UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO BÁSICA E EXPERIMENTAL

Paula Seixas da Costa

# RESVERATROL E CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA: ASSOCIAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO COM CASEÍNA CINASE 2

Rio de Janeiro
2015

**Paula Seixas da Costa**

# RESVERATROL E CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA: ASSOCIAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO COM CASEÍNA CINASE 2

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Ciências Nutricionais.

Orientador: Prof.ª Eliane Fialho de Oliveira

**Rio de Janeiro**

**2015**

RESVERATROL E CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA: ASSOCIAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO COM CASEÍNA CINASE 2

**Paula Seixas da Costa**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em ciências nutricionais Aprovado por:

---

**Orientadora: Profª. Eliane Fialho de Oliveira**

**Profª. Associada do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC / UFRJ**

---

**Revisor: Prof. Tatiana El-Bacha Porto**

**Profª. Adjunta do Departamento de Nutrição e Dietética/ INJC / UFRJ**

---

**Titular: Profª. Anna Paola Trindade Rocha Pierucci**

**Profª. Associada do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC / UFRJ**

---

**Titular: Cristiana Pedrosa Melo Porto**

**Profª. Associada do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC / UFRJ**

---

**Titular:Pesquisadora Titular do Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos/IOC/ Fiocruz**

---

**Titular : Prof. Anderson Junger Teodoro**

**Prof. Adjunto do Departamento de Tecnologia de Alimentos/Escola de Nutrição/ UNIRIO**

**Suplente interno: Profª. Mariana Costa Monteiro**

**Profª. Adjunto do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC / UFRJ**

**Suplente externo: Prof Alexandre Guedes Torres**

**Prof. Adjunto do Departamento de Bioquímica / IQ/ UFRJ**

Seixas-Costa, Paula

**Resveratrol e células de câncer de mama: associação de espécies reativas de oxigênio com caseína cinase 2**/ Paula Seixas da Costa. - Rio de Janeiro:

UFRJ/Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2015

xxi, 118 fl.il.

Orientador: Eliane Fialho de Oliveira

Tese (Doutorado)- UFRJ / Programa de Pós- graduação em Nutrição,

2015.

Referências bibliográficas: f. -76-113

1. resveratrol 2. Câncer de mama 3. MCF-7 4. caseína cinase 2 5. Espécies reativas de Oxigênio

Tese I. Fialho de Oliveira, Eliane. II Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição III. Título

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Alimentos Funcionais do departamento de Nutrição Básica e Experimental, INJC/UFRJ, sob a orientação da professora Eliane Fialho de Oliveira na vigência de auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Fundação Ary Frauzino e CAPES.**

**A minha filha Maria Eduarda,**
**ao meu marido Elmo Eduardo,**
**aos meus pais Maria Alice e Paulo Sérgio e**
**as minhas irmãs Patricia e Priscila,**
**por tudo o que representam na minha vida.**

**AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo que tem me proporcionado na minha vida....

a minha orientadora Eliane Fialho, Lili, por toda assistência e direcionamento, pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela confiança e amizade durante toda a minha trajetória na pós graduação. Obrigada pelas oportunidades,

aos meus amigos do laboratório, pela parceria, por toda ajuda e por todas as risadas que me fizeram dar.

a minha eterna aluna de IC Patricia Severo Ramos pela ajuda preciosa nos momentos em que eu mais precisei,

aos meus pais Maria Alice e Paulo Sérgio e minhas irmãs Patricia e Priscila por todo amor, carinho, compreensão, apoio e motivação,

ao meu marido Elmo Eduardo que na árdua tarefa de ser marido, conselheiro, companheiro e orientador de plantão brilhantemente conseguiu ser muito melhor do que eu poderia imaginar,

a minha filha Maria Eduarda, maior presente da minha vida, que nos seus apenas dois anos de vida soube compreender que a mamãe por vezes estressada devido a seminários, qualificação e tese precisa mesmo é de um abraço, um beijo e um “te ama mamãe”,

e a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Tudo vale a pena quando a alma não é pequena”

Fernando Pessoa

# RESUMO

É estimado que, em 2020, a incidência de câncer em todo o mundo esteja em torno de 15 milhões de casos. Atualmente, o câncer de mama representa a segunda neoplasia mais mortal entre as mulheres. O Resveratrol (RV) é um polifenol encontrado em uvas e vinho tinto e conhecido por ser quimiopreventivo e quimioterápico, contudo, seus mecanismos de ação ainda não foram completamente elucidados. A caseína cinase 2 (CK2) é uma serina / treonina proteína cinase encontrada em todas as células eucariotas. Ela desempenha um papel crítico na proliferação celular e oncogênese, por isso é uma candidata a alvo molecular para o tratamento de diversos tipos de câncer. No presente estudo demonstramos que o RV em células de câncer de mama MCF-7 induziu a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estas inibem a atividade da CK2. Concentrações crescentes de RV reduziram a viabilidade das células MCF-7 de maneira tempo e dose dependente apresentando $IC_{50}$ de 238 µM e 151 µM para 24 e 48 horas, respectivamente. O inibidor da CK2, 4, 5, 6,7-Tetrabromo-2-azabenzimidazole (TBB), em 24 horas, reduziu a viabilidade das células MCF-7 de maneira dose dependente apresentando um $IC_{50}$ de 106 µM. A concentração de 200 µM de RV na MCF-7 não causou aumento na produção de EROs em 3h de incubação, contudo, em 24h a mesma concentração aumentou em aproximadamente 50% essa produção. Entretanto, o TBB inibiu a geração de EROs com 3h de tratamento e não aumentou a produção da mesma em 24h. A pré-incubação com os antioxidantes n-acetil cisteína (NAC) e glutationa reduzida (GSH) e a enzima polietilenoglicol-catalase conseguiu proteger a viabilidade celular da MCF-7 do efeito do RV, mas não do TBB. Corroborando com esses resultados, a pré-incubação com a PEG-catalase favoreceu a redução de aproximadamente 50% da produção de EROs observada nas células MCF-7 tratadas com RV por 24h. O RV foi capaz de causar diminuição no potencial de membrana mitocondrial da MCF-7 após 3h e 24h de tratamento. Contudo, ao realizar um pré-tratamento com a PEG-catalase não se constatou disfunção mitocondrial nos dois tempos testados, mesmo após a adição do RV. Ao substituir o RV pelo TBB ocorreu igualmente a perda do potencial de membrana mitocondrial em 3h e 24h, mas o pré-tratamento com a PEG-catalase não alterou o efeito do TBB. Com relação a CK2, o RV e o TBB conseguiram inibir a atividade da enzima após 24h de tratamento. Entretanto, a utilização da PEG-catalase manteve a atividade da CK2 próximo ao da célula MCF-7 controle, mesmo quando o RV foi adicionado, o que não ocorreu na presença de TBB. Interessantemente, o RV exibiu propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) favoráveis e preencheu a “regra dos 5s” de Lipinski mostrando ser bem absorvido, permeável, biodisponível e um composto oralmente viável. Concluímos que esses resultados mostraram o efeito do RV sobre a produção de EROS nas células MCF-7 e o seu envolvimento com a inibição da atividade da CK2 e somando-se aos resultados *in silico* podemos inferir o potencial desse polifenol como uma possível ferramenta para o tratamento do câncer de mama.

## ABSTRACT

It is estimated that in 2020, the worldwide incidence of cancer will be about 15 million. Currently, the breast cancer is the second most deadly cancer among women. Resveratrol (RV) is a polyphenol found in grapes and red wine, which is known to play a role as chemopreventive and chemotherapeutic agent; however, the mechanisms of action has not been fully elucidated. Casein kinase 2 (CK2) is a serine/threonine protein kinase found in all eukaryotes cells that plays a critical role in cell proliferation and oncogenesis, therefore it candidates as a molecular target for the treatment of several types of cancer. In the present study, we demonstrate that RV produces reactive oxygen species (ROS) leading to an inhibition of CK2 on MCF-7 breast cancer cells. Cells were treated with different concentrations of resveratrol during 24h and 48h of growth. MCF-7 cellular viability decreased in a time and dose dependent manner with an $IC_{50}$ of 238μM and 151 μM for 24h and 48h, respectively. In addition, 4, 5,6,7-Tetrabromobenzotriazole (TBB), a specific inhibitor of CK2, decreased MCF-7 cellular viability in a dose-dependent manner with $IC_{50}$ of 106 μM during 24h of growth. ROS production was not increased when MCF-7 was treated for 3h hours but its production increased on 50% when treatment for 24h with 200 μM of RV. However, TBB inhibited the generation of ROS with 3h of treatment and did not increase the ROS production in 24h. The pre-incubation with antioxidants such as NAC, GSH and PEG-catalase protected cellular viability from the effect of RV, but not from TBB effect. In relation with these results, the pre-incubation with PEG-Catalase favored the reduction to about 50% of ROS production observed on MCF-7 cells treated with RV for 24h. RV was able to decrease the MCF-7 mitochondrial membrane potential after the 3h and 24h treatments. However, when pre-treated with PEG-Catalase it was observed no mitochondrial dysfunction in both tested times, even after the addition of RV. When RV was substituted for TBB, there was also a decrease of the mitochondrial membrane potential for 3h and 24h but the pre-treatment with PEG-Catalase did not modify the effect of TBB. In relation to CK2, RV, and TBB inhibited the enzyme activity after the 24h treatment. Nonetheless, the PEG-Catalase utilization kept the CK2 activity close to the control MCF-7 cells even after the addition of RV. The same was not observed with the addition of TBB. Interestingly, RV exhibited favorable ADMET properties and fulfilled Lipinski's "Rule of five" showing it is well-absorbed, permeable, bioavailable and an orally viable compound. Taken together, the results contribute to elucidate the effect of RV over ROS production on MCF-7 and its relation to the inhibition of CK2 activity and, in addition, with the *in silico* results, we propose that this polyphenol may be a possible compound used in breast cancer treatment.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.C- Antes de Cristo

ADMET- Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

AKT- Proteína cinase B

AMPK- proteína cinase ativada por 5' adenosina monofosfatase

ATP- Trifosfato de adenosina

Bax- do inglês, *Bcl-2 associated X, protein* Proteína Bax

Bcl-2- do inglês *B-cell lymphoma-2*, Proteína Bcl-2

Caco-2- Linhagem celular de adenocarcinoma de intestino

CAT-Catalase

CK2- Caseína cinase 2

ClogP - Coeficiente de participação (octano/ água)

COX- Ciclooxigenase

COX-2- Ciclooxigenase2

D.C- Depois de Cristo

DMAT- 2-dimetilamino-4,5,6,7-tetrabromo- 1H-benzimidazol

DMBA- 7,12-dimetilbenzo (a) antraceno

CYP450- Citocromo P450

DMSO- Dimetilsulfóxido

DNA- Ácido dexorribonucléico

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGCG- Galato de epigalocatequina

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

ERK1- do inglês, *extracellular-signal-regulated kinases* cinase do tipo 1 regulada por sinal extracelular

ERK2- do inglês, *extracellular-signal-regulated kinases,* cinase do tipo 2 regulada por sinal extracelular

EROs/ROS- Espécies reativas de oxigênio

Glut-4- Transportador de glicose tipo 4 sensível a insulina

GSH- Glutationa reduzida

GTP- Trifosfato de guanosina

$H_2$DCFDA- 2’, 7'- acetato de diclorofluoresceína

$H_2O_2$- Peróxidode hidrogênio

HBA- Receptores ligantes de hidrogênio

HBD- Doadores ligantes de hidrogênio

$HO^{\bullet}$- Radical hidroxila

JC-1- Iodeto de 5,5’, 6,6’-tetracloro1,1’,3,3’-tetraetilbenzimidazolocarbocianina

MCF-7- Linhagem epitelial de câncer de mama

MTT- Brometo de 3(dimetiltiazol-2yl) 2,5 difenil tetrazólio

NAC- N-acetilcisteína

NADPH- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfato na forma reduzida

$O_2^{\bullet}$- Ânion superóxido

PBS- Tampão fosfato salino

PEG- Catalase- polietilenoglicol catalase

PMSF- Fluoreto de Fenilmetanosulfonil

RNA- Ácido ribonucleico

STZ- Streptozocina,

TBB- 4, 5, 6,7-Tetrabromo-2-azabenzimidazole

TMB- Tetra-metilbenzidina

VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular

$\Delta\Psi m$- Potencial de membrana mitocondrial

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**FIGURA 1**. Fases da carcinogênes..... **2**

**FIGURA 2**. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma ..... **4**

**FIGURA 3**. Distribuição de incidência e mortalidade por câncer de mama no mundo **5**

**FIGURA 4**. Fitoquímicos e seus compostos bioativos..... **9**

**FIGURA 5**. Vias de sinalização onde se encontram as principais ações dos fitoquímicos durante a carcinogênese..... **11**

**FIGURA 6**. Diagrama esquemático da capacidade de resposta seletiva da população saudável, bem como pacientes com câncer a agentes quimiopreventivos..... **12**

**FIGURA 7.** Estrutura química do resveratrol..... **13**

**FIGURA 8**. Estrutura química do resveratrol glicosilado..... **16**

**FIGURA 9**. Ilustração esquemática metabolismo do resveratrol..... **17**

**FIGURA 10.** Efeitos benéficos do resveratrol..... **20**

**FIGURA 11**. Estrutura heterotetrâmera da CK2..... **24**

**FIGURA 12 .** EROs e a sua contribuição para diversas doenças..... **26**

**FIGURA 13.** Homeostase das células normais e de câncer em relação a EROs..... **27**

**FIGURA 14.** Ação entre regulação de EROs na tumorigênese em diferentes estágios..... **28**

**FIGURA 15.** Dependência da concentração de resveratrol na viabilidade das células MCF-7..... **41**

**FIGURA 16.** Produção de EROs pelo resveratrol na linhagem celular MCF-7..... **43**

**FIGURA 17.** Viabilidade da MCF-7 tratada com NAC na ausência e presença de resveratrol..... **45**

**FIGURA 18.** Viabilidade celular de MCF-7 tratada com GSH e ou resveratrol..... **46**

**FIGURA 19.** Viabilidade celular de MCF-7 tratada com Resveratrol e Catalase..... **47**

**FIGURA 20.** Viabilidade celular de MCF-7 tratada com Resveratrol e PEG-catalase..... **48**

**FIGURA 21**. Produção de EROS em células MCF-7 tratadas com Resveratrol e PEG-catalase..... **49**

**FIGURA 22.** Atividade da caseína cinase 2 (CK2) nas células MCF-7 tratadas com resveratrol (RV) por 24 horas comparada com a atividade da CK2 da HB2..... **50**

**FIGURA 23.** Atividade da caseína cinase 2 (CK2) nas células MCF-7 tratadas com resveratrol (RV) por 24 horas na ausência e na presença de PEG-catalase..... **51**

**FIGURA 24.** Avaliação do potencial de membrana mitocondrial da célula MCF-7 tratada com diferentes concentrações de Resveratrol..... **52**

**FIGURA 25.** Avaliação do potencial de membrana mitocondrial da célula MCF-7 tratada com Resveratrol e ou PEG-catalase..... **53**

**FIGURA 26.** Atividade da caseína cinase 2 (CK2) nas células MCF-7 tratadas com TBB ou RV por 24 horas..... **54**

**FIGURA 27**. Viabilidade MCF-7 tratada com TBB..... **55**

**FIGURA 28.** Produção de EROs pelo TBB na linhagem celular MCF-7..... **56**

**FIGURA 29**. Viabilidade da MCF-7 tratada com NAC na ausência e presença de TBB..... **57**

**FIGURA 30**. Viabilidade da MCF-7 tratada com GSH na ausência e presença de TBB..... **58**

**FIGURA 31**. Viabilidade da MCF-7 tratada com Catalase na ausência e presença de TBB..... **59**

**FIGURA 32**. Viabilidade celular da MCF-7 tratada com TBB e PEG-catalase..... **60**

**FIGURA 33.** Atividade da caseína cinase 2 (CK2) nas células MCF-7 tratadas com TBB por 24 horas na ausência e na presença de PEG-catalase..... **61**

**FIGURA 34.** Avaliação do potencial de membrana mitocondrial da célula MCF-7 tratada com diferentes concentrações de TBB..... **62**

**FIGURA 35.** Avaliação do potencial de membrana mitocondrial da célula MCF-7 tratada com diferentes concentrações de TBB na presença ou ausência de PEG-catalase..... **63**

**FIGURA 36.** Mecanismo de ação proposto para o Resveratrol em células MCF-7 associando EROs e CK2..... **75**

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1.** Fontes dietéticas de resveratrol..... **15**

