF 1 mM e 10 μ g/mL de aprotinina e leupeptina. Posteriormente, foram rinsados com tampão de quinase contendo HEPES-KOH 50 mM, pH 7.5, EGTA 2.5 mM, DTT 1 mM, β -glicerofosfato 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM, NaF 1 mM e ortovanadato de sódio 0.1 mM. A atividade da CDK7 foi determinada pela incubação dos imunocomplexos com 30 μ L da solução de quinase contendo 1 μ g de CDK2 (Santa Cruz Biotechnology), proteína substrato da CDK7, e ATP 0.1 mM por 30 min a 37° C. Em seguida, a CDK2 fosforilada foi submetida a SDS-PAGE, transferida e então visualizada por *imunoblotting* utilizando anticorpo primário anti-CDK2 fosforilada em resíduo de treonina 160.

3.10. Análise proteômica (gel 1D)

3.10.1. Digestão com tripsina

Após a coloração dos géis com Coomassie coloidal, as bandas foram excisadas com lâmina de bisturi e colocadas em microtubos (Axygen®). As bandas foram lavadas (3 vezes) com 200 μL de bicarbonato de amônio 25mM (NH_4HCO_3) em 50% de acetonitrila (ACN) pH 8,0 e agitadas *overnight* em vortex. O sobrenadante foi retirado e foi adicionado DTT 10 mM (aproximadamente 50 μL ou o volume suficiente para cobrir toda a superfície do gel) e em seguida, os microtubos foram incubados a 56 °C durante 1 h. A solução foi retirada e as bandas dos géis lavadas com NH_4HCO_3 25 mM (\pm 200 μL). A solução foi retirada e as bandas foram alquiladas com 50 μL de iodoacetamida 55 mM durante 30 min, no escuro, em temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi retirada e as bandas lavadas com NH_4HCO_3 25 mM. A desidratação das bandas de gel foi realizada com 100 μL de ACN 100% durante 5 min. A ACN foi retirada e a digestão do gel realizada com uma solução de tripsina (Promega®) preparada no gelo (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tripsina diluída em NH_4HCO_3 25 mM). As bandas de gel foram reidratadas com 15 μL da solução de tripsina e os microtubos mantidos a 4°C durante 10 min. Decorrido esse período, foi adicionado NH_4HCO_3 25 mM (\pm 50 μL ou o volume suficiente para cobrir toda a banda do gel) e os microtubos foram incubados a 37 °C durante 20 h.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas e foi adicionado 1% de ácido fórmico. Para a etapa de extração de peptídeos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, constituindo assim a primeira extração de peptídeos. Foram adicionados 50 μL de ACN 50% e ácido trifluoroacético (TFA) 5% nos tubos com as

bandas de gel e agitados suavemente durante 30 min. O líquido foi retirado (segunda extração) e adicionado à solução da primeira extração. Foi realizada a terceira extração de peptídeos, como descrito anteriormente. A solução resultante das três extrações foi seca em um concentrador à vácuo (*speed vac*) e solubilizada em 20 μL de água deionizada. Os peptídeos resultantes foram analisados por espectrometria de massas.

Antes da espectrometria de massa, os peptídeos foram dessalinizados utilizando o tip *Perfect Pure Tip (Eppendorf)* que contém uma mini-coluna de fase reversa C-18. As ponteiros foram acondicionadas em acetonitrila 100% e, em seguida, lavadas três vezes com água. A solução de peptídeo foi aspirada e expelida por dez vezes. Após três lavagem da ponteira com água, os peptídeos foram eluídos em solução com 50% ACN. As amostras foram secas em no *speed-vac*, e ressuspensas em solução de 0,1% de ácido fórmico e ACN 3%.

3.10.2. Espectrometria de massa – ESI-Q-TOF

Os peptídeos oriundos da hidrólise do gel 1D foram colocadas no Sistema Waters CapLC™ (Waters, Miliford, MA). Os peptídeos foram dessalinizados usando a coluna Waters Opti-Pak C18 acoplada ao Q-TOF MICRO® (Waters, Miliford, MA), instalado na UEMP-CCS, UFRJ. Os peptídeos gerados a partir da hidrólise foram fracionados por cromatografia líquida conjugada a um espectrômetro de massas com ionização por spray de elétrons (ESI-Q-TOF). O volume de injeção da amostra foi de 10 μL na coluna nanoEase C18 150 mm \times 75 μm (Waters, Miliford, MA) com eluição de 0,2 $\mu\text{L}/\text{min}$ e um gradiente linear 10-50% ACN com ácido fórmico a 0,1%. A voltagem do ESI foi de 3,5 kV com auxílio de uma agulha metálica. A temperatura

da fonte foi 100 °C e a voltagem do cone de 100 V. O controle do instrumento e a aquisição de dados foram conduzidos pelo programa *MassLynx* (versão 4.0, Waters) e os experimentos realizados com varredura de razão massa-carga (m/z) de 200 a 2000 usando um tempo de varredura de 1 s durante todo o processo de cromatografia. Um número máximo de 3 íons com cargas +2, +3 e +4 foram selecionadas para MS/MS a partir de um único MS. Massas adicionais de Na⁺ e K⁺ foram automaticamente excluídas.

O espectro MS/MS foi obtido da dissociação induzida por colisão usando o argônio como gás de colisão a uma pressão de 13 psi. A voltagem de colisão variou entre 18 e 45 V dependendo da massa do precursor. O íon de referência usado foi o íon monocarregado de m/z 588,8692 do ácido fosfórico. A massa MS/MS exata foi obtida automaticamente usando o Q-TOF^s LockSprayTM (Waters, Miliford, MA, USA).

3.11. Eletroforese bidimensional

3.12. Isoeletrofocalização – Primeira dimensão

Para primeira dimensão, 100 µg de proteínas foram solubilizados em 140 µl de tampão de reidratação contendo uréia 8 M, tiouréia 2M (v/v), DTT 20 mM, CHAPS (*3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate*) 2%, anfólitos 1% (v/v) e azul de bromofenol 0,002% (v/v). Cada amostra foi aplicada em uma tira de focalização isoeletrica IPG (*Immobilized pH gradient*) - matriz de poliacrilamida - de 7 cm (*Invitrogen*), com gradiente de pH nos intervalos entre 3 a 10 ou 4 a 7. As tiras foram colocadas em suporte próprio do sistema e mantidas assim por um período de

60 minutos para reidratação das mesmas. Após esse período, as proteínas foram submetidas à focalização com a seguinte programação de voltagens: 100 V - 15 min., 200 V - 15 min., 500 V - 30 min., 1000 V – 60 min. e 2000 V - 30 min., utilizando-se o sistema *Zoom IPGRunner System*.

3.12.1. SDS-PAGE – Segunda dimensão

Após a primeira dimensão, as fitas foram incubadas por 15 minutos em 1 ml de solução de equilíbrio 1 – *NuPAGE LDS 1x* e DTT 50 mM – sob agitação a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi trocada e foi adicionado 1 ml de solução de equilíbrio 2 – *NuPAGE LDS 1x* e iodoacetoamida 23 mg/ml por 15 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Após esses tratamentos, as fitas foram colocadas sobre géis desnaturantes de bis-tris 4-12% (*NuPAGE Novex*) e cobertas com uma solução de agarose 0,5 % (p/v). As corridas foram realizadas em tampão *NuPAGE MES*, por 50 minutos a 200 V, utilizando-se o sistema *XCELL Surelock Minicell* (O'FARREL, 1975). Posteriormente, os géis foram corados e escaneados utilizando LabScan Master.

3.13. Banco de dados

Os dados obtidos do ESI-Q-TOF foram analisados com auxílio do programa online MASCOT (www.matrixscience.com), sendo o banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Uma tolerância inicial de $\pm 0,2$ Da para massa de peptídeo foi empregada na análise do ESI-Q-TOF. As cisteínas foram consideradas carbamidometiladas, além da oxidação por metionina.

3.14. Análise estatística

Os dados estão expressos como média \pm SEM de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o Programa Prism 5 for Windows versão 5.0 e o teste de *Tukey* foi usado para determinar as diferenças entre as médias com nível de significância com valor de $P < 0,05$.

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Efeito da associação do resveratrol com melfalan em linhagens de células epiteliais de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231.

Neste estudo, primeiramente, foi analisado o efeito do resveratrol sobre as células MCF-7 e MDA-MB-231 através do ensaio de viabilidade celular por redução de MTT. Para isto, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços e, após atingirem 80% de confluência, foram tratadas com diferentes concentrações de *trans*-resveratrol (10 – 500 μ M) ou 0,5% de DMSO + 0,5% de etanol-HCl e PBS 1:1 (controle), por 5 minutos, 24 e 48 horas.

No ensaio de redução de MTT (**figuras 9**), foi demonstrado que o resveratrol reduziu a viabilidade celular de maneira dose e tempo dependente. Nas células MCF-7, esta diminuição observada mostrou ser significativa, no tratamento por 24 horas, a partir da concentração de 75 μ M de resveratrol, apresentando um IC_{50} de 120 μ M. No tratamento por 48 horas, este efeito sobre a viabilidade celular foi significativo a partir de 50 μ M de resveratrol, com IC_{50} de 79 μ M (**figuras 9A e 9B**). A concentração de 500 μ M de resveratrol foi capaz de reduzir quase que 100% a viabilidade das células MCF-7. Nas células MDA-MB-231, o resveratrol teve um efeito citotóxico menor do que nas células MCF-7, apresentando o IC_{50} para os tratamentos de 24 e 48 horas de 370 μ M e 125 μ M, respectivamente (**figuras 9C e 9D**).

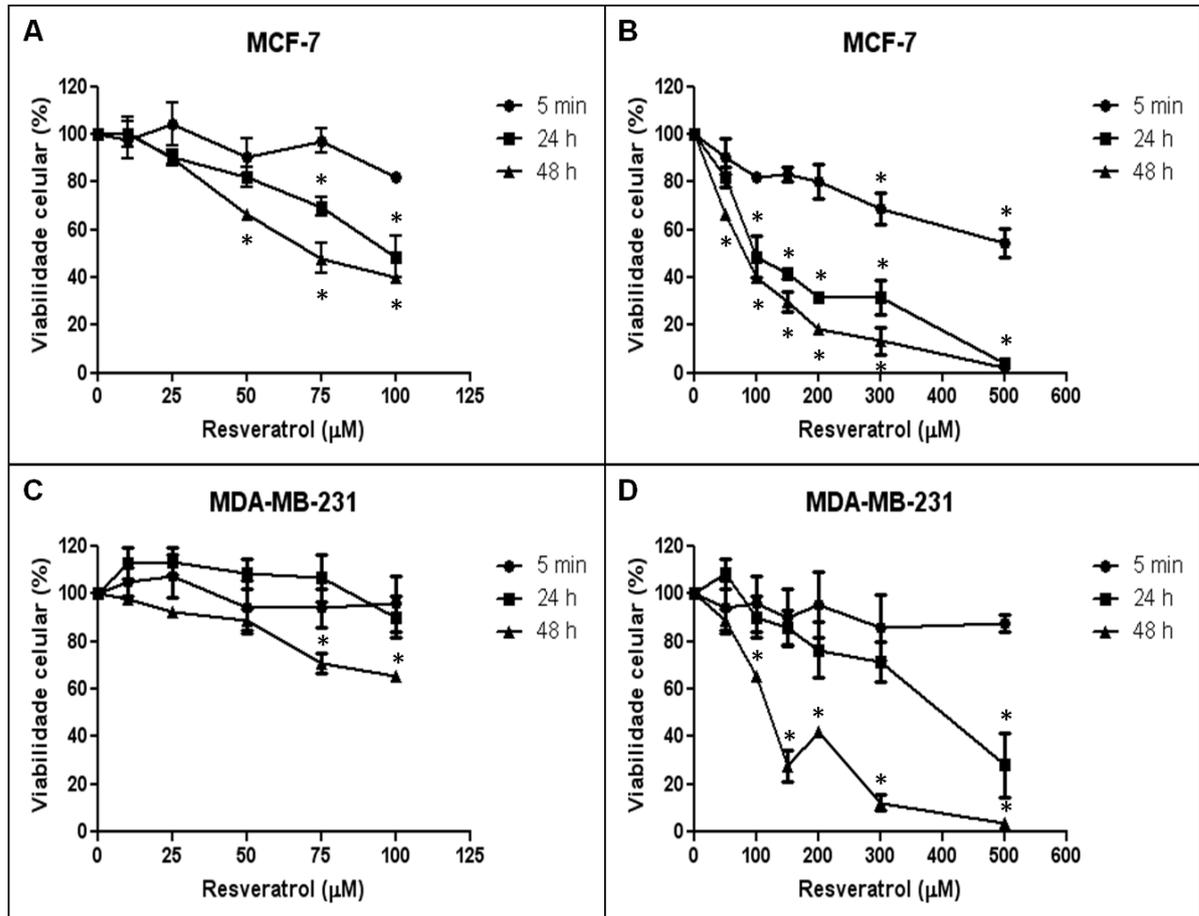


Figura 9. Efeito do resveratrol na viabilidade das células MCF-7 e MDA-MB-231. Células foram incubadas com 0,5 mg/mL de MTT por 3 horas a 37 °C. Após a incubação, os cristais de formazano formados foram dissolvidos em isopropanol ácido 0,04 M. A quantidade de MTT reduzido foi calculada baseada na diferença entre a absorbância de 570 e 650 nm (branco). Viabilidade das células MCF-7 tratadas com concentrações menores que 100 µM de resveratrol (A) e com concentrações de até 500 µM de resveratrol (B). Viabilidade das células MDA-MB-231 tratadas com concentrações menores que 100 µM de resveratrol (C) e com concentrações de até 500 µM de resveratrol (D). Os dados representam a média ± erro padrão de 3 experimentos independentes. * Nível de significância de $P < 0,05$.

Para investigar o efeito citotóxico do resveratrol sobre uma linhagem de célula não cancerosa, o ensaio de redução de MTT foi realizado em células VERO (**figuras 10A e 10B**), em células de rins de macaco verde, e em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) de humano (**figura 10C**). O resveratrol, assim como nas células de câncer de mama, reduziu a viabilidade das células VERO de maneira dose e tempo dependente. No entanto, o IC_{50} do resveratrol para esta linhagem celular foi de 307 μM no tratamento por 24 horas, ou seja, mais que o dobro do IC_{50} do resveratrol para as células MCF-7. O tratamento das células VERO com 200 μM de resveratrol reduziu 23% da viabilidade celular, enquanto que o mesmo tratamento diminuiu a viabilidade das células MCF-7 em 68%. Este resultado mostra que as células MCF-7 foram mais sensíveis aos efeitos citotóxicos do resveratrol do que as células VERO. Nas células PBMC, o resveratrol promoveu uma redução na viabilidade de maneira dose dependente, sendo esta redução significativa a partir da concentração de 75 μM . O IC_{50} do resveratrol foi de 500 μM , o que mostra a baixa toxicidade deste fitoquímico nesta linhagem.

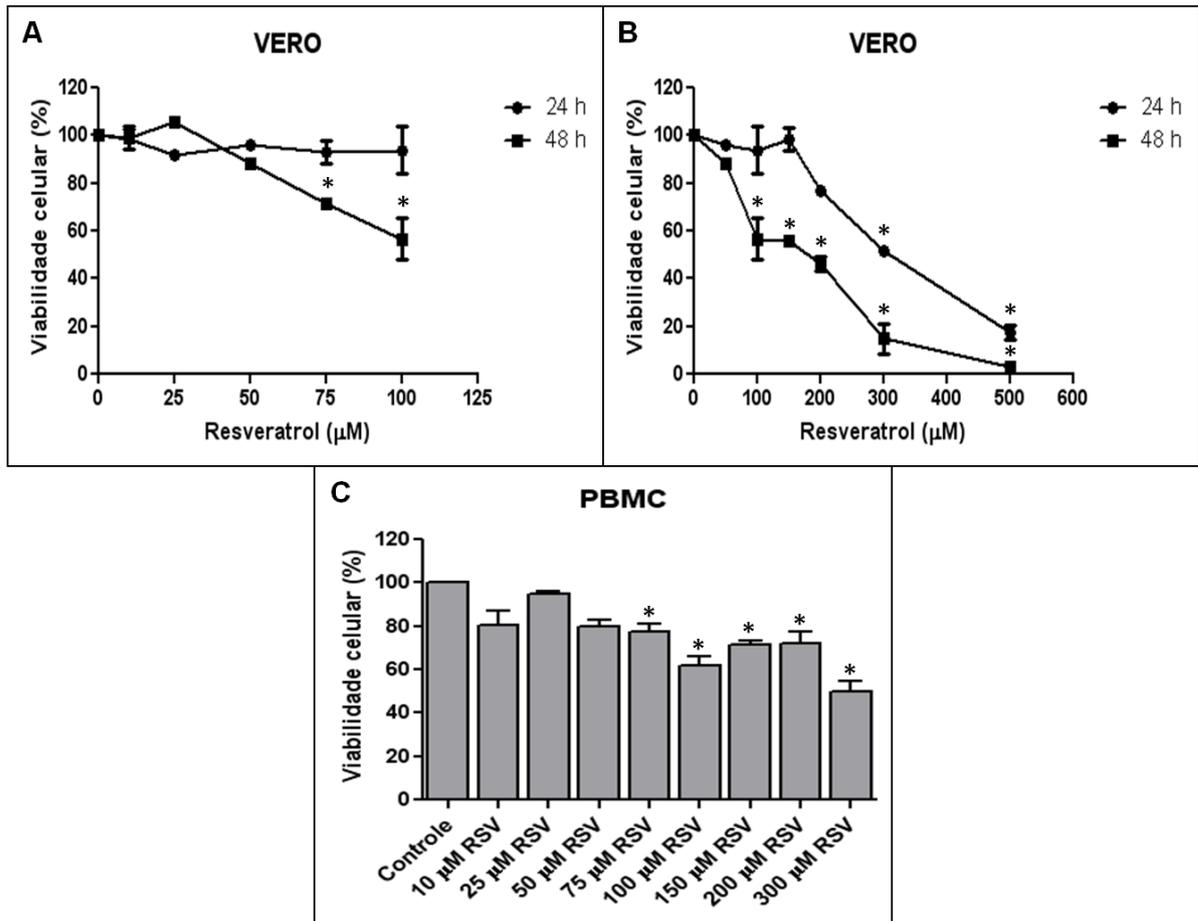


Figura 10. Efeito do resveratrol na viabilidade das células VERO e PBMC.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução de MTT como descrito por MOSSMAN (1983). Viabilidade das células VERO tratadas com concentrações menores que 100 μM de resveratrol (A) e com concentrações de até 500 μM de resveratrol (B). Viabilidade das células PBMC tratadas por 24 horas com concentrações de até 300 μM de resveratrol (C). Os dados representam a média ± erro padrão de 3 experimentos independentes. RSV, resveratrol. * Nível de significância de $P < 0,05$.

Antes de analisar os efeitos da associação do resveratrol com melfalan sobre as células MCF-7 e MDA-MB-231, o ensaio de redução de MTT foi realizado com diferentes concentrações de melfalan (10 – 500 μM) (**figura 11**). Neste ensaio, foi demonstrado que o melfalan, assim como o resveratrol, reduziu a viabilidade celular de maneira dose e tempo dependente. No tratamento por 24 horas, esta diminuição

observada mostrou ser significativa a partir da concentração de 75 μM de melfalan nas células MCF-7, apresentando um IC_{50} de 110 μM . No tratamento por 48 horas, este efeito sobre a viabilidade celular foi significativo a partir de 50 μM de melfalan e concentrações acima de 100 μM foram capazes de reduzir quase que 100% a viabilidade celular (**figuras 11A e 11B**). O IC_{50} para este tempo de tratamento foi de 42 μM . As células MDA-MB-231 foram mais resistentes ao melfalan do que as células MCF-7. No tratamento por 24 horas, apenas a concentração de 500 μM de melfalan promoveu uma redução significativa da viabilidade celular, com IC_{50} de 305 μM (**figura 11C**). O tratamento por 48 horas resultou em maior diminuição da viabilidade celular, apresentando IC_{50} de 112 μM (**figura 11D**).

A **figura 12** apresenta o efeito da associação do resveratrol com melfalan sobre a viabilidade das células MCF-7 e MDA-MB-231. Nota-se que, após o tratamento por 24 horas com a combinação de 50 μM de resveratrol com 50 μM de melfalan, a viabilidade das células MCF-7 e MDA-MB-231 diminuíram 32,2% e 19,2%, respectivamente. Esta redução na viabilidade celular foi maior que a soma dos efeitos citotóxicos dos compostos isolados nas mesmas concentrações. Outras combinações também obtiveram resultados similares, como a associação de 100 μM de resveratrol com 25 μM de melfalan, na qual a diminuição da viabilidade das células MCF-7 e MDA-MB-231 foi 13% e 3%, respectivamente, maior do que a soma dos efeitos dos compostos isolados nas mesmas concentrações. No tratamento por 48 horas, combinações com concentrações acima de 100 μM de resveratrol com 25, 50 ou 75 μM de melfalan foram capazes de reduzir quase que 100% a viabilidade celular. Estes dados mostram que o resveratrol é capaz de potencializar os efeitos citotóxicos do melfalan, atuando de forma sinérgica com este quimioterápico. Como mostrado na **figura 12C** através da microscopia de luz transmitida, a combinação do

resveratrol com melfalan promoveu mais modificações na morfologia das células MCF-7 do que o tratamento com resveratrol ou melfalan. Estes dados mostram que o resveratrol é capaz de potencializar os efeitos citotóxicos do melfalan nas células MCF-7 e MDA-MB-231. No entanto, este aumento do efeito citotóxico do melfalan foi mais acentuado nas células MCF-7 do que nas células MDA-MB-231. Por isso, nesta investigação do aumento da citotoxicidade do melfalan pelo resveratrol, outros experimentos foram realizados neste estudo utilizando somente as células MCF-7.

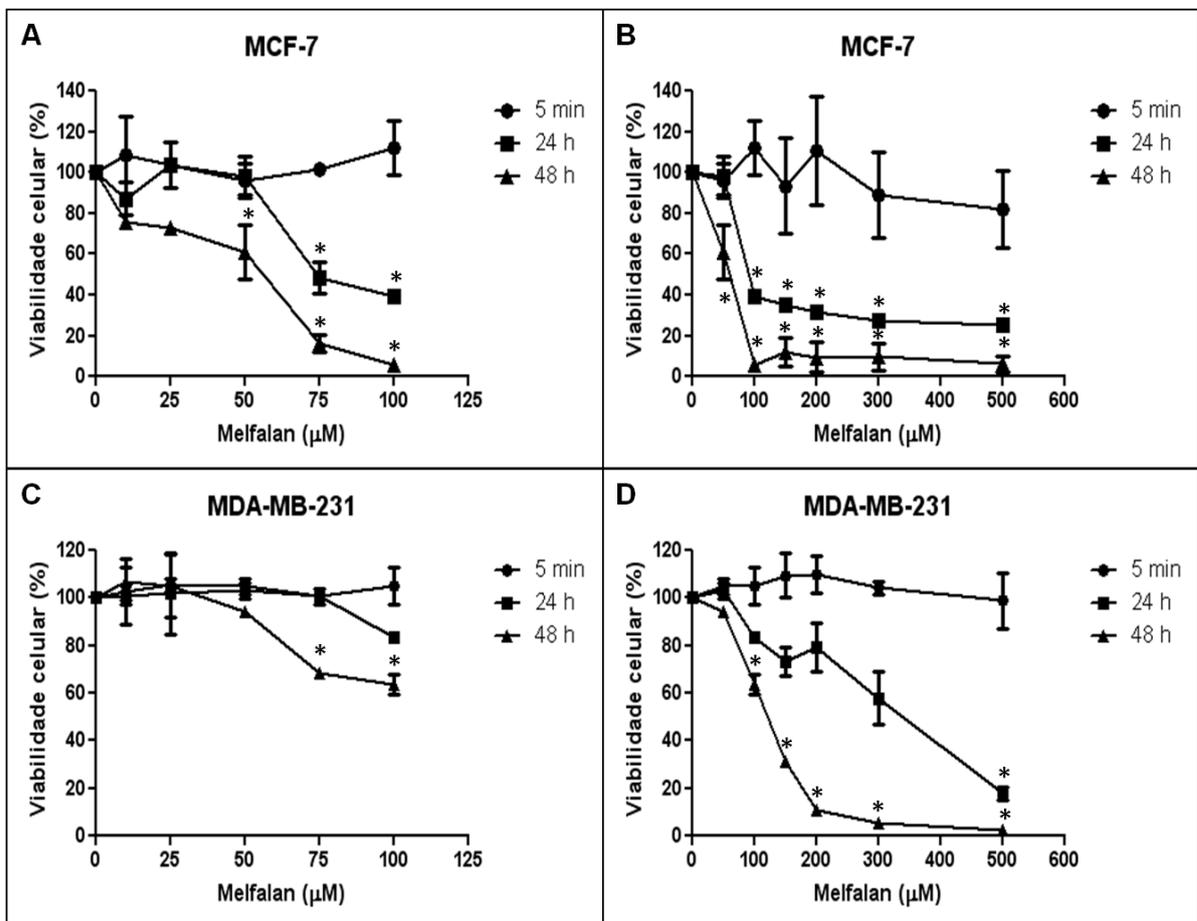


Figura 11. Efeito do melfalan na viabilidade das células MCF-7 e MDA-MB-231: ensaio de redução de MTT.

Viabilidade das células MCF-7 tratadas com concentrações menores que 100 µM de resveratrol (A) e com concentrações de até 500 µM de resveratrol (B). Viabilidade das células MDA-MB-231 tratadas com concentrações menores que 100 µM de resveratrol (C) e com concentrações de até 500 µM de resveratrol (D). Os dados representam a média ± erro padrão de 3 experimentos independentes. * Nível de significância de $P < 0,05$.

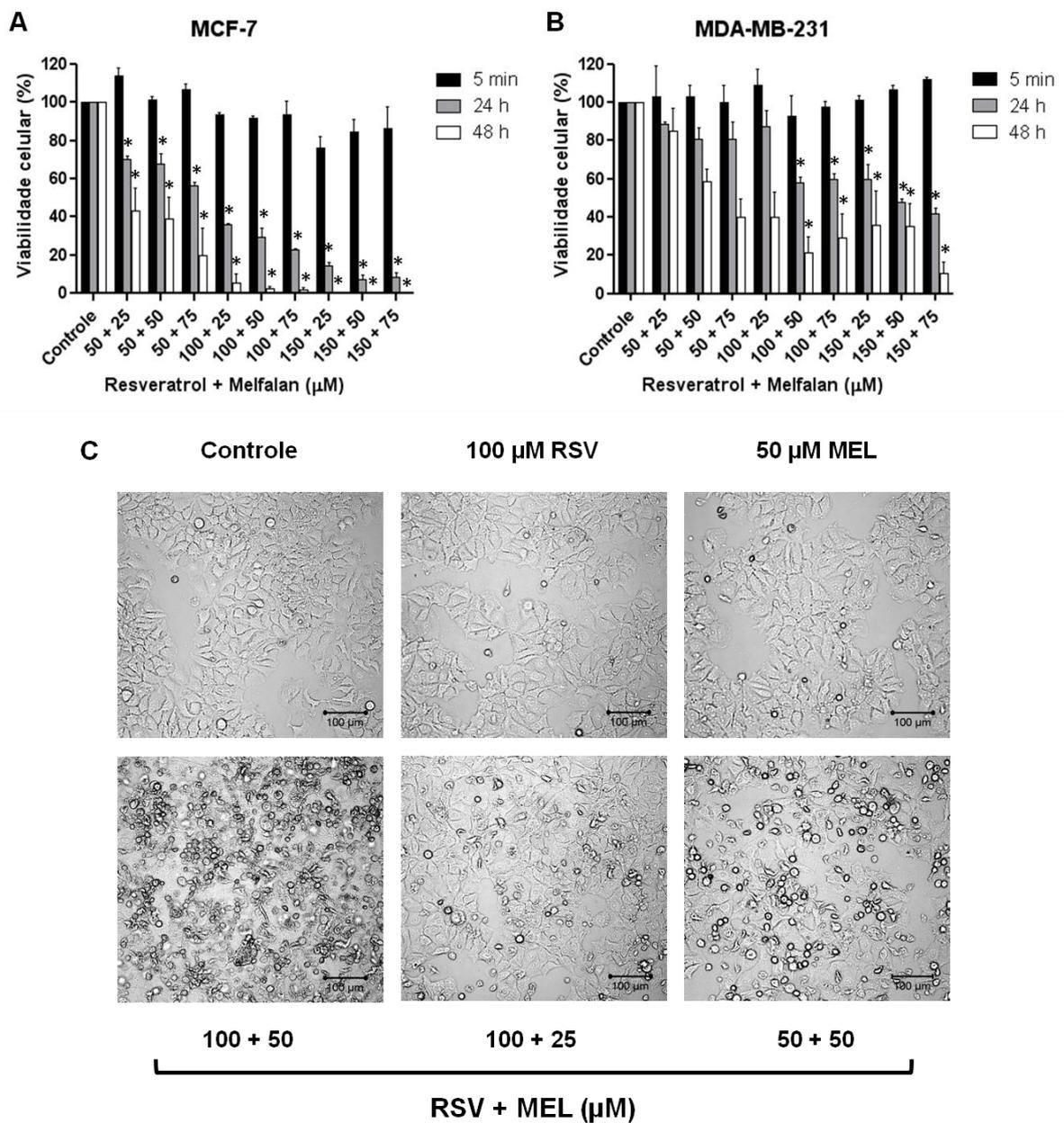


Figura 12. Efeito da associação do resveratrol com melfalan sobre as células MCF-7 e MDA-MB-231.

Viabilidade das células MCF-7 (A) e MDA-MB-231 (B) tratadas com diferentes combinações de resveratrol com melfalan ou 0,5% de DMSO + 0,5% de etanol-HCl e PBS 1:1 (controle), pelos tempos determinados. Microscopia de luz transmitida das células MCF-7 tratadas com resveratrol e melfalan (C). As imagens são representativas de 3 diferentes experimentos. Os dados representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes. MEL, melfalan; RSV, resveratrol. * Nível de significância de $P < 0,05$.

Após observar que o tratamento com associação do resveratrol com melfalan resultava em potencialização dos efeitos citotóxicos nas células MCF-7 e MDA-MB-231, foi analisado se a sequência do tratamento com resveratrol e melfalan poderia influenciar neste efeito cooperativo (**figura 13**). Interessantemente, o tratamento sequencial com resveratrol seguido por melfalan gerou uma maior citotoxicidade do que o tratamento com melfalan seguido por resveratrol. Estes achados indicam que o pré-tratamento com resveratrol poderia estar sensibilizando as células MCF-7 ao tratamento com melfalan.

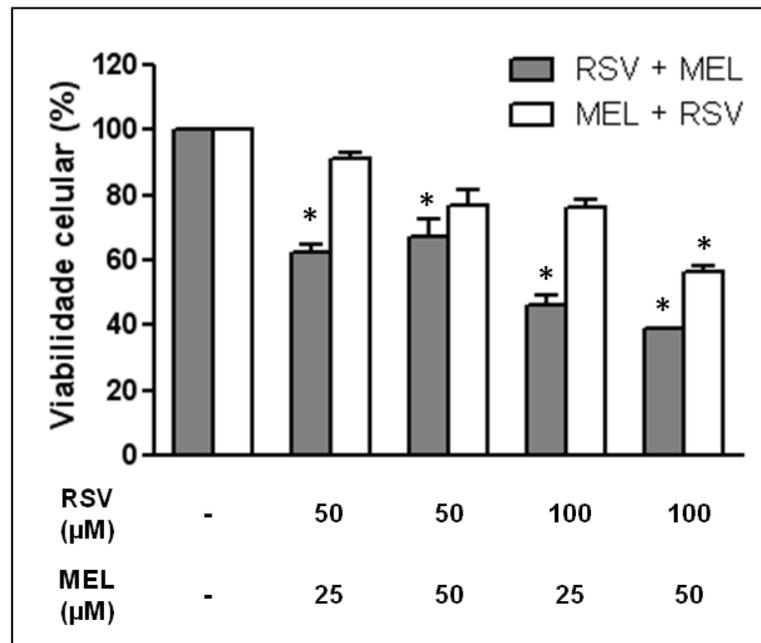


Figura 13. Efeito da sequência do tratamento de resveratrol e melfalan sobre a viabilidade celular.

Células MCF-7 foram tratadas com resveratrol por 24 horas seguido pelo tratamento com melfalan por mais 24 horas (RSV + MEL) ou com melfalan por 24 horas seguido pelo tratamento com resveratrol por mais 24 horas (MEL + RSV). Os dados representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes. MEL, melfalan; RSV, resveratrol. * Nível de significância de $P < 0,05$.

A fim de verificar o efeito do resveratrol sobre a apoptose, as células MCF-7 tratadas com este polifenol foram contadas, incubadas com RNase e triton X-100, coradas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo (**figura 14A**). Observou-se que o tratamento com 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM de resveratrol aumentou a apoptose nas células MCF-7 em 1,0%, 6,5%, 9,3% e 8,0%, respectivamente. Este aumento foi significativo apenas no tratamento com concentrações igual ou maior que 100 μM de resveratrol. O tratamento com 50 μM de melfalan aumentou a apoptose nas células MCF-7 em 4,6% (**figura 14B**). Quando 50 μM de melfalan foram combinados com 50 μM ou 100 μM de resveratrol, a quantidade de células MCF-7 na fase sub-G1 foi aumentada em 21,9% e 24,7%, respectivamente. Estes resultados sugerem que o efeito apoptótico aumentado nas células MCF-7 pelo tratamento com combinações de resveratrol com melfalan foi alcançado através da ação do resveratrol, que aumentou a apoptose induzida pelo melfalan.

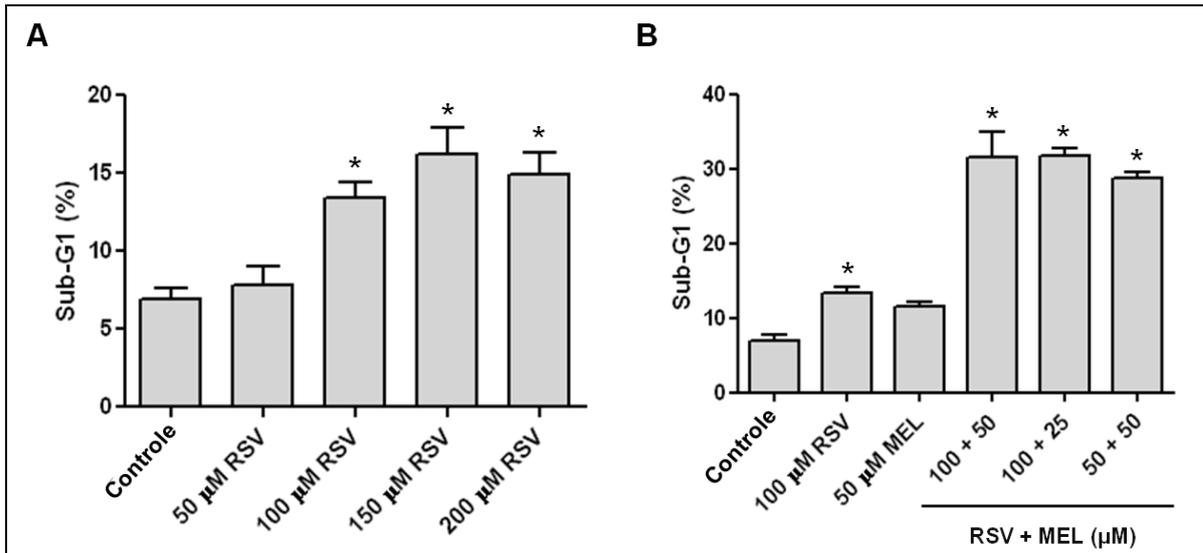


Figura 14. Efeito do resveratrol isolado (A) e da combinação do resveratrol com melfalan (B) na apoptose das células MCF-7.

Após 24 horas de tratamento, 5×10^5 células foram ressuspensas em PBS contendo Triton X-100 0,1%, 50 μg/ml de iodeto de propídio e 1 mg/ml de RNase A. O conteúdo de DNA foi medido usando FACScan equipado com o programa FACStation running CellQuest. A porcentagem de células na fase sub-G1 (células apoptóticas) foi quantificada usando o programa WinMDI versão 2.9 e os valores correspondem à média \pm erro padrão (n= 3). MEL, melfalan; RSV, resveratrol. * Nível de significância de $P < 0,05$.

Para determinar se a sensibilização pelo resveratrol envolve a ação da p53 e de caspases, os níveis de p53 e a ativação de caspases foram analisados pelo ensaio de *Western blotting* (**figura 15A**). Análises densitométricas das bandas visualizadas no *blotting* foram realizadas para quantificar as proteínas (**figura 15B**). Os dados mostraram que o nível de p53 foi aumentado mais do que duas vezes pelo tratamento com resveratrol isolado, assim como pelo tratamento com as diferentes combinações deste composto com melfalan. Nenhuma alteração foi observada no nível de p53 após o tratamento com melfalan isolado. A expressão da procaspase 8 foi diminuída pelos tratamentos com diferentes combinações de resveratrol e melfalan. Além disso, o tratamento das células MCF-7 com resveratrol e melfalan

resultou em clivagem aumentada da caspase 7 e caspase 9, indicando que o resveratrol cooperou com melfalan para ativar estas caspases.

Após observar os efeitos do resveratrol e do melfalan sobre a viabilidade celular e apoptose, o efeito destas drogas sobre a distribuição do ciclo celular foi analisada por citometria de fluxo (**figura 16**). O tratamento por 24 horas com resveratrol promoveu um aumento do número de células na fase S de 7,5% e de 6,5% nas concentrações de 50 μM e 200 μM , respectivamente, e uma diminuição concomitante no número de células em G1 e G2 / M fases (**figura 16A**). O tratamento por 48 horas com 50 μM de resveratrol acentuou este acúmulo de células na fase S (**figura 16B**). O tratamento por 24 horas e 48 horas com diferentes concentrações de melfalan também promoveu acúmulo de células na fase S, mas este resultado não foi significativo (**figura 16C e 16D**). Não foi possível realizar a distribuição do ciclo celular nos tratamentos por 48 horas com 200 μM de resveratrol isolado e com 75 μM de melfalan isolado devido à baixa viabilidade celular nestes tratamentos.

Quando as células foram tratadas com combinações de 50 μM de resveratrol e 25 μM , 50 μM ou 75 μM de melfalan por 24 horas, um aumento significativo de aproximadamente 12% de células na fase S foi observado (**figura 17A**). O tratamento por 48 horas com as associações de 50 μM de resveratrol com 25 μM ou 50 μM de melfalan promoveu um aumento de células na fase S de 12% e 13%, respectivamente (**figura 17B**). Este efeito foi significativo apenas nas associações em que a concentração do resveratrol era de 50 μM . Não foi possível realizar a distribuição do ciclo celular no tratamento por 48 horas com a combinação de 50 μM de resveratrol e 75 μM de melfalan isolado devido à baixa viabilidade celular neste tratamento.

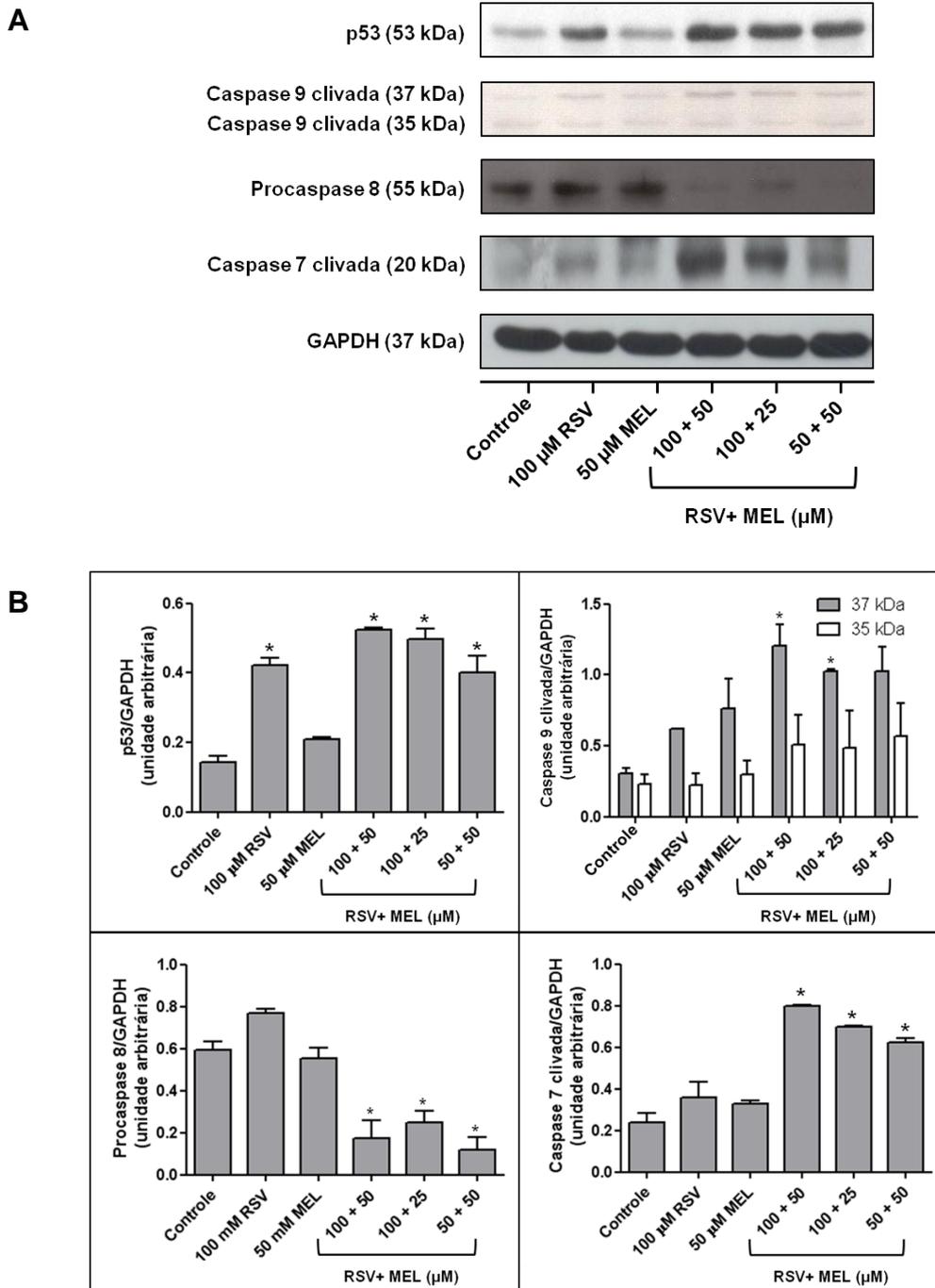


Figura 15. Efeitos do resveratrol e melfalan nos níveis da p53 e da ativação de caspases.

(A) Os extratos protéicos das células tratadas (100 μ g) foram submetidos à SDS-PAGE. Em seguida, *Western blotting* foi realizado utilizando anticorpos contra p53, caspase 9 clivada, procaspase 8, caspase 7 clivada e GAPDH (controle de carregamento). Os *immunoblottings* são representativos de 3 diferentes experimentos. (B) A análise densitométrica de cada banda foi realizada utilizando o *software ImageJ*, sendo os dados expressos como unidade arbitrária. Os valores correspondem à média \pm erro padrão (n= 3). MEL, melfalan; RSV, resveratrol. * Nível de significância de $P < 0,05$.

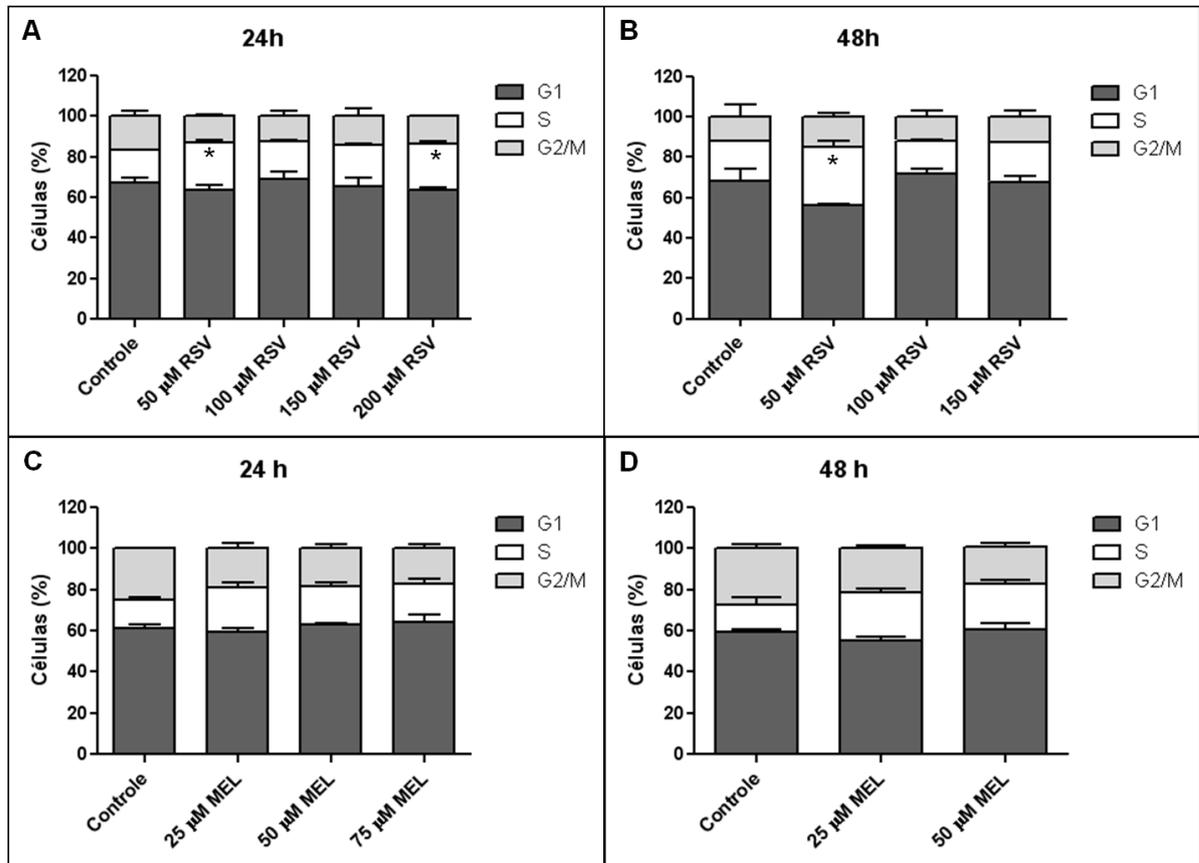


Figura 16. Efeito do resveratrol e do melfalan no ciclo de divisão celular das células MCF-7.

Após o tratamento, 5×10^5 células foram ressuspensas em PBS contendo Triton X-100 0,1%, 50 µg/ml de iodeto de propídio e 1 mg/ml de RNase A. O conteúdo de DNA foi medido usando FACScan equipado com o programa FACStation running CellQuest. A porcentagem de células nas fases G1, S e G2/M foi quantificada usando o programa WinMDI versão 2.9. Tratamento com resveratrol por 24 horas (A) e por 48 horas (B). Tratamento com melfalan por 24 horas (C) e por 48 horas (D). Os valores correspondem à média \pm erro padrão de três experimentos independentes. MEL, melfalan; RSV, resveratrol. * Nível de significância de $P < 0,05$.

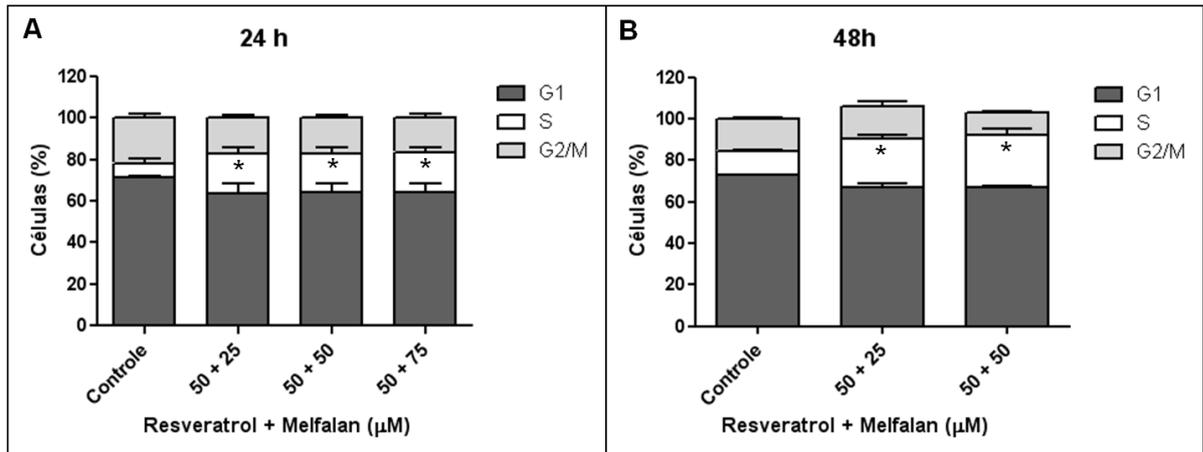
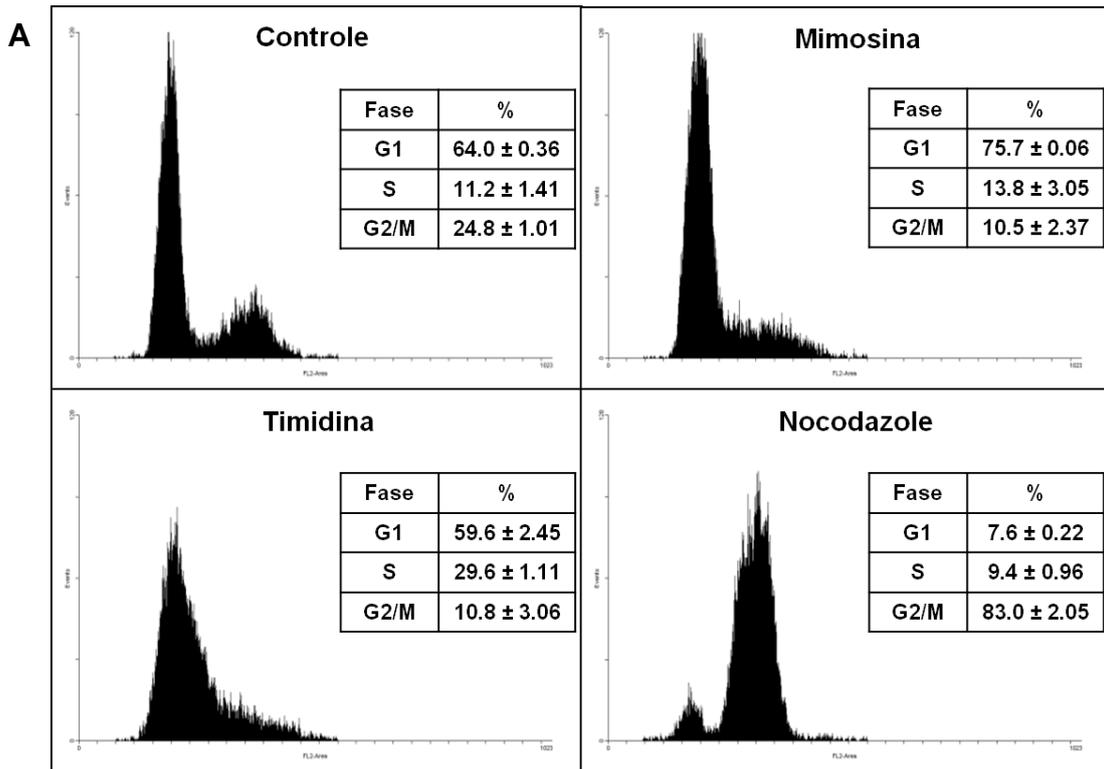


Figura 17. Efeito da associação do resveratrol com melfalan no ciclo de divisão celular das células MCF-7.

Após o tratamento, 5×10^5 células foram ressuspensas em PBS contendo Triton X-100 0,1%, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de iodeto de propídio e 1 mg/ml de RNase A. O conteúdo de DNA foi medido usando FACScan equipado com o programa FACStation running CellQuest. A porcentagem de células nas fases G1, S e G2/M foi quantificada usando o programa WinMDI versão 2.9. Tratamento com diferentes combinações de resveratrol e melfalan por 24 horas (A) e por 48 horas (B). Os valores correspondem à média \pm erro padrão de três experimentos independentes. * Nível de significância de $P < 0,05$.

Para testar o papel da progressão do ciclo celular no aumento da citotoxicidade do melfalan, as células MCF-7 foram bloqueadas em diferentes fases usando inibidores específicos do ciclo celular e tratadas concomitantemente com melfalan. A **figura 18A** mostra a especificidade de cada inibidor do ciclo celular, sendo a mimosina potente bloqueador da fase G1, timidina da fase S, e nocodazole da fase G2/M. Em seguida, foi analisada a viabilidade das células MCF-7 tratadas com: melfalan isolado; um dos inibidores específicos do ciclo celular isolado; ou combinação do melfalan com um dos inibidores específicos do ciclo celular (**figura 18B**). Foi observado que tanto o tratamento com melfalan isolado nas concentrações utilizadas quanto o tratamento com os inibidores específicos do ciclo celular não alterou a viabilidade celular de forma significativa. No entanto, de forma similar ao tratamento com a associação do resveratrol com melfalan, o tratamento com combinação de bloqueadores específicos do ciclo celular e melfalan também potencializou a habilidade do melfalan em reduzir a viabilidade das células MCF-7. Estes achados sugerem que o bloqueio na fase S induzido pelo resveratrol poderia ser um dos mecanismos pelo qual o resveratrol atua sensibilizando as células MCF-7 ao tratamento com melfalan.