**TABELA 2**. Nível plasmático de resveratrol após o consumo de vinho tinto..... **17**

**TABELA 3.** Viabilidade oral, propriedades moleculares e propriedades ADMET do resveratrol..... **64**

**SUMÁRIO**


**1. INTRODUÇÃO..... 1**

**1.1. Câncer..... 2**

**1.2. Epidemiologia do Câncer..... 3**

**1.3. Câncer de mama..... 5**

**1.3.1 Estratégias terapêuticas Convencionais..... 6**

**1.4. Compostos bioativos e Câncer..... 7**

**1.4.1 Resveratrol..... 13**

**1.4.2 Efeitos biológicos do Resveratrol..... 18**

**1.4.3 Resveratrol e câncer..... 20**

**1.5 Caseína Cinase 2 e sua implicação no câncer..... 21**

**1.6 Espécies reativas de Oxigênio e Câncer..... 25**

**1.7 Pesquisa *in sílico* na descoberta de novos medicamentos..... 28**

**1.8 Justificativa..... 30**

**2 OBJETIVOS..... 31**

**2.1. Objetivo Geral..... 32**

**2.2. Objetivos Específicos..... 32**

**3 Material e Métodos..... 33**

**3.1. Reagentes..... 34**

**3.2 Manutenções da Cultura Celular..... 34**

**3.3. Ensaio de viabilidade celular..... 35**

**3.3.1.Tratamento..... 35**

**3.3.2.Ensaio de viabilidade por MTT..... 35**

**3.4. Mensuração da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs)..... 35**

**3.4.1.Tratamento para a mensuração do EROs..... 35**

**3.4.2 Ensaios de mensuração de EROS..... 36**

**3.5. Avaliação da viabilidade celular após tratamento com Resveratrol e TBB na presença de antioxidantes e enzimas antioxidantes..... 36**

**3.5.1.Tratamento para ensaio de viabilidade..... 36**

**3.5.2. Ensaio de viabilidade..... 36**

**3.6.Determinação da atividade da Caseína Cinase 2..... 37**

**3.6.1. Tratamento para dosagem da atividade da CK2..... 37**

**3.6.2. Obtenção dos extratado celulares para dosagem de atividade..... 37**

**3.6.3. Ensaio de atividade de CK2..... 37**

**3.7.Determinação do potencial de membrana mitocondrial (**$\Delta\Psi m$)..... **38**

**3.7.1.Tratamento para determinação do** $\Delta\Psi m$**..... 38**

**3.7.2.Ensaio para determinação do** $\Delta\Psi m$..... **38**

**3.8. Análise da Viabilidade oral e das propriedades moleculares e ADMET do resveratrol..... 39**

**3.9.Análise Estatística..... 39**

**4. RESULTADOS..... 40**

**4.1. Efeito do resveratrol na viabilidade da MCF-7..... 41**

**4.2. Mensuração da produção de EROs em MCF-7 tratada com Resveratrol..... 42**

**4.3. Avaliação efeito de antioxidantes sobre a viabilidade celular na MCF-7 tratada com Resveratrol..... 44**

**4.4. Efeito do Resveratrol sobre a atividade da CK2..... 50**

**4.5. Determinação do efeito do Resveratrol sobre o** $\Delta\Psi m$ **da MCF-7..... 51**

**4.6. Efeito do TBB na atividade da CK2 e a viabilidade da MCF-7..... 54**

**4.7. Efeito do TBB sobre a produção de EROs na MCF-7..... 56**

**4.8. Atividade da CK2 nas células MCF-7 tratadas com TBB e PEG-catalase..... 60**

**4.9. Mensuração do potencial de membrana mitocondrial da MCF-7 tratada com TBB..... 61**

**4.10. Análise da Viabilidade oral e das propriedades moleculares e ADMET do Resveratrol..... 63**

**5. DISCUSSÃO..... 65**

**6. CONCLUSÃO..... 73**

**7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 76**

# *1. Introdução*

# 1. Introdução

## 1.1 Câncer

Grande parte da nossa compreensão atual sobre o câncer baseia-se no princípio fundamental de que esta é uma doença caracterizada essencialmente de alterações genéticas, resultantes de uma expansão de clones de células, que se desenvolvem em uma aparente forma regulada por causa de mutações adquiridas somaticamente, além de se multiplicarem de um modo desregulado (Stratton *et al.*, 2011). Estas mutações somáticas incluem mutações pontuais, rearranjos, deleções, inserções, aumento do número de cópias de segmentos de DNA e alterações epigenéticas. Dependendo do tipo de câncer, o número de tais mutações pode variar de centenas a milhares sendo que mais de 100 mil diferentes mutações somáticas já foram encontradas em malignidades (Garay & Gray, 2012; Greaves & Maley, 2012).

O câncer é uma das doenças de mais difícil cura e tratamento. Ela apresenta uma considerável complexidade genética, com mais de 400 genes diferentes já implicados no seu desenvolvimento. Por sua vez, também exibe grande heterogeneidade inter e intratumoral (Duffy, 2013). A sequência de eventos que causa a transformação de uma célula normal em uma célula neoplásica chama-se carcinogênese. As células epiteliais progridem por uma série de lesões pré-malignas até um câncer invasivo emergir (Vincent & Gatenby, 2008). Esse processo pode levar vários anos até que a célula alterada prolifere e dê origem a um tumor maligno visível (Boehm & Hahn, 2005). Extensas observações experimentais demonstraram que a carcinogênese pode ser dividida em três etapas: iniciação, promoção e progressão. (**Figura 1**) (Vincent & Gatenby, 2008).

**Figura 1. Fases da carcinogênese adaptado de (Béliveau &Gingras, 2007).**

Na iniciação, considerado o primeiro estágio da carcinogênese, as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos ou carcinógenos 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). Todos eles têm a capacidade de promover alterações na composição e na estrutura básica da dupla fita de DNA provocando modificações em alguns de seus genes. Em geral, é necessária a exposição repetida a esses agentes para que haja o desenvolvimento de tumores malignos. Nessa etapa, as células se encontram geneticamente alteradas, porém ainda não é possível detectar o tumor clinicamente (Béliveau & Gingras, 2007; Freitas *et al*., 2010).

O segundo estágio de desenvolvimento do câncer é conhecido como promoção, no qual 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 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 & Gatenby, 2008).

A progressão é o terceiro e último estágio sendo caracterizado pelo alto grau de anaplasia, desequilíbrio entre proliferação/apoptose celular e autossuficiência (Vincent & Gatenby, 2008). Nesse caso ocorre multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, o câncer já está instalado e evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (INCA, 2009).

Durante a carcinogênese, as células cancerosas podem desenvolver um mecanismo angiogênico, que se caracteriza pela produção de pequenos vasos os quais serão responsáveis por trazerem nutrientes e oxigênio para o desenvolvimento do câncer. Após o desenvolvimento, as células de câncer entram nesses pequenos vasos, ou em vasos linfáticos migrando para outros órgãos, processo conhecido como metástase (Boehm & Hahn, 2005).

### 1.2. Epidemiologia do câncer

O Câncer não é uma doença nova, médicos do Egito antigo (3000 a.C.) já haviam registrado doenças que, dadas suas características, podem ser consideradas como câncer. Hipócrates (377 a.C.) também descreveu enfermidades que se assemelhavam aos cânceres de estômago, reto, mama, útero, pele e outros. No entanto, registros que designam a causa das mortes como câncer passaram a existir na Europa apenas a partir do século XVIII. Desde

então, observou-se o aumento constante nas taxas de mortalidade por câncer, que parecem acentuar-se após o século XIX, com a chegada da industrialização (WHO, 1998).

Globalmente hoje, o câncer é uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, nos quais o número de casos de câncer vem aumentando (Umar *et al*., 2012). Em 2012 ocorreram cerca de 14 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo com 8,2 milhões de mortes relacionadas à doença. Entre os tipos de câncer que causaram mais mortes no mundo neste período destacam-se o de pulmão (1,59 milhão de mortes), fígado (745000 mortes), estômago (723000 mortes), colorretal (694000 mortes), de mama (521000 mortes), esôfago (400000 mortes) (WHO, 2015).

Nos Estados Unidos, cinco milhões de pessoas desenvolvem câncer por ano e destes, um terço culminará em óbito como resultado direto ou indireto da doença. Porém, do total de mortes por câncer ocorridas em 2005 mais de 70% ocorreram em países de baixa ou média renda (Jemal *et al*., 2011). Além disso, estima-se que em 2020, a incidência mundial de câncer seja na ordem de 15 milhões, dos quais 60% desses novos casos deverão ocorrer em países em desenvolvimento (Jemal, *et al.*).

No Brasil foi estimada para o ano de 2014 a ocorrência de aproximadamente quinhentos e setenta e seis mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Excluindo os casos de câncer de pele não melanoma, acreditam-se na ocorrência de trezentos e noventa e cinco 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 tireoide para o sexo feminino (**Figura 2**) (INCA, 2014).

| Localização primária | casos | % |
|---|---|---|
| Próstata | 68.800 | 22,8% |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 16.400 | 5,4% |
| Cólon e Reto | 15.070 | 5,0% |
| Estômago | 12.870 | 4,3% |
| Cavidade Oral | 11.280 | 3,7% |
| Esôfago | 8.010 | 2,6% |
| Laringe | 6.870 | 2,3% |
| Bexiga | 6.750 | 2,2% |
| Leucemias | 5.050 | 1,7% |
| Sistema Nervoso Central | 4.960 | 1,6% |

| Localização primária | casos | % |
|---|---|---|
| Mama Feminina | 57.120 | 20,8% |
| Cólon e Reto | 17.530 | 6,4% |
| Colo do Útero | 15.590 | 5,7% |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 10.930 | 4,0% |
| Glândula Tireoide | 8.050 | 2,9% |
| Estômago | 7.520 | 2,7% |
| Corpo do Útero | 5.900 | 2,2% |
| Ovário | 5.680 | 2,1% |
| Linfoma não Hodgkin | 4.850 | 1,8% |
| Leucemias | 4.320 | 1,6% |

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

**Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2015).**

### 1.3. Câncer de mama

Em todo o mundo, o câncer de mama é ao mesmo tempo o mais comum e o mais letal entre as mulheres. Sua incidência é maior na Europa e nas Américas, embora os casos estejam em ascensão na África e na Ásia (**Figura 3**) e como na maioria dos cânceres, vem sendo observado um expressivo aumento em países em desenvolvimento, como o Brasil e a China (Servick, 2014.).

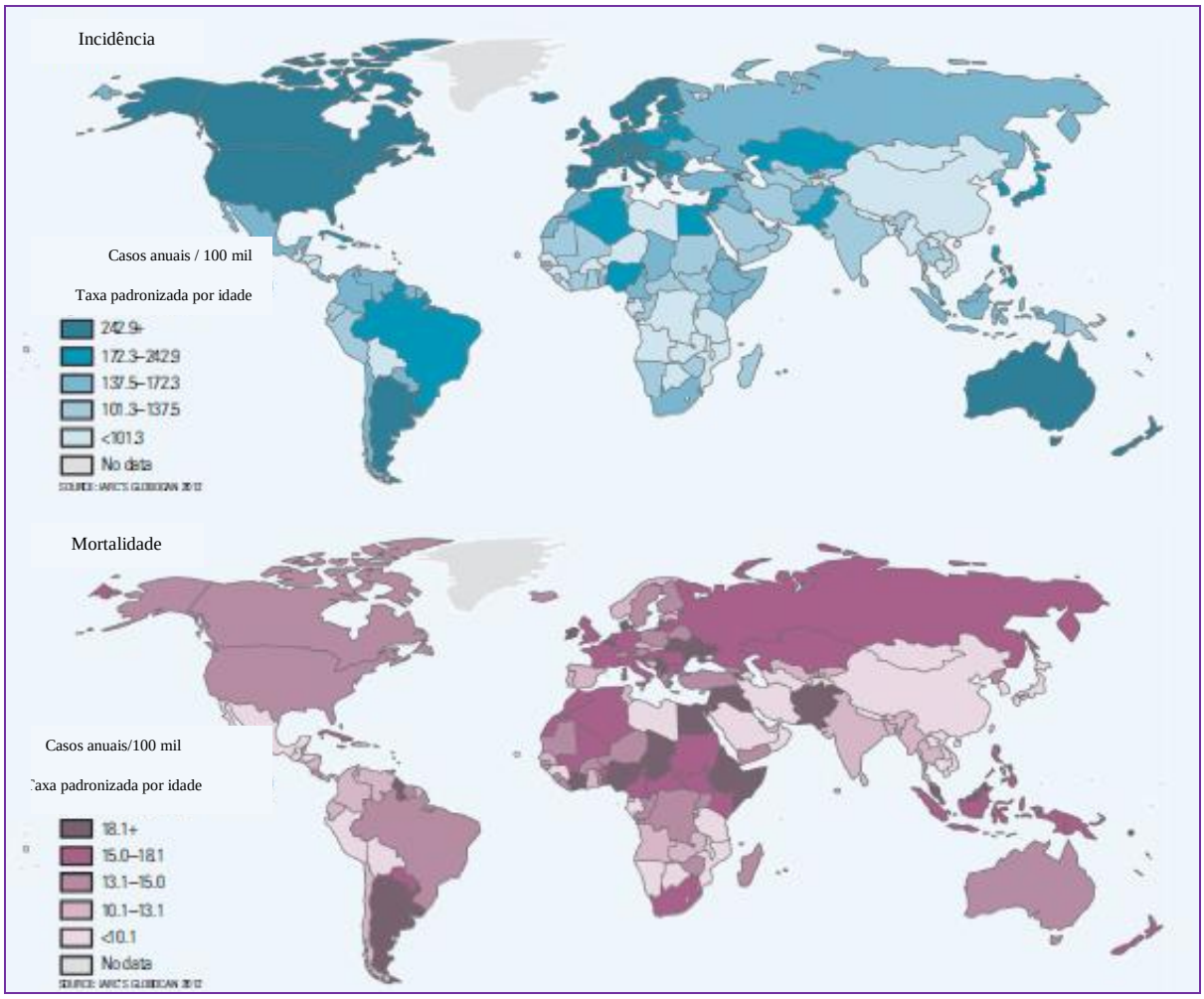


**Figura 3. Distribuição de incidência e mortalidade por câncer de mama no mundo (Servick K., 2014).**

A etiologia do câncer de mama é multifatorial incluindo interações entre genética e fatores comportamentais, bem como a pós-menopausa, exposição ambiental e a altas doses de radiação ionizante (Mahon *et al.*, 2006). A contribuição dos fatores externos na gênese da doença foi 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

subsequentes. Esta hipótese reforça que hábito de fumar, ingestão de bebidas alcoólicas, paridade e fatores dietéticos são fatores relevantes na carcinogênese mamária (Ziegler, *et al.*, 1993).

### 1.3.1. Estratégias terapêuticas convencionais

Atualmente, o tratamento do câncer de mama é realizado por um longo período, geralmente anos e envolve cirurgia (mastectomia total ou parcial), quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia (Muller, *et al*., 2004). A quimioterapia para o câncer de mama é feita geralmente por uma combinação de drogas, injetadas por via endovenosa em intervalos de três semanas. As drogas citotóxicas agem contra as células cancerosas de duas formas principais: matando as células de câncer e ou interferindo na divisão celular e consequentemente na reprodução celular. Desta forma, tais drogas erradicam ou controlam o crescimento celular (McCoy, *et al.*, 2003).

A quimioterapia neoadjuvante é a primeira modalidade de tratamento se o tumor primário for grande (acima de 3 cm), localmente avançado, ou se o câncer for um tipo inflamatório (Parry, *et al*., 2005). Após a quimioterapia, ocorrendo uma redução suficiente no tamanho do tumor, faz-se em seguida a cirurgia conservadora e a radioterapia. A quimioterapia neoadjuvante não melhora a sobrevida da paciente, mas permite que o tumor diminua, possivelmente resultando em uma cirurgia de conservação da mama, o que parece seguro e eficaz podendo melhorar a qualidade de vida (Stebbing & Gaya, 2001).

O tamoxifeno é o fármaco mais utilizado para o tratamento convencional endócrino do câncer de mama. Ele vem sendo empregado por mais de 30 anos e sua dose é de um comprimido por dia durante cinco anos. Ele funciona parcialmente por bloquear os receptores de estrogênio, evitando sua circulação e consequentemente impedindo o crescimento de células cancerosas da mama. É o único tratamento endócrino adequado para mulheres pré-menopáusicas (Harmer, 2008).

Os inibidores da enzima aromatase são outra classe de fármacos utilizados no tratamento de câncer de mama estrogênio positivo, porém são eficazes apenas em mulheres no período pós-menopausa. Eles diminuem o estrogênio circulante de forma a desacelerar o crescimento das células cancerosas sensíveis ao estrogênio, bloqueando a ação da enzima aromatase (Howells, *et al.*, 2005). O Anastrozol (Arimidex ® [AstraZeneca]), Exemestano, (Aromasin ® [Pharmacia]) e Letrozole (Femara ® [Novartis]) são inibidores de aromatase que, em ensaios clínicos, demonstraram ser mais eficazes e melhor tolerados do que o

tamoxifeno (Izeradjene, *et al.*, 2005). Contudo, destaca-se que a quimioterapia, hoje realizada, não é seletiva para as células malignas significando que, quando uma medicação citotóxica é introduzida no organismo ela atuará de forma a impedir a divisão das células cancerosas, assim como das células normais, as quais estão se proliferando como parte do processo fisiológico normal, causando alguns efeitos secundários indesejáveis. Dentre esses efeitos destacam-se mielossupressão, alopecia, náuseas, vômito, diarreia, estomatite, eutropenia entre outros (McCoy *et al.*, 2003).