B

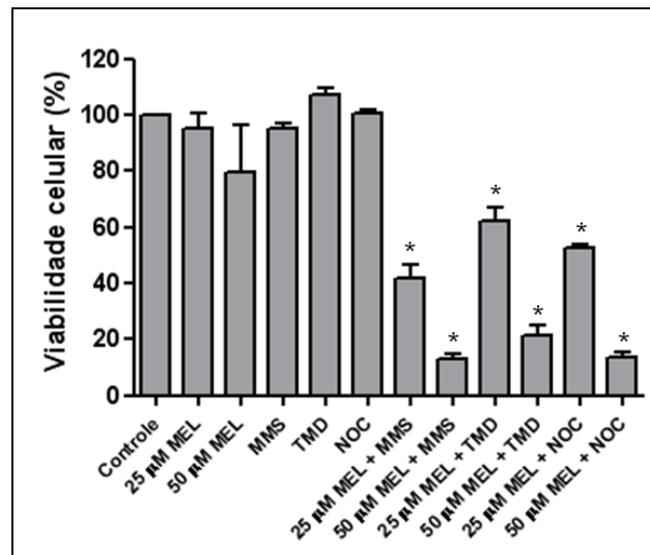


Figura 18. Efeito de inibidores específicos do ciclo celular sobre citotoxicidade induzida pelo melfalan nas células MCF-7.

(A) Análise do ciclo celular após 24 horas de tratamento com inibidores específicos do ciclo celular: mimosina, timidina e nocodazole. As porcentagens de células nas fases G1, S ou G2/M são mostradas no diagrama. (B) A viabilidade das células MCF-7 foi determinada através do ensaio de MTT após o tratamento concomitante de melfalan com 2 mM de timidina, 0,4 mM de mimosina ou 0,4 µg/mL de nocodazole. Os valores correspondem à média ± erro padrão de três experimentos independentes. MEL, melfalan, MMS, mimosina, NOC, nocodazole; RSV, resveratrol, TMD, timidina. * Nível de significância de $P < 0,05$.

Após os resultados obtidos sobre a distribuição do ciclo celular, uma investigação mais precisa da via de sinalização relacionada a este efeito foi realizada. Para isto, as células foram tratadas com resveratrol e/ou melfalan e os níveis de proteínas regulatórias do ciclo na fase S foram analisados. Inicialmente, os níveis da proteína *checkpoint 2* fosforilada no resíduo de treonina 68 (forma ativa) dos extratos celulares foram avaliados por *Western blotting* (**figura 19**). Tal quinase é ativada em resposta a estresse genotóxico, e assim fosforila proteínas regulatórias da divisão celular, como cdc25A e p53 (AHN e cols., 2004). Foi observado que, tanto o resveratrol quanto melfalan isoladamente, aumentaram os níveis de fosforilação de *checkpoint 2*, e a associação dos compostos intensificou este aumento. No entanto, não se observou mudança nos níveis de cdc25A, fosfatase responsável por ativar a CDK2 através da defosforilação dos resíduos de tirosina 15 e/ou treonina 14.

Além da defosforilação pela cdc25A, a atividade da CDK2 é também controlada por sua interação com as ciclinas E e A, na transição da fase G1 para fase S e na transição da fase S para fase G2 do ciclo celular, respectivamente (KALDIS e ALEEM, 2005). Por este motivo, os níveis destas ciclinas foram investigados. Os dados mostraram que houve um aumento nos níveis de ciclina E pelos tratamentos, mas este aumento não foi significativo. Os níveis de ciclina A foram reduzidos no tratamento com resveratrol, assim como no tratamento com as diferentes combinações deste composto com melfalan. Adicionalmente, foram avaliados os níveis de p21, proteína inibidora de CDK2, e observou-se que os níveis de p21 foram aumentados tanto com o tratamento com o resveratrol quanto com melfalan, mas a associação dos compostos não promoveu mudança nos níveis desta proteína (**figura 20**).

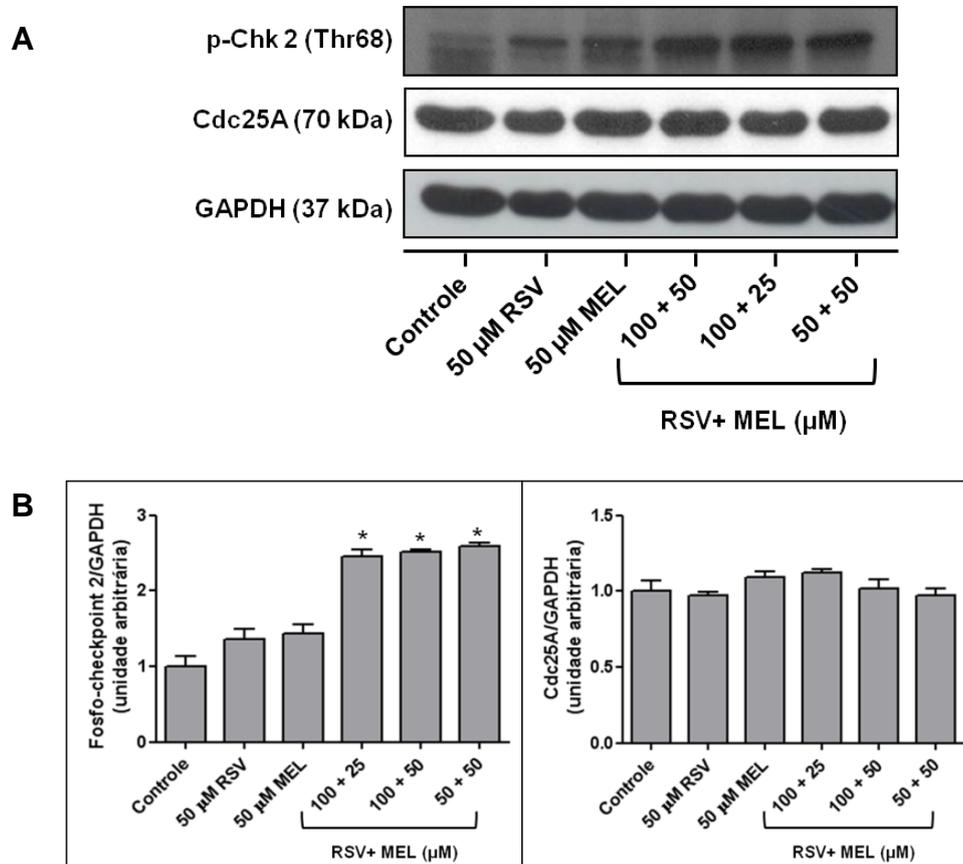


Figura 19. Efeitos do resveratrol e melfalan nos níveis da fosfo-checkpoint 2 e cdc25A.

(A) Os extratos protéicos das células tratadas (100 µg) foram submetidos à SDS-PAGE. Em seguida, *Western blotting* foi realizado utilizando anticorpos contra fosfo-checkpoint 2, cdc25A e GAPDH (controle de carregamento). Os *imunoblottings* são representativos de 3 diferentes experimentos. (B) A análise densitométrica de cada banda foi realizada utilizando o *software ImageJ*, sendo os dados expressos como unidade arbitrária. Os valores correspondem à média ± erro padrão (n= 3). MEL, melfalan; RSV, resveratrol. * Nível de significância de $P < 0,05$.

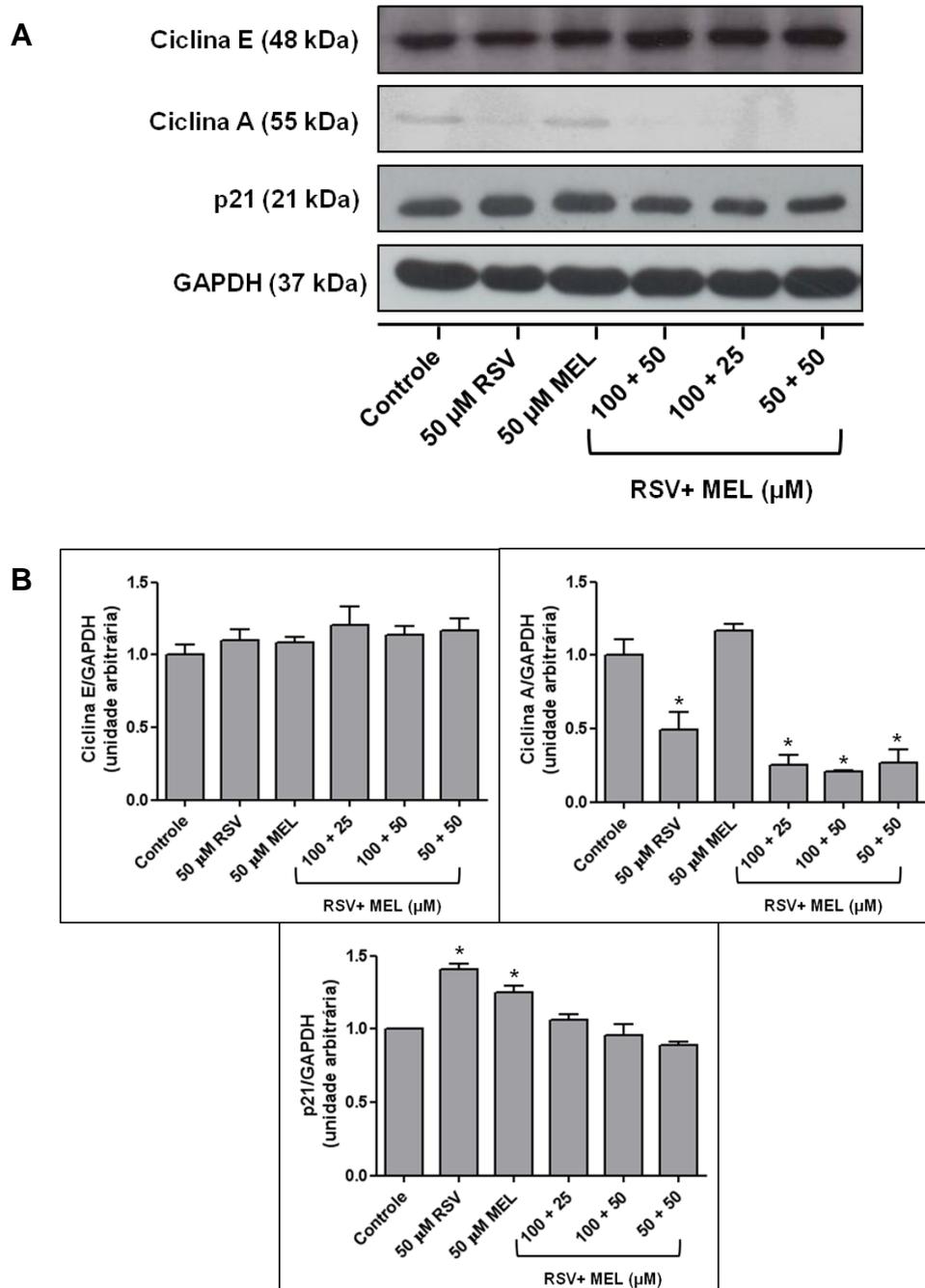


Figura 20. Efeitos do resveratrol e melfalan nos níveis da ciclina E, ciclina A e p21.

(A) Os extratos protéicos das células tratadas (100 μ g) foram submetidos à SDS-PAGE. Em seguida, *Western blotting* foi realizado utilizando anticorpos contra ciclina E, ciclina A, p21 e GAPDH (controle de carregamento). Os *imunoblottings* são representativos de 3 diferentes experimentos. (B) A análise densitométrica de cada banda foi realizada utilizando o *software ImageJ*, sendo os dados expressos como unidade arbitrária. Os valores correspondem à média \pm erro padrão (n= 3). MEL, melfalan; RSV, resveratrol. * Nível de significância de $P < 0,05$.

Subseqüentemente, os níveis de CDK2 total, quinase regulatória da fase S do ciclo celular, foram analisados. O resultado mostrou que não houve alteração nos níveis desta proteína pelos tratamentos. Entretanto, notou-se que o tratamento com resveratrol, assim como o tratamento com as diferentes combinações deste composto com melfalan, foram capazes de reduzir os níveis de fosforilação da CDK2 no resíduo de treonina 160 (**figura 21**). Uma vez que o tratamento com melfalan não produziu este efeito, sugere-se que o resveratrol seja o composto responsável por este resultado nas associações testadas. A fosforilação da CDK2 neste resíduo é necessária para sua ativação, sendo esta realizada pela enzima CDK7. Assim, estes dados indicam uma possível inibição da CDK7 pelo resveratrol e sua associação com melfalan. Por este motivo, a atividade da CDK7 foi analisada por um ensaio de quinase *in vitro*. A **figura 22** mostra uma redução na fosforilação da CDK2 (substrato), ou seja, uma redução da atividade da CDK7 pelo resveratrol. O mesmo efeito foi demonstrado nas células tratadas com a combinação de resveratrol e melfalan, mas não foi observado nas células que foram tratadas com melfalan isoladamente. Estes dados suportam a sugestão acima de que o resveratrol estaria inibindo a atividade da CDK7.

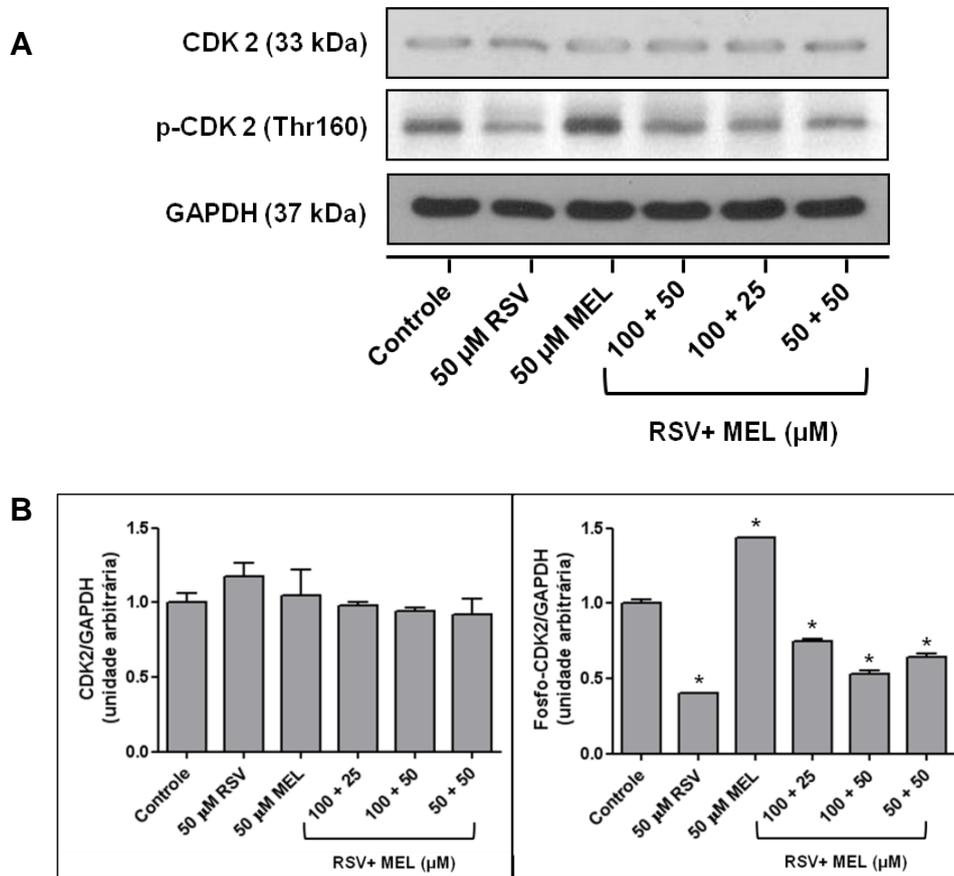


Figura 21. Efeitos do resveratrol e melfalan nos níveis da CDK2 e de sua forma fosforilada (Thr160).

(A) Os extratos protéicos das células tratadas (100 μg) foram submetidos à SDS-PAGE. Em seguida, *Western blotting* foi realizado utilizando anticorpos contra CDK2, CDK2 fosforilada em resíduo de treonina 160 e GAPDH (controle de carregamento). Os *immunoblottings* são representativos de 3 diferentes experimentos. (B) A análise densitométrica de cada banda foi realizada utilizando o *software ImageJ*, sendo os dados expressos como unidade arbitrária. Os valores correspondem à média ± erro padrão (n= 3). MEL, melfalan; RSV, resveratrol. * Nível de significância de P < 0,05.

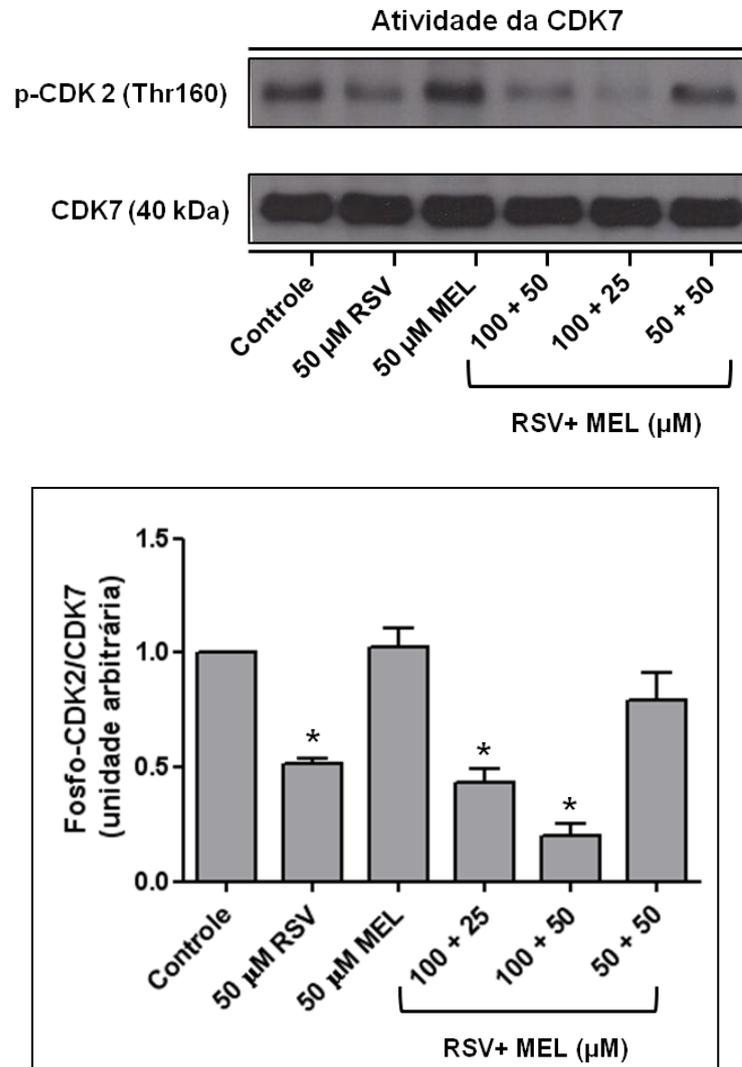


Figura 22. Efeito do resveratrol e melfalan na atividade da CDK7.

Após os tratamentos, a CDK7 foi imunoprecipitada e incubada em solução de quinase contendo CDK2, proteína substrato da CDK7, e ATP. Em seguida, foi realizado ensaio de *Western blotting* utilizando anticorpo contra CDK2 fosforilada em resíduo de treonina 160. Os *immunoblottings* são representativos de 3 diferentes experimentos. (B) A análise densitométrica de cada banda foi realizada utilizando o *software ImageJ*, sendo os dados expressos como unidade arbitrária. Os valores correspondem à média \pm erro padrão (n= 3). MEL, melfalan; RSV, resveratrol. * Nível de significância de $P < 0,05$.

4.2. Análise proteômica das células MCF-7 tratadas com resveratrol e melfalan.

Com o intuito de investigar outras vias de sinalização celular que poderiam estar sendo afetadas pelo tratamento com resveratrol e melfalan nas células MCF-7, o perfil protéico destas células tratadas com estes compostos foi estudado, utilizando técnicas como SDS-PAGE, eletroforese bidimensional (2D) e identificação de proteínas por espectrometria de massa.

Primeiramente, para análise do perfil protéico, os extratos das células tratadas com diferentes concentrações de resveratrol foram submetidos à SDS-PAGE (**figura 23**). No entanto, não se observou mudança no perfil de proteínas após o tratamento visto por este método.

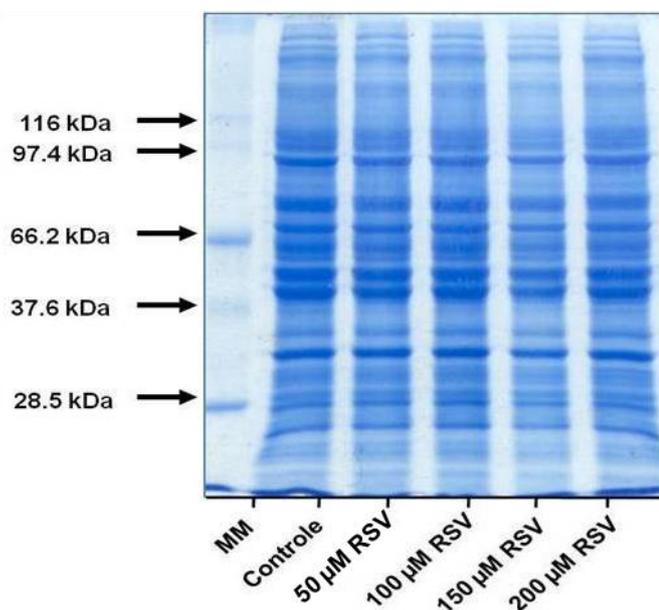


Figura 23. Efeito do resveratrol no perfil protéico das células MCF-7: SDS-PAGE.

Após o tratamento com resveratrol por 24 horas, as células MCF-7 foram lisadas e o extrato protéico foi obtido. Em seguida, 50 µg de proteína foram submetidos à SDS-PAGE 10%. O gel é representativo de 3 diferentes experimentos.

Para a análise do efeito da associação do resveratrol com melfalan no perfil protéico das células MCF-7, os extratos das células tratadas com 50 μ M de resveratrol, 50 μ M melfalan e diferentes combinações dos compostos foram submetidos à SDS-PAGE (**figura 24**). Não se observou variações nos níveis de proteínas entre os tratamentos por este método. Em seguida, foi realizada a extração de peptídeos das bandas do gel 1D e esses foram submetidos a espectrometria de massa utilizando o espectrômetro Q-TOF para a identificação de proteínas.

Foram identificadas 60 proteínas no extrato de células controle; 75 proteínas no extrato de células tratadas com 50 μ M de resveratrol; 47 proteínas no extrato de células tratadas com 50 μ M de melfalan; e 56 proteínas no extrato de células tratadas com a associação de 50 μ M de resveratrol com 50 μ M de melfalan. A **tabela 1** mostra a relação de todas as proteínas identificadas.

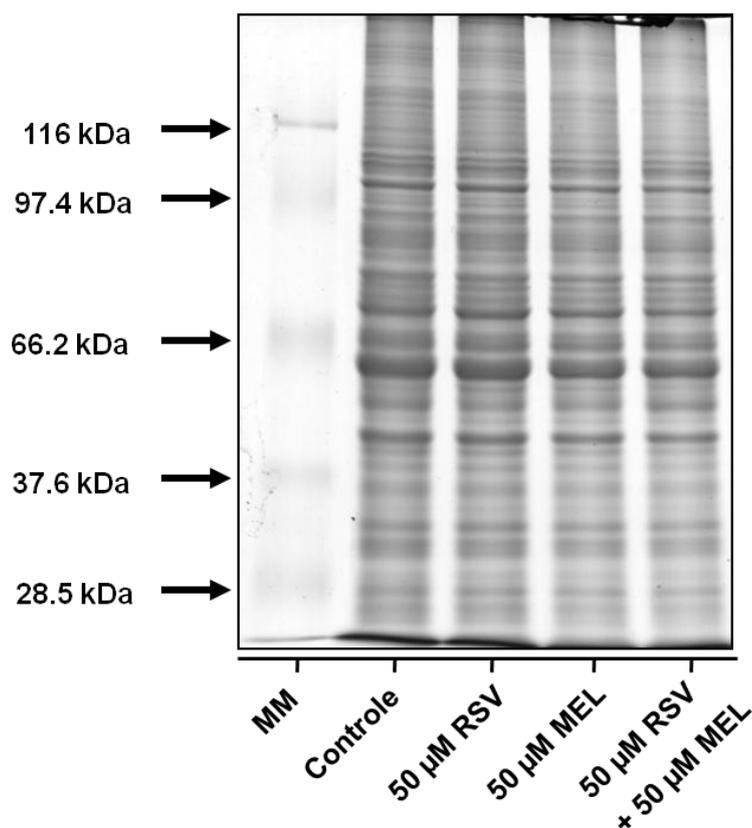


Figura 24. Efeito do resveratrol em combinação ou não com melfalan sobre o perfil protéico das células MCF-7: SDS-PAGE.

Após o tratamento com resveratrol, melfalan ou com a associação dos compostos por 24 horas, as células MCF-7 foram lisadas e o extrato protéico foi obtido. Em seguida, 50 μg de proteína foram submetidos à SDS-PAGE 10%. O gel é representativo de 3 diferentes experimentos. As bandas destacadas foram excisadas, hidrolisadas e analisadas por ESI-Q-TOF.

Tabela 1. Proteínas identificadas nas células MCF-7 tratadas com resveratrol, melfalan ou com associação dos dois compostos.

Proteína	Código de Acesso NCBI	Score	%	MM/pI	Peptídeos	Controle	RSV	MEL	RSV+ MEL
14-3-3 protein beta/alpha	gi 4507949	67	16	28,179/4,76	4	x	x	x	
14-3-3 protein sigma	gi 5454052	95	7	27,871/4,68	2		x	x	
14-3-3 protein theta	gi 5803227	98	22	28,032/4,68	5	x	x	x	
14-3-3 protein zeta/delta	gi 4507953	242	33	27,899/4,73	9	x	x	x	x
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	gi 1483511	59	6	34,322/8,88	2	x			
40S ribosomal protein S3 isoform 1	gi 15718687	90	13	26,842/9,68	3	x			
40S ribosomal protein S5	gi 13904870	76	14	23,033/9,73	3	x			
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	gi 31542947	296	28	61,187/5,70	15	x	x	x	x
60S acidic ribosomal protein P0	gi 4506667	145	17	34,423/5,71	5	x	x	x	
60S ribosomal protein L18	gi 4506607	113	19	21,735/11,73	3	x			
60S ribosomal protein L7	gi 15431301	80	4	29,264/10,66	1		x		
actin, cytoplasmic 2	gi 4501887	519	47	42,108/5,31	15	x	x	x	x
ADP/ATP carrier protein	gi 179247	61	12	33,188/9,71	3			x	
alpha-enolase isoform 1	gi 4503571	316	32	47,481/7,01	12	x	x	x	x
annexin A2	gi 16306978	140	20	38,822/7,57	6	x	x	x	x
annexin A4	gi 4502105	86	13	36,290/5,84	4	x	x	x	
annexin A5	gi 4502107	84	11	35,971/4,94	4	x	x	x	
annexin A6 isoform 1	gi 71773329	130	11	76,168/5,42	7	x	x	x	x
apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial isoform 1 precursor	gi 4757732	69	4	67,144/9,04	2		x		
argininosuccinate synthase	gi 16950633	116	9	46,786/8,08	5	x	x		x
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial isoform a precursor	gi 4757810	79	8	59,828/9,16	4	x	x	x	x
ATP synthase subunit O, mitochondrial precursor	gi 4502303	98	10	23,377/9,97	2		x		
catalase	gi 4557014	61	2	59,947/6,90	1				x
citrate synthase, mitochondrial precursor	gi 38327625	84	5	51,908/8,45	2				x
cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial precursor	gi 50592988	94	6	48,584/8,74	2				x
cytokeratin 8	gi 181573	488	36	53,529/5,52	18	x	x	x	x
delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial isoform a precursor	gi 25777734	86	5	62,137/8,25	2		x		x
elongation factor 1-alpha 1	gi 4503471	149	13	50,451/9,10	6	x	x	x	x
elongation factor 1-alpha 2	gi 4503475	154	13	50,780/9,11	6	x	x	x	
elongation factor 1-beta	gi 4503477	86	6	24,919/4,50	1		x		
elongation factor 1-gamma	gi 4503481	82	9	50,429/6,25	4	x	x	x	x
elongation factor Tu, mitochondrial precursor	gi 34147630	66	3	50,185/7,26	1		x		x

Tabela 1. Continuação.