Além dos efeitos secundários, a sensibilidade ou resistência das células tumorais a drogas existentes também é um fator que influencia no resultado do tratamento dos pacientes com câncer de mama, assim, existe uma procura constante pelo desenvolvimento de novos medicamentos (Muller *et al*., 2004; Coseri, 2009). Além da terapia convencional, nos últimos trinta anos, os compostos bioativos de alimentos têm recebido atenção especial por serem novos possíveis agentes terapêuticos. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares relacionados aos efeitos anticâncer dos compostos bioativos ainda são pouco conhecidos sendo sua utilização na prática clínica restrita. (Newman, 2008).

### 1.4. Compostos bioativos e câncer

Desde o início da história da medicina, existem relatos de associação entre o consumo de determinados alimentos e a saúde. Hipócrates, o pai da medicina moderna, a cerca de 2,5 mil anos atrás, disse: "Deixe o alimento ser seu remédio e o remédio ser teu alimento”. Galen de Pegamon (129-199 D.C), um médico grego seguidor dos ensinamentos de Hipócrates, costumava prescrever vários vegetais para o tratamento do câncer, contudo, apesar do grande interesse na dieta como um modo para prevenir e curar o câncer, apenas no final do século XX os mecanismos de ação dos alimentos começaram a ser desvendados (Karpozilos *et al.*, 2004).

Há mais de uma década já é conhecido que as atividades biológicas de alguns vegetais são atribuídas principalmente às suas substâncias químicas, principalmente os compostos polifenólicos conhecidas como compostos bioativos. Essas substâncias são geralmente são produzidas em quantidades relativamente pequenas, servindo para funções específicas em um determinado estágio do desenvolvimento da planta (Bentley, 1990). São conhecidas por possuírem efeitos protetores contra patógenos ambientais sendo produzidos em situação de estresse, contudo, também servem para atrair polinizadores no caso de pigmentos como as antocianinas (Bentley, 1990).

Essas substâncias bioativas, igualmente conhecidas como fitoquímicos, são encontradas em diversos alimentos do reino vegetal (**Figura 4**). Podem pertencer a diferentes classes estruturais, estando divididas em dois grandes grupos: proteínas antimicrobianas e compostos não proteicos, como alcaloides, quinonas, óleos essenciais, polifenóis e terpenos (Surh *et al.*, 2003; Samy & Gopalakrishnakone, 2010).

Os fitoquímicos são capazes de atuar no metabolismo e na fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos para a saúde. Considerados como ingredientes não nutricionais e já reconhecidos por apresentarem resposta ao estresse oxidativo, os compostos bioativos também já foram descritos como capazes de reduzir a incidência de algumas doenças crônicas como o câncer, sendo assim chamados de quimiopreventivos (Sgarbieri & Pacheco, 1999; Patil *et al*., 2009).

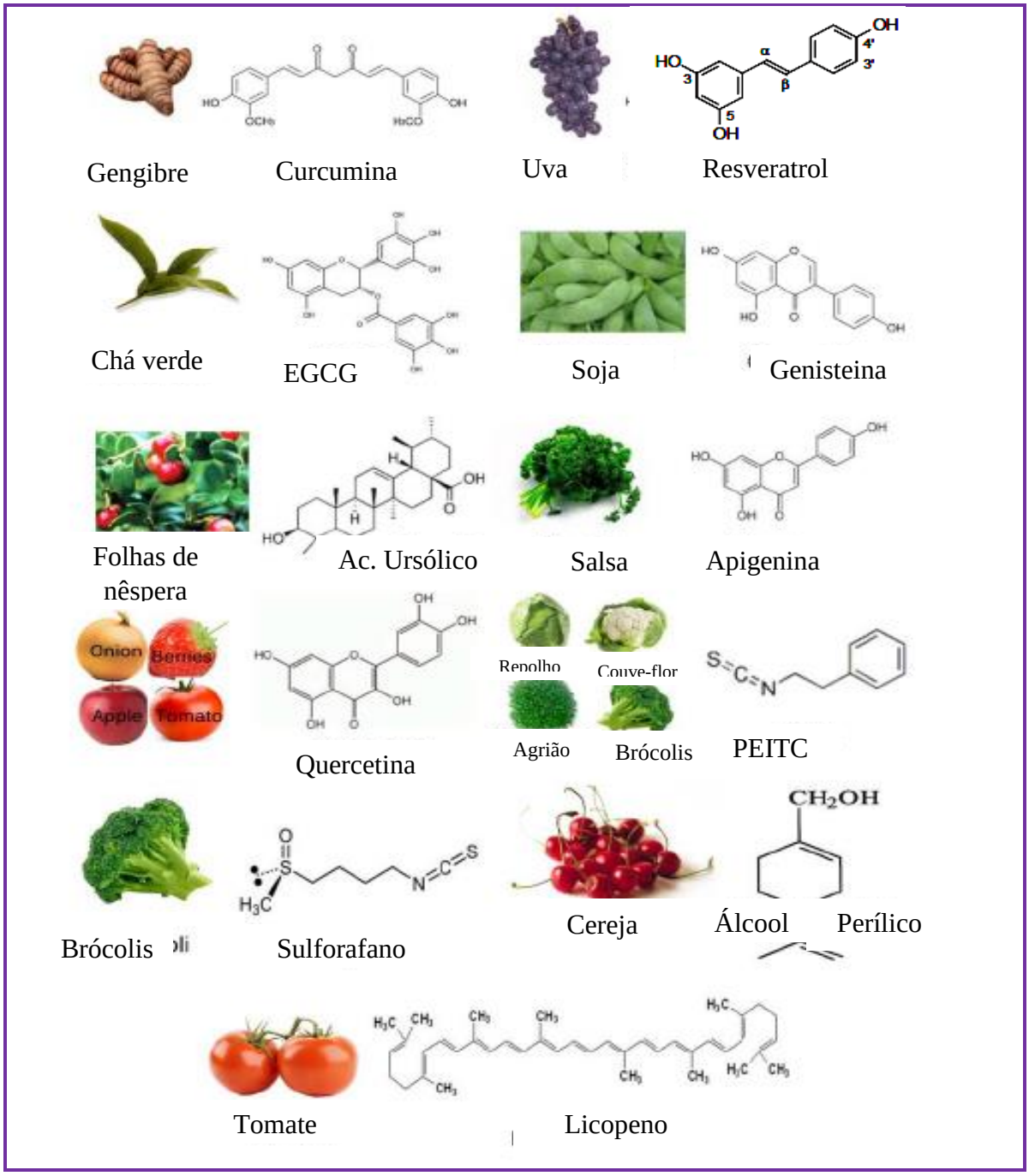


**Figura 4: Fitoquímicos e seus compostos bioativos adaptado de (Pratheeshkuma, 2012).**

Entre os fitoquímicos cujas ações quimiopreventivas já foram descritas em diferentes tipos de câncer estão a genisteina, alicina, licopeno, capsaicina, curcumina, 6-gingerol, ácido elágico, catequinas, resveratrol, entre outros. Além disso, esses agentes quimiopreventivos também apresentam potencial para serem usados como coadjuvantes às terapias atuais (Thambi, 2004).

Nas células iniciadas por agentes carcinogênicos, durante a etapa de iniciação, os compostos bioativos atuam bloqueando as enzimas de fase I e II (por exemplo, citocromo P450, glucoronidases e sulfotransferases), reparando o DNA e atuando como "scavenging" de espécies reativas de oxigênio (Wattenberg, 1990). Na etapa de promoção as ações desses compostos estão principalmente ligadas a ações que culminam em apoptose das células além de incluir a parada do ciclo celular e inibição de histonas diacetiladas (Khan et al., 2007; Thambi & Aggarwa, 2004). Finalmente, durante a progressão, onde já são observadas anormalidades cromossômicas, os compostos bioativos • alteram a expressão de oncogênes supressores de tumor, inibem angiogénese e metaloproteinase de matriz (MMP). Desta forma resumidamente, os mecanismos de ação desses compostos incluem a inibição de vias de sinalização, proliferação e angiogênese de células cancerosas. Também são capazes de induzir apoptose, suprimindo, por exemplo, expressão de proteínas anti-apoptóticas (**Figura 5**) (Thambi & Aggarwa, 2004).

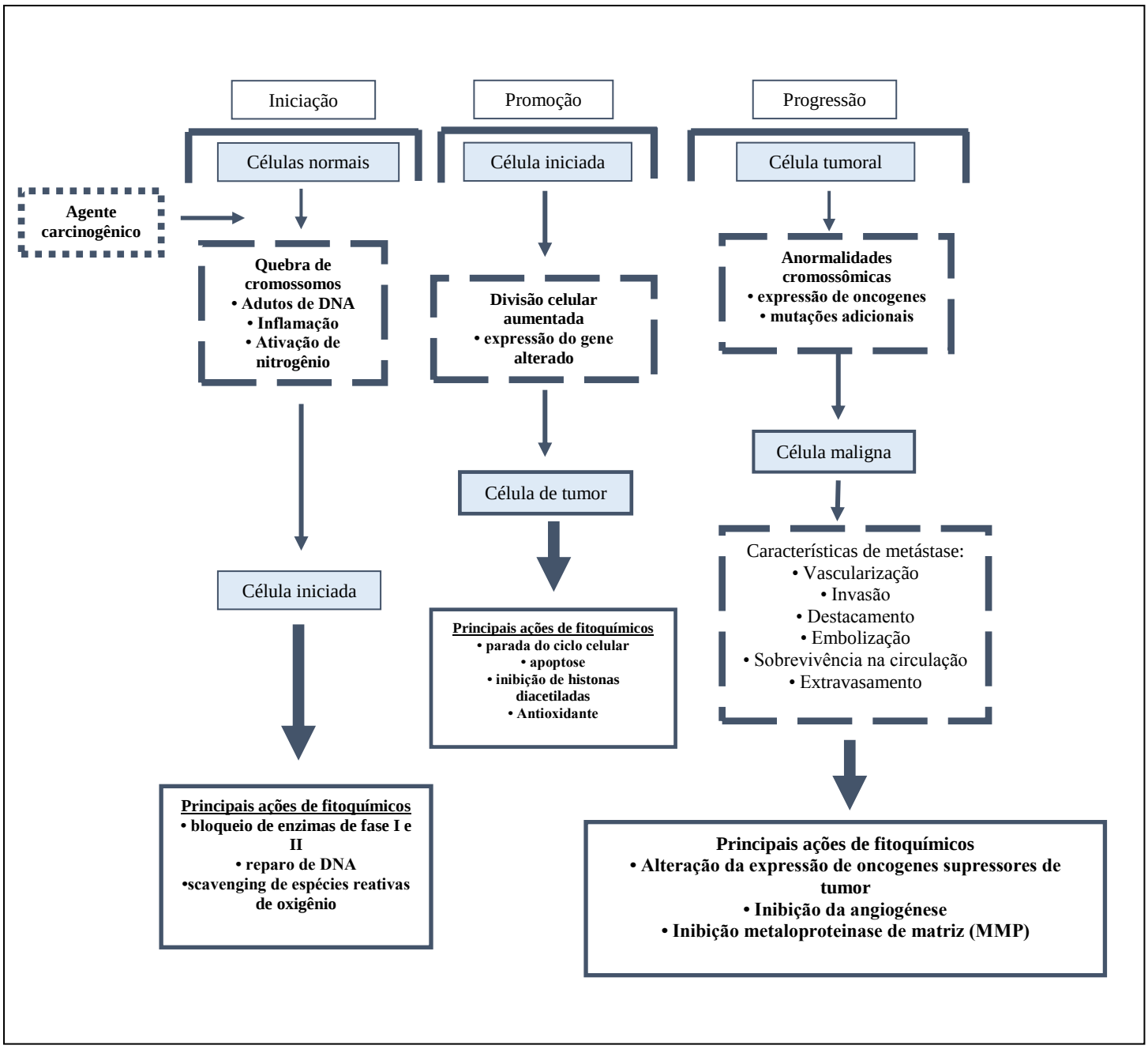


**Figura 5: Vias de sinalização onde se encontram as principais ações dos fitoquímicos durante a carcinogênese adaptado de (Mehta *et al.*, 2010).**

Como mencionado anteriormente e sugerido na figura 5, os compostos bioativos podem atuar tanto como quimiopreventivos ou como quimioterápicos. Eles podem prevenir o aparecimento e desenvolvimento do câncer e, em pacientes já com o câncer instalado e podem ser empregados em combinação com agentes quimioterapêuticos convencionais. Igualmente, devem-se considerar seus benefícios na pós-terapia, juntamente com a intervenção farmacológica de forma a suprimir ou inibir possíveis recorrências e quimioresistência (**Figura 6**) (Pratheeshkumar *et al*., 2012; Casanova *et al.*, 2012).

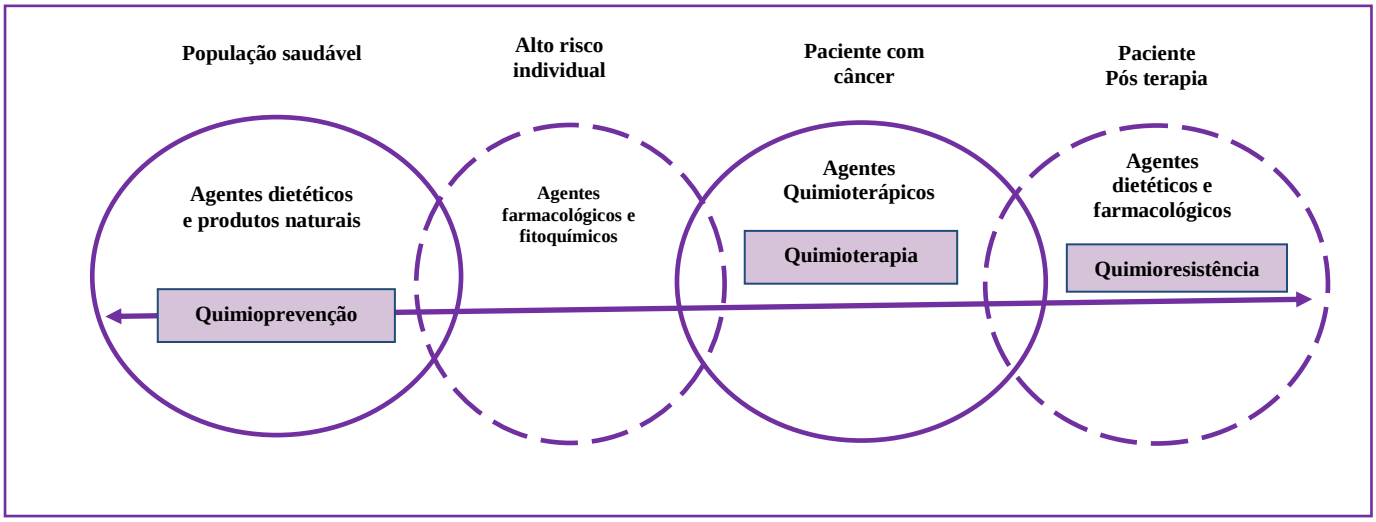


**Figura 6: Diagrama esquemático da capacidade de resposta seletiva da população saudável, bem como pacientes com câncer a agentes quimiopreventivos adaptado de (Mehta *et al*., 2010).**

A linhagem celular MCF-7, positiva para receptores de estrogênio, foi em 1970, retirada de uma efusão pleural de uma paciente com câncer de mama metastático e desde então empregada como modelo celular em pesquisas com câncer de mama *in vitro* (Simstein, *et al.*, 2003). Ela igualmente tem sido utilizada em estudos com compostos bioativos, já sendo observado, por exemplo, que o licopeno diminuiu seu crescimento por meio da inibição da progressão do ciclo celular e que a genisteina, principal isoflavona da soja, foi capaz de regular a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (King-Batoon, et al., 2008; Ferenc, et al., 2010). Além disto, pesquisadores demonstraram inibição do crescimento de células MCF-7 após tratamento com o ácido epigalocatequina-3-galato e regulação da proteína p53 levando a célula a apoptose quando estas foram tratadas com resveratrol (Huang, et al., 2008; Ferraz *et al*, 2012). Entretanto, muito ainda precisa ser elucidado com relação à MCF-7, compostos bioativos e seus mecanismos de ação.

1.4.1. Resveratrol

O resveratrol é um polifenólico , encontrado naturalmente em mais de 70 espécies de plantas, uvas, oleaginosas e vinhos tintos (Miller & Rice-Evans, 1995). Ele foi isolado pela primeira vez em 1940 na raiz da *Hellebore branca* (*Veratrunm grandiflorum*) e em 1963, foi identificado como componente ativo da raiz seca de *Polygonum cuspidatum*, também conhecida como Ko-jo-kon, que, no Japão é usada na medicina tradicional contra dermatites supurativas, gonorreia e hiperlipemia (Soleas, *et al.*, 1997a). Nas uvas (*Vitis vinifera*), o resveratrol foi detectado pela primeira vez em 1976 e em 1992 no vinho tinto (Soleas *et al.*, 1997a).

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 (**Figura 7**). O isômero trans é encontrado em maiores quantidades e é a forma biologicamente ativa, entretanto este isômero é fotossensível, podendo ser convertido na presença de luz, em cis-resveratrol, perdendo assim a sua atividade biológica (Latruffe, *et al.*, 2002; Signorelli & Ghidoni, 2005). Além disso, existem derivados glicosilados e sulfatados do resveratrol que também possuem atividade biológica importante em uma variedade de modelos experimentais (Jang *et al*., 1997).

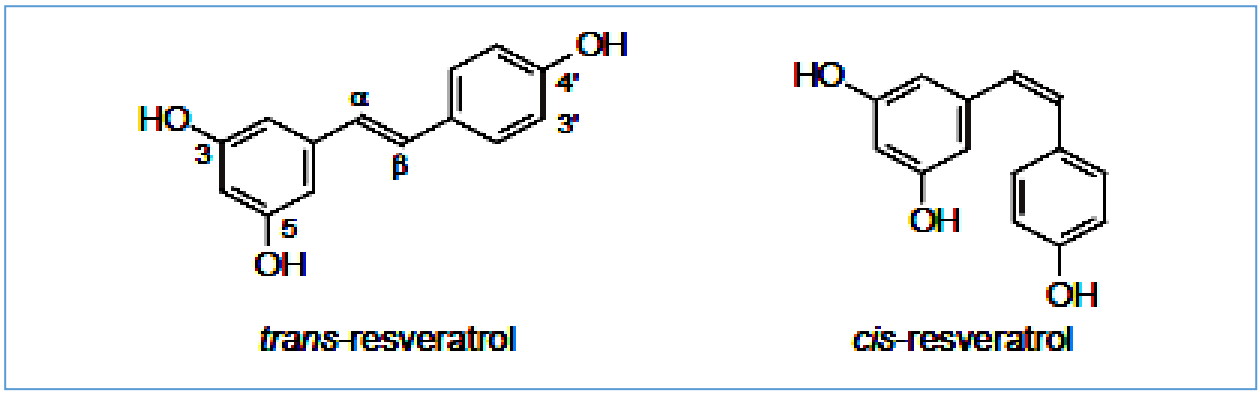


**Figura 7- Estrutura química do resveratrol. adaptado de (Signorelli & Ghidoni, (2005).**

Nas plantas ele é sintetizado em resposta a condições de estresse, sendo considerada uma das moléculas mais importantes da fisiologia vegetal. Neste contexto, seu papel parece ser a inibição da progressão da infecção fúngica por *Botryfis cinerea* ou por fatores abióticos, como radiação ultravioleta. Por esta razão, este composto faz parte de um grupo denominado fitoalexina, uma classe de antibióticos de origem vegetal (Soleas, *et al.*, 1997b).

Uma alta infestação fúngica, no entanto, não é vantajosa com relação à concentração do resveratrol. Foi constatado que uvas com10% de infecção por *Botrytis cinerea* produz um vinho contendo altos níveis de resveratrol, sem qualquer efeito sobre sua qualidade. Por outro lado, quando a infecção atinge 40% da uva, os vinhos produzidos apresentaram teores muito reduzidos de resveratrol, Isso acontece porque o resveratrol formado em uvas com grande infestação fúngica pode ser degradado por enzimas extracelulares do fungo (Jeand *et al*, 1991).

Nas uvas, o resveratrol é exclusivamente sintetizado na epiderme foliar e na casca, não sendo sintetizado na polpa (Goswami & Das, 2009). As uvas rosadas frescas contêm na casca 50-100 mg de resveratrol por grama, o que corresponde 5 a 10% da sua biomassa (Goswami & Das, 2009). Além das uvas e do vinho tinto, o trans-resveratrol também já foi detectado em amendoins, mirtilo, pistache, entre outros vegetais (**Tabela 1**) (Baur & Sinclair, 2006).

| FONTE | TRANS-RESVERATROL |
|---|---|
| **Vinho tinto** | 0,1-14,4 mg/L |
| **Vinho branco** | < 0,1-2,1 mg/L |
| **Uvas** | 0,16-3,54 µg/g |
| **Cascas de uvas secas** | 24,06 µg/g |
| **Suco de uvas tinta** | 0,5 mg/L |
| **Suco de uvas brancas** | 0,05 mg/L |
| **Suco de cranberry** | 0,2 mg/L |
| **Mirtilo** | 32 ng/g |
| **Amendoim** | 0,2-1,92 µg/g |
| **Amendoim torrado** | 0,055 µg/g |
| **Manteiga de amendoim 100% natural** | 0,65 µg/g |
| **Pistache** | 0,09-1,67 µg/g |
| **Lúpulo** | 0,5-1 µg/g |

**Tabela 1: Fontes dietéticas de resveratrol. Adaptado de (Baur & Sinclair, 2006).**

No vinho tinto, a concentração de resveratrol pode variar bastante, pois a quantidade sintetizada depende do cultivar da uva, origem geográfica, tipo de vinificação, infecção por *Botryfis* e práticas enológicas (Gusman, *et al.*, 2001). Além disso, o progresso na metodologia de análise provavelmente explica os valores mais elevados encontrados mais recentemente (Fremont, *et al.*, 2000). Cabe ressaltar que nos vinhos suíços encontra-se pouco resveratrol, entretanto no Pinot Noir Australiano é possível verificar até 13 mg / L já em vinhos tintos brasileiros, a quantidade de resveratrol pode chegar a 18 mg/ L (Bertelli & Das, 2009).

Nos alimentos o resveratrol geralmente pode ser encontrado em sua forma conjugada conhecida como forma glicosilada ou *piceid* (GLCRES, resveratrol-3-O-h-glicosídeo) (**Figura 8**) ou na forma livre chamada de aglicona (Signorelli & Ghidoni, 2005). As células intestinais são capazes de absorver somente a forma aglicona e para isso o processo de absorção em alguns casos requer enzimas glicosidases que, transforme a forma conjugada em aglicona. Por isso, a quantidade relativa da forma aglicona e glicosilada do resveratrol afeta a taxa de absorção deste composto. Além disso, os níveis de expressão e atividade das glicosidases intestinais podem explicar as diferenças na taxa de absorção observadas em humanos e ratos (Day *et al.*, 1998). Em humanos, sua absorção é em torno de 75% e ocorre principalmente por difusão transepitelial. Sua conversão em conjugados hidrofílicos facilita a

entrada na corrente sanguínea e consequentemente a sua excreção. Com o tempo, a concentração plasmática diminui, mas um pico secundário aparece após a liberação da bile devido à recirculação enteroepática (Signorelli & Ghidoni, 2005).

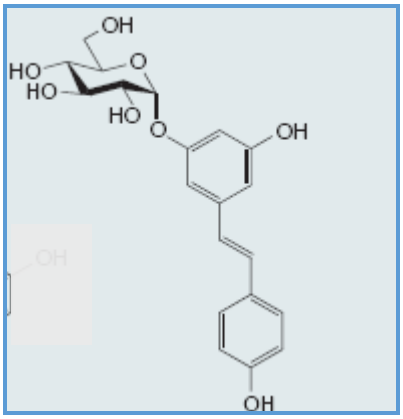


**Figura 8: Estrutura química do resveratrol glicosilado. Adaptado de (Baur & Sinclair, 2006).**

O transporte de resveratrol já foi estudado na linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2, o qual pode ocorrer tanto por difusão passiva como por transporte ativo, sendo capaz de ligar-se a albumina para em seguida ser distribuído no organismo (Jannin, *et al.*, 2004; Lancon, *et al.*, 2004). Resultados demonstraram que pouco após a ingestão oral, o resveratrol pode ser encontrado no cólon, enquanto que, para a detecção nos outros tecidos foram necessárias algumas horas (Vitrac, *et al.*, 2003). Os principais tecidos alvos do resveratrol no organismo são o fígado, os rins, o coração, os ovários, os pulmões e o cérebro sendo que no fígado é acumulado até uma concentração comparável àquela que exerce efeitos biológicos *in vitro* (Vitrac *et al*., 2003).

Dados experimentais de farmacocinética, realizados tanto em modelos animais como em humanos, revelaram que o resveratrol parece ser rapidamente metabolizado pelo organismo, apresentando uma meia-vida curta (~8-14 min) e baixa biodisponibilidade. Outros estudos já demonstraram que seus metabólitos podem ser detectados no plasma entre o período de 12-72 h após a administração. Destaca-se o fato de que 3 porções de vinho tinto (cerca de 450 ml) são suficientes para atingir níveis plasmáticos de trans-resveratrol livre em torno de 100 nM-1 uM (**Tabela 2**) (Pervaiz & Holme, 2009; Bertelli *et al.*, 2009).

| | Níveis plasmáticos de resveratrol | Referência |
|---|---|---|
| Ratos (4ml/15dias) | 100 nM-1 µM | Bertelli *et al.*, 1996 |
| Humano consumo crônico (300 ml vinho tinto/ 15 dias) | 1,2 µM | Pignatelli *et al.* 2006 |
| Humano consumo agudo (3 vezes (150ml) em duas semanas) | 100 nM | Spaak *et al.* 2004 |

**Tabela 2: Nível plasmático de resveratrol após o consumo de vinho tinto adaptado de (Bertelli *et al*., 2009).**

Sua excreção total na urina e nas fezes, após a administração oral em humanos, foi relatada ser de 71 a 98%, mostrando ser dependente da sua concentração plasmática, mas independente da forma aglicona ou glicosilada (Amri *et al*., 2012). Contudo, a taxa de excreção não apresenta relação direta com a quantidade consumida sugerindo que, embora pequenas quantidades de resveratrol sejam rapidamente metabolizadas e eliminadas, este composto pode ser retido e acumulado nos tecidos, tornando-se potencialmente disponível para captação celular e sinalização intracelular (Meng *et al*., 2004).

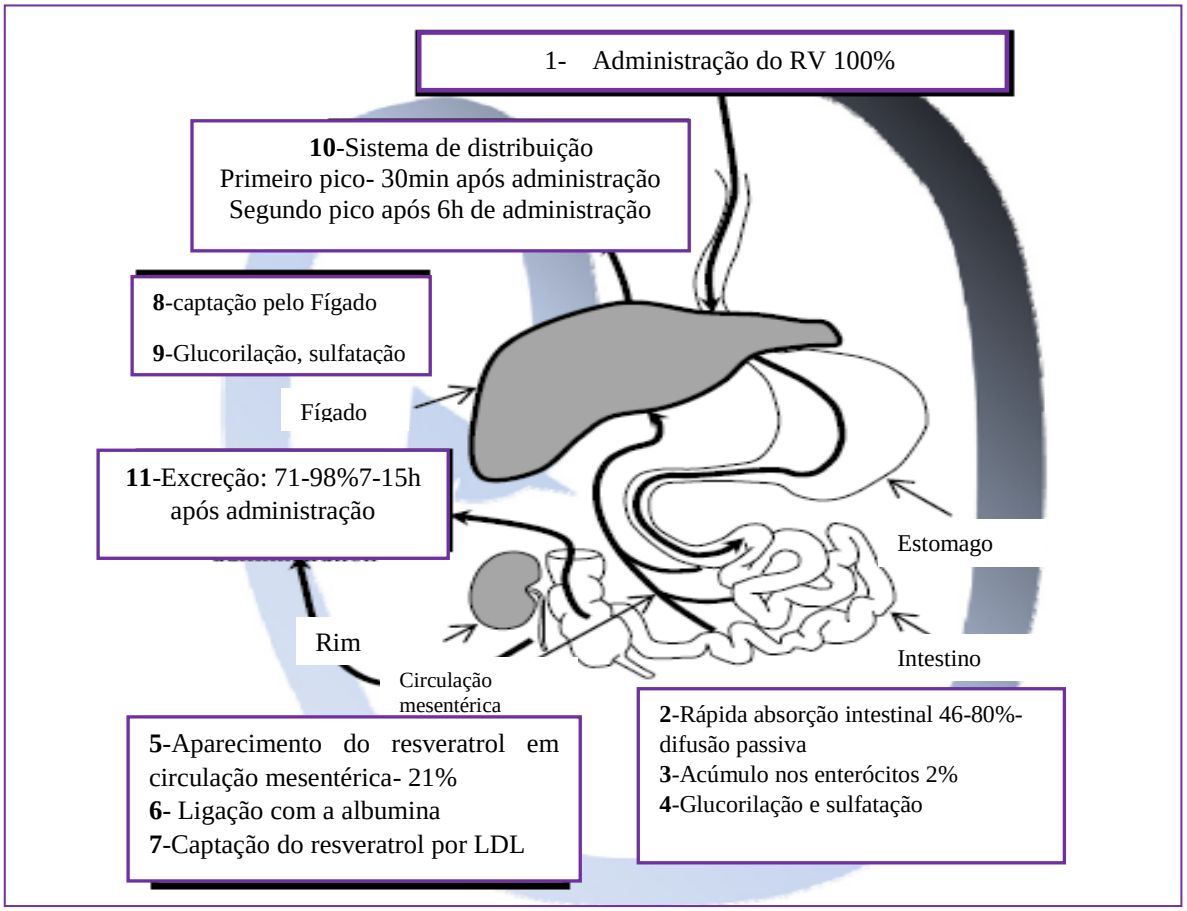


**Figura 9: Ilustração esquemática do metabolismo do resveratrol adaptado de (Amri, 2012).**

### 1.4.2. **Efeitos biológicos do resveratrol**

Na França, no início dos anos 70, estudos epidemiológicos revelaram uma correlação inversa entre o consumo de vinho tinto e mortalidade por doenças cardiovasculares. Essa discussão iniciou-se uma vez que os franceses têm cerca de 40% menos incidência de infarto do que o restante dos europeus, apesar de terem uma dieta tradicionalmente rica em gordura saturada e vinho tinto (Fremont *et al.*, 2000). Esse fenômeno, denominado Paradoxo Francês, foi resolvido com a identificação de componentes do vinho tinto, entre eles o resveratrol (Fremont *et al*., 2000).

Atualmente, sabe-se que seu efeito cardioprotetor envolve uma variedade de mecanismos moleculares. Em parte, isso se deve a sua alta capacidade antioxidante, que atenua os efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROs) no organismo (Fabris, *et al.*, 2008). Tal propriedade foi associada principalmente com a estrutura química do resveratrol onde, os grupamentos hidroxilas de seus anéis fenólicos agem como doadores de elétrons. Consequentemente são responsáveis pela capacidade de neutralizar e sequestrar o radical hidroxila e o ânion superóxido. Como resultado deste efeito, o resveratrol previne peroxidação dos fosfolipídios de membrana, oxidação proteica, danos ao DNA e, potencialmente, a formação de placas de ateroma (Leonard, *et al.*, 2003; Lopez-Velez, *et al.*, 2003; Mokni, *et al.*, 2007).

Outra propriedade do composto hoje conhecida, a antinflamatória, ocorre devido a sua capacidade de inibir a transcrição e a atividade de ciclooxigenase (COX), em especial a COX-2, reduzindo o metabolismo do ácido araquidônico e consequentemente a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias (Das & Das, 2007). Portanto, essa sua característica confere ao composto a capacidade de inibir a agregação plaquetária tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Szewczuk, *et al.*, 2004; Szewczuk & Penning, 2004; Olas & Wachowicz, 2005). Além disso, estudos demonstraram que, o resveratrol pode provocar vasodilatação através do aumento da produção de óxido nítrico. Desta forma, esses fatores conferem ao composto a capacidade de diminuir a incidência de doenças cardiovasculares (Li, *et al.*, 2006).

Após estas constatações, vários estudos diferentes associaram o resveratrol com outras propriedades benéficas à saúde. Esta busca por outras peculiaridades da fitoalexina em questão apontou que, o efeito do consumo baixo a moderado de vinho tinto, estava igualmente relacionado com a redução de doenças neurológicas pertinentes à idade (incluindo degeneração macular, acidente vascular cerebral e déficits cognitivos, com ou sem demência) (Granzotto & Zatta, 2014).

Estudos comprovaram que este fato estava diretamente ligado com a presença resveratrol no vinho tinto. Apesar disso, seu efeito parece estar além da sua capacidade antioxidante e de suas propriedades antinflamatórias conhecidas, uma vez que já foi demonstrada que tal composto pode aumentar a eliminação de beta-amiloide, uma proteína bastante relacionada com a doença de Alzheimer (Granzotto & Zatta, 2014).

O resveratrol também já foi estudado por sua ação no diabetes. O tratamento com o composto reduziu significativamente a concentração de glicose no sangue em animais diabéticos tipo 1 tratados com streptozocina (STZ), por meio de vias dependentes e independentes de insulina. (Turan et *al*., 2012).

No diabetes tipo 2, do mesmo modo, o resveratrol mostrou habilidade em aumentar a sensibilidade à insulina em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica e que manifestaram resistência à insulina. Além disso, em experimentos *in vitro*, ele foi capaz de estimular a captação de glicose na ausência de insulina (Su *et al*., 2006; Szkudelski & Szkudelska, 2011).