Proteína	Código de Acesso NCBI	Score	%	MM/pI	Peptídeos	Controle	RSV	MEL	RSV+MEL
endoplasmic reticulum resident protein 29 isoform 1 precursor	gi 5803013	170	19	29,032/6,77	4		x	x	
enoyl-CoA hydratase	gi 1922287	171	17	31,807/8,34	3		x		x
eukaryotic translation initiation factor 6 isoform a	gi 4504771	66	7	27,095/4,56	1		x		
flavin reductase (NADPH)	gi 4502419	58	11	22,219/7,13	2	x	x	x	
fructose-bisphosphate aldolase A isoform 1	gi 4557305	305	43	39,851/8,30	13	x	x	x	x
glucose-6-phosphate dehydrogenase	gi 26224790	103	8	55,188/6,91	4			x	
glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2)	gi 12653507	97	10	47,858/9,14	4	x	x		
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 31645	396	38	36,202/8,26	11	x	x	x	x
GTP:AMP phosphotransferase	gi 33150692	67	6	25,605/9,30	1				x
guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	gi 5174447	113	21	35,511/7,60	7	x	x		
heat shock 70 kDa protein 1A/1B	gi 167466173	441	23	70,294/5,48	14	x	x	x	x
heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1	gi 5729877	362	20	71,082/5,37	13	x	x	x	
heat shock protein 27	gi 662841	221	40	22,427/7,83	7	x	x	x	x
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	gi 47939618	67	6	34,273/9,28	2	x			x
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	gi 34740329	67	6	39,799/9,10	2	x			
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	gi 13937888	157	13	33,635/4,99	4		x		x
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1 (hnRNP-E1)	gi 460771	98	16	38,015/6,66	5	x	x		x
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	gi 5031753	65	3	49,484/5,89	1		x		
heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 isoform A2	gi 4504447	78	14	36,041/8,67	4	x	x	x	x
human elongation factor-1-delta	gi 38522	124	16	31,316/4,95	3		x		x
isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	gi 28178825	126	8	46,915/6,53	3				x
keratin, type I cytoskeletal 18	gi 4557888	804	36	48,029/5,34	17	x	x	x	x
keratin, type I cytoskeletal 19	gi 24234699	167	17	44,079/5,04	7	x	x		x
lamin B1	gi 15126742	143	10	66,652/5,13	5	x	x	x	x
L-lactate dehydrogenase A chain isoform 1	gi 5031857	81	9	36,950/8,44	3	x	x	x	x
malate dehydrogenase precursor	gi 2906146	237	28	35,965/8,92	8	x	x	x	x
malate dehydrogenase, cytoplasmic isoform 2	gi 5174539	58	10	36,631/6,91	3	x	x		x
nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide variant	gi 62897731	81	13	23,344/4,52	2	x	x		x
peroxiredoxin-1	gi 4505591	221	45	22,324/8,27	9	x	x	x	x
peroxiredoxin-2 isoform a	gi 32189392	135	27	22,049/5,66	6	x	x	x	x
peroxiredoxin-6	gi 4758638	170	29	25,133/6,00	6	x	x		x
phosphatidylethanolamine-binding protein 1 preproprotein	gi 4505621	127	22	21,158/7,01	3	x	x	x	x
probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	gi 4758138	101	4	69,618/9,06	2		x	x	x

Tabela 1. Continuação.

Proteína	Código de Acesso NCBI	Score	%	MM/pI	Peptídeos	Controle	RSV	MEL	RSV+ MEL
prohibitin	gi 4505773	61	15	29,843/5,57	4	x	x	x	
prohibitin 2	gi 119609105	90	7	32,262/9,77	2		x		
proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3	gi 20810439	72	8	28,661/5,19	2	x	x	x	
proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5	gi 119576786	101	11	29,858/4,64	2		x	x	x
proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 6	gi 119586280	59	5	25,730/6,74	1				x
proteasome subunit alpha type-7	gi 4506189	93	20	28,041/8,60	4	x	x		x
proteasome subunit X	gi 558526	117	25	23,053/8,66	5	x	x		x
protein disulfide-isomerase A6 precursor	gi 5031973	72	6	48,490/4,95	2		x		
pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial isoform 1 precursor	gi 4505685	62	3	43,952/8,35	1				x
pyruvate kinase isozymes M1/M2 isoform a	gi 33286418	361	37	58,470/7,96	16	x	x	x	x
ras-related protein Rab-1A isoform 1	gi 4758988	139	20	22,891/5,93	4		x		
ras-related protein Rab-2A isoform a	gi 4506365	74	17	23,702/6,08	3	x			
ras-related protein Rab-7a	gi 34147513	107	30	23,760/6,40	6	x	x		
ribosomal protein L13	gi 42490910	110	16	24,308/11,65	3	x			
ruvB-like 1	gi 4506753	133	12	50,538/6,02	4		x		
S-adenosylhomocysteine hydrolase	gi 178277	85	4	48,254/6,03	2		x		
serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial isoform 1 precursor	gi 19923315	180	9	56,414/8,76	4		x	x	
serine--tRNA ligase, cytoplasmic	gi 16306548	92	2	59,253/6,05	1			x	x
serum albumin	gi 28592	87	5	71,316/6,05	3	x			x
set	gi 338039	127	12	32,115/4,12	3		x		
stress-induced-phosphoprotein 1	gi 5803181	73	4	63,227/6,40	2				x
T-complex protein 1 subunit beta	gi 197692147	221	10	57,766/6,01	4			x	x
T-complex protein 1 subunit epsilon	gi 24307939	84	4	60,089/5,45	3				x
T-complex protein 1 subunit theta	gi 48762932	186	6	60,153/5,42	3		x		x
transgelin-2	gi 4507357	179	27	22,548/8,41	5	x	x		x
transketolase	gi 37267	104	13	68,435/7,90	6	x	x	x	x
triosephosphate isomerase isoform 1	gi 4507645	68	20	26,938/6,45	4	x	x		
tubulin 5-beta	gi 35959	634	31	50,055/4,81	12		x		
tubulin alpha-1C chain	gi 14389309	69	13	50,548/4,96	5	x		x	x
tubulin beta-3 chain isoform 1	gi 50592996	614	26	50,856/4,83	11		x		
tubulin beta-4B chain	gi 5174735	308	29	50,255/4,79	11	x	x	x	x
voltage-dependent anion-selective channel protein 1	gi 4507879	107	15	30,868/8,62	4	x	x	x	
X-ray repair cross-complementing protein 6	gi 4503841	91	13	70,084/6,23	7	x	x	x	x

Para uma melhor análise das proteínas diferentemente expressas pelos tratamentos, os extratos das células tratadas com 50 μ M de resveratrol, 50 μ M de melfalan ou com a associação de 50 μ M de resveratrol com 50 μ M de melfalan foram submetidos à eletroforese bidimensional. Primeiramente, a amostra controle foi submetida ao gel 2D utilizando tiras com gradiente de pH 3 - 10 (**figura 25**). Uma vez que foi observado que a maioria das proteínas se localizavam entre os pH de 4 - 7, os posteriores géis 2D foram feitos utilizando tiras nesta faixa de pH (**figura 26**).

Para a obtenção de géis reprodutíveis, foram realizados experimentos padronizando assim, todos os passos envolvidos na produção de géis buscando o fracionamento mais representativo possível do extrato protéico. Foram avaliadas soluções de lise e extração das proteínas. Como resultado, obtivemos maior concentração das proteínas com solução de lise com 4% CHAPS, extração de proteínas sem precipitação e focalização isoelétrica em faixas de pH de 4-7.

Os géis das células tratadas com resveratrol, melfalan ou com a combinação dos compostos apresentaram diferenças quantitativas entre os *spots* quando comparado com o grupo controle, bem como apresentou diferenças quanto a presença ou ausência dos mesmos, demonstrando que os tratamentos alteram o proteoma das células MCF-7. A detecção dos *spots* foi realizada visualmente e após a excisão, os peptídeos foram extraídos, porém a identificação dos peptídeos ainda não foi realizada.

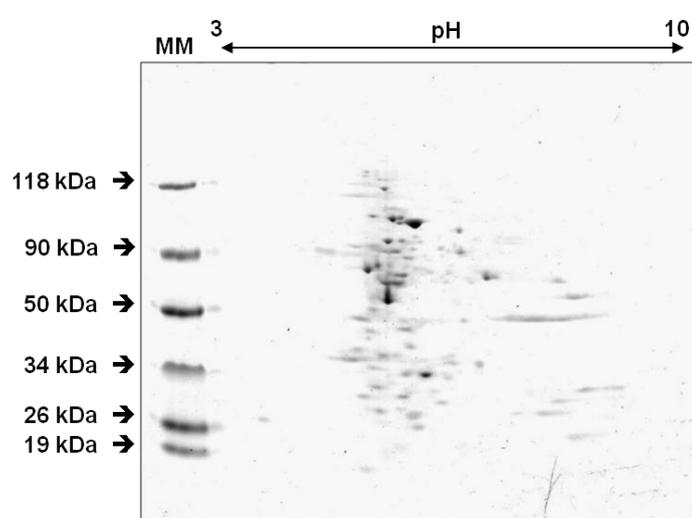


Figura 25. Eletroforese bidimensional das células MCF-7: gradiente de pH 3-10. As células MCF-7 controle foram lisadas e o extrato protéico foi obtido. Em seguida, 100 μ g de proteína foram submetidos à eletroforese bidimensional com gradiente de pH de 3-10.

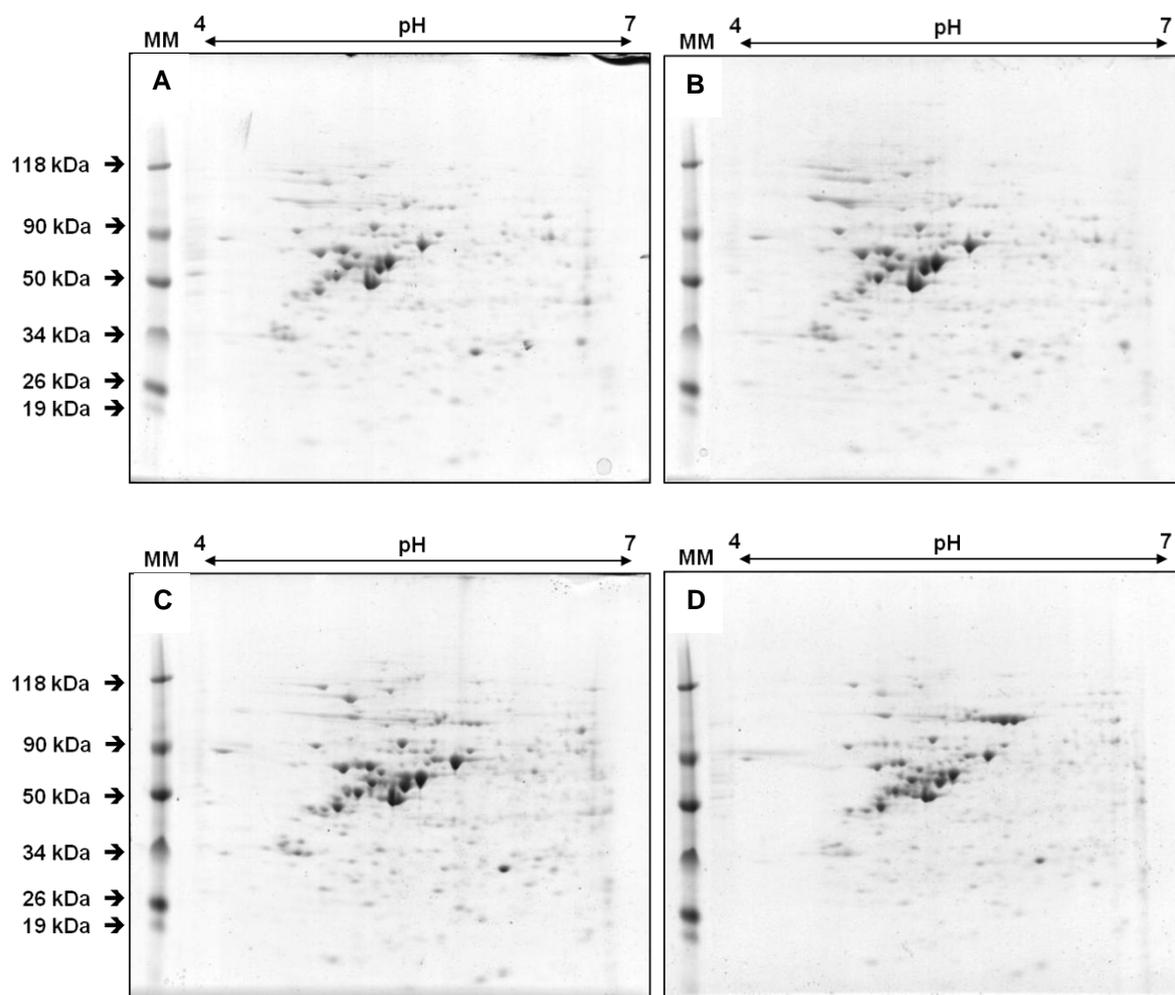


Figura 26. Efeito do resveratrol no perfil protéico das células MCF-7: Eletroforese bidimensional.

Após o tratamento por 24 horas, as células MCF-7 foram lisadas e o extrato protéico foi obtido. Em seguida, 100 μg de proteína foram submetidos à eletroforese bidimensional com gradiente de pH de 4-7. Controle (A), tratamento com 50 μM de resveratrol (B), 50 μM de melfalan (C) e com associação de 50 μM de resveratrol e 50 μM de melfalan (D).

5. *Discussão*

5. Discussão

5.1. Efeito da associação do resveratrol com melfalan em linhagens de células epiteliais de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231.

Estratégias no tratamento do câncer usando combinações de quimioterápicos com mecanismos moleculares distintos mostram melhora na eficácia destes agentes. Diversos estudos tem comprovado atividade antitumoral de compostos bioativos provenientes de alimentos. Estes compostos, como o resveratrol, possuem atividades anticancerígenas através da regulação de diversas vias de sinalização. Recentes estudos tem analisado a associação de compostos bioativos com quimioterápicos com o intuito de potencializar os efeitos antitumorais e diminuir a toxicidade sistêmicas dos quimioterápicos (DORAI e AGGARWAL, 2004; SARKAR e LI, 2006; BLOCK e cols., 2008).

Neste estudo, foi investigado o efeito da associação do resveratrol com melfalan em células de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231. O resveratrol reduziu a viabilidade celular de maneira dose e tempo dependente, tendo um maior efeito citotóxico nas células MCF-7 (**figura 9**). Este resultado está de acordo com POZO-GUISADO e colaboradores (2002), no qual observaram este mesmo efeito nestas células. Em seguida, foi avaliado se o resveratrol também estaria exercendo efeito citotóxico em células não cancerosas. Os resultados mostraram que, em células VERO, o resveratrol também apresentou efeito citotóxico, porém este efeito foi menor do que nas células MCF-7, uma vez que o IC_{50} no tratamento por 24 horas foi de 307 μ M, mais que o dobro do IC_{50} do resveratrol nas células MCF-7. Adicionalmente, este composto apresentou baixa toxicidade nas células PBMC

(**figura 10**). AZIZ e colaboradores (2006) mostraram que o tratamento com resveratrol (0 – 50 μM) por 24 horas resultou em diminuição da viabilidade celular e indução de apoptose em células de carcinoma de próstata LNCaP. O mesmo resultado não foi observado em células epiteliais de próstata normal HPEC. Em 2010, PAN e colaboradores (2010) demonstraram que um análogo metoxilado do resveratrol apresentou um efeito na inibição do crescimento das células MCF-7 maior do que o próprio resveratrol, sem afetar o crescimento das células normais PBMC.

No ensaio de redução de MTT, o melfalan reduziu a viabilidade das células MCF-7 e MDA-MB-231 de maneira dose e tempo dependente, apresentando IC_{50} para o tratamento por 24 horas de 110 μM e 305 μM , respectivamente (**figura 11**). Esta maior resistência das células MDA-MB-231 ao melfalan também foi observada por WANG e colaboradores (2004). BIELAWSKY e colaboradores (2006) demonstraram efeito citotóxico do melfalan em células MCF-7, com IC_{50} de 125 μM , próximo ao achado neste trabalho.

O tratamento com a associação de resveratrol com melfalan promoveu uma potencialização dos efeitos citotóxicos, sendo esta potencialização maior nas células MCF-7 do que nas células MDA-MB-231 (**figura 12**). Além disso, este aumento da citotoxicidade foi dependente da sequência dos tratamentos. O tratamento com resveratrol seguido pelo melfalan produziu mais efeitos citotóxicos do que o tratamento com melfalan seguido pelo resveratrol (**figura 13**). FULDA e DEBATIN (2004) mostraram que o pré-tratamento com resveratrol melhorou a capacidade de agentes anticancerígenos, tais como VP16, doxorubicina, citarabina, D actinomicina, o taxol ou o metotrexato, em induzir apoptose nas células de neuroblastoma. HE e

colaboradores (2011) demonstraram que o resveratrol aumentou a atividade antitumoral de rapamicina em várias linhagens de célula de câncer de mama.

No entanto, nem todos quimioterápicos apresentam este efeito quando associados com resveratrol, como descrito por MAO e colaboradores (2010). Estes pesquisadores mostraram que o resveratrol inibe os efeitos citotóxicos do taxol em células de câncer de bexiga, uma vez que previne as células de entrarem em mitose, a fase que o taxol exerce sua ação.

Resveratrol, através de diferentes mecanismos regulatórios, tem mostrado induzir morte celular e promover bloqueio no ciclo celular em várias linhagens de células de câncer (JUAN e colaboradores, 2008; ATHAR e colaboradores, 2009). Da mesma forma, neste trabalho, o resveratrol também induziu a morte celular e seus efeitos foram significativos a partir da concentração de 100 μM (**figura 14**). Diversos estudos sugerem que o resveratrol pode agir como um potente sensibilizador de apoptose induzida por drogas antitumorais (FULDA e DEBATIN, 2004; JAZIREHI e BONAVIDA, 2004; DURAJ e colaboradores, 2006). Um efeito similar foi observado no presente estudo.

Para elucidar sobre o mecanismo molecular envolvido no aumento da sensibilidade a apoptose induzida pelo resveratrol, investigamos algumas moléculas-chave que regulam a apoptose. O tratamento com a associação de resveratrol com melfalan resultou no aumento dos níveis de p53, redução dos níveis de procaspase 8, e ativação das caspases 7 e 9 (**figura 15**). GATOUILLAT e colaboradores (2010) relataram que o resveratrol aumentou o potencial quimioterapêutico da doxorubicina em células quimiorresistentes de melanoma B16 através do aumento da expressão de p53. No entanto, em um outro estudo, o aumento do efeito do resveratrol em sensibilizar células de câncer a apoptose induzida por várias drogas foi demonstrado

ser independente da p53 (FULDA e DEBATIN, 2004). BHARDWAJ e colaboradores (2007) mostraram que o resveratrol aumentou o potencial apoptótico e antiproliferativo de velcade e talidomida em várias linhagens de células de mieloma. Esse aumento foi associado com a inibição de NF- κ B e STAT3, com um acúmulo de células na fase sub-G1, um aumento na liberação de Bax e ativação de caspase-3.

A análise da distribuição do ciclo celular mostrou que o resveratrol, tanto isoladamente quanto em combinação com o melfalan, inibiu a progressão do ciclo celular na fase S (**figuras 16 e 17**). O tratamento das células MCF-7 com inibidores específicos de diferentes fases do ciclo celular seguido pelo tratamento com melfalan também potencializou o efeito citotóxico do melfalan (**figura 18**), sugerindo que o bloqueio do ciclo celular poderia ser necessário para a quimiossensibilização das células MCF-7 ao melfalan pelo resveratrol. Este bloqueio poderia estar aumentando a incorporação de melfalan nas células, explicaria em parte a maior eficácia deste composto observada neste trabalho.

O efeito sobre a progressão do ciclo celular foi provavelmente causado pela diminuição nos níveis de ciclina A e fosfo-CDK2 (Thr160) pelo tratamento com resveratrol e sua associação com melfalan (**figuras 20 e 21**). No entanto, o tratamento com melfalan isoladamente aumentou os níveis de CDK2 fosforilada em resíduo de treonina 160. ZHOU e colaboradores (2009) mostraram que a ativação de p-CDK2 pode desempenhar um papel na indução de um atraso na fase-S reversível e não citotóxico em células HepG2.

Um mecanismo importante para a regulação da progressão do ciclo celular é controlada pela atividade de CDKs, que são reguladas através da interação com os suas respectivas ciclinas (MALUMBRES e BARBACID, 2005). A ciclina E interage com a CDK2 para regular a progressão da fase G1 para S. A ciclina A se liga a

CDK2, e este complexo é necessário durante a fase S. Além da ligação com as ciclinas, a CDK2 pode interagir com outras proteínas como a p21, proteína inibidora de CDK2. Os dados mostraram que os níveis de p21 foram significativamente aumentados pelo tratamento com resveratrol ou melfalan isoladamente (**figura 20**). Uma vez que a p21 é em parte regulada pela p53 (BLUNDELL, 2006) e o tratamento com a associação do resveratrol com melfalan aumentou os níveis de p53, mas não alterou os níveis de p21, os resultados sugerem que, sob estas condições experimentais, a p21 seja regulada de maneira independente da p53.

A atividade da CDK2 também é regulada pela fosforilação em resíduos conservados de treonina e tirosina. A desfosforilação dos resíduos de tirosina-15 e treonina-14 pela enzima cdc25A é necessária para ativação de CDK2 e progressão do ciclo celular. A ativação completa desta quinase requer a fosforilação da treonina 160 pela CDK7 (VERMEULEN e colaboradores, 2003).

O tratamento das células MCF-7 com resveratrol e com sua associação com melfalan reduziu os níveis de fosfo-CDK2 (Thr160). Diante deste resultado, a atividade da CDK7 foi analisada e observou-se uma inibição da sua atividade (**figura 22**). A inibição desta quinase manteve a CDK2 na sua forma inativa, bloqueando o ciclo celular na fase S. LIANG e colaboradores (2003) demonstraram que o resveratrol induziu um bloqueio do ciclo celular através da inibição da atividade da quinase CDK7 em células de carcinoma de cólon HT29. No entanto, este bloqueio do ciclo celular observado por estes pesquisadores foi na fase G2. A CDK7, além de controlar a atividade da CDK2, também controla a atividade da CDK1, que é uma enzima responsável pela progressão na fase G2 (VERMEULEN e colaboradores, 2003).

5.2. Análise proteômica das células MCF-7 tratadas com resveratrol e melfalan.

Várias pesquisas estão sendo realizadas ou para melhorar a eficácia do tratamento ou para encontrar novas maneiras de tratar ou prevenir o câncer. A análise proteômica desempenha um papel importante na descoberta e validação de biomarcadores para o câncer. Os compostos bioativos como resveratrol têm múltiplos mecanismos de ação, sendo de interesse descobrir alvos/biomarcadores destes agentes quimiopreventivos para que se possa desenvolver terapias-alvo no câncer.

Com o intuito de investigar outras vias de sinalização celular que poderiam estar sendo afetadas pelo tratamento com resveratrol e melfalan nas células MCF-7, o perfil protéico destas células tratadas com estes compostos foi estudado. Visto pela análise do gel unidimensional (SDS-PAGE), não se observou mudança no perfil de proteínas das células MCF-7 após o tratamento com diferentes concentrações de resveratrol (**figura 23**).

No entanto, observou-se variações nos níveis de proteínas entre os tratamentos com resveratrol, melfalan ou associação dos compostos. Em seguida, foi realizada a extração de peptídeos de todas as bandas do gel 1D e esses foram submetidos a espectrometria de massa utilizando o espectrômetro Q-TOF para a identificação de proteínas. Foram identificadas em torno de 98 proteínas (**tabela 1**). Discutiremos aqui brevemente algumas das proteínas diferencialmente expressas pelos tratamentos.

Observou-se a presença da enzima catalase nas células tratadas com a associação de resveratrol com melfalan. A catalase é uma enzima altamente expressa em alguns tecidos, protegendo as células contra um excesso de formação

de ROS. Em comparação com células normais, as células malignas, na maioria das vezes, exibem níveis mais elevados de ROS intracelular e níveis alterados de moléculas antioxidantes (OBERLEY e OBERLAY, 1997). GLORIEUX e colaboradores (2011) mostraram que a proliferação e a capacidade de migração das células MCF-7 foram prejudicadas pelo aumento da expressão da catalase. Em relação a sua sensibilidade aos quimioterápicos, observou-se que as células com expressão aumentada de catalase foram mais sensíveis ao trióxido de etoposide, paclitaxel e arsênico. No entanto, nenhum efeito foi observado sobre a resposta citotóxica à radiação ionizante, 5-fluorouracil, cisplatina ou doxorubicina.

Outra proteína observada neste estudo foi o fator de alongamento 1α (EF- 1α). Notou-se a presença de EF- $1\alpha 1$ em todos os tratamentos realizados nas células MCF-7. No entanto, com relação a EF- $1\alpha 2$, sua presença não foi detectada nas células tratadas com a associação de resveratrol com melfalan. EF-1a é uma GTPase que catalisa a entrega de tRNA carregado ao ribossoma durante o alongamento de proteína e é criticamente envolvido na tradução (NEGRUTSKII e EL'SKAYA, 1998). TALAPATRA e colaboradores (2002) demonstraram que a expressão aumentada de EF- 1α resulta em resistência seletiva a apoptose induzida pela ausência de fator de crescimento e pelo estresse do retículo endoplasmático.

Os resultados também mostraram a presença de ribonucleoproteína nuclear heterogênea C1/C2 (hnRNP C1/C2) nas células tratadas com resveratrol e com sua associação com melfalan. HnRNP C1/C2 desempenha um papel em coordenar as vias de resposta ao dano do DNA e a apoptose induzida pela radiação. Os autores sugerem que hnRNP C1/C2 promova alterações na expressão de genes necessários para as vias de reparo do DNA após a irradiação através da interação direta com o DNA genômico, proteínas associadas ao DNA e/ou mRNA transcrito

transcrito, mas estudo adicional é necessário para validar esta hipótese. Estudos que analisam as vias de resposta ao estresse têm indicado um papel para hnRNP C1/C2 nos mecanismos de reparo de danos ao DNA. Um estudo mostrou que hnRNP C1/C2 se liga à proteína Ku se estiver ao mesmo tempo ligada ao RNA transcrito e pode ser fosforilada pela subunidade catalítica do complexo de DNA-PK (ZHANG e cols., 2004; HARLEY e cols., 2009).

Através da eletroforese bidimensional, observou-se que os géis das células tratadas com resveratrol, melfalan ou com a combinação dos compostos apresentaram diferenças quantitativas entre os *spots* quando comparado com o grupo controle, bem como apresentou diferenças quanto a presença ou ausência dos mesmos, demonstrando que os tratamentos alteram o proteoma das células MCF-7 (**figura 26**). A detecção dos *spots* foi realizada visualmente e após a excisão, todos os *spots* foram preparados para análise no espectrômetro de massa, porém a identificação dos peptídeos ainda não foi concluída. A análise proteômica realizada por CECCONI e colaboradores (2008) em células de linfoma tratadas com resveratrol revelou um total de 32 proteínas diferencialmente expressas, sendo 9 destas relacionadas a proliferação celular, ciclo celular e morte celular.

6. Conclusões

6. Conclusões

Parte I

- Tanto resveratrol quanto melfalan reduziram a viabilidade das células MCF-7 e MDA-MB-231;
- Resveratrol apresentou um menor efeito citotóxico nas células PBMC do que nas células de câncer de mama;
- A associação de resveratrol com melfalan resultou na potencialização dos efeitos citotóxicos dos compostos, sendo este aumento maior nas células MCF-7;
- O pré-tratamento com resveratrol sensibiliza as células MCF-7 ao tratamento com melfalan;
- Resveratrol promoveu apoptose nas células MCF-7;
- Resveratrol potencializou a apoptose induzida pelo melfalan;
- A expressão da procaspase 8 foi diminuída pelos tratamentos com diferentes combinações de resveratrol e melfalan;
- O tratamento das células MCF-7 com resveratrol e melfalan resultou em clivagem aumentada da caspase 7 e caspase 9;
- O tratamento com resveratrol, assim como sua associação com melfalan, promoveu um acúmulo de células na fase S, sugerindo um bloqueio do ciclo celular nesta fase;
- O conjunto de resultados obtidos nesta tese propicia o desenvolvimento de um esquema o qual demonstra os efeitos do resveratrol e sua associação, ou não, com melfalan nas células MCF-7 nos níveis de proteínas relacionadas ao ciclo celular (**figura 27**).

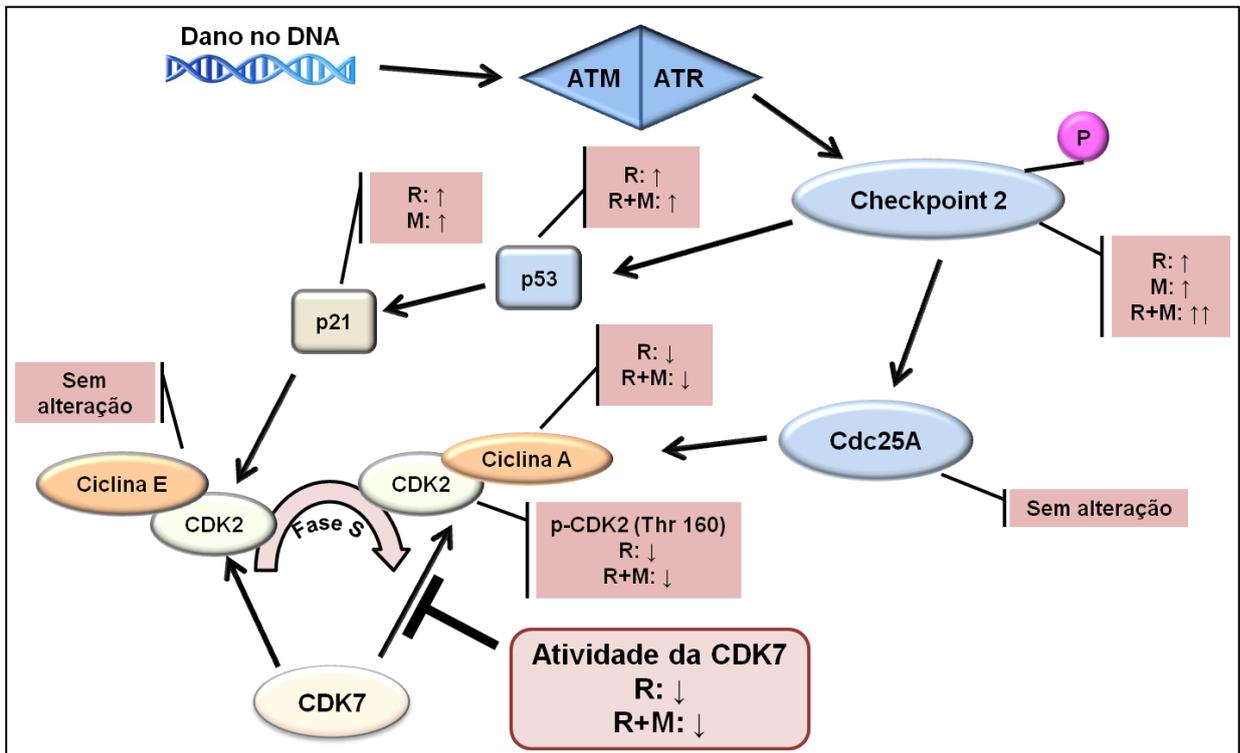


Figura 27. Esquema do efeito do resveratrol e sua associação com melfalan nos níveis de proteínas relacionadas à progressão do ciclo celular na fase S das células MCF-7.

R: resveratrol; M: melfalan; R + M: Associação do resveratrol com melfalan.

Parte II

- O perfil protéico das células MCF-7 foi alterado pelos tratamentos com resveratrol, melfalan ou a associação dos compostos;
- No gel 1D foram identificadas 60 proteínas no extrato de células controle; 75 proteínas no extrato de células tratadas com resveratrol; 47 proteínas no extrato de células tratadas com melfalan; e 56 proteínas no extrato de células tratadas com a associação de resveratrol com melfalan;
- Através da eletroforese bidimensional, observou-se que os géis das células tratadas com resveratrol, melfalan ou com a combinação dos compostos apresentaram diferenças quantitativas entre os *spots* quando comparado com o grupo controle.

7. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n° 18, de 30 de abril de 1999 (republicada em 03/12/1999). Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/18_99.html.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION (ADA). Position of American Dietetic Association: Functional Foods. **Journal of The American Dietetic Association**, v. 104, p. 814-826, 2009.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198-207, 2003.

AHN, J.; URIST, M.; PRIVES, C. The Chk2 protein kinase. **DNA Repair**, v. 3, p. 1039-1047, 2004.

ALKHALAF, M.; JAFFAL, S. Potent antiproliferative effects of resveratrol on human osteosarcoma SJSA1 cells: Novel cellular mechanisms involving the ERKs/p53 cascade. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 318–325, 2006.

ALMEIDA, L.; VAZ-DA-SILVA, M.; FALCAO, A.; SOARES, E.; COSTA, R.; LOUREIRO, A. I.; *et al.* Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. 7–15, 2009.

AMRI, A.; CHAUMEIL, J. C.; SFAR, S.; CHARRUEAU, C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? **Journal of Controlled Release**, v. 158, p. 182–193, 2012.

ASENSI, M.; MEDINA, I.; ORTEGA, A.; CARRETERO, J.; BAÑO, M. C.; OBRADOR, E.; ESTRELA, J. M. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, p. 387-98, 2002.

ASHCROFT, A. Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics. **Natural product reports**, v. 20, p. 202-215, 2003.

ATES, O.; CAYLI, S.; ALTINOZ, E.; GURSES, I.; YUCEL, N.; SENER, M.; KOCAK, A.; YOLOGLU, S. Neuroprotection by resveratrol against traumatic brain injury in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 294, p. 137–144, 2007.

ATHAR, M.; BACK, J. H.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R.; KIM, A. L. Multiple molecular targets of resveratrol: anti-carcinogenic mechanisms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 486, p. 95–102, 2009.

ATHAR, M.; BACK, J. H.; TANG, X.; KIM, K. H.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R.; KIM, A. L. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 224, p. 274–283, 2007.

AZIZ, M. H.; NIHAL, M.; FU, V. X.; JARRARD, D. F.; AHMAD, N. Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3 -kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, p. 1335–1341, 2006.

AZMI, A. S.; BHAT, S. H.; HANIF, S.; HADI, S. M. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. **FEBS Letters**, v.580, p533-538, 2006.

BARTEK, J.; LUKAS, C.; LUKAS, J. Checking on DNA damage in S phase. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 792–804, 2004.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 493-506, 2006.

BÉLIVEAU, R.; GINGRAS, D. O flagelo do câncer. Em: Os alimentos contra o câncer. Editora Vozes, Rio de Janeiro, v.1, p. 17-29, 2007.

BHARDWAJ, A.; SETHI, G.; VADHAN-RAJ, S.; BUESO-RAMOS, C.; TAKADA, Y.; GAUR, U.; *et al.* Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through downregulation of STAT3 and nuclear factor-kappa B-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. **Blood**, v. 109, p. 2293–2302, 2007.

BIELAWSKI, K.; BIELAWSKA, A.; SOSNOWSKA, K.; MILTYK, W.; WINNICKA, K.; PAŁKA, J. Novel amidine analogue of melphalan as a specific multifunctional inhibitor of growth and metabolism of human breast cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 320 – 331, 2006.

BLOCK, K. I.; KOCH, A. C.; MEAD, M. N.; TOTHY, P. K.; NEWMAN, R. A.; GYLLENHAAL, C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. **International Journal of Cancer**, v. 123, p. 1227–1239, 2008.

BLUNDELL, R. A. The Biology of p21Waf1/Cip1 - Review Paper. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 2, p. 33-40, 2006.

BODZON-KULAKOWSKA, A.; BIERCZYNSKA-KRZYSIK, A.; DYLAG, T.; DRABIK, A.; SUDER, P.; NOGA, M.; *et al.* Methods for samples preparation in proteomic research. **Journal of Chromatography B**, v. 849, p. 1–31, 2007.

BOEING, H.; BECHTHOLD, A.; BUB, A.; ELLINGER, S.; HALLER, D.; KROKE, A.; *et al.* Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **European Journal of Nutrition**, v. 51, p. 637–663, 2012.

BROWN, V. A.; PATEL, K. R.; VISKADURAKI, M.; CROWELL, J. A.; PERLOFF, M.; BOOTH, T. D.; *et al.* Repeat Dose Study of the Cancer Chemopreventive Agent Resveratrol in Healthy Volunteers: Safety, Pharmacokinetics and Effect on the Insulin-like Growth Factor Axis. **Cancer Research**, v. 70, p. 9003–9011, 2010.

BURZ, C.; BERINDAN-NEAGOE, I.; BALACESCU, O.; IRIMIE, A. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. **Acta Oncologica**, v. 48, p. 811-821, 2009.

CARBONARO, M. Proteomics: present and future in food quality evaluation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 209-216, 2004.

CECCONI, D.; ZAMO, A.; PARISI, A.; Bianchi, E.; PAROLINI, C.; TIMPERIO, A. M.; ZOLLA, L.; CHILOSI, M. Induction of Apoptosis in Jeko-1 Mantle Cell Lymphoma Cell Line by Resveratrol: A Proteomic Analysis. **Journal of Proteome Research**, v.7, p. 2670–2680, 2008.

CHAN, J. Y.; PHOO, M. S.; CLEMENT, M. V.; PERVAIZ, S.; LEE, S. C. Resveratrol displays converse dose-related effects on 5-fluorouracil-evoked colon cancer cell apoptosis - The roles of caspase-6 and p53. **Cancer Biology and Therapy**, v. 7, p. 1305-1312, 2008.

CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? **Trends in Cell Biology**, v. 18, p. 157-164, 2008.

CHUTHAPISITH, S.; LAYFIELD, R.; KERR, I. D.; EREMIN, O. Principles of proteomics and its applications in cancer. **Surgeon**, v. 5, p. 14-22, 2007.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos. Editora Rubio, Rio de Janeiro, 2010.

CUCCIOLLA, V.; BORRIELLO, A.; OLIVA, A.; GALLETTI, P.; ZAPPIA, V.; DELLA RAGIONE, F. Resveratrol: from basic science to the clinic. **Cell Cycle**, v. 6, p. 2495-2510, 2007.

DAMIANAKI, A.; BAKOGEORGOU, E.; KAMPA, M.; NOTAS, G.; HATZOGLOU, A. *et al.* Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 78, p. 429-441, 2000.

DAY, A. J.; DUPONT, M. S.; RIDLEY, S.; RHODES, M.; RHODES, M. J.; MORGAN, M. R.; *et al.* Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver betaglucosidase activity. **FEBS Letters**, v. 436, p. 71-75, 1998.

DEGEN, W. G. J.; PRUIJN, G. J. M.; RAATS, J. M. H.; VAN VENROOIJ, W. J. Caspase-dependent cleavage of nucleic acids. **Cell Death and Differentiation**, v. 7, p. 616-627, 2000.

DIERSSEN, J. W.; DE MIRANDA, N. F.; MULDER, A.; VAN PUIJENBROEK, M.; VERDUYN, W.; CLAAS, F. H.; *et al.* High-resolution analysis of HLA class I alterations in colorectal cancer. **BMC Cancer**, v.6, p. 233, 2006.

DOLLERY, C. Melphalan, Therapeutic Drugs. Churchill Livingstone, London, UK, v. 2, p. 48-52, 1991.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. **Science**, v. 312, p. 212-217, 2006).

DONALDSON, M. S. Nutrition and câncer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. **Nutrition Journal**, v. 3, p. 1-21, 2004.

DORAI, T.; AGGARWAL, B. B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 215, p. 129–140, 2004.

DORRIE, J.; GERAUER, H.; WACHTER, Y.; ZUNINO, S. J. Resveratrol induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. **Cancer Research**, v. 61, p. 4731-4739, 2001.

DULAK, J. Nutraceuticals as anti-angiogenic agents: hopes and reality. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, p. 51-69, 2005.

DURAJ, J.; BODO, J.; SULIKOVA, M.; RAUKO, P.; SEDLAK, J. Diverse resveratrol sensitization to apoptosis induced by anticancer drugs in sensitive and resistant leukemia cells. **Neoplasma**, v. 53, p. 384–392, 2006.

FAVALORO, B.; ALLOCATI, N.; GRAZIANO, V.; DI ILIO, C.; DE LAURENZI, V. Role of Apoptosis in disease. **Aging**, v. 4, p. 330-349, 2012.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, p. 64–71, 1989.

FIALHO, E.; MORENO, F. S.; ONG, T. P. Nutrição no pós-genoma: fundamentos e aplicações de ferramentas ômicas. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 757-766, 2008.

FILOMENI, G.; GRAZIANI, I.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M. R. *trans*-Resveratrol induces apoptosis in human breast cancer cells MCF-7 by the activation of MAP kinases pathways. **Genes and Nutrition**, v. 2, p. 295–305, 2007.

FREITAS, M. S.; COSTA, D. C. F.; CASANOVA, F. A. Principais mecanismos de oncogênese. Em: Bases moleculares em clínica médica (ALVES, P. C. C.; DA POIAN, A. T.; ABRAHÃO, A.). Editora Atheneu, São Paulo, v. 1, p. 555-571, 2010.

FREMONT, L.; GOZZELINO, M. T.; LINARD, A. Response of plasma lipids to dietary cholesterol and wine polyphenols in rats fed polyunsaturated fat diets. **Lipids**, v. 35, p. 991-999, 2000.

FUKUI, M.; YAMABE, N.; ZHU, B. T. Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **European Journal of Cancer**, v. 46, p. 1882–1891, 2010.

FULDA, S.; DEBATIN, K. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. **Oncogene**, v. 23, p. 6702–6711, 2004.

GARG, A. K.; BUCHHOLZ, T. A.; AGGARWAL, B. B. Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 7, p. 1630-1647, 2005.

GARVIN, S.; OLLINGER, K.; DABROSIN, C. Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts *in vivo*. **Cancer Letters**, v. 231, p. 113–122, 2006.

GATOUILLAT, G.; BALASSE, E.; JOSEPH-PIETRAS, D.; MORJANI, H.; MADOULET, C. Resveratrol Induces Cell-Cycle Disruption and Apoptosis in Chemoresistant B16 Melanoma. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 110, p. 893-902, 2010.

GILL, C.; WALSH, S. E.; MORRISSEY, C.; FITZPATRICK, J. M.; WATSON, R. W. Resveratrol sensitizes androgen independent prostate cancer cells to death-receptor mediated apoptosis through multiple mechanisms. **Prostate**, v. 67, p. 1641–1653, 2007.

GLORIEUX, C.; DEJEANS, N.; SID, B.; BECK, R.; CALDERON, P. B.; VERRAX, J. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, p. 1384-90, 2011.

GOSWAMI, S. K.; DAS, D. K. Resveratrol and chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 284, p. 1-6, 2009.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 39-63, 2002.

GRAVITZ, L. Chemoprevention: First line of defence. Combinations of drugs are showing some promise as therapeutic agents that stop cancer before it starts. **Nature**. V. 471, P. S5-S7, 2011.

GRIVICICH, I.; REGNER, A. e DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, p.335-343, 2007.

GROSS, J. Mass Spectrometry: A Textbook. Editora Springer, p. 536, 2004.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. The risk of cancer in Brazil: tendencies and recent epidemiologic studies. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, p. 227-234, 2005.

GUIMARÃES, C. A. e LINDEN, R. Programmed Cell Death. **European Journal of Biochemistry**, v.271, p.1638-1650, 2004.

GUPTA, S. C.; KANNAPPAN, R.; REUTER, S.; KIM, J. H.; AGGARWAL, B. B. Chemosensitization of tumors by resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p.150-160, 2011.

HARMER, V. Breast cancer. Part 2: present and future treatment modalities. **British Journal of Nursing**, v. 17, p.1028-1035, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p.57-70, 2000.

HARPER, C. E.; PATEL, B. B.; WANG, J.; ARABSHAHI, A.; ELTOUM, I. A.; LAMARTINIERE, C. A. Resveratrol suppresses prostate cancer progression in transgenic mice. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 1946-1953, 2007.

HARIKUMAR, K. B.; KUNNUMAKKARA, A. B.; SETHI, G.; DIAGARADJANE, P.; ANAND, P.; PANDEY, M. K.; *et al.* Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine *in vitro* and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. **International Journal of Cancer**, v. 127, p. 257–268, 2010.

HALEY, B.; PAUNESKU, T.; PROTIĆ, M.; WOLOSCHAK, G. E. Response of heterogeneous ribonuclear proteins (hnRNP) to ionizing radiation and their involvement in DNA damage repair. **International Journal of Radiation Biology**, v. 85, p. 643–655, 2009.

HE, X.; WANG, Y.; ZHU, J. H.; ORLOFF, M.; ENG, C. Resveratrol enhances the antitumor activity of the mTOR inhibitor rapamycin in multiple breast cancer cell lines mainly by suppressing rapamycin-induced AKT signaling. **Cancer Letters**, v. 301, p. 168–176, 2011.

HIGGINS, C. F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. **Nature**, v. 446, p. 749-757, 2007.

HORVATH, Z.; SAIKOA, P.; ILLMERA, C.; MADLENERA, S.; HOECHTLA, T.; BAUERA, W.; ERKERB, T.; JAEGERB, W.; FRITZER-SZEKERESA, M.; SZEKERESA, T. Synergistic action of resveratrol, an ingredient of wine, with Ara-C and tiazofurin in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Experimental Hematology**, v. 33, p. 329–335, 2005.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil para 2012. **Ministério da Saúde**, 2011.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; MEHTA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, p. 218-220, 1997.

JAZIREHI, A. R.; BONAVIDA, B. Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, p. 71–84, 2004.

JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, F.; MELISSA, M.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Center Statistic. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, p. 69-90, 2011.

JOE, A. K.; LIU H.; SUZUI, M.; VURAL, M. E.; XIAO, D. *et al.* Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 893-903, 2002.

JUAN, M. E.; WENZEL, U.; DANIEL, H.; PLANAS, J. M. Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4813–4818, 2008.

KAMPA, M.; HATZOGLOU, A.; NOTAS, G.; DAMIANAKI, A.; BAKOGEORGOU, E. *et al.* Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. **Nutrition and Cancer**, v. 37, p. 223-233, 2000.

KALDIS, P.; ALEEM, E. Cell cycle sibling rivalry - Cdc2 vs. Cdk2. **Cell Cycle**, v. 4, p. 1491-1494, 2005.

KALRA, N.; ROY, P.; PRASAD, S.; SHUKLA, Y. Resveratrol induces apoptosis involving mitochondrial pathways in mouse skin tumorigenesis. **Life Sciences**, v. 82, p. 348–358, 2008.

KHANDUJA, K. L.; BHARDWAJ, A.; KAUSHIK, G. Resveratrol inhibits *N*-nitrosodiethylamine-induced ornithine decarboxylase and cyclooxygenase in mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 50, p. 61–65, 2004.

KIMURA, Y.; OKUDA, H. Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1844-1849, 2001.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A Novel Approach to Testing for Induced Point Mutations in Mammals. **Humangenetik**, v. 26, p. 231-243, 1975.

KUBOTA, T.; UEMURA, Y.; KOBAYASHI, M.; TAGUCHI, H. Combined effects of resveratrol and paclitaxel on lung cancer cells. **Anticancer Research**, v. 23, p. 4039–4046, 2003.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. **Cancer Letters**, v. 269, p. 243-261, 2008.

KUWAJERWALA, N.; CIFUENTES, E.; GAUTAM, S.; MENON, M.; BARRACK, E. R.; REDDY, G. P. Resveratrol induces prostate cancer cell entry into S phase and inhibits DNA synthesis. **Cancer Research**, v. 62, p. 2488-2492, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T₄. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LA PORTE, C.; VODUC, N.; ZHANG, G.; SEGUIN, I.; TARDIFF, D.; SINGHAL, N.; CAMERON, D. W. Steady-State pharmacokinetics and tolerability of trans-resveratrol 2000 mg twice daily with food, quercetin and alcohol (ethanol) in healthy human subjects. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 49, p. 449–454, 2010.

LATRUFFE, N.; DELMAS, D.; JANNIN, B.; CHERKAOUI, M. M.; PASSILY-DEGRACE, P.; BERLOT, J. P. Molecular analysis on the chemopreventive properties of resveratrol, a plant polyphenol microcomponent. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 10, p. 755-760, 2002.

LE CORRE, L.; CHALABI, N.; DELORT, L.; BIGNON Y.; BERNARD-GALLON, D. J. Resveratrol and breast cancer chemoprevention: Molecular mechanisms. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, p. 462 – 471, 2005.

LI, H.; XIA, N.; FÖRSTERMANN, U. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. **Nitric Oxide**, v. 26, p. 102–110, 2012.

LI, J.; ORLANDI, R.; WHITE, C. N.; ROSENZWEIG, J.; ZHAO, J.; SEREGNI, E.; *et al.* Independent validation of candidate breast cancer serum biomarkers identified by mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 51, p. 2229-2235, 2005.

LI, S.; SHENG, M. Caspases in synaptic plasticity. **Molecular Brain**, v. 5, p. 1-6, 2012.

LI, Z. G.; HONG, T.; SHIMADA, Y.; KOMOTO, L.; KAWABE, A.; DING, Y.; *et al.* Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by resveratrol. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1531–1536, 2002.

LIANG, Y. C.; TSAI, S. H.; CHEN, L.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, J. K. Resveratrol-induced G(2) arrest through the inhibition of CDK7 and p34(CDC2) kinases in colon carcinoma HT29 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 1053–1060, 2003.

LIN, C. J.; LEE, C. C.; SHIH, Y. L.; LIN, T. Y.; WANG, S. H.; LIN, Y. F.; SHIH, C. M. Resveratrol Enhances the Antitumor Effects of Temozolomide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, p. 377–391, 2012.

LIU, G. e ROBINS, I. A História Natural e a Biologia do Câncer. In: R. W. Pollock (Ed.). UICC Manual de Oncologia Clínica. São Paulo: Wiley, 2006. A História Natural e a Biologia do Câncer, p.1-17.

LOPEZ, M. F. Proteome Analysis I: Gene products are where the biological action is. **Journal of chromatography**, v. 722, p. 191-202, 1999.

LOWRY, O. H.; ROSEBRUOGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, p. 630–641, 2005.

MAO, Q.; Bai, Y.; LIN, Y.; ZHENG, X.; QIN, J.; YANG, K.; XIE, L. Resveratrol confers resistance against taxol via induction of cell cycle arrest in human cancer cell lines. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, p. 1–11, 2010.

MARKUS, M. A.; MORRIS, B. J. Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. **Clinical Interventions in Aging**, v. 3, p. 331-339, 2008.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Medicine**, v. 3, p. 442, 2006.

MCCOY, J. Chemotherapy as a treatment for breast cancer. Em: Breast Cancer Nursing Care and Management (HARMER, V.). Whurr Publishers, London, 2003.

MCDONALD, E. R.; EL-DEIRY, W. S. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. **International Journal for Oncology**, v. 16, p. 871-886, 2000.

MCELIGOT, A. J.; MOUTTAPA, M.; ZIOGAS, A.; ANTON-CULVER, H. Diet and predictors of dietary intakes in women with family history of breast and/or ovarian cancer. **Cancer Epidemiology**, v.33, p. 419–423, 2009.

MEERAN, S. M.; KATIYAR, S. K. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. **Bioscience**, v. 13, p. 2191-2202, 2008.

MICHAEL, D.; OREN, M. The p53 and mdm2 families in cancer. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 12, p. 53-59, 2002.

MICHELS, G.; WATJEN, W.; WEBER, N.; NIERING, P.; CHOVOLOU, Y. *et al.* Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells. **Toxicology**, v. 225, p. 173-182, 2006.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. Antioxidant activity of resveratrol in red wine. **Clinical Chemistry**, v. 41, p. 1789, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Controle do câncer de mama: documento de consenso. **Ministério da saúde**, v. 1, p. 1-33, 2004.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 63-66, 1983.

MUKHERIJ, M. Phosphoproteomics in analyzing signaling pathways. **Expert Review of Proteomics**, v. 2, p. 117-28, 2005.

NABEKURA, T.; KAMIYAMA, S.; Kitagawa, S. Effects of dietary chemopreventive phytochemicals on P-glycoprotein function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 327, p. 866–870, 2005.

NEGRUTSKII, B. S.; EL'SKAYA, A. V. Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 60, p. 47- 78, 1998.

NILES, R. M.; MCFARLAND, M.; WEIMER, M. B.; REDKAR, A.; FU, Y. M.; MEADOWS, G. G. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. **Cancer Letters**, v. 190, p. 157-163, 2003.

OBERLEY, T. D.; OBERLEY, L. W. Antioxidant enzyme levels in cancer. **Histology and Histopathology**, v. 12, p. 525–535, 1997.

O'FARRELL, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/15/es/index.html>. Acessado em: 20 de setembro de 2010 (2008).