Adicionalmente, o resveratrol foi capaz de reduzir de maneira dose-dependente a secreção de leptina em adipócitos isolados de ratos, sugerindo desta forma que este composto é capaz de afetar a função endócrina dos adipócitos (Szewczuk & Penning, 2004).

Evidências experimentais já atribuíram ao resveratrol outra ação, o de aumento da expectativa de vida. Em leveduras foi demostrado que doses elevadas ele seria capaz de aumentar em mais de 50% o tempo de vida desses organismos unicelulares. O mecanismo principal atribuído refere-se à regulação das sirtuinas conhecidas como NADH deacetilases (Jang, *et al.*, 1997). Além disso, também já se observou efeito analgésico, protetor da audição, da medula espinhal, fígado, pulmões, intestino, colón, além de diminuir injúria renal e inibir a colonização por *Helicobacter pylori* no estômago (Giovannini, *et al.*, 2001; Granados-Soto, *et al.*, 2002; Lugarini, *et al.*, 2002; Seidman, *et al.*, 2003; Lee, *et al.*, 2008), (Subbaramaiah, *et al.*, 1998; Fulgenzi, *et al.*, 2001; McClintock, *et al.*, 2002; Korolkiewicz, *et al.*, 2003; Yang & Piao, 2003).

Em 1997, foi relatado pela primeira vez que o resveratrol preveniu contra o câncer de mama e de pele, sugerindo, portanto, que este composto poderia ser uma ferramenta terapêutica promissora a ser testada (Baur & Sinclair, 2006). Após o exposto, implicações distintas estão relacionadas ao resveratrol**,** como proteção contra doenças neurológicas, diabetes, câncer, entre outros (**Figura 10**) (Markus & Morris, 2008; Saiko, *et al.*, 2008; Goswami & Das, 2009); Fremont, 2000).

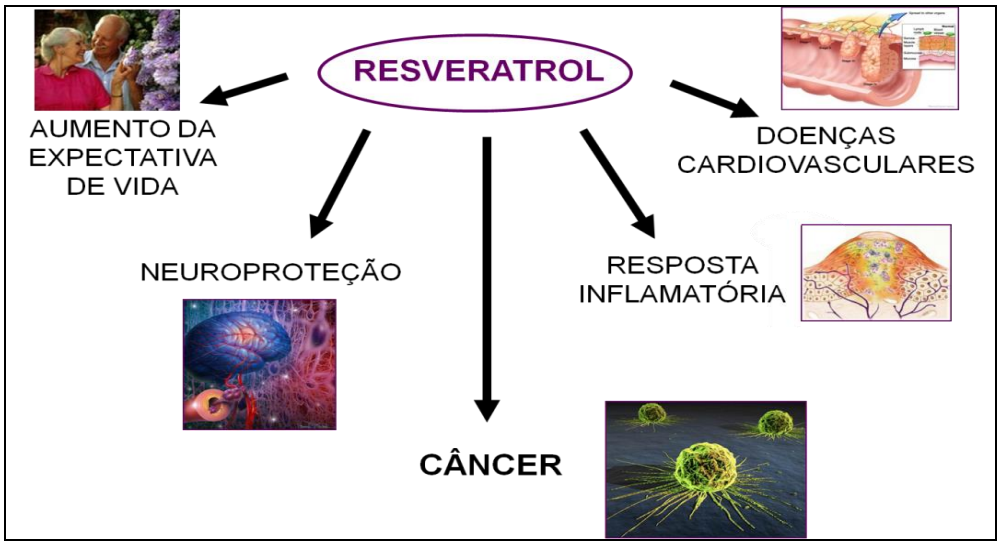


**Figura 10. Efeitos benéficos do resveratrol adaptado de (Béliveau &Gingras, 2007).**

### 1.4.3. Resveratrol e câncer

Os agentes antitumorais são capazes de suprimir a ativação metabólica pró-carcinogênica, prejudicando efeitos combinatórios responsáveis pela mutagênese e mitogênese. Eles interagem com alvos celulares (DNA, proteínas), inibindo o desenvolvimento do tumor nos três diferentes estágios da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão e consequente indução da célula tumoral a morte (Jang *et al.*, 1997; Signorelli & Ghidoni, 2005). Entre as moléculas derivadas de alimentos com capacidade de inibir ou reverter esses processos celulares, o resveratrol é particularmente interessante pois, atua em uma ampla gama de mediadores intracelulares envolvidos no desenvolvimento de tumores malignos (Jang *et al*., 1997).

Já foi demostrado que esta fitoalexina inibe o crescimento de várias linhagens de células tumorais humanas, incluindo células de leucemia promielocítica, células de câncer de cólon, pulmão e mama (Aggarwal *et al*., 2004). O mesmo efeito já foi observado em câncer de próstata, estômago, esôfago e pâncreas (Baur & Sinclair, 2006).

Somando-se a esses estudos, observou-se que a administração de 625 mg de resveratrol/kg de ração durante 28 semanas, pode suprimir a progressão do câncer de próstata em camundongos (Harper, *et al.*, 2007). Além disso, quando injetado intraperitonealmente (2,5 ou 10 mg/kg), o resveratrol reduziu o crescimento de carcinoma de pulmão metastático também em camundongos. Em ratos, 1 g/kg de resveratrol na dieta suprimiu o câncer de mama induzido por DMBA (*7,12-dimethylbenz(a)anthracene*) (Kimura & Okuda, 2001; Athar *et al*., 2007; Whitsett *et al.* 2006).

Contudo, apesar de existirem dados disponíveis sobre o efeito anticarcinogênico do resveratrol tanto *in vitro* como *in vivo*, poucos ensaios clínicos têm sido conduzidos. Porém, pesquisadores já observaram em pacientes leucêmicos que o resveratrol reduziu recidiva naqueles que foram submetidos ao transplante de medula óssea (Cucciolla, *et al.*, 2007).

Seguindo a constatação de que o resveratrol reduz a viabilidade em células de câncer de diversas linhagens, os mecanismos envolvidos sobre sua ação quimioterapêutica vêm sendo investigados ao longo dos anos. Desta forma, atualmente, o grande desafio é entender os mecanismos biológicos e as vias moleculares envolvidas nas ações anticâncer do resveratrol (Yogeshwer, 2010).

A literatura tem sugerido que alguns desses mecanismos incluem a indução de enzimas do complexo CYP450 de fase II (Li *et al*., 2006). 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 reagir com o DNA, podendo desencadear aa tumorigênese (Kundu & Surh, 2008).

Consequentemente**,** a modulação da ativação de carcinógenos e de enzimas antioxidantes é um interessante mecanismo quimioterapêutico do resveratrol que, por sua vez, já foi descrito inibindo ou aumentando a expressão da glutationa S-transferase, glutationa peroxidase e NADPH:quinona oxidoredutase, (Kundu & Surh, 2008).

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 & Katiyar, 2008). Já foi demonstrado adicionalmente, que o resveratrol afeta a divisão de diferentes linhagens de células de câncer podendo atuar em diversas fases do ciclo celular (Athar *et al*., 2009; Hsieh *et al*., 2002; Casanova *et al.*, 2012). Kuwajerwala e colaboradores (2000) mostraram que o tratamento de células de câncer de próstata LNCaP com resveratrol induziu as células a entrarem na fase do ciclo celular responsável pela síntese de DNA (fase S), mas a progressão da fase S para a fase G2 foi limitada pelo efeito inibitório do resveratrol. O ciclo celular é uma sequência recorrente de eventos que incluem duplicação do conteúdo da célula e subsequente divisão celular.

Do mesmo modo, Liang e colaboradores (2003), observaram que o resveratrol promoveu um bloqueio na fase durante a qual a célula se prepara para divisão (fase G2) em células de câncer de cólon. Em outra linhagem de câncer de cólon, o resveratrol promoveu diminuição de proteínas regulatórias na progressão da fase de síntese (fase G1) (Wolter *et al*., 2001).

O resveratrol também pode ser considerado um fitoestrógeno devido sua similaridade estrutural com dietilestilbestrol, um estrogênio sintético, sendo assim capaz de se ligar a receptores de estrogênio (Signorelli & Ghidoni, 2005). Ele pode atuar tanto como agonista ou antagonista, originando respostas contrárias dependendo da concentração, da competição e da expressão desses receptores nas células. Sakamoto e colaboradores (2010) demonstraram que o resveratrol induziu morte celular por meio da promoção do processo de apoptose pela redução da razão Bcl2/Bax em células de carcinoma de mama MCF-7. No entanto, quando reduziram a expressão do receptor de estrogênio α através do ensaio de RNA de interferência, a redução na razão Bcl2/Bax mediada pelo resveratrol foi revertida.

A inibição da angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos, essencial para o crescimento do tumor, é outro mecanismo já descrito onde o resveratrol pode ter ação importante (Kimura & Okuda, 2001; Tseng *et al*., 2004). Foi demostrado que ele pode reduzir a produção de citocinas angiogênicas, incluindo VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e interleucina-8 (Dulak, 2005). Além disso, pode inibir a expressão e atividade de metaloproteinase-2 e -9, que são enzimas relacionadas com degradação proteolítica da matriz extracelular e metástase do tumor (Kundu & Surh, 2008; Tang *et al*., 2008).

A atividade anticancerígena do resveratrol também foi associada à sua interferência em vias de sinalização, responsáveis por regular a sobrevivência celular (Fulda, 2004; Kuo *et al.*, 2002; Niles *et al.*, 2003, Ferraz da Costa *et al*., 2012). Estudos i*n vitro* mostraram que o resveratrol induziu ou inibiu a ativação do sinal extracelular regulado por cinases como a ERK1 e ERK2, assim como demonstraram um efeito inibitório da IkB cinase pelo resveratrol (Miloso, *et al.*, 1999; Holmes-McNary & Baldwin, 2000; Yu, *et al.*, 2001).

Somando-se às várias ações do resveratrol, Yoon e colaboradores (2002) demonstraram que o mesmo foi capaz de inibir também a atividade da caseína cinase 2 (CK2) em linhagem de células de câncer cervical. Sugerindo assim, que este pode ser um dos mecanismos envolvidos na inibição da oncogênese pelo resveratrol.

### 1.5 CK2 e sua implicação no câncer

A fosforilação reversível de proteínas é sabidamente o mecanismo pós traducional mais comum de controle da atividade biológica. Desde que foi inicialmente identificado como o mecanismo que regula o metabolismo de glicogênio no final dos anos 60, esse conceito foi ampliado a várias atividades celulares diferentes. A reação de fosforilação é catalisada por uma família composta por cerca de 200 tipos diferentes de enzimas denominadas proteínas cinases (Hunter, 1995).

As proteínas cinases transferem o fosfato terminal de nucleotídeos, especialmente ATP (5' trifosfato de adenosina) e eventualmente GTP (5' trifosfato de guanosina), para as hidroxilas disponíveis em resíduos de serina, treonina ou tirosina (Hunter, 1995), fazendo com que a fosforilação proteica funcione como o principal mecanismo de regulação das funções celulares em células normais e neoplásicas. Sendo assim, muitas proteínas cinases estão sendo escolhidas como alvo para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer (Moran *et al.*, 2006).

A caseína cinase 2 (CK2) é uma proteína presente e principalmente no citoplasma e também no núcleo de organismos eucariotos. Sua função é promover a fosforilação de resíduos de serina/ treonina, sendo tradicionalmente classificada como uma proteína serina-treonina cinase (Xu, *et al*., 1998; Litchfield, 2003). Ela consiste em um complexo heterotetrâmero com peso molecular aproximadamente de 130kDa (Hanif *et al.*, 2010), contém duas subunidades catalíticas alfa (α, α') e duas subunidades regulatórias beta (β), formando as configurações $\alpha_2\beta_2$, α, α' β2, ou $\alpha_2'\beta2$ dependendo do tipo de célula (**Figura 11**) (Tawfic *et al*., 2001).

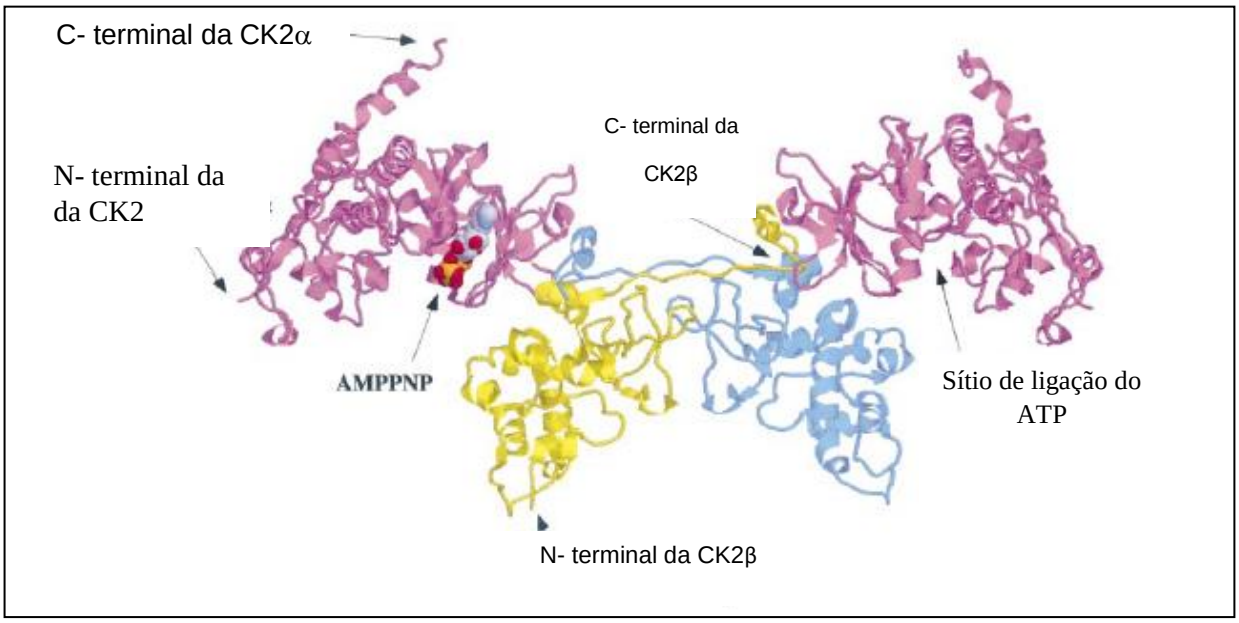


**Figura 11- Estrutura heterotetrâmera da CK2. Adaptado de (Litchfield, 2003).**

A CK2 é uma proteína constitutivamente ativa, não requerendo de segundo mensageiro para sua ativação. Apresenta quase 450 substratos conhecidos e é capaz de interagir e inibir várias proteínas celulares, independentes do seu estado de fosforilação (Hanif *et al.*, 2010).

A CK2 participa de uma série de funções celulares, incluindo a manutenção da viabilidade, proliferação e diferenciação celulares. Já foi demonstrado que nocaute embrionário tanto para CK2α quanto CK2β é letal (Xu *et al.*, 1998; Litchfield, 2003; Wang *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2007; Buchou *et al.*, 2003). Além disso, a inibição da atividade de CK2 facilita a morte celular (Hanif *et al.*, 2009; Gray *et al.*, 2014).

A expressão da CK2 é elevada em todos os tipos de câncer incluindo de cabeça e pescoço, pulmão, próstata e do sistema imune (Ahmad *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). Em glândula mamária de camundongos já foi observado que a superexpressão da sua subunidade catalítica α e que favorece a promoção da tumorigênese do mesmo tecido (Xu *et al.*, 1998).

Essas evidências bioquímicas e genéticas indicam a CK2 como uma forte candidata a alvo farmacológico para o tratamento de cânceres como o de mama (Wang *et al.*, 2000; Yamane & Kinsella, 2005). Neste contexto, tentativas vem sendo realizadas com a finalidade de desenvolver estratégicas para promover a inibição da atividade da CK2 (Wang *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2007).

Os inibidores químicos da CK2 podem ser classificados como substratos análogos ou nucleotídeos os quais são derivados do TBB (4, 5, 6,7-Tetrabromo-2-azabenzimidazol) ou de

polifenóis. Interessantemente, já foi observado que $H_2O_2$ pode também modular sua atividade (Schneider *et al*., 2009)

### 1.6 Espécies reativas de Oxigênio e Câncer

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas formadas após uma redução incompleta de oxigênio dentre as quais se destacam: ânion superóxido ($O_2$•) e radical hidroxila (HO•) (Brieger *et al*., 2012). O peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$), neste contexto, é uma molécula a qual sua redução parcial por metais leva a formação de HO• (Halliwell & Gutteridge, 1990). As EROs são produzidas constantemente na cadeia transportadora de elétrons conhecidos subprodutos da respiração celular assim como produto final de várias reações metabólicas (Brieger *et al*., 2012).

Quando as EROs são geradas, umas amplas variedades de antioxidantes são acionados pois, eles são moléculas que direta ou indiretamente, protegem as células contra os efeitos adversos das EROs (Halliwell, 1990; Halliwell, 1995). Vários compostos têm sido referidos como tendo funções antioxidantes entre estes incluem a, n- acetil-cisteína (NAC), glutationa reduzida (GSH) e catalase (CAT) entre outros (Krishna *et al*., 1996; Chanvitayapongs *et al*, 1997; Evans *et al*., 1997; Beyer *et al*., 1998; Devamanoharan *et al*., 1998; McKenzie *et al*., 1998; Nohl *et al*., 1998; Halliwell, 1999; Fremont, 2000).