PALSAMY, P.; SUBRAMANIAN, S. Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic beta-cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, p. 423–432, 2010.

PAN, M.; LIN, C.; TSAI, J.; HO, C.; CHEN, W. 3,5,3',4',5'-pentamethoxystilbene (MR-5), a synthetically methoxylated analogue of resveratrol, inhibits growth and induces G1 cell cycle arrest of human breast carcinoma MCF-7 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 226–234, 2010.

PATEL, K. R.; BROWN, V. A.; JONES, D. J.; BRITTON, R. G.; HEMINGWAY, D.; MILLER, A. S.; *et al.* Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. **Cancer Research**, v. 70, p. 7392–7399, 2010.

PATIL, B. S.; JAYAPRAKASHA, G. K., CHIDAMBARA, M. K. N., VIKRAM, A. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8142-8160, 2009.

PERVAIZ, S. e HOLME, A. L. Resveratrol: Its Biologic Targets and Functional Activity. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.11, p.2851-2897, 2009.

PITOT, H. C. Adventures in hepatocarcinogenesis. **Annual Review of Pathology**, v. 2, p. 1-29, 2007.

Portal do Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acessado em: 20 de julho de 2012.

POZO-GUISADO, E.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; MULERO-NAVARRO, S.; SANTIAGO-JOSEFAT, B.; FERNADEZ-SALGUERO, P. M. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not MDA-MB231 in human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 1357-1366, 2002.

QUAN, F.; PAN, C.; MA, Q.; ZHANG, S.; YAN, L. Reversal effect of resveratrol on multidrug resistance in KBv200 cell line. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 62, p. 622–629, 2008.

RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. 559S-569S, 2003.

RICHARD, T.; PAWLUS, A. D.; IGLÉSIAS, M. L.; PEDROT, E.; WAFFO-TEGUO, P.; MÉRILLON, J. M.; MONTI, J. P. Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 103–108, 2011.

ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHAES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; *et al.* Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. Comunicado Técnico Embrapa. **EMBRAPA**, 2005. Disponível

em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/187102/1/cot136.pdf>.
Acessado em: 30 de junho de 2012.

ROTHBARTH, J.; VAHRMEIJER, A. L.; MULDER, G. J. Modulation of cytostatic efficacy of melphalan by glutathione: mechanisms and efficacy. **Chemico-Biological Interactions**, v. 140, p. 93–107, 2002.

RUI, Z.; JIAN-GUO, J.; YUAN-PENG, T.; HAI, P.; BING-GEN, R. Use of serological proteomic methods to find biomarkers associated with breast cancer. **Proteomics**, v. 3, p. 433-439, 2003.

RUSSO, J.; RUSSO, I.H. The etiopathogenesis of breast cancer prevention. **Cancer Letters**, v. 90, p. 81-89, 1995.

SAIKO, P.; SZAKMARY, A.; JAEGER, W.; SZEKERES, T. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? **Mutation Research**, v. 658, p. 68-94, 2008.

SAKAMOTO, T.; HORIGUCHI, H.; OGUMA, E.; KAYAMA, F. Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 856-864, 2010.

SANCHEZ-FIDALGO, S.; CARDENO, A.; VILLEGAS, I.; TALERO, E.; DE LA LASTRA, C. A. Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 633, p. 78–84, 2010.

SANTAMARIA, D.; ORTEGA, S. Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. **Bioscience**, v. 11, p. 1164-1188, 2006.

SARKAR, F. H.; LI, Y. Using chemopreventive agents to enhance the efficacy of cancer therapy. **Cancer Research**, v. 66, p. 3347–3350, 2006.

SCHNEIDER, Y.; VINCENT, F.; DURANTON, B.; BADOLO, L.; GOSSE, F. et al. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. **Cancer Letters**, v. 159, p. 85-91, 2000.

SGARBIERI, V.C., PACHECO, M.T.B. Revisão: alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, p. 7-19, 1999.

SHOU, M.; KORZEKWA, K. R.; KRAUSZ, K. W.; BUTERS, J. T.; GROGAN, J.; GOLDFARB, I.; *et al.* Specificity of cDNA-expressed human and rodent cytochrome P450s in the oxidative metabolism of the potent carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. **Molecular Carcinogenesis**, v. 17, p. 241–249, 1996.

SIGNORELLI, P.; GHIDONI, R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 449–466, 2005.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: A molecule whose time has come and gone? **Clinical Biochemistry**, v. 39, p. 91-113, 1997.

STEBBING, J. J.; GAYA, A. The evidence-based use of induction chemotherapy in breast cancer. **Breast Cancer**, v. 8, p. 23–37, 2001.

STEEN, H.; MANN, M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. **Nature**, v. 5, p. 699-711, 2004.

SU, H. C.; HUNG, L. M.; CHENG, J. K. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 290, p. 1339–1346, 2006.

SURH, Y. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature**, v.3, p. 768-780, 2003.

SZKUDELSKI, T.; SZKUDELSKA, K. Anti-diabetic effects of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 34–39, 2011.

TALAPATRA, S.; WAGNER, J. D. O.; THOMPSON, C. B. Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, p. 856-861, 2002.

TANG, F.Y.; CHIANG, E. P.; SUN, Y. C. Resveratrol inhibits heregulin-b1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and cell invasion in human breast cancer cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, p. 287–294, 2008.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TYSNES, B. B.; BJERKVIG, R. Cancer initiation and progression: Involvement of stem cells and the microenvironment. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1775, p. 283–297, 2007.

VAHRMEIJER, A. L.; VAN DIERENDONCK, J. H.; KEIZER, H. J.; BEIJNEN, J. H.; TOLLENAAR, R. A.; PIJL, M. E.; *et al.* Increased local cytostatic drug exposure by isolated hepatic perfusion: a phase I clinical and pharmacologic evaluation of treatment with high dose melphalan in patients with colorectal cancer confined to the liver. **British Journal of Cancer**, v. 82, p. 1539–1546, 2000.

VANG, O.; AHMAD, N.; BAILE, C. A.; BAUR, J. A.; BROWN, K.; *et al.* What Is New for an Old Molecule? Systematic Review and Recommendations on the Use of Resveratrol. **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-11, 2011.

VERHOEF, M. D. C., WILT, J. H. W.; GRÜNHAGEN, D. J.; GEEL, A. N.; HAGEN, T. L. M., EGGERMONT, A. M. M. Isolated Limb Perfusion with Melphalan and TNF- α in the Treatment of Extremity Sarcoma. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 8, p. 417–427, 2007.

VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, p. 131–149, 2003.

VERRILLS, N. M.; LIEM, N. L.; LIAW, T.Y.; HOOD, B. D.; LOCK, R. B.; KAVALLARIS, M. Proteomic analysis reveals a novel role for the actin cytoskeleton in vincristine resistant childhood leukaemia - an *in vivo* study. **Proteomics**, v. 6, p. 1681-1694, 2006.

VINCENT, T. L.; GATENBY, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **International Journal of Oncology**, v. 32, p. 729-737, 2008.

VITRAC, X.; DESMOULIERE, A.; BROUILLAUD, B.; KRISA, S.; DEFFIEUX, G.; BARTHE, N.; *et al.* Distribution of [^{14}C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. **Life Science**, v. 72, p. 2219–2233, 2003.

WAHL, G. M.; CARR, A. M. The evaluation of diverse biological response to DNA damage: insights from yeast and p53. **Nature Cell Biology**, v. 3, p. 277-286, 2001.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS, J. E.; WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, p. 1377–1382, 2004.

WALLE, T. Bioavailability of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 9–15, 2011.

WANG, Y.; SERFASS, L.; ROY, M.; WONG, J.; BONNEAU, A.; GEORGESA, E. Annexin-I expression modulates drug resistance in tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 314, p. 565–570, 2004.

WARD, D. G.; SUGGETT, N.; CHENG, Y.; WEI, W.; JOHNSON, H.; BILLINGHAM, W.; *et al.* Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis. **British Journal of Cancer**, v. 94, p. 1898-905, 2006.

WEN, X.; LIN, Z. Q.; LIU, B.; WEI, Y. Q. Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 45, p. 217–224, 2012.

WHITSETT, T.; CARPENTER, M.; LAMARTINIERE, C. A. Resveratrol, but not EGCG, in the diet suppresses DMBA-induced mammary cancer in rats. **Journal of Carcinogenesis**, v. 5, p. 15–25, 2006.

WICKMAN, G.; JULIAN, L.; OLSON, M. F. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 735-742, 2012.

WOLTER, F.; AKOGLU, B.; CLAUSNITZER, A.; STEIN, J. Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2197-203, 2001.

YU, W.; FU, Y.; WANG, W. Cellular and Molecular Effects of Resveratrol in Health and Disease. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, p. 752–759, 2012.

ZAHID, M.; GAIKWAD, N. W.; ALI, M. F.; LU, F.; SAEED, M.; YANG, L.; ROGAN, E. G.; Cavalieri, E. L. Prevention of estrogen–DNA adduct formation in MCF-10F cells by resveratrol. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, p. 136–145, 2008.

ZHOU, H. B.; CHEN, J. J.; WANG, W. X.; CAI, J. T.; DU, Q. Anticancer activity of resveratrol on implanted human primary gastric carcinoma cells in nude mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, p. 280–284, 2005.

ZHOU, R.; FUKUI, M.; CHOI, H. J.; ZHU, B. T. Induction of a reversible, noncytotoxic S-phase delay by resveratrol: implications for a mechanism of lifespan prolongation and cancer protection. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, p. 462–474, 2009.

8. Apêndices

8.1. Apêndice 1: Artigo publicado I

Resveratrol Chemosensitizes Breast Cancer Cells to Melphalan by Cell Cycle Arrest

Fabiana Casanova,¹ Julia Quarti,² Danielly Cristiny Ferraz da Costa,¹ Caroline Araújo Ramos,² Jerson Lima da Silva,¹ and Eliane Fialho^{2*}

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

ABSTRACT

Melphalan (MEL) is a chemotherapeutic agent used in breast cancer therapy; however, MEL's side effects limit its clinical applications. In the last 20 years, resveratrol (RSV), a polyphenol found in grape skins, has been proposed to reduce the risk of cancer development. The aim of this study was to investigate whether RSV would be able to enhance the antitumor effects of MEL in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. RSV potentiated the cytotoxic effects of MEL in human breast cancer cells. This finding was related to the ability of RSV to sensitize MCF-7 cells to MEL-induced apoptosis. The sensitization by RSV involved the enhancement of p53 levels, the decrease of procaspase 8 and the activation of caspases 7 and 9. Another proposed mechanism for the chemosensitization effect of MCF-7 cells to MEL by RSV was the cell cycle arrest in the S phase. The treatment with RSV or MEL increased the levels of p-Chk2. The increase became pronounced in the combined treatments of the compounds. The expression of cyclin A was decreased by treatment with RSV and by the combination of RSV with MEL. While the levels of cyclin dependent kinase 2 (CDK2) remained unchanged by treatments, its active form (Thr¹⁶⁰-phosphorylated CDK2) was decreased by treatment with RSV and by the combination of RSV with MEL. The activity of CDK7, kinase that phosphorylates CDK2 at Thr¹⁶⁰, was inhibited by RSV and by the combination of RSV with MEL. These results indicate that RSV could be used as an adjuvant agent during breast cancer therapy with MEL. *J. Cell. Biochem.* 113: 2586–2596, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: APOPTOSIS; CANCER; CELL CYCLE; MELPHALAN; RESVERATROL

Cancer is a growing health problem around the world particularly with the steady rise in life expectancy, increasing urbanization, and the subsequent changes in environmental conditions including lifestyle. According to a recent report [Jemal et al., 2011], cancer accounted for 7.6 million deaths (around 13% of all deaths) in 2008, and deaths from cancer worldwide are projected to continue to rise to over 11 million in 2030.

The therapies available to date for cancer treatment are surgery, radiotherapy, and chemotherapy. Chemotherapy is often used as the main regimen in the treatment of most cancers. However, the development of tumor resistance to chemotherapy (chemoresistance) presents a major hurdle in cancer therapy [Higgins, 2007]. The use of cancer chemopreventive phytochemicals in combination with

chemotherapeutic agents has been shown to be a pragmatic approach to overcome chemoresistance and sensitize cancer cells to apoptosis or growth arrest, while minimizing the side effects arising from the conventional therapy [Garg et al., 2005]. Among the potential chemosensitizers are bioactive compounds such as resveratrol (RSV).

RSV is a natural phytoalexin that is present in especially high concentrations in grape skins and, as a consequence, in red wine [Gusman et al., 2001]. Its beneficial health effects include its anti-infective, antioxidant, and cardioprotective functions in addition to its anticancer potential [Baur and Sinclair, 2006; Marques et al., 2009]. Research from in vitro and in vivo studies indicate that RSV can sensitize tumor cells to chemotherapeutic agents by modulating

Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); Grant number: E-26/103.110/2008; Grant sponsor: Cancer Foundation/2009; Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Grant sponsor: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

*Correspondence to: Eliane Fialho, PhD, Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Caixa Postal 68041, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, CEP 21941-590, Brazil. E-mail: fialho@nutricao.ufrj.br

Manuscript Received: 21 August 2011; Manuscript Accepted: 7 March 2012

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 13 March 2012

DOI 10.1002/jcb.24134 • © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

apoptotic pathways, down-regulating drug transporters, and down-modulating proteins involved in tumor cell proliferation. In addition, RSV has also been shown to overcome chemoresistance by inhibiting the NF- κ B and STAT3 pathways [Athar et al., 2009; Gupta et al., 2011].

Chan et al. [2008], using HCT116 human colon cancer cells, showed that RSV exerted synergistic effects with 5-FU in a caspase-6 dependent manner. RSV has also been shown to enhance the chemosensitivity of tumor cells by arresting the cells at different stages of the cell cycle and by downregulating genes involved in cell proliferation. Gatouillat et al. [2010] showed that RSV enhanced doxorubicin induced cytotoxicity in a chemoresistant B16 melanoma by downregulating cyclin D1. Combined treatment with RSV was also associated with an increase in cell cycle arrest at the G(1)-S phase.

Interestingly, this bioactive compound has also been reported to suppress apoptosis induced by paclitaxel, vincristine, and daunorubicin in some tumor cells [Ahmad et al., 2004; Mao et al., 2010]. The potential mechanisms underlying this dual effect are discussed. Overall, studies suggest that RSV can be used to sensitize tumors to specific cancer chemotherapeutics. No study has been conducted demonstrating the effect of the combination of RSV with melphalan (MEL) in breast cancer cells.

MEL is a well-known alkylating agent presently employed as an antineoplastic agent in humans, and is often the drug of choice in the treatment of metastatic melanoma, ovarian, and breast cancer. MEL, especially when used at a high dose, shows a diversity of toxic side effects. The most common side effect occurring during therapy is bone marrow suppression leading to leukopenia and thrombocytopenia [Dollery, 1991]. Therefore, the aim of this study was to investigate whether RSV would be able to enhance the cytotoxic effects of MEL in breast cancer cells. The improvement of the cytotoxic effects of MEL on tumor cells could result in clinical practice in reduction of the dose used of this compound, and this would provide a reduction of side effects.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

RSV (>99% pure), MEL, protease inhibitor cocktail, propidium iodide, RNase A and 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) used in the cell culture methods were products of Gibco (USA). All other chemicals were purchased in the purest form commercially available.

CELL CULTURES

The human breast epithelial cell lines MCF-7, an estrogen receptor-positive cell line derived from an in situ carcinoma, and MDA-MB-231, an estrogen receptor-negative cell line derived from a metastatic carcinoma, were used in this study. Both were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 units/ml of penicillin, 100 μ g/ml of streptomycin, and 5 μ g/ml of insulin; the cells were kept at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air according

to ATCC recommendations. For all experiments, the cells were subjected to no more than 20 passages. For treatment, the cells were counted and plated at the same initial density. When the cultures reached 70–80% confluence, the cells were treated with various concentrations of *trans*-RSV, MEL, or both compounds at the indicated times.

CELL VIABILITY ASSAY

The cell viability assay was performed using MTT according to the method described by Carmichael et al. [1987]. After treatment, the cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and then incubated for 3 h in 0.5 ml of MTT solution (0.5 mg/ml of PBS) at 37°C in 5% CO₂ in an incubator. The medium was removed, and 0.5 ml of 0.04 mol/L HCl in absolute isopropanol was added to the attached cells. The absorbance of the converted dye in living cells was measured at a wavelength of 570 nm. The cell viability of breast cancer cells cultured in the presence of the studied compounds was calculated as a percent of the control cells. The experiments were performed in triplicate. The IC₅₀ values were calculated from dose-response curves; the IC₅₀ was defined as the concentration of drugs that reduced the number of viable cells to 50% of the control. GraphPad Software 5.0 was used for the IC₅₀ calculations.

CELL CYCLE AND CELL DEATH ANALYSIS

Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry as described previously [Poza-Guisado et al., 2002]. After treatment, the cells (5×10^5) were harvested, washed twice with PBS, and incubated with 0.5 ml of PBS containing 1 mg/ml RNase A, 0.1% Triton X-100, and 50 μ g/ml propidium iodide for 30 min at room temperature in the dark. The stained cells were analyzed using a FACScan laser flow cytometer equipped with Cell Quest software (Becton Dickinson, San Jose, CA). The percentage of cells in the G1, S, G2/M, and sub-G1 phases was quantified using the WinMDI version 2.9 Software.

PREPARATION OF CELL LYSATES

After treatment for 24 h, the cells were washed with PBS and lysed in liquid nitrogen. The cells were then scraped in ice-cold lysis buffer [5 mM Tris-HCl, 10 mM ethylenediamine tetraacetic acid, 5 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylarsine oxide, 1 μ M okadaic acid, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (pH 7.4)] with freshly added protease inhibitor cocktail (1.04 mM 4-2-aminoethylbenzenesulfonyl fluoride, 15 μ M pepstatin A, 14 μ M E-64, 40 μ M bestatin, 20 μ M leupeptin, and 0.8 μ M aprotinin). The lysate was collected, sonicated and cleared by centrifugation at 8,000 rpm for 5 min at 4°C; the supernatant (total cell lysate) was then collected, aliquoted, and stored at -80°C. The protein concentration was determined according to Lowry's method [1951]; bovine serum albumin was used as standard.

WESTERN BLOT ANALYSIS

Equal amounts of total cellular proteins (100 μ g) were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon P, Millipore, Bedford, MA). The membranes were blocked overnight at 4°C in Tris-buffered saline containing 1% Tween 20 (TBS-T), and 5% nonfat milk and incubated for 2 h with

the primary antibody (1:1,000). The membranes were then washed with TBS-T and incubated with a peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5,000) for 1 h. The antibodies used were as follows: anti-p53 (DO-1), anti-procaspase 8 (SC7890), and anti-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 0411), from Santa Cruz Biotechnology, and anti-caspase 9 (#9502), anti-caspase 7 (#9492), anti-phospho-Chk2 (Thr68) (#2661), anti-p21 (#2947), anti-Cdc25A (#3252), anti-CDK7 (#2916), anti-cyclin dependent kinase 2 (CDK2) (#2546), anti-phospho-CDK2(#2561), anti-cyclin A (#4656), anti-cyclin E (#4132), from Cell Signaling Technology. The immunocomplexes were visualized with the enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Amersham, UK). For every immunoblot assay, equal loading of protein was confirmed by stripping the blot and re-probing with the GAPDH antibody. The quantification of protein was performed by densitometric analysis of protein bands using ImageJ 1.42q Software.

IMMUNOPRECIPITATION

Two hundred microliters of cell lysate (containing 200 μ g total cellular proteins) were first precleared by incubation with protein A/G-agarose (20 μ l, 50% slurry, Santa Cruz Biotechnology) for 30 min. The clarified supernatants were collected by microcentrifugation and then incubated overnight with the primary antibody at 4°C. Then, 20 μ l of protein A/G-agarose were added to the reaction mixtures for 3 h at 4°C to absorb the immunocomplexes. Immunoprecipitated proteins were subjected to SDS-PAGE and then transferred onto a PVDF membrane. The resulting proteins were visualized by immunoblotting.

IN VITRO CDK7 KINASE ASSAY

CDK7 kinase activity was determined by an in vitro method [Agarwal et al., 2004]. Briefly, 200 μ g of total protein from cell lysates were precleared with protein A/G-agarose, and the CDK7 protein was then immunoprecipitated using an anti-CDK7 antibody with protein A/G-agarose beads. After an overnight incubation at 4°C, the immunocomplexes were washed three times with washing buffer containing 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 80 mM β -glycerophosphate, 1 mM NaF, 0.1 mM sodium orthovanadate, 0.1% Tween 20, 10% glycerol, 1 mM PMSF, and 10 μ g/ml of each aprotinin and leupeptin and were then rinsed with kinase buffer containing 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 2.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM MgCl₂, 1 mM NaF, and 0.1 mM sodium orthovanadate. CDK2 phosphorylation was determined by incubating the immunocomplexes with 30 μ l of the CDK2 kinase solution containing 1 μ g of CDK2 substrate protein (Santa Cruz Biotechnology) and 0.1 mM ATP in kinase buffer for 30 min at 37°C. Then, the phosphorylated CDK2 was subjected to SDS-PAGE, transferred, and then visualized by immunoblotting with antibodies against specific phosphorylated sites of the CDK2 substrate.

STATISTICAL ANALYSIS

Quantitative data represent the mean values with the respective standard error (SE) of the mean corresponding to three or more replicates. Data were analyzed by one-way analysis of variance

(ANOVA) using the post-hoc multiple comparisons Tukey's test. Data were considered to be statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

CYTOTOXIC EFFECTS OF RSV AND MEL

We first investigated the effects of RSV and MEL on the viability of human breast cancer cells using the MTT assay as previously described. As shown in Figure 1A,B, RSV and MEL exhibited cytotoxic effects on MCF-7 and MDA-MB-231 cell growth in a dose- and time-dependent manner. The IC₅₀ values of RSV and MEL in MCF-7 cells after 24 h of treatment were \sim 120 μ M, and \sim 110 μ M, respectively. In MDA-MB-231 cells, the IC₅₀ values of RSV and MEL after 24 h of treatment were \sim 370 μ M and \sim 305 μ M, respectively. These results show that MCF-7 cells were more sensitive to RSV and MEL than MDA-MB-231 cells. To investigate the cytotoxic effect of RSV in non-malignant cells, the cell viability assay was performed in VERO cells, kidney epithelial cells extracted from an African green monkey, and BHK-21 cells, hamster kidney fibroblast cells (data not shown). The cytotoxic effect of RSV on the VERO cells was lower than on the MCF-7 cells, with an IC₅₀ value of \sim 300 μ M. The treatment of VERO cells with 200 μ M of RSV reduced \sim 23% of cell viability, whereas treatment with the same concentration of RSV reduced the viability of the MCF-7 cells by \sim 68%. In BHK-21 cells, no cytotoxic effect was observed in treatments with up to 200 μ M of RSV. Aziz et al. [2006] showed that treatment with RSV (0–50 μ M) for 24 h resulted in a decrease of cell viability and an induction of apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells. The same result was not observed in normal prostate epithelial HPEC cells. These observations suggested that RSV may have potential as a chemotherapeutic agent.

EFFECTS OF THE ASSOCIATION OF RSV WITH MEL ON THE CELL VIABILITY

Given the results obtained with the use of RSV against carcinoma cells, we analyzed the effect of RSV in combination with MEL on the MCF-7 and MDA-MB-231 cells (Fig. 2). After treatment for 24 h with a combination of 50 μ M of RSV and 50 μ M of MEL, MCF-7 and MDA-MB-231 cell viability decreased by 32.2% and 19.2%, respectively (Fig. 2A). This decrease in viability was greater than the sum of the cytotoxic effects of separate treatments with RSV and MEL at the same concentrations. Other combinations of RSV and MEL also produced similar results; for example, treatment with 100 μ M of RSV and 25 μ M of MEL led to a decrease of viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells that was 13% and 3%, respectively, greater than the sum of the effects of these compounds used individually at the same concentrations. After treatment for 48 h, combinations of 100 μ M of RSV and either 25, 50, or 75 μ M of MEL were able to reduce the viability of the MCF-7 cells by almost 100%. As shown by bright field microscopy, the combination of RSV with MEL promoted more modifications in the morphology of MCF-7 cells than treatment with RSV or MEL alone (Fig. 2B). These data show that RSV is able to potentiate the cytotoxic effects of MEL in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Although this increase of cytotoxic effects of MEL by RSV was greater in MCF-7 cells than MDA-MB-231 cells. Therefore, in the investigation of enhanced MEL

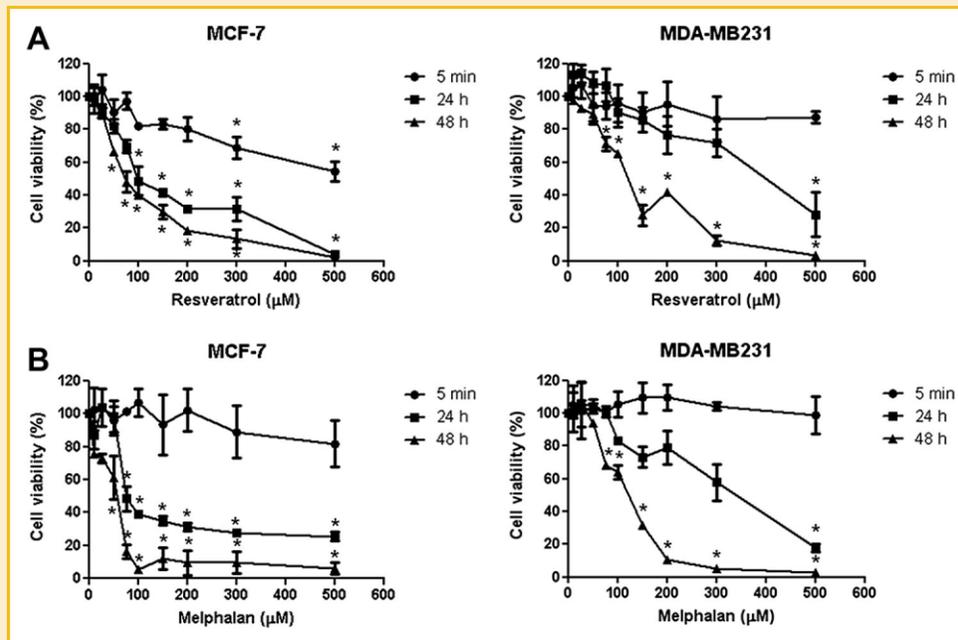


Fig. 1. The effects of RSV and MEL on the cell viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Cells were treated with 0, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, or 500 μM concentrations of RSV (A) or with the same concentrations of MEL for the indicated times (B). Cell viability was then determined by the MTT assay as described in the Materials and Methods Section. The percentage of cell viability was calculated as the ratio of treated cells to control cells. Data represent the mean \pm SE of three independent experiments. MEL, melphalan; RSV, resveratrol.

cytotoxicity by RSV, others experiments were carried out in this study using only MCF-7 cells.

Since a combination of cytotoxic agents may give rise to different effects depending on timing during a fixed treatment schedule, we tested whether the sequence of treatment with RSV and MEL might influence the cooperative effect (Fig. 2C). Interestingly, sequential treatment with RSV followed by MEL yielded more cytotoxic effects than treatment with MEL followed by RSV. These findings indicate that pretreatment with RSV conferred a state of increased responsiveness to MEL-induced cytotoxicity.

SENSITIZATION FOR MEL-INDUCED APOPTOSIS BY RSV

To explore the effect of RSV on apoptosis, the fraction of MCF-7 cells undergoing apoptosis after treatment with RSV was determined by FACScan (Fig. 3A). Treatments with 50 μM , 100 μM , 150 μM , and 200 μM of RSV increased the apoptosis in MCF-7 cells by 1.0%, 6.5%, 9.3%, and 8.0%, respectively. This increase was significant only in treatments in which the RSV concentration was greater than 100 μM . Treatment with 50 μM of MEL increased the apoptosis in MCF-7 cells by 4.6% (Fig. 3B). When 50 μM of MEL was combined with 50 μM or 100 μM of RSV, the mean amount of MCF-7 cells in the sub-G1 phase was increased by 21.9% and 24.7%, respectively. These results suggest that the increased apoptotic effect on MCF-7 cells with combination RSV and MEL treatment was achieved through the action of RSV, which enhanced the MEL-induced apoptosis. The induction of apoptosis by these compounds contributed to reduction of cell viability observed. Although others molecular mechanisms may be related to this reduced cell viability,

such as necrosis and decreased cell proliferation. Pozo-Guisado et al. [2002] showed that treatment with RSV in similar concentrations used in this study inhibited cell proliferation and decreased cell number in a dose-dependent manner in MCF-7 cells. Scarlatti et al. [2008] demonstrated that, in response to RSV treatment, MCF-7 cells exhibited a significant increase in necrotic death within the first 24 h of incubation. The cell counting in combination treatment with RSV and MEL was performed to determine if, beside apoptosis, other mechanism is also involved in the reduction of cell viability (data not shown). It was observed that when 50 μM of MEL was combined with 50 μM or 100 μM of RSV, the MCF-7 cell number was decreased by 19.3% and 47.8%, respectively.

To determine if the sensitization by RSV involved p53 and caspases, p53 levels and caspase activation were analyzed by Western blot analysis (Fig. 4A). Densitometric analysis of protein bands was conducted to quantify the amount of protein (Fig. 4B). The data show that the p53 level was increased more than twofold by treatment with RSV alone and with treatments of combinations of RSV with MEL. No change in the p53 level was observed after the treatment with MEL alone. The expression of procaspase 8 was decreased by a combination treatment with RSV and MEL. Besides treatment of MCF-7 cells with RSV and MEL resulted in enhanced cleavage of caspase-7 and caspase-9 indicating that RSV cooperated with MEL to activate these caspases.

CELL CYCLE PROGRESSION

After observing the effects of RSV and MEL on the cell viability and apoptosis, the effect of these drugs on the cell cycle distribution was

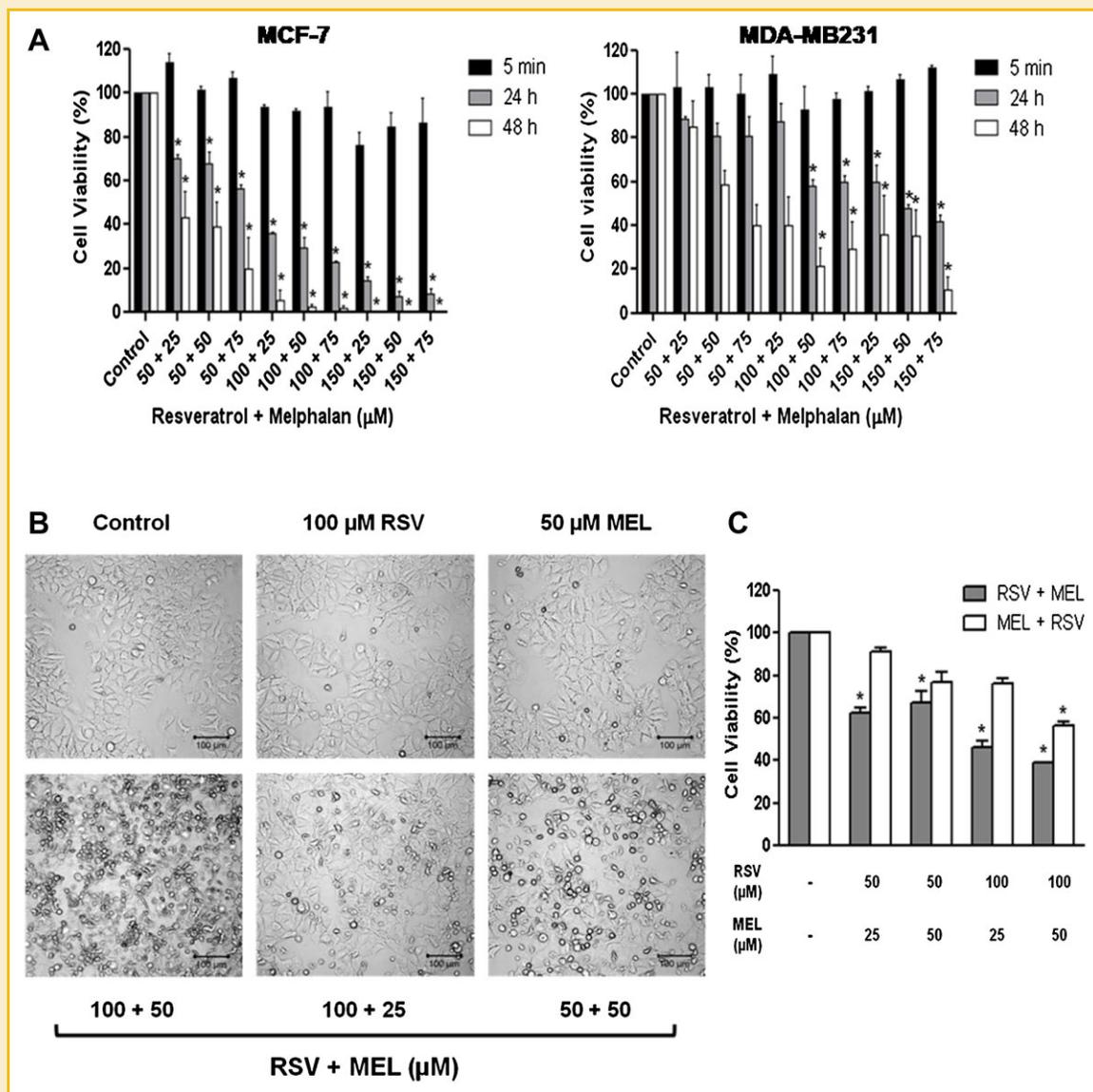


Fig. 2. The effects of the association of RSV with MEL in breast cancer cells. A: The effects of the association of RSV with MEL on the cell viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells for the indicated times. B: Representative bright field microscopy images of MCF-7 cells treated with RSV and MEL. C: Sequence-dependent effect of RSV and MEL on the cell viability. MCF-7 cells were treated with RSV for 24 h followed by MEL for 24 h (RSV + MEL) or with MEL for 24 h followed by RSV for 24 h (MEL + RSV). The cell viability was determined by the MTT assay as described in the Materials and Methods Section. The percentage of cell viability was calculated as the ratio of treated cells to control cells. Data represent the mean \pm SE of three independent experiments. MEL, melphalan; RSV, resveratrol.

analyzed by flow cytometry (Fig. 5A,B). Treatment for 24 h with 50 μM or 200 μM of RSV induced a significant accumulation of cells in the S phase and a concomitant decrease in the number of cells in the G1 and G2/M phases (Fig. 5A). In accordance with these data, Pozo-Guisado et al. [2002] demonstrated that RSV, at the same concentrations used in this study, inhibited DNA synthesis activity in MCF-7 cells by measuring the rate of thymidine incorporation. Treatment for 48 h with 50 μM of RSV enhanced the accumulation of cells in the phase S. Treatment with 25 μM , 50 μM , or 75 μM of MEL also promoted the accumulation of cells in the S phase, but this result was not significant (data not shown). When the cells were treated with combinations of RSV and MEL, a significant increase of

cells in the S phase was observed. This effect was significant only in treatments in which the concentration of RSV was 50 μM (Fig. 5B). It was not possible to perform the cell cycle distribution of treatment with 200 μM of RSV alone and with combination of 50 μM of RSV and 75 μM of MEL for 48 h due to low cell viability in these treatments.

To directly test the role of cell cycle progression in increasing MEL's cytotoxicity, cells were arrested in the G1, S, or G2/M phase using the specific cell cycle inhibitors mimosine, thymidine, or nocodazole and treated concomitantly with MEL (Fig. 5C). Similar to the treatment with both RSV and MEL, treatment with a combination of cell cycle inhibitors and MEL also potentiated the ability of MEL

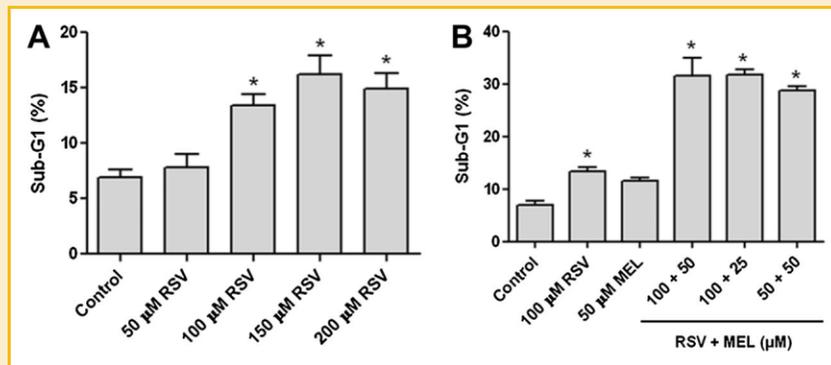


Fig. 3. The effects of RSV alone (A) and of the combination of RSV with MEL (B) on apoptosis in MCF-7 cells. After 24 h of treatment, cells were stained with propidium iodide for cytofluorimetric analyses. Percentages of apoptotic cells (sub-G1, apoptotic cells) are expressed as the mean \pm SE (n = 3).

to decrease the viability of MCF-7 cells (Fig. 5D). These findings suggest that RSV-induced cell cycle arrest in S phase could be one of the mechanisms of RSV to sensitize MCF-7 cells for treatment with MEL.

EFFECTS OF RSV AND MEL ON THE EXPRESSION OF S CELL CYCLE CHECKPOINT-RELATED PROTEINS

Based on the results of the cell cycle distribution, we next investigated whether the cell cycle arrest at the S phase by RSV and/or MEL was related to the expression of cell cycle-regulatory proteins, which are essential for cell cycle progression at the S phase (Fig. 6A). MCF-7 cells were treated with RSV and MEL for 24 h and then harvested for immunoblotting. The levels of phospho-checkpoint kinase 2 (p-Chk2) were determined. Chk2 is a multifunctional enzyme that is involved in the induction of cell cycle arrest and apoptosis because it phosphorylates regulatory proteins such as Cdc25A and p53 [Ahn et al., 2004]. We observed

that the treatment with RSV or MEL increased the levels of p-Chk2 expression. The increase became significantly pronounced in the combined treatments of RSV with MEL. No change was observed in the Cdc25A phosphatase levels. This phosphatase activates the CDK2.

While CDK2/cyclin E is known to play an important role in driving the cells in G1 phase to enter the S phase, CDK2/cyclin A is involved to drive cells in the late S phase to enter the G2 phase [Woo and Poon, 2003; Kaldis and Aleem, 2005]. The levels of cyclin E expression were increased by treatments, but this change was not significant. The expression of cyclin A was decreased by treatment with RSV and by a combination treatment with RSV and MEL. Moreover, the p21 protein levels, a CDK2 inhibitor, were significantly increased by treatment with RSV or MEL. No change was observed in p21 levels by combination treatment with RSV and MEL. Since p21 is in part regulated by p53 [Dotto, 2000] and the combination treatment with RSV and MEL increased the p53 levels,

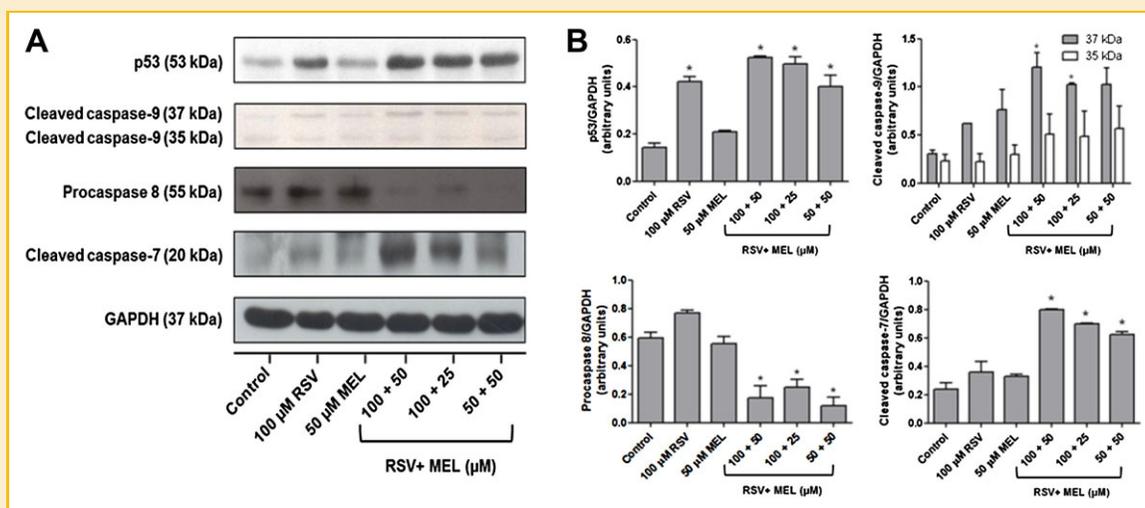


Fig. 4. The effects of RSV and MEL on p53 levels and activation of caspases. A: Equal amounts of total cellular proteins (100 μ g) were loaded in each lane for the detection of p53, cleaved caspase-9, procaspase 8, and cleaved caspase-7. GAPDH was used as a loading control. The immunoblots are representative of three different experiments that gave similar results. B: Densitometric analysis of each lane was calculated using ImageJ Software, and the data are expressed as arbitrary units.

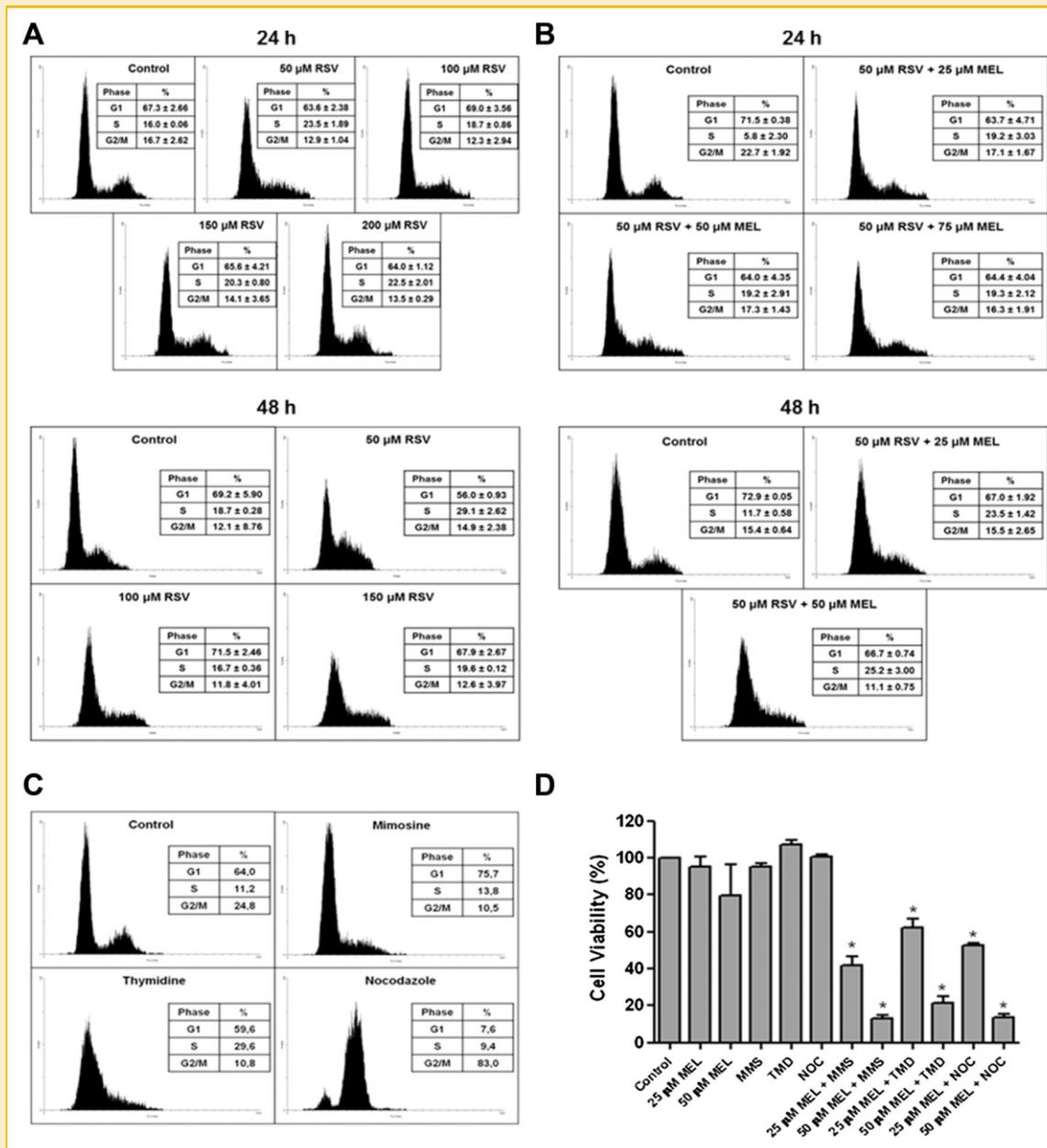


Fig. 5. The effects of RSV alone (A) and of the combination of RSV with MEL (B) on the cell cycle distribution in MCF-7 cells. After treatment, the cells were stained with propidium iodide, and their DNA content was determined by flow cytometry. C: Analysis of the cell cycle after 24 h of treatment with the cell cycle inhibitors mimosine, thymidine and nocodazole. The percentages of cells in G1, S or G2/M phase are shown. D: The effect of cell cycle inhibitors on MEL-induced cytotoxicity. Cell viability of MCF-7 cells was determined via the MTT assay after concomitant treatment of MEL with 2 mM thymidine, 0.4 mM mimosine, or 0.4 μ g/ml nocodazole. The percentage of cell viability was calculated as the ratio of treated cells to control cells. Data represent the mean \pm SE of three independent experiments. MEL, melphalan; MMS, mimosine; NOC, nocodazole; RSV, resveratrol; TMD, thymidine.

the results suggest that, under such experimental conditions, p21 is partly regulated in a p53-independent manner. The GAPDH expression was analyzed to confirm the equal loading of protein; a representative GAPDH blot is shown.

The effects of RSV and MEL on the expression of CDK2 were also determined. We found that while the total protein levels of CDK2 remained largely unchanged by treatments, its active form

(Thr¹⁶⁰-phosphorylated CDK2) was decreased by treatment with RSV and by the combination treatment with RSV and MEL. This finding suggests that RSV is responsible for decreasing the phosphorylation of CDK2 at Thr¹⁶⁰. The treatment of MEL alone increased the levels of Thr¹⁶⁰-phosphorylated CDK2. Therefore, the activity of CDK7, the kinase that phosphorylates CDK2 at Thr¹⁶⁰, was analyzed by an in vitro kinase assay. Figure 6B shows a reduction in

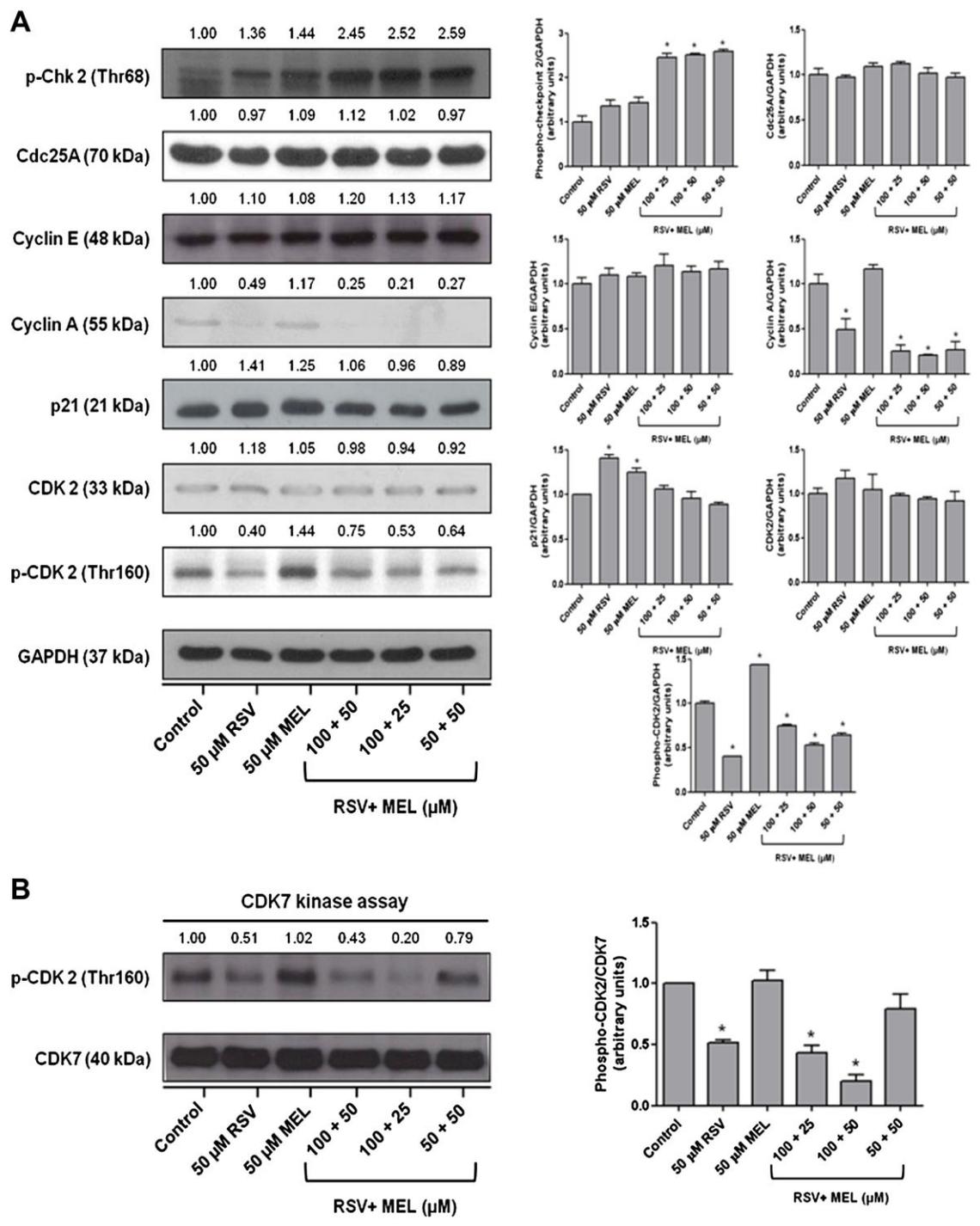


Fig. 6. The effects of RSV and MEL on the cell cycle-regulated proteins involved in the S phase progression and CDK7 kinase activity. A: Phospho-checkpoint 2, Cdc25A, cyclin A, cyclin E, p21, CDK2, and phospho-CDK2 levels were analyzed. After treatment for 24 h, total proteins in cellular extracts were collected and assayed by Western blotting using antibodies against the S cell cycle regulators as indicated. GAPDH was used as an internal control for equivalent protein loading. The GAPDH immunoblot is representative of all the different experiments. For CDK7 kinase activity (B), CDK7 was immunoprecipitated from treated cell lysates and then subjected to kinase assay in the presence of ATP and the CDK2 substrate protein as described in the Materials and Methods Section. The phosphothreonine site of the CDK2 substrate at Thr160 was determined by Western blotting. The immunoblots are representative of three different experiments that gave similar results. Densitometric analysis of each lane was calculated using ImageJ Software, and the data are expressed as arbitrary units. IP, immunoprecipitation.

the phosphorylation of CDK2 substrate at Thr¹⁶⁰; these data support the above suggestion that RSV inhibited the activity of the CDK7 kinase. The same effect was found in the cells treated with a combination of RSV and MEL but not in cells that were treated with MEL alone.

DISCUSSION

MEL is a phenylalanine derivative of nitrogen mustard used in cancer therapy; it was first synthesized in 1953. This cytotoxic drug is believed to exert its pharmacologic activity by inducing interstrand cross-links in the major groove of DNA; this mechanism represents the toxicity of all alkylation events [Rothbarth et al., 2004]. Initially, MEL was only used to treat multiple myeloma, but later, it is also shown to be effective in the treatment of patients with several other tumors, such as ovarian or breast cancer. MEL, especially when used at a high dose, shows a diversity of toxic side effects. The most common side effect occurring during therapy is bone marrow suppression leading to leukopenia and thrombocytopenia. The occurrence of resistance to antineoplastic agents such as MEL is a major problem in cancer treatment [Dollery, 1991]. Studies are necessary to improve the efficacy of MEL either by potentiating the cytotoxicity of MEL or by reducing the resistance against MEL.

Here, we investigated the effect of the combination treatment of RSV and MEL on human breast cancer MCF-7 and MDA-MB231 cells. RSV is a natural phytoalexin that is present in grape skins and, as a consequence, in red wine [Gusman et al., 2001]. As early as 1997, RSV was found to be a potent chemopreventive agent, which blocked the initiation, promotion, and progression of tumors [Jang et al., 1997]. Since that time, extensive research on its anticancer activity performed in a wide variety of cellular models suggests a potential antiproliferative and apoptogenic use of this compound [Goswami and Das, 2009].

Consistent with earlier observations [Nakagawa et al., 2001; Pozo-Guisado et al., 2002; Wesierska-Gadek et al., 2008], we found here that RSV inhibits the viability of human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells while maintaining little cytotoxic effect in non-malignant cell lines.

We also showed that RSV enhanced the cytotoxic effects of MEL on MCF-7 and MDA-MB231 cells in vitro. The potentiation of cytotoxic effects of MEL by RSV was higher in MCF-7 cells than MDA-MB231 cells. This increase was dependent on the treatment sequence. Sequential treatment with RSV followed by MEL yielded more cytotoxic effects than treatment with MEL followed by RSV. Fulda and Debatin [2004] showed that pretreatment with RSV enhanced the ability of anticancer agents, such as VP16, doxorubicin, cytarabine, actinomycin D, taxol, or methotrexate, to induce apoptosis in SHEP neuroblastoma cells in a dose- and time-dependent manner. He et al. [2011] demonstrated that RSV enhanced the antitumor activity of rapamycin in multiple breast cancer cell lines.