Como seu nome sugere, EROs são quimicamente mais reativas que o $O_2$ assim, historicamente, EROs foram pensadas exclusivamente como agentes prejudiciais as células (Cross, 1987). No entanto, ao longo das últimas décadas, há uma crescente valorização sobre o papel das EROs como mediadores de sinalização intracelular regulando numerosas respostas fisiológicas e biológicas (Sena, 2012).

As EROs desempenham papel importante no sistema imunológico e também estão envolvidas com a função tireoidiana, sendo o $H_2O_2$ um cofator necessário da tiroperoxidase para a produção de hormônios (Brieger *et al.*, 2012). Contudo, quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade dos sistemas antioxidantes celulares, ocorre um acúmulo destas EROs levando a em uma variedade de patologias (**Figura 12**) (Brieger *et al.*, 2012)

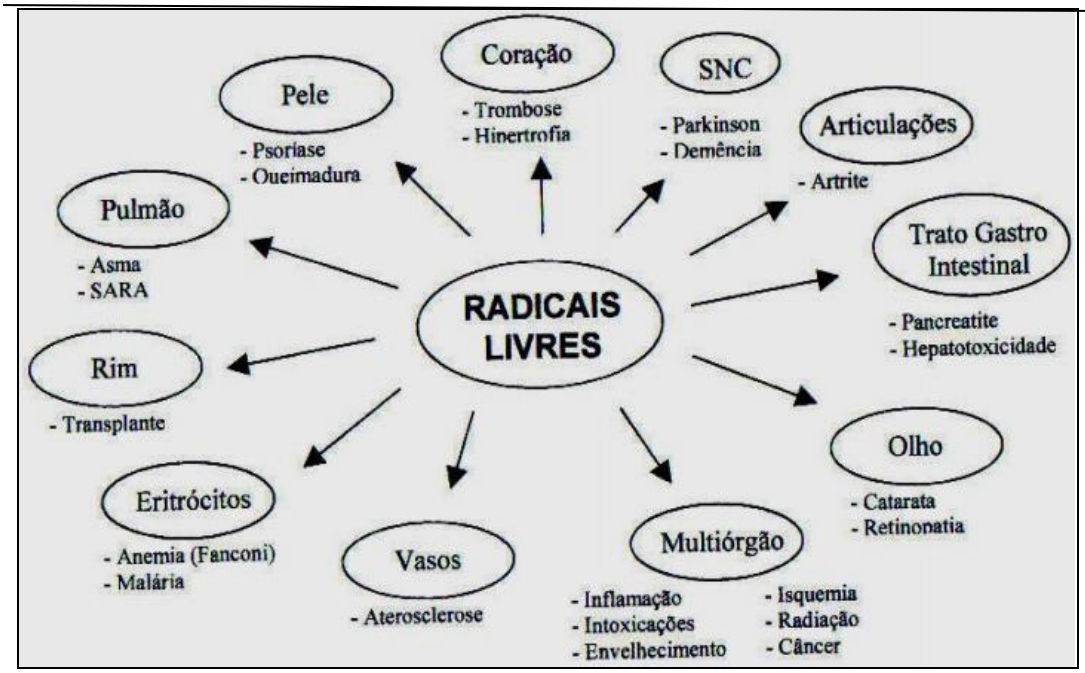


**Figura 12 – EROs e a sua contribuição para diversas doenças. Adaptado de (Brieger *et al*., 2012).**

Evidências sugestivas demonstram que a taxa de produção de EROs está aumentada nas células cancerosa quando comparadas às células normais. Além disso, a regulação e sinalização redox desempenham atribuições tanto na origem do tumor quanto na resposta à sua terapêutica. Desta forma, as EROs apresentam funções distintas. Dependendo do estágio, as ações de ROS são distintas, na tumorigênese (Cairns, 2011).

Primeiramente, as EROs desempenham um papel causal no desenvolvimento e progressão tumoral pela indução de mutações do DNA, instabilidade genômica e sinalização pró-tumorigenica (Glasauer, 2014**)**. Contudo, muitas células cancerosas apresentam aumento de antioxidante e neste contexto, estudos mostraram que em vários tipos de células de câncer onde aconteceu bloqueio de mecanismos antioxidantes ocorre a morte das mesmas (Glasauer, 2014**)**. Este fato, por consequência, sugere que os níveis de EROs elevados têm o potencial para bloquear efetivamente a tumorigênese (Trachootham *et al*., 2006; Glasauer *et al*., 2014).

Em contrapartida, as células normais, como têm uma menor taxa de produção de EROs, sofrem menos com esse desequilíbrio do que as células cancerosas (**Figura 13**) (Trachootham *et al*., 2006; Glasauer *et al*., 2014).

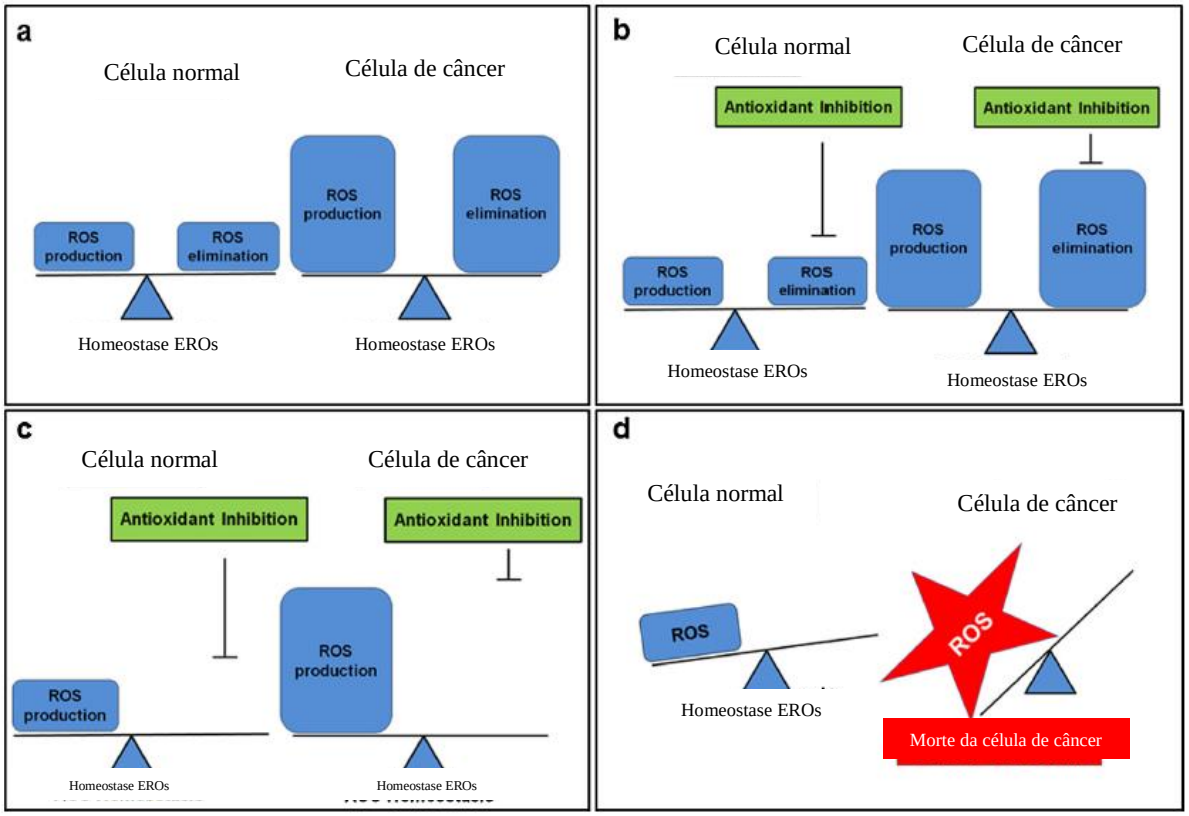


**Figura 13: Homeostase das células normais e de câncer em relação a EROs. Adaptado de (Glauser, 2014).**

Sendo assim, vários agentes anti-câncer em uso clínico hoje, incluindo antraciclinas, cisplatina e bleomicina, são geradores de EROs (Trachootham *et a*l., 2004). Assim como a radiação ionizante, um tratamento primário para muitos tipos de câncer, causa danos ao DNA e geração de EROs (Valerie, *et al.*, 2007). Por isso, o estudo de terapia contra o câncer com o uso de pró-oxidante é uma área de grande importância de estudo (**Figura 14**) (Glasauer *et al.*, 2014).

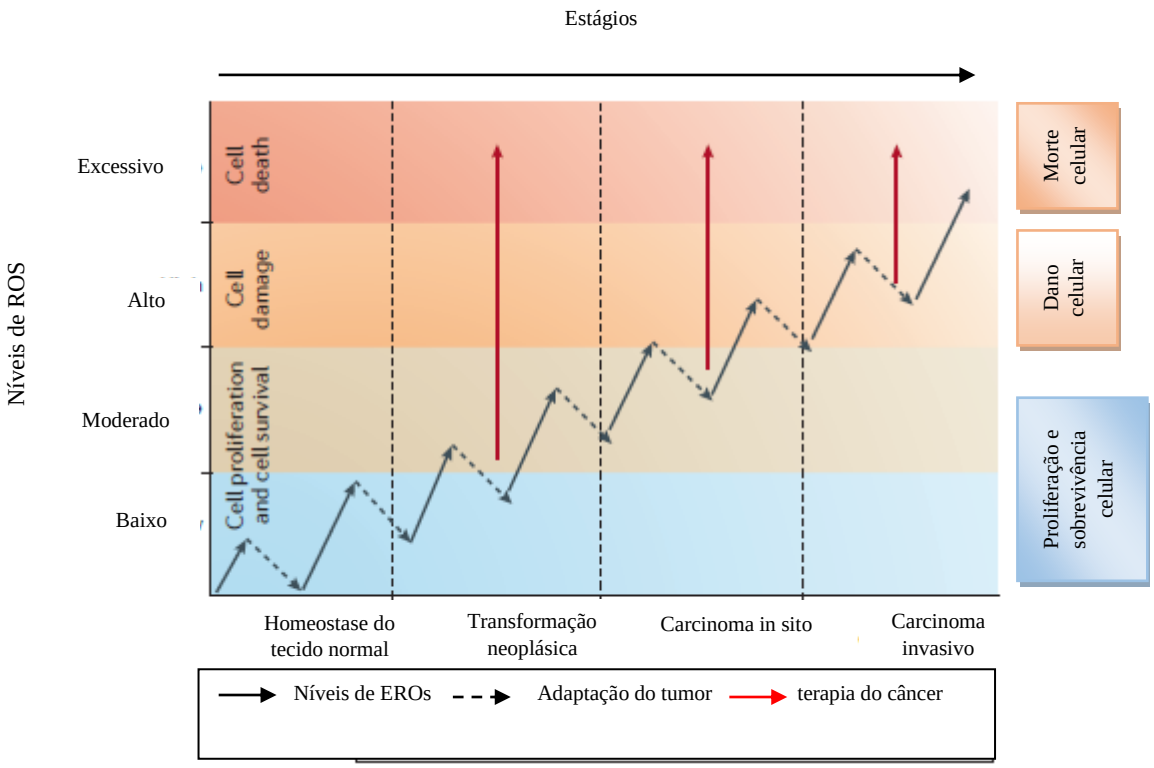


**Figura 14: Ação entre regulação de EROs na tumorigênese em diferentes estágios adaptado de (Gorrini *et al.*, 2013**).

Resultados recentes com células de leucemia forneceram uma visão interessante sobre o efeito do resveratrol no estado redox intracelular. Esses dados indicam que a atividade anti ou pró oxidante , deste composto depende da sua concentração e do tipo de célula onde está atuando, podendo levar ao dano oxidativo do DNA celular. Propõe-se deste modo que a ação pró-oxidante do resveratrol poderia ser um dos mecanismos importantes de ação antineoplásica por diminuir o potencial de membrana mitocondrial e aumentar a geração de EROs levando, consequentemente, a morte celular (Azmi *et al*., 2006).

### 1.7 Pesquisa *in silico* na descoberta de medicamentos

O processo de descoberta e desenvolvimento de um fármaco para a indústria farmacêutica (desde a seleção de um candidato clínico até sua aprovação definitiva) é demorado e dispendioso. As principais razões que impedem a chegada deste fármaco ao mercado são: dificuldades farmacocinéticas, toxicidades em humanos (50%) e uma falta de eficácia (29%) (Lin, 1998; Cheng *et al*, 2002). A taxa de falha devido a problemas na farmacocinética pode ser ainda maior do que a relatada, pois inapropriadas propriedades farmacocinéticas, tais como impossibilidade de administração oral, distribuição desfavorável,

rápido metabolismo ou excreção e uma toxicidade induzida pelo fármaco pode manifestar-se clinicamente como uma falta de eficácia (Grass & Sinko, 2002).

Desta forma, um candidato ideal a fármaco deve possuir tanto boa atividade farmacológica (potência e selectividade), assim como boa absorção, distribuição, metabolismo, excreção e baixa toxicidade (propriedades ADMET), pois um composto que apresenta uma elevada potência *in vitro* pode posteriormente não ter eficácia ou ser altamente tóxicos em modelos *in vivo* (Lin, 2003). Contudo, como quaisquer ensaios *in vitro* somente detectar as propriedades inerentes da molécula não é suficiente. Deve-se também integrar esses resultados com previsões / medida de outros fatores para assegurar o uso de uma molécula como candidata a ser testada *in vivo* (Lin, 2003).

Neste contexto, a "Regra-dos-cinco" identificada por Lipinski e colaboradores, 1997 avalia várias características críticas que devem ser consideradas para os compostos quando são pensados em ter administração via oral. Estas propriedades, geralmente são entendidas mais como diretrizes do que cortes absolutos e englobam: massa molecular <500 daltons (Da), coeficiente de partição octanol / água (CLOGP) <5, número de aceptores ligantes de hidrogênio <5 e número de doadores ligantes de hidrogênio <10. Em geral, essa regra aponta para propriedades físico-químicas complementando as propriedades ADMET (van de Waterbeemd & Gifford, 2003).

Em todo o caso, ciência básica ainda deve ser feita em primeiro lugar, tornando este um tempo especialmente interessante para ser envolvida em Previsão ADMET e consequentemente levando a descoberta de novos fármacos(van de Waterbeemd & Gifford, 2003).

### 1.8. Justificativa

O câncer é uma das enfermidades da humanidade de difícil cura e tratamento, sendo hoje uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Seu tipo mais comum e mais mortal entre as mulheres é o de mama, estando mais incidente na Europa e nas Américas, embora sua incidência esteja crescendo na África e na Ásia (Servick, 2014).

As abordagens clínicas disponíveis atualmente na clínica são cirurgia, radioterapia, hormonioterapia e quimioterapia, sendo esta a primeira escolha terapêutica (Higgins, 2007). No entanto, a quimioterapia não consegue distinguir as células normais das malignas. (Dollery, 1993). Consequentemente, esse tratamento provoca diversos efeitos colaterais (McCoy, 2003).

Desta forma, nas últimas décadas pesquisas têm sido conduzidas com o intuito de identificar novos agentes que possam ser utilizados no tratamento contra o câncer de mama. Neste contexto, os compostos bioativos têm se destacado e em1997 foi relatado pela primeira vez que o resveratrol teria ação contra o câncer. Assim, sugere-se que este composto pode ser uma ferramenta terapêutica promissora a ser testada (Soleas *et al.*, 1997). Contudo, apesar das evidências bioquímicas, clínicas e epidemiológicas existentes, ainda é preciso à compreensão de seus mecanismos de ação bem como identificação de seus possíveis alvos moleculares.

A CK2 é uma importante enzima com participação descrita em diversos mecanismos regulatórios do metabolismo, proliferação e diferenciação celulares. Adicionalmente, foi demostrado que a CK2 tem um papel fundamental na oncogênese e por esse motivo apresenta-se como candidata a alvo molecular para o tratamento de diversos tipos de câncer incluindo o de mama (Gray *et al*., 2014). Interessantemente, sua atividade em células de leucemia foi diminuída na presença de resveratrol, o que culminou em diminuição da viabilidade e morte celular (Yoon *et al*., 2002). Entretanto, ainda não há uma concordância de qual mecanismo está implicado nesse processo. Postula-se, porém, envolvimento de produção de EROs, mas, ainda faltam comprovações consistentes sobre como elas estariam atuando (Ahamed *et al*., 2006; Schinaider *et al.*, 2009).

Baseando-se nessas evidências é notável a importância de investigar se o resveratrol induz a produção de espécies reativas de oxigênio e qual sua relação com a modulação da atividade da caseína cinase 2 em modelos de células de carcinoma mamário humano, como uma forma de avaliar uma possível via de regulação de morte celular e ação terapêutica deste composto.