Studies suggest that RSV could act as potent sensitizer for antitumor drug-induced apoptosis [Kubota et al., 2003; Fulda and Debatin, 2004; Jazirehi and Bonavida, 2004; Duraj et al., 2006]. A similar effect was observed in this study. To gain further insight into

the molecular mechanism of RSV induced apoptosis sensitivity, we investigated key molecules known to regulate apoptosis. The combination treatment of RSV with MEL resulted in the upregulation of p53, downregulation of procaspase 8, and the activation of caspases 7 and 9. Gatouillat et al. [2010] reported that RSV enhanced the chemotherapeutic potential of doxorubicin in chemoresistant B16 melanoma cells through the upregulation of p53. Interestingly, in another study, an enhancement in the sensitization effect of RSV on apoptosis induced by various drugs in cancer cell lines was found to be p53 independent [Fulda and Debatin, 2004]. Bhardwaj et al. [2007] have shown that RSV enhanced the apoptotic and anti-proliferative potential of velcade and thalidomide in multiple myeloma cells. Such an enhancement was associated with inhibition of NF- κ B and STAT3 activation pathways and with an accumulation of the sub-G(1) population, an increase in Bax release, and the activation of caspase-3.

The analysis of cell cycle distribution showed that RSV, both alone and in combination treatment with MEL, inhibited cell cycle progression in the S phase. Treatment of MCF-7 cells with specific cell cycle inhibitors followed by MEL also potentiated the cytotoxic effect of MEL, suggesting that the cell cycle arrest is necessary for the chemosensitization of MCF-7 cells to MEL by RSV. The cell cycle arrest may increase MEL incorporation into the cells. This finding would explain the improved efficacy of MEL we observed here.

The effect on cell cycle progression was probably caused by downregulation of cyclin A and phospho-CDK2 (Thr160) by treatment with RSV and its association with MEL. The treatment of MEL alone increased the levels of Thr¹⁶⁰-phosphorylated CDK2. This observation is in agreement with the known function of activated CDK2 (phospho-CDK2) in driving cells in late G1 phase into the S-phase. Zhou et al. [2009] showed that activation of p-CDK2 is believed to play a role in the induction of a reversible, non-cytotoxic S-phase delay in HepG2 cells.

Figure 7 shows proteins related to cell cycle progression in the S phase. An important mechanism for regulating cell cycle progression is controlled by the activity of CDKs, which is regulated by interacting with their respective CDK subunits [Malumbres and Barbacid, 2005]. Cyclin E associates with CDK2 to regulate progression from G1 into S phase. Cyclin A binds with CDK2, and this complex is required during S phase. In addition to cyclin binding, CDK2 activity is also regulated by phosphorylation on conserved threonine and tyrosine residues. Dephosphorylation at tyrosine-15 and threonine-14 sites by the enzyme Cdc25A is necessary for activation of CDK2 and further progression through the cell cycle. Full activation of CDK2 requires phosphorylation of threonine 160, brought about by the CDK7 [Vermeulen et al., 2003].

Because hypophosphorylation of CDK2 protein was induced in MCF-7 cells by RSV treatment alone and by combination treatment with MEL, we analyzed the CDK7 activity and observed an inhibition of its activity. The CDK7 kinase inhibition maintained CDK2 in its inactive form and arrested the cell cycle in the S phase. Liang et al. [2003] demonstrated that RSV induced cell cycle arrest through the inhibition of CDK7 kinase activity in colon carcinoma HT29 cells. However, the cell cycle arrest observed by these researchers was at the G2 phase. CDK7, in addition to controlling the activity of CDK2,

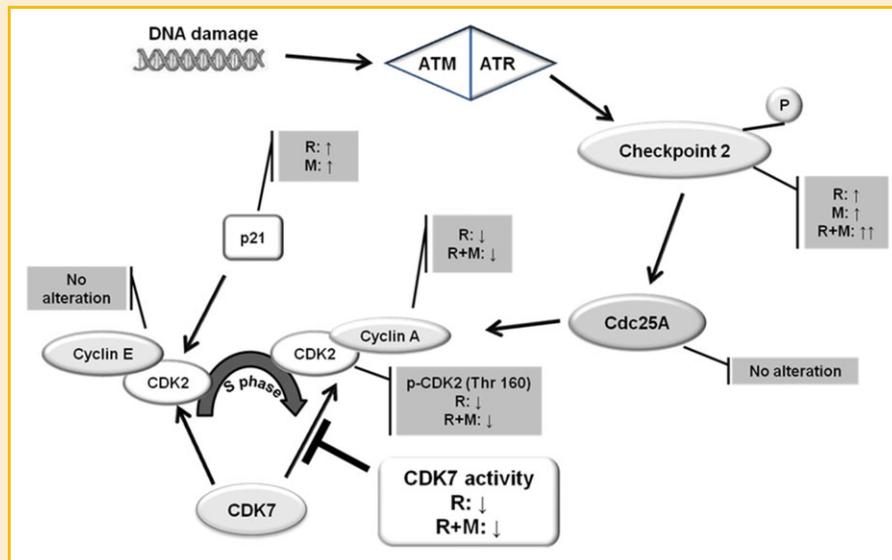


Fig. 7. The effects of RSV and its association with MEL on proteins related to the cell cycle progression in the S phase of MCF-7 cells. M, melphalan; R, resveratrol; R + M, association of RSV with MEL.

also controls the activity of CDK1, which is an enzyme responsible for progression at the G2 phase [Vermeulen et al., 2003].

In summary, our results indicate that RSV could be used as an adjuvant agent during breast cancer therapy with MEL. It is important to emphasize that this is the first study demonstrating the effect of the combination of RSV with MEL in human cancer cells. Despite more than 1,100 publications on the cancer chemotherapeutic potential of RSV, only about 20 reported on its chemosensitization potential. Thus, further studies should be performed in this area to determine effective combinations of RSV and chemotherapeutic agents, their effects on different types of cancers and possible mechanisms of action involved in chemosensitization by RSV.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ—E-26/103.110/2008); Cancer Foundation/2009 (without grant number); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq—PhD scholarship); and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES—PhD scholarship).

REFERENCES

Agarwal C, Dhanalakshmi S, Singh RP, Agarwal R. 2004. Inositol hexaphosphate inhibits growth and induces G1 arrest and apoptotic death of androgen-dependent human prostate carcinoma LNCaP cells. *Neoplasia* 6:646–659.

Ahmad KA, Clement MV, Hanif IM, Pervaiz S. 2004. Resveratrol inhibits drug-induced apoptosis in human leukemia cells by creating an intracellular milieu nonpermissive for death execution. *Cancer Res* 64:1452–1459.

Ahn J, Urist M, Prives C. 2004. The Chk2 protein kinase. *DNA Repair* 3:1039–1047.

Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. 2009. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 486:95–102.

Aziz MH, Nihal M, Fu VX, Jarrard DF, Ahmad N. 2006. Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Mol Cancer Ther* 5:1335–1341.

Baur JA, Sinclair DA. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5:493–506.

Bhardwaj A, Sethi G, Vadhan-Raj S, Bueso-Ramos C, Takada Y, Gaur U, Nair AS, Shishodia S, Aggarwal BB. 2007. Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappa B-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. *Blood* 109:2293–2302.

Carmichael J, Degraff W, Gazdar A, Minna J, Mitchell J. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47:936–942.

Chan JY, Phoo MS, Clement MV, Pervaiz S, Lee SC. 2008. Resveratrol displays converse dose-related effects on 5-fluorouracil-evoked colon cancer cell apoptosis—The roles of caspase-6 and p53. *Cancer Biol Ther* 7:1305–1312.

Dollery C. 1991. Melphalan, therapeutic drugs. London: Churchill Livingstone.

Dotto GP. 2000. p21 WAF1/Cip1: More than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* 1471:M43–M56.

Duraj J, Bodo J, Sulikova M, Rauko P, Sedlak J. 2006. Diverse resveratrol sensitization to apoptosis induced by anticancer drugs in sensitive and resistant leukemia cells. *Neoplasia* 53:384–392.

Fulda S, Debatin KM. 2004. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene* 23:6702–6711.

- Garg AK, Buchholz TA, Aggarwal BB. 2005. Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. *Antioxid Redox Signal* 7: 1630–1647.
- Gatouillat G, Balasse E, Joseph-Pietras D, Morjani H, Madoulet C. 2010. Resveratrol induces cell-cycle disruption and apoptosis in chemoresistant B16 melanoma. *J Cell Biochem* 110:893–902.
- Goswami SK, Das DK. 2009. Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Lett* 284:1–6.
- Gupta SC, Kannappan R, Reuter S, Kim JH, Aggarwal BB. 2011. Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Ann NY Acad Sci* 1215:150–160.
- Gusman J, Malonne H, Atassi G. 2001. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis* 22:1111–1117.
- He X, Wang Y, Zhu JH, Orloff M, Eng C. 2011. Resveratrol enhances the anti-tumor activity of the mTOR inhibitor rapamycin in multiple breast cancer cell lines mainly by suppressing rapamycin-induced AKT signaling. *Cancer Lett* 301:168–176.
- Higgins CF. 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 446:749–757.
- Jang MS, Cai EN, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275:218–220.
- Jazirehi AR, Bonavida B. 2004. Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 3:71–84.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69–90.
- Kaldis P, Aleem E. 2005. Cell cycle sibling rivalry—Cdc2 vs. Cdk2. *Cell Cycle* 4:1491–1494.
- Kubota T, Uemura Y, Kobayashi M, Taguchi H. 2003. Combined effects of resveratrol and paclitaxel on lung cancer cells. *Anticancer Res* 23:4039–4046.
- Liang YC, Tsai SH, Chen L, Lin-Shiau SY, Lin JK. 2003. Resveratrol-induced G(2) arrest through the inhibition of CDK7 and p34(CDC2) kinases in colon carcinoma HT29 cells. *Biochem Pharmacol* 65:1053–1060.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Malumbres M, Barbacid M. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30:630–641.
- Mao QQ, Bai Y, Lin YW, Zheng XY, Qin J, Yang K, Xie LP. 2010. Resveratrol confers resistance against taxol via induction of cell cycle arrest in human cancer cell lines. *Mol Nutr Food Res* 54:1574–1584.
- Marques FZ, Markus MA, Morris BJ. 2009. Resveratrol: Cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *Int J Biochem Cell Biol* 41:2125–2128.
- Nakagawa H, Kiyozuka Y, Uemura Y, Senzaki H, Shikata N, Hioki K, Tsubura A. 2001. Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. *J Cancer Res Clin Oncol* 127:258–264.
- Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Mulero-Navarro S, Santiago-Josefat B, Fernandez-Salguero PM. 2002. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: Cell-specific alteration of the cell cycle. *Biochem Pharmacol* 64:1375–1386.
- Rothbarth J, Koevoets C, Tollenaar R, Tilby MJ, van de Velde CJH, Mulder GJ, Kuppen PJK. 2004. Immunohistochemical detection of melphalan-DNA adducts in colon cancer cells in vitro and human colorectal liver tumours in vivo. *Biochem Pharmacol* 67:1771–1778.
- Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R. 2008. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ* 15:1318–1329.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. 2003. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36:131–149.
- Wesierska-Gadek J, Kramer MP, Maurer M. 2008. Resveratrol modulates roscovitine-mediated cell cycle arrest of human MCF-7 breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* 46:1327–1333.
- Woo RA, Poon RY. 2003. Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* 2:316–324.
- Zhou R, Fukui M, Choi HJ, Zhu BT. 2009. Induction of a reversible, non-cytotoxic S-phase delay by resveratrol: implications for a mechanism of lifespan prolongation and cancer protection. *Br J Pharmacol* 158:462–474.

8.2. Apêndice 2: Artigo publicado II



Resveratrol: Composto Bioativo Presente em Alimentos e seus Efeitos em Células Tumoriais de Mama

Maitê Santos Malheiros, Caroline Araujo Ramos, Danielly Cristiny Ferraz da Costa,
Fabiana Alves Casanova, Jerson Lima da Silva e Eliane Fialho de Oliveira

Vencedores do Prêmio Wraps 2009

Resumo

Uma dieta rica em frutas e hortaliças é capaz de oferecer um conjunto de compostos bioativos. Essas substâncias apresentam ação biológica no organismo humano prevenindo inúmeras doenças, dentre elas o câncer. O trans-resveratrol é um composto bioativo presente em uvas, em vinhos, em oleaginosas e em algumas frutas vermelhas, e o consumo moderado de vinho tinto tem sido responsável por diversos benefícios à saúde humana. Diversos estudos científicos mostram os efeitos promissores do resveratrol sobre os processos que ocorrem durante as principais fases da carcinogênese, sugerindo que este composto pode ser capaz de atuar como agente quimiopreventivo e quimioterápico. Considerando os vários mecanismos pelos quais a célula pode regular seus processos

metabólicos durante a evolução do desenvolvimento tumoral, alguns dos possíveis efeitos biológicos do resveratrol envolvem a modulação de vias de genes supressores de tumor e também do processo de fosforilação de proteínas. Estes e outros mecanismos serão discutidos nesta revisão, na qual os efeitos quimiopreventivos e quimioterápicos do resveratrol, especialmente contra o câncer de mama, serão abordados.

Câncer de mama

No Brasil, o câncer de mama é a primeira causa de óbito por câncer entre mulheres, sendo o Rio de Janeiro, o estado que apresenta o maior coeficiente de mortalidade do País. Na região Sudeste o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 novos casos por 100 mil, enquanto que no Brasil o número esperado de novos casos de câncer de mama é de 49 casos a cada 100 mil mulheres, segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2010.

Embora não se conheça com exatidão o mecanismo causal do câncer de mama, sabe-se que muitos fatores genéticos e ambientais estão envolvidos com a gênese da doença. A contribuição de fatores externos é comprovada pela observação de que populações de origem asiática, ao migrarem para o ocidente, tendem a aumentar o risco de desenvolver câncer de mama nas gerações subseqüentes. Isso reforça a hipótese de que os fatores dietéticos, o hábito de fumar, a ingestão de bebidas alcoólicas e a paridade são fatores que podem exercer um peso importante na carcinogênese mamária.

Alimentos funcionais e compostos bioativos em alimentos (CBA)

O termo alimentos funcionais foi introduzido, inicialmente, no Japão, em meados da década de 1980. Alimento funcional pode ser definido como o alimento semelhante em aparência aos alimentos convencionais, consumido na dieta usual, capaz de produzir efeitos metabólicos e fisiológicos úteis na manutenção de uma benéfica saúde física e mental, auxiliando na redução do risco de doenças crônicas não-transmissíveis, além de possuir as suas funções nutricionais básicas. Ingrediente funcional ou composto bioativo é o composto responsável pela ação biológica contida no alimento funcional.

No Brasil, somente a partir de 1999, a regulamentação técnica para a análise de novos alimentos e de ingredientes foi proposta e aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A definição de alimentos funcionais, segundo a ANVISA engloba duas alegações:

- Alegação de propriedade funcional - Relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou o não-nutriente possuem no crescimento, no desenvolvimento, na manutenção e em outras funções normais do organismo humano;
- Alegação de propriedade de saúde - Aquela que afirma, sugere ou implica a existência da relação entre o alimento ou o ingrediente com a doença ou com a condição relacionada à saúde. Deste modo, o alimento ou o ingrediente que alegar propriedades funcionais e/ou de saúde pode,



Nutrição Profissional 28 - Janeiro/Fevereiro/Março de 2010

além de funções nutricionais básicas, ao tratar-se de nutriente, produzir efeitos metabólicos e fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.

Para a Associação Dietética Americana (ADA), os alimentos funcionais incluem alimentos integrais, fortificados, enriquecidos ou restauradores, que apresentam, potencialmente, efeitos benéficos para a saúde se forem consumidos como integrantes de uma dieta variada. Para produzir o efeito desejado, as substâncias fisiologicamente ativas devem estar presentes nos alimentos funcionais, em quantidades suficientes e adequadas. No entanto, os níveis ótimos

de ingestão destes compostos não foram ainda determinados.

Ingestão de polifenóis e promoção de saúde

Evidências epidemiológicas confirmam que dietas ricas em frutas e vegetais estão associadas à redução da frequência e da severidade de diversos problemas de saúde. Cientistas buscam, por mais de duas décadas, identificar substâncias específicas em frutas e vegetais responsáveis pelos benefícios que proporcionam à saúde humana. Os diversos estudos apontam, como sendo os principais componentes, os metabólitos secundários de plantas, denominados polifenóis, bem como carotenóides, como o licopeno.

Especial Prêmio Wraps



Casa Hope. A nossa esperança é você.

Claudinho nasceu em 12/10/2000 em Rio Claro, São Paulo.

Em abril de 2002, ficou gravemente doente e teve que se submeter a um transplante de fígado.

Desde então ele se encontra na Casa Hope, recebendo todo o apoio que necessita para que possa completar o seu tratamento. Aqui ele tem casa, comida, escola, assistência social, recreação, remédio, psicólogo...

Daqui a pouco, Claudinho poderá voltar para casa...

Você também pode fazer parte desta história. Basta adotar o leito do Claudinho, da Ana, do Beto, da Júlia...

ADOTE
UM LEITO*.
AJUDE A
SALVAR
VIDAS.



LIGUE
5087-7999

*O programa Adote um Leito consiste no patrocínio do custo mensal de uma criança e seu acompanhante com todos os serviços que a Hope oferece.



Resveratrol e prevenção de doenças

O resveratrol é um polifenol encontrado naturalmente em mais de 70 espécies de plantas, incluindo alimentos como uvas, vinhos tintos, oleaginosas e frutas vermelhas. Em plantas, o resveratrol é sintetizado em resposta a condições de estresse, e por isto é considerado uma fitoalexina. O conteúdo de resveratrol nas diferentes fontes alimentares varia de acordo com o clima, com a maneira de se cultivar, com a ocorrência de infecções causadas por fungos, com a exposição à radiação ultravioleta (UV) e com o tipo de processo empregado na fabricação do vinho. O resveratrol existe sob as formas isoméricas cis e trans, sendo o isômero trans (3-5-4'-hidroxiestilbeno) o mais comumente encontrado em plantas e o que apresenta maior biodisponibilidade. Numerosos estudos reportam o trans-resveratrol como agente preventivo contra uma variedade de doenças. Além disso, esse composto pode estar associado com o aumento da expectativa de vida em leveduras.

Os mecanismos envolvidos na ação do resveratrol não estão bem estabelecidos. Entretanto, sugere-se atividade antioxidante, inibição da ciclooxigenase-2, indução de enzimas envolvidas em processos de detoxificação, modulação do ciclo celular, indução de morte celular programada (apoptose), efeito antiproliferativo, dentre outras funções.

Efeitos do resveratrol sobre células tumorais de mama

Vários polifenóis são estruturalmente semelhantes a estrógenos. Fitoestrógenos como o flavonóide quercetina e a isoflavona genisteína atuam tanto como agonistas ou antagonistas de receptores de estrogênio, originando respostas contrárias dependendo da concentração, da competição e da expressão de receptores de estrogênio. O resveratrol é considerado um fitoestrógeno dietético devido a sua similaridade estrutural com o dietilestilbestrol, um estrogênio sintético. Em alguns tipos de células como a linhagem tumoral de mama MCF-7 (MCF-7 significa Michigan Cancer Foundation - 7, referência ao instituto em que a linhagem de células de câncer de mama foi criada), que expressa receptores de estrogênio, o resveratrol pode atuar como superagonista.

Sabe-se que uma estimulação incorreta do balanço hormonal pode aumentar o risco do desenvolvimento do câncer por favorecer a proliferação celular, ao invés da diferenciação celular e da senescência. Conseqüentemente, os tumores hormônio-dependentes podem ser prevenidos pela ingestão diária de quantidades apropriadas de moduladores seletivos de receptores de estrogênio. Esses componentes possuem quantidades variadas de agonistas ou de antagonistas de estrogênio, dependendo do tipo ce-

lular, da expressão de genes alvo de receptores de estrogênio e de outras respostas intracelulares associadas.

O resveratrol também se mostrou capaz de diminuir a viabilidade e de provocar a indução de apoptose em células de câncer de mama MCF-7. Outro estudo realizado demonstrou que este polifenol possui atividade pró-apoptótica, pois ativa diferentes classes de Mitogen Activated Protein Kinases (MAP quinases), proteínas que fosforilam várias outras proteínas, em resposta a diferentes estímulos oxidativos.

A fosforilação reversível de proteínas é sabidamente o mecanismo pós-traducional mais comum de controle da atividade biológica de proteínas. Desde que foi inicialmente identificado como o mecanismo que regula o metabolismo de glicogênio no final dos anos 1960, aplicou-se esse conceito a várias atividades celulares diferentes. A reação de fosforilação é catalisada por uma família composta de cerca de 200 tipos diferentes de enzimas denominadas proteínas cinases. Tais enzimas transferem o fosfato terminal de nucleotídeos, especialmente trifosfato de adenosina (ATP) e eventualmente guanosina trifosfato (GTP), para as hidroxilas disponíveis em resíduos de serina, de treonina ou de tirosina. A reação de defosforilação é catalisada por proteínas fosfatases, um grupo cuja compreensão ainda é incipiente, todavia avança rapidamente nos últimos anos.

Os processos de fosforilação e de defosforilação de proteína estão intimamente conectados às vias de sinalização celular, pelas quais a célula controla diversos processos metabólicos. Uma alteração nessas vias de fosforilação seja por uma mutação ou por super expressão, pode desencadear diversos tipos de doenças, dentre elas, o câncer.

A maioria dos sinais extracelulares é amplificada e é transformada no interior da célula por proteínas cinases. Proteínas cinases podem ser importantes reguladoras das vias de sinalização intracelular, cuja atividade é rigorosamente regulada. Contudo, alelos mutantes desses genes de proteínas cinases ou de outros sinais oncogênicos podem perturbar a rede de sinalização dessa célula, podendo levar a uma desregulação de ambos os processos transitórios, tais como mudanças na motilidade e na forma da célula, ou até mesmo a processos menos reversíveis como diferenciação celular, divisão e apoptose.

Estudo realizado em 2007 demonstrou a atividade do resveratrol como uma substância pró-apoptótica e verificou-se a ativação de diferentes MAP cinases em resposta a diversos estímulos oxidativos, na linhagem de carcinoma mamário humano MCF-7.

Logo, se a fosforilação é o mecanismo mais comumente utilizado em diversos processos celulares, o mapeamento das fosfoproteínas, cuja atividade é modulada por compostos bioativos em alimentos, poderá fornecer uma visão detalhada dos requisitos necessários a carcinogênese e como as moléculas sinalizadoras respondem a esse mecanismo.

Além disto, existem vias de genes supressores de tumor moduladas por resveratrol. A proteína supressora de tumor p53 constitui uma dessas principais vias. Trata-se de uma proteína envolvida não apenas na regulação da maquinaria de anti-proliferação celular, mas também em outros processos tais como transcrição gênica, reparo ao DNA, controle do ciclo celular, estabilidade genômica, segregação cromossomal, senescência e apoptose. O desenvolvimento humano não depende da p53, mas a perda de função desta proteína confere um elevado risco de desenvolvimento tumoral. Mutações no gene da p53 é a mais comum mudança genética específica encontrada em cânceres humanos. Esta proteína mutada está presente em mais de 50% dos tumores malignos e por isto se tornou um dos principais focos nos estudos contra o câncer.

A proteína p53 vem sendo descrita como um alvo biológico do resveratrol em diferentes modelos experimentais. Evidências sugerem que o resveratrol é capaz de ativar esta proteína, mantendo seus níveis celulares estáveis e consequentemente prevenindo o desenvolvimento tumoral. Desta forma, a p53 é capaz de exercer suas funções como fator transcricional, estimulando a expressão de genes envolvidos em apoptose e reparo de DNA, e também como proteína transdutora de sinal, modulando a atividade de outras proteínas envolvidas na carcinogênese.

Conclusão

Na tentativa de elucidar os mecanismos pelos quais o resveratrol previne ou trata o câncer de mama, várias pesquisas são desenvolvidas com a finalidade de demonstrar se esse composto bioativo é capaz de inviabilizar o crescimento de culturas de células *in vitro*. Sua atuação também pode estar ligada a expressão de genes envolvidos em apoptose e reparo de DNA ou em modificação de vias de sinalização por meio de fosforilação de proteínas. Sendo assim, o resveratrol caracteriza-se atualmente como uma molécula promissora contra o câncer de mama, podendo auxiliar na prevenção e no tratamento dessa doença. Entretanto, ainda necessita-se de mais estudos que esclareçam a ação desse composto bioativo em humanos. NP

Leia a versão original do trabalho no
Portal Racine: www.racine.com.br

Currículos

Maitê Santos Malheiros é graduanda em nutrição pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) e aluna de iniciação científica do Instituto de Bioquímica Médica (IBqM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Caroline Araujo Ramos é graduanda em nutrição pela UFRJ e aluna de iniciação científica do Instituto de Nutrição Josué de Castro (INJC) da UFRJ.

Danielly Cristiny Ferraz da Costa é graduada em nutrição pela UFRJ, mestre e doutoranda em química biológica pelo IBqM/UFRJ.

Fabiana Alves Casanova é graduada em nutrição pela UFRJ, mestre e doutoranda em nutrição humana pelo INJC/UFRJ.

Jerson Lima da Silva é graduado em medicina pela UFRJ e doutor em biofísica pelo Instituto de Biofísica da UFRJ. Atualmente é professor titular do IBqM/UFRJ.

Eliane Fialho de Oliveira é graduada em nutrição pela UFRJ, mestre em química biológica e doutora em ciências pelo IBqM/UFRJ. Atualmente é professora adjunta do Departamento de Nutrição Básica e Experimental (DNBE) do INJC/UFRJ.

9. Curriculum vitae

Nome: Fabiana Alves Casanova

Nascimento: 29/09/1983

Naturalidade: Rio de Janeiro

➤ **Formação Acadêmica**

- **Graduação em Nutrição**, pelo Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, fevereiro de 2001 a março de 2005.
- **Mestrado em Nutrição Humana**, pelo Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, março de 2005 a setembro de 2006.
- **Doutorado em Ciências (Química Biológica)**, pelo Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, agosto de 2007 a setembro de 2012.

➤ **Orientação de Estudantes**

- **Caroline Araújo Ramos**. Iniciação Científica. Estudante do Curso de Graduação em Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Período: 2008-2010.
- **Julia Quarti Cardoso**. Iniciação Científica. Estudante do Curso de Graduação em Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Período: fevereiro de 2010 até o presente momento.

➤ **Comunicação em Congresso**

- 40 comunicações em congressos nacionais
- 13 comunicações em congressos internacionais

➤ **Publicações**

- **CASANOVA, F.A.**; NAKAMURA, A.; MASUDA, H.; LIMA, L.M.T.R.; FIALHO, E. Functionality of phosphorylated vicilin exposed by physical and chemical agents. *Food Chemistry*, v. 107, p. 1138-1143, 2008.
- MALHEIROS, M; RAMOS, C.A.; COSTA, D.C.F.; **CASANOVA, F.A.**; SILVA, J.L.; FIALHO, E. Resveratrol: Composto Bioativo Presente em Alimentos e seus Efeitos em Células Tumerais de Mama. *Nutrição Profissional*, v. 28, p. 57-61, 2010.
- **CASANOVA, F.A.**; SILVA, J.L.; QUARTI, J.; FIALHO, E.; COSTA, D.C.F.; RAMOS, C.A. Resveratrol chemosensitizes breast cancer cells to melphalan by cell cycle arrest. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 113, p. 2586-2596, 2012.