# 2.Objetivos

## 2.Objetivos

### 2.1 Geral

Investigar as ações citotóxicas do resveratrol a partir da relação entre estresse oxidativo e da enzima caseína cinase 2 em células de carcinoma mamário humano MCF-7.

### 2.2 Específicos

- Determinar a citotoxicidade do resveratrol na presença ou ausência dos antioxidantes N-acetilcisteina, Glutationa reduzida, catalase e polietilenoglicol-catalase nas células MCF-7;
- Determinar a citotoxicidade do inibidor específico da caseína cinase 2 TBB na presença ou ausência dos antioxidantes N-acetilcisteina, Glutationa reduzida, catalase e polietilenoglicol-catalase nas células MCF-7;
- Avaliar os efeitos do resveratrol sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em células tratadas com o composto antioxidante polietilenoglicol-catalase ou com TBB em células MCF-7;
- Avaliar os efeitos do resveratrol sobre a atividade da enzima CK2 nas células MCF-7 e comparar com células normais de mama linhagem HB2;
- Comparar os efeitos do resveratrol e do TBB sobre a atividade da CK2 na presença e ausência de polietilenoglicol-catalase nas células MCF-7;
- Verificar os efeitos do resveratrol e do TBB sobre o potencial de membrana mitocondrial na presença ou ausência polietilenoglicol-catalase nas células MCF-7;
- Avaliar a viabilidade oral e propriedades moleculares do resveratrol pela regra de Limpinsk.

# 3 Material e Métodos

## 3. Material e métodos

### 3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Trans Resveratrol, 4, 5, 6, 7-Tetrabromo-2-azabenzimidazol (TBB), coquetel de inibidores de proteases, brometo de 3(dimetiltiazol-2yl) 2,5 difenil tetrazólio (MTT), insulina bovina e fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), N-acetilcisteína (NAC), Glutationa reduzida (GSH), catalase, Polietilenoglicol-catalase (PEG-catatalase), sonda fluorescente JC-1 e 2'7 diacetato de diclorofluroesceina ($H_2$DCFDA) 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). O Kit CycLex® CK2 *activity* da *MBL (International*, Woburn, MA).

### 3.2. Manutenção das Culturas celulares

As linhagens de células epiteliais de câncer de mama humano, MCF-7 e célula normal de mama HB2 foram cultivadas em garrafas de polietileno e poliestireno transparentes com área de 25cm$^2$.

Para a linhagem MCF-7, o meio utilizado para cultura consiste em DMEM (*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*) suplementado com 2,0 g/L de tampão HEPES, 3,7 g/L, bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino, 5 µg/mL de insulina e 100 unidades/mL de penicilina G e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina.

A HB2 foi cultivada em DMEM suplementado com 2,0 g/L de tampão HEPES, 3,7 g/L, bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino, 5 µg/mL de insulina e 100 unidades/mL de penicilina G e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina acrescido de 0,5 µg/mL de hidrocortisona, 0,5% v/v de penicilina e 5% estreptomicina (v/v )1% glutamina v/m.

Ambas as linhagens celulares foram mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% de $CO_2$ (Jin, *et al.*, 2009). Para a realização dos experimentos as células foram subcultivadas na mesma densidade inicial e após alcançarem 70 – 80 % de confluência.

### 3.3. Ensaio de viabilidade celular

#### 3.3.1. Tratamento

As células foram subcultivadas em placas com 96 poços e após 24h incubadas em diferentes tempos (3, 24 e 48h), com concentrações diferentes ou crescentes de trans-resveratrol (0, 50, 100, 200, 300, 400 µM) diluído em 0,5% de Dimetilsulfóxido (DMSO) ou TBB (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400 µM) igualmente diluído em 0,5% de DMSO.

#### 3.3.2 Ensaio de viabilidade por MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução de MTT adaptado de Mossman (1983). O ensaio de redução de MTT é baseado na habilidade das células viáveis de reduzirem o MTT, um composto solúvel de coloração amarela, em cristais de formazano, precipitado insolúvel de coloração roxa.

Após a incubação das células com os compostos, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS a 37ºC. Em seguida, foi adicionado 100 µL de MTT diluído em DMEM sem vermelho de fenol e 10% de soro fetal bovino em concentração 1 mg/mL por 1 hora a 37°C. Após a incubação, a solução de MTT foi removida e foi acrescentado 200 µL de DMSO 100%.

A leitura foi realizada por espectrofotometria em frequência de onda 570 nm. A quantidade de MTT reduzido é lida na absorbância de 570 nm e os resultados obtidos em absorbância são expressos em percentagem de células vivas com relação ao controle (considerado como tendo uma viabilidade celular correspondente a 100%).

### 3.4. Mensuração da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs)

#### 3.4.1. Tratamento para a mensuração de EROs

As células MCF-7 foram subcultivadas em placas de 24 poços e as espécies reativas de oxigênio foram medidas na cultura de células MCF-7 tratadas com resveratrol 200 µM ou 100 µM de TBB na presença ou ausência de 500 U/mL PEG-catalase por 3 ou 24 horas. Como controle, as células foram tratadas com 0,5% do volume total de meio de cultura de DMSO à 100%, veículo dos compostos.

### 3.4.2 Ensaio de mensuração de EROs

Após os respectivos tratamentos, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS), tripsinizadas, contadas e ajustadas à $3 \times 10^5$. Em seguida, foram ressuspendidas em 500 µL de tampão contendo $H_2$DCFDA (2’, 7'-diacetado de diclorofluresceína) por 1 hora.

A fluorescência produzida pela oxidação da diclorofluresceína foi lida em fluorímetro com excitação de507 e emissão de 530 nm.

## 3.5. Avaliação da viabilidade celular após tratamento com resveratrol e TBB na presença de antioxidantes e enzimas antioxidantes

### 3.5.1. Tratamento para ensaio de viabilidade

As células MCF-7 foram subcultivadas em placas de 96 poços e a viabilidade foi avaliada nas culturas tratadas com; 0, 0,5, 1, 2 e 5 mM de NAC, 0, 500, 750 µM de GSH, 500 U/ml de Catalase e 500 U/ml de PEG-catalase por 3 e 24 horas.

Igualmente, as células foram tratadas com os antioxidantes e enzimas antioxidantes por 30 min e em seguida foram adicionados, resveratrol à 100 e 200 µM ou TBB 100 e 200 µM, também por 3 e 24 horas.

Como controle, as células foram tratadas com 0,5% de DMSO à 100%, veículo dos compostos.

### 3.5.2. Ensaio de viabilidade

O ensaio de viabilidade celular realizado foi por quantificação da redução do MTT como descrito no item 3.3.2.

### 3.6. Determinação da atividade da enzima Caseína Cinase 2

#### 3.6.1. Tratamento para dosagem da atividade da CK2

As células MCF-7 foram subcultivadas em placas de Petri de 20 mm e 200 µM de *trans*-resveratrol ou 100 µM de TBB foram adicionados na presença ou ausência de 500 UI/mL de PEG-catalase por 24h.

Como controle, as células foram tratadas com 0,5% de DMSO à 100%, veículo dos compostos. A cultura de célula de mama normal HB2 foi igualmente subcultivada, contudo na ausência dos compostos.

#### 3.6.2. Obtenção dos extratos celulares para dosagem de atividade de CK2

Após o tempo de incubação, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS gelado e lisadas com a adição de nitrogênio líquido. Em seguida foi adicionado tampão de lise contendo: Tris-HCl 5 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético 10 mM (EDTA), Ortovanadato de Sódio 1mM, Fluoreto de Sódio 5 mM, Ácido ocadáico 1 µM, coquetel de inibidores de proteases em concentração final de 1 mM [Aprotinina A, Leupeptina, Bestatina e Pepstatina, E-64 e fenilmetanosulfonofluorídeo (PMSF)]. As células foram removidas dos recipientes utilizando *cell scraper*.

Os extratos celulares foram colocados em um tubo tipo *eppendorff*, que foi centrifugado por 5 minutos a 4 ºC e10.000 RPM. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry, *et al.*, 1951) usando como padrão albumina de soro bovino (BSA). O lisado celular foi armazenado em tubo *eppendorff* e estocado, para análises posteriores.

#### 3.6.3. Ensaio de atividade de CK2

A atividade da caseína cinase 2 foi mensurada pelo Kit CycLex® CK2 *activity* (*MBL International*, Woburn, MA). O meio de reação contendo o extrato celular da MCF-7 ou HB2 (1mg/ml) tampão de cinase, e ATP 100 µM foi adicionado a uma placa de 96 poços pré-revestida com o substrato p53 recombinante, que apresenta um resíduo de serina fosforilável por CK2.

Depois de 30 minutos os poços foram lavados com Tween 2% e foi adicionado anticorpo anti-fosfoserina (detector específico que reconhece apenas a forma fosforilada da serina 46 da p53 conjugada com peroxidase) e deixou-se incubar por 60 minutos.

Após a incubação, o anticorpo foi retirado, os poços foram lavados com PBS-Tween 2%, em seguida foi adicionado o substrato cromogênico tetra-metilbenzidina (TMB) e 15 minutos depois se adicionou ácido sulfúrico 0,5 N para parada da reação.

A reação foi quantificada por espectrofotometria à 450nm, o que reflete a quantidade relativa de atividade de CK2 na amostra.

### 3.7. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$)

#### 3.7.1. Tratamento para determinação do $\Delta\Psi m$

As células MCF-7 foram subcultivadas e após 24h quando alcançaram 80-90% de confluência elas foram tratadas com 0, 50, 100 e 200 µM de resveratrol ou TBB por 3 e 24 horas. Igualmente, as placas foram subcultivadas e tratadas com 0 e 500 UI/mL de PEG-catalase e após 30 min com 200 µM de resveratrol ou 100 µM de TBB.

Como controle, as células foram tratadas com 0,5% de DMSO à 100%, veículo dos compostos.

#### 3.7.2. Ensaio para determinação do $\Delta\Psi m$

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado pela utilização da sonda flurescente JC-1 (iodeto de 5,5’, 6,6’ -tetracloro1, 1’,3,3’-tetraetilbenzimidazolocarbocianina), marcador utilizado para mensurar o $\Delta\Psi m$

O JC-1 é uma sonda catiônica mitocondrial vital, lipofílica que se acumula na mitocôndria proporcionalmente ao $\Delta\Psi m$. Dessa forma, em altos $\Delta\Psi m$, ele forma agregados no interior da mitocôndria, com mudanças nas suas propriedades fluorescentes. No estado monomérico, o corante fluoresce verde, enquanto no estado agregado o corante fluoresce vermelho. Em células com danos mitocondriais ou alterações no $\Delta\Psi m$, o corante não se agrega, mantendo sua forma monomérica e acumulando-se no citoplasma emitindo uma fluorescência verde. A despolarização mitocondrial é indicada por uma diminuição na proporção de intensidade de fluorescência vermelho/verde (Mehta & Shana, 2006).

Após a incubação por 24 horas, as células MCF-7 foram lavadas em tampão PBS e incubadas com 10μg/mL de JC-1 por 10 minutos, no escuro, à 37°C. Em seguida, o JC-1 foi retirado e as células foram lavadas com PBS.

Os valores de ΔΨm foram obtidos por espectrofluorimetria nos seguintes comprimentos de onda: 480 e 530/590 excitação e emissão, respectivamente. Os valores foram expressos pela razão da emissão entre a fluorescência vermelho/verde (590/530).

### 3.8Análise da Viabilidade oral e das propriedades moleculares e ADMET do resveratrol

Com o intuito de estimular mais experimentos *in vivo* e ensaios clínicos com o resveratrol, realizamos uma análise da relação estrutura-atividade, utilizando o recurso de modelagem molecular para avaliar as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) *in silico* do resveratrol. Utilizou-se o AdmetSAR, uma ferramenta computacional aberta e abrangente, acessível gratuitamente pelo endereço eletrônico http://www.admetexp.org, que pode ser utilizada na avaliação de propriedades ADMET *in silico* de diversas moléculas. Este recurso também contempla a análise dos critérios clássicos de Lipinski a qual avalia o número de doadores e de receptores ligantes de hidrogênio, peso molecular do composto e coeficiente de partição octanol/água (clogP) (Lipinski, 1997).

### 3.9 Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram submetidos à análise estatística descritiva, média e erro padrão, análise de variância (ANOVA), usando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Resultados com valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

# 4. Resultados

## 4. Resultados

### 4.1. Efeito do resveratrol na viabilidade da MCF-7

Anteriormente, já foi demonstrado que o resveratrol atua nos três estágios da carcinogênese; iniciação, promoção e progressão (Athar, *et al.*, 2007). Para analisar seu efeito sobre a linhagem de células de câncer de mama MCF-7 foi realizado o ensaio de viabilidade celular por redução de MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações de trans-resveratrol por 24 e 48 horas (**Figura 15**).

O resultado obtido após 24 horas mostrou que a viabilidade celular foi reduzida em até 74% na concentração de 400 µM com um $IC_{50}$ de 238 µM. Em 48 horas, na concentração de 400 µM, ocorreu uma diminuição da viabilidade celular em torno de 76%, apresentando um $IC_{50}$ de 151 µM. Esses dados indicam que a viabilidade celular diminuiu de maneira dose e tempo dependente em relação às células controle, sugerindo assim, que o resveratrol apresenta um efeito citotóxico para as células MCF-7.

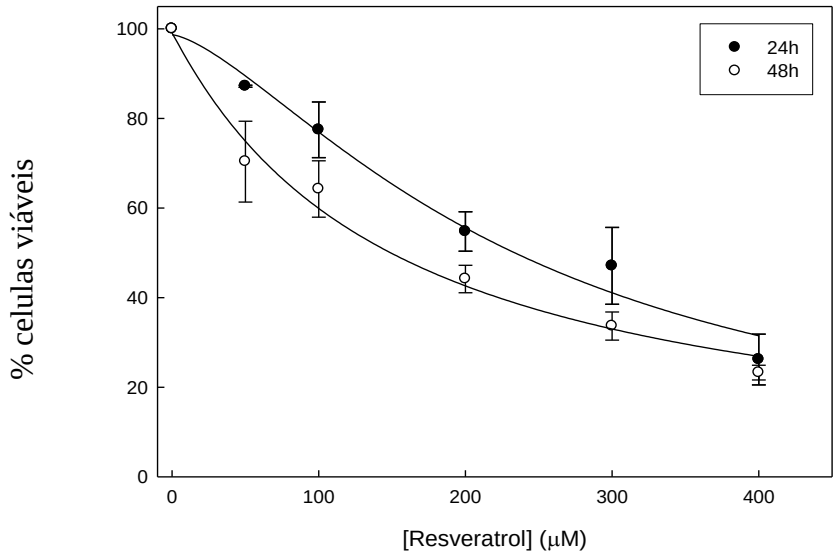


**FIGURA 15 – Dependência da concentração de resveratrol na viabilidade celular das células MCF-7.** As células MCF-7 foram plaqueadas em placa de 96 poços com meio DMEM, 10% de soro fetal bovino, 2.0 g/L HEPES e 5.0 µg/ml insulina a 37ºC e atmosfera com 5% de $CO_2$. O resveratrol foi adicionado em diferentes concentrações e o ensaio de viabilidade por MTT foi realizado logo em seguida como descrito no item 3.3.2. Células incubadas com resveratrol por 24 (●) e 48 (○) horas. Os valores representam médias ± EP (n=3). $P < 0,05$

## 4.2 Mensuração da produção de EROs em células MCF-7 tratadas com resveratrol

Embora os polifenóis sejam geralmente reconhecidos como antioxidantes, observações os descrevem também como pró-oxidantes. Sendo assim, a produção de EROs pelos compostos polifenóis desencadeia uma série de eventos celulares que podem culminar com a morte das células cancerosas (Khan *et al*., 2012).

Pesquisas realizadas com células de leucemia indicaram efeito no estado redox intracelular causado pelo resveratrol, apoiando que a atividade oxidante (anti ou pró), deste composto depende da sua concentração e do tipo de célula onde está atuando (Athar *et a*l., 2009).

Sendo assim, para verificarmos o conteúdo de EROs nas células MCF-7 tratadas com resveratrol utilizamos a concentração de resveratrol igual a 200 µM, próxima ao IC50 encontrado, e a 2’, 7'-diacetato de diclorofluoresceína ($H_2$DCFDA), que uma vez dentro das células ela é oxidada pelas EROs em 2',7'-dichlorofluoresceina (DCF), uma molécula altamente fluorescente.

Conforme mostra a **figura 16**, não observamos aumento significativo na quantidade de EROs em 3 horas (**Figura 16 A**), contudo, no tempo de 24 horas, a produção foi aproximadamente duas vezes maior nas células tratadas com trans-resveratrol por 24h (**figura 16 B**) do que em células que não receberam qualquer tratamento.

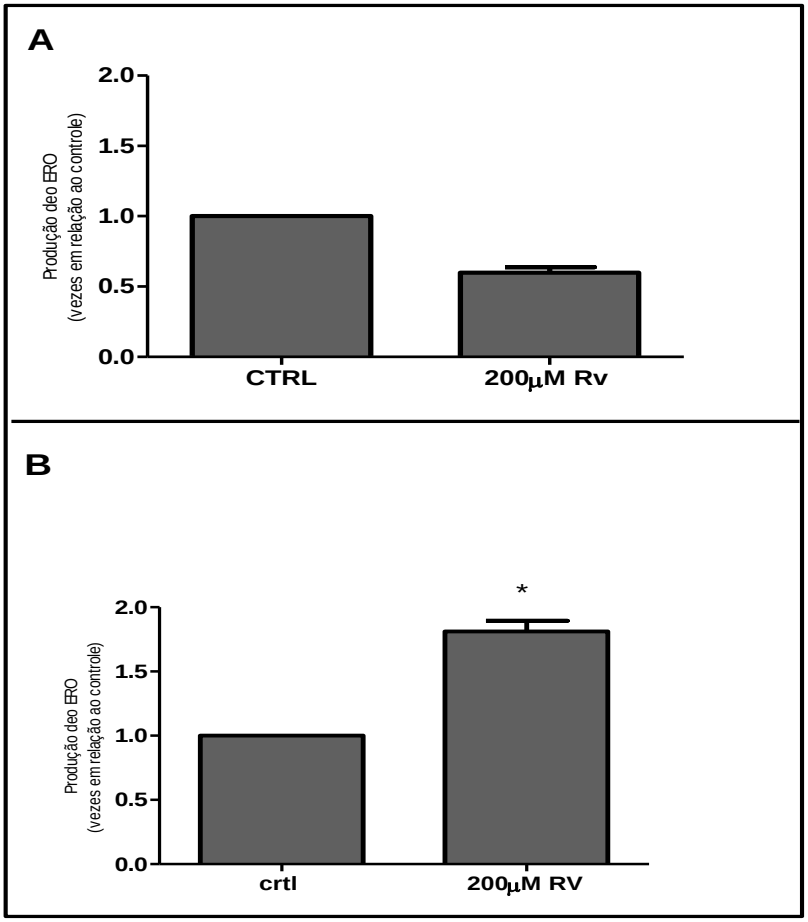


**FIGURA 16 – Produção de EROs pelo resveratrol na linhagem celular MCF-7.** As células MCF-7 foram plaqueadas em placa de 24 poços com meio D-MEM, 10% de soro fetal bovino, 2.0 g/L HEPES e 5.0 µg/ml insulina a 37ºC e atmosfera com 5% de $CO_2$. 200µM de resveratrol foi adicionado e o ensaio de produção de EROs foi realizado com $H_2$DCFDA como descrito no item 3.4.2. Figura (A) tempo de incubação 3h e Figura (B) tempo de incubação 24 horas. Os valores representam médias ± EP (n=3). * $p \leq 0{,}01$, em relação ao controle. CRTL= controle, Rv = Resveratrol

### 4.3 Avaliação do efeito de antioxidantes sobre a viabilidade de células MCF-7 tratadas com resveratrol

Com o intuito de averiguar a existência de uma relação entre a diminuição da viabilidade celular com a produção de EROs na MCF-7 tratada com resveratrol, utilizamos o antioxidante N-acetilcisteína (NAC). Inicialmente verificamos se o antioxidante em questão interferia na viabilidade celular. Para isso, incubamos a MCF-7 com concentrações crescentes de NAC por 24h uma vez que neste tempo foi onde observamos aumento na produção de EROs, e realizamos o ensaio de MTT. O resultado, apresentado na **figura 17 A** mostra que, não houve alteração na viabilidade celular quando tratadas com diferentes concentrações de NAC.

Tendo em vista a conhecida capacidade antioxidante do NAC e que o mesmo não alterou a viabilidade da MCF-7, investigamos se o pré-tratamento com NAC protegeria as células MCF-7 do efeito do trans resveratrol sobre a viabilidade celular. Para isso, a cultura de células MCF-7 foi tratada com diferentes concentrações de NAC e em seguida foram adicionados 200 µM de trans resveratrol, deixando-os incubando por 24h.

Como resultado, destacamos que, ao tratar as células MCF-7 com resveratrol, a viabilidade celular reduziu aproximadamente 50%. No entanto, ao realizarmos o pré-tratamento com o NAC, observamos que conforme aumentamos a concentração do antioxidante, notamos uma proteção das células quanto a diminuição de sua viabilidade causada pelo resveratrol. Esses dados sugerem que a diminuição da viabilidade celular observada com a incubação com resveratrol está relacionado ao aumento da produção de EROs, conforme pode ser visualizado na **figura 17 B**.

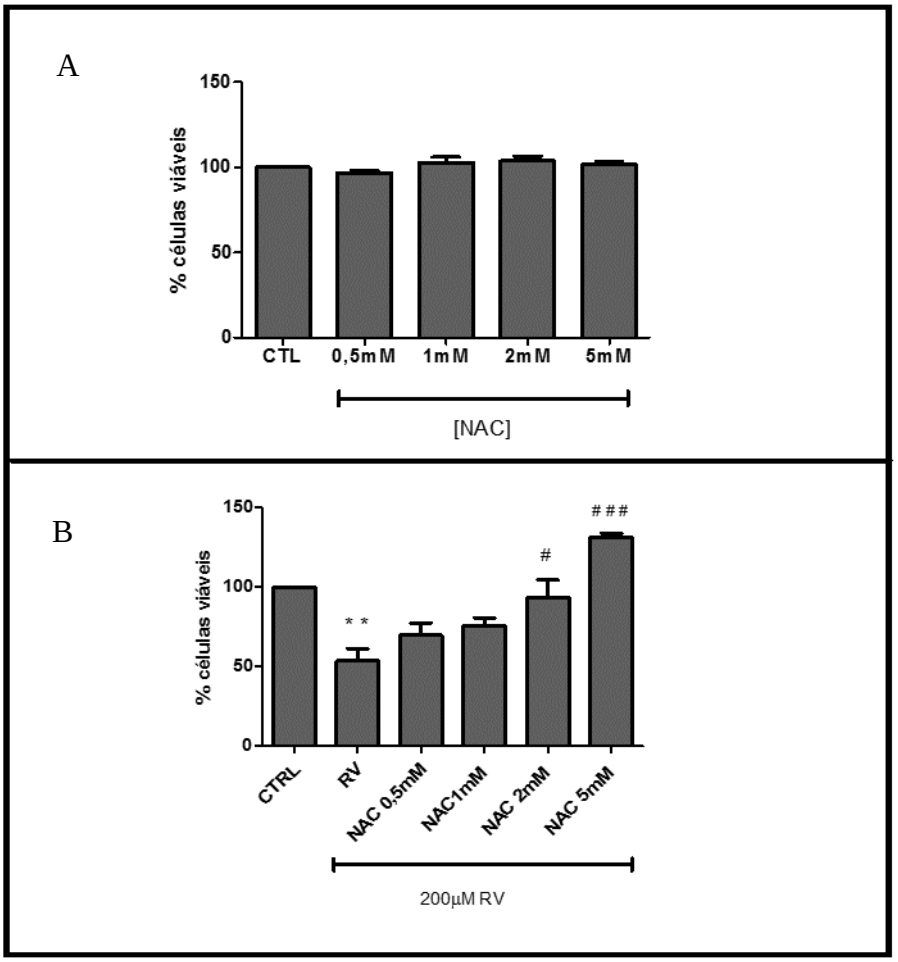


**FIGURA 17 – Viabilidade da MCF-7 tratada com NAC na ausência e presença de resveratrol.** As células MCF-7 foram plaqueadas em placa de 96 poços com meio DMEM, 10% de soro fetal bovino, 2.0 g/L HEPES e 5.0 µg/ml insulina a 37ºC e atmosfera com 5% de $CO_2$. Painel (A) - foram adicionadas diferentes concentrações de NAC por 24h e Painel (B) - as células foram incubadas com diferentes concentrações de NAC por 30 minutos e posteriormente com 200 µM de resveratrol por 24 horas. O ensaio de viabilidade por MTT foi realizado logo em seguida Os resultados são expressos relativos aos respectivos controles e os valores representam médias ± EP (n = 3). ** $p \leq 0{,}01$ em relação ao controle; # $p \leq 0{,}05$ em relação a célula tratada com resveratrol #; ### $p \leq 0{,}001$, em relação a célula tratada com RV. CTRL = controle; RV= resveratrol, NAC = n acetil cisteína

Averiguada a capacidade da NAC em proteger as células MCF-7 do efeito tóxico do trans resveratrol, novos experimentos foram desenvolvidos a fim de verificarmos se outros antioxidantes apresentariam o mesmo efeito. Glutationa reduzida (GSH) foi utilizada como antioxidante, uma vez que essa molécula é encontrada na maioria das células e é amplamente utilizada em pesquisas com sistemas biológicos, com a finalidade de avaliar o estado redox (Sies, 1999).

Primeiramente, tratamos as células MCF-7 com concentrações crescentes de GSH por 24h e fizemos o teste de viabilidade celular, onde verificamos que, diferentes concentrações de GSH não foram capazes de alterar a viabilidade celular das células MCF-7 (**Figura 18 A**). E em seguida observamos que GSH, assim como o NAC, foi capaz de proteger as células do efeito citotóxico do resveratrol (**Figura 18 B**). Sendo assim, esses dados sugerem que a produção de EROs aumentada em 24h na presença de trans resveratrol (conforme figura 17B) esteja associada à diminuição da viabilidade das células MCF-7.

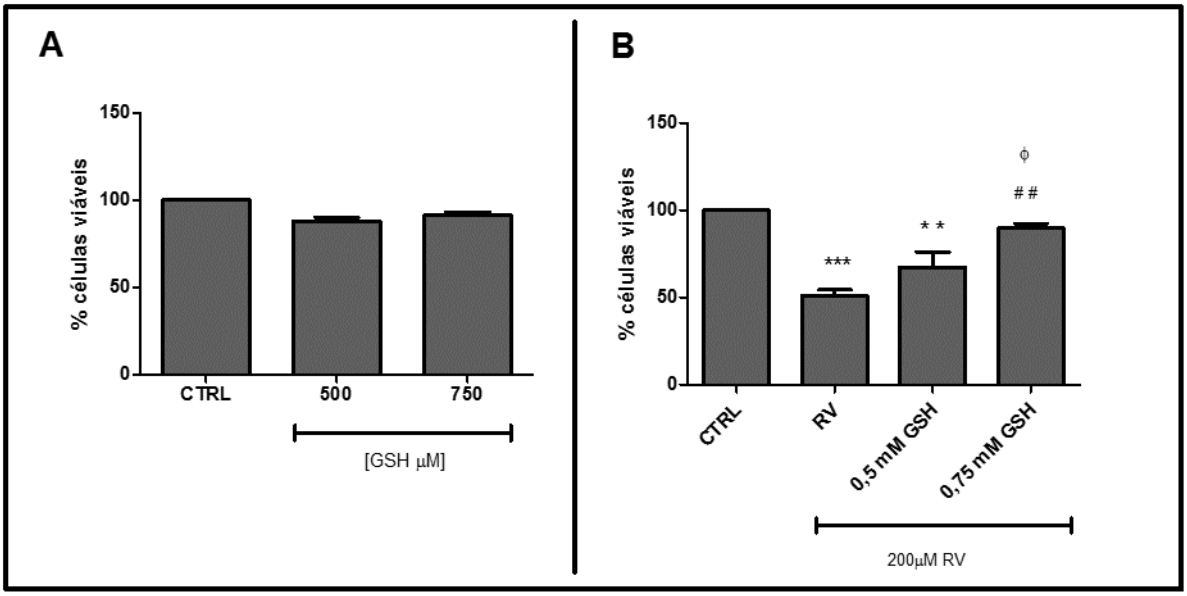


**Figura 18 – Viabilidade celular de MCF-7 tratada com GSH e / ou resveratrol. Painel A:** Células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de $CO_2$. GSH foi adicionado a diferentes concentrações por 24 horas. **Painel A** as células foram semeadas e tratadas com diferentes concentrações de GSH. **Painel B** as células foram incubadas com diferentes concentrações de GSH por 30 minutos e posteriormente com 200 µM de resveratrol por 24 horas. O ensaio de viabilidade por MTT foi realizado logo em seguida Os resultados são expressos em % em comparação com o resultado controle e os valores representam médias ± EP (n = 3); ** $p \leq 0{,}01$ *** $p \leq 0{,}001$, $^{Ø}$ $p \leq 0{,}01$ em relação às células incubadas com 50 mM GSH, ## $p \leq 0{,}01$ em relação às células incubadas com resveratrol CTRL = controle; RV resveratrol e GSH = glutationa reduzida.

A fim de verificarmos outra classe de antioxidantes que poderia interferir na viabilidade celular, utilizamos a enzima catalase, na qual reage com $H_2O_2$ produzindo $H_2O$ e $O_2$. Inicialmente, as células de câncer de mama foram incubadas com 100 e 200 µM de resveratrol, na ausência ou na presença da catalase, e após 24 horas foi realizado o ensaio de redução do MTT.

O resultado evidenciou que o resveratrol, nas duas concentrações utilizadas, foi capaz de diminuir o número de células viáveis quando comparado às células que não foram tratadas com resveratrol, como mostrado anteriormente. Entretanto, não houve diferença quando as células foram incubadas com resveratrol em associação com a catalase (**Figura 19**). Esses dados sugerem que a catalase não foi capaz de proteger as células MCF-7 do efeito citotóxico do resveratrol. Cabe mencionar que na presença de catalase, a diminuição da viabilidade com resveratrol 100 µM foi menos pronunciada, quando comparada às células incubadas somente com resveratrol

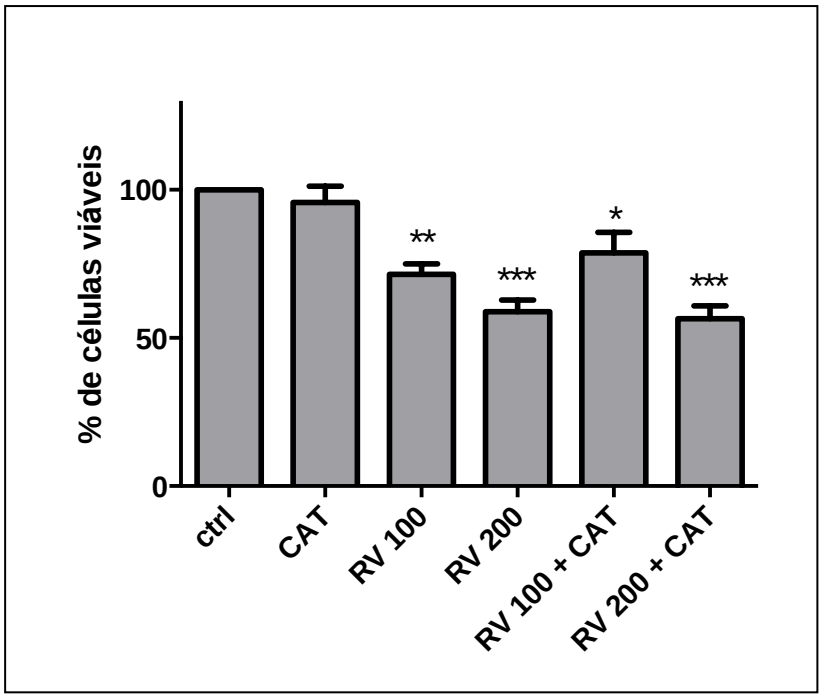


**Figura 19 – Viabilidade celular de MCF-7 tratada com resveratrol e catalase.** Células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de $CO_2$. O resveratrol foi adicionado nas concentrações de 100 µM ou 200 µM e catalase adicionada em concentração de 500U/ml ao controle foi adicionado 0,5% (v/v) de DMSO, veículo do Resveratrol. As células foram incubadas durante 24 horas. O ensaio de viabilidade por MTT foi realizado logo em seguida Os resultados são expressos em % através da comparação com o resultado do respectivo controle e os valores representam médias ± EP (n = 3). Significativo em relação ao controle * $p \leq 0{,}05$; ** $p \leq 0{,}01$ *** $p \leq 0{,}001$. CTRL = controle; RV resveratrol. CAT = catalase

Ao verificar que a catalase não protegeu as células do efeito do resveratrol sobre a viabilidade celular, tornou-se necessária à utilização de outro composto, a PEG-catalase (polietilenoglicol-catalase). A PEG-Catalase possui cadeia lipofílica facilitando a entrada da referida enzima pela membrana plasmática, uma vez que ela não consegue atravessar esta membrana. Desta forma verificaremos se a formação de $H_2O_2$ sugerida anteriormente pode ser intracelular.

As células de câncer de mama foram incubadas na ausência ou presença de 100 ou 200 μM de resveratrol em associação com PEG-catalase. O resveratrol foi capaz de diminuir o número de células viáveis e por outro lado, o tratamento com a PEG- Catalase preservou as células do efeito citotóxico do resveratrol (**Figuras 20 A e B**). Deste modo, sugerimos que $H_2O_2$ intracelular pode ter sido produzido pelas células de câncer de mama MCF-7 tratadas com resveratrol. Por consequência, o resultado sugere que a produção de $H_2O_2$ pode ser a causa da diminuição da viabilidade celular observada.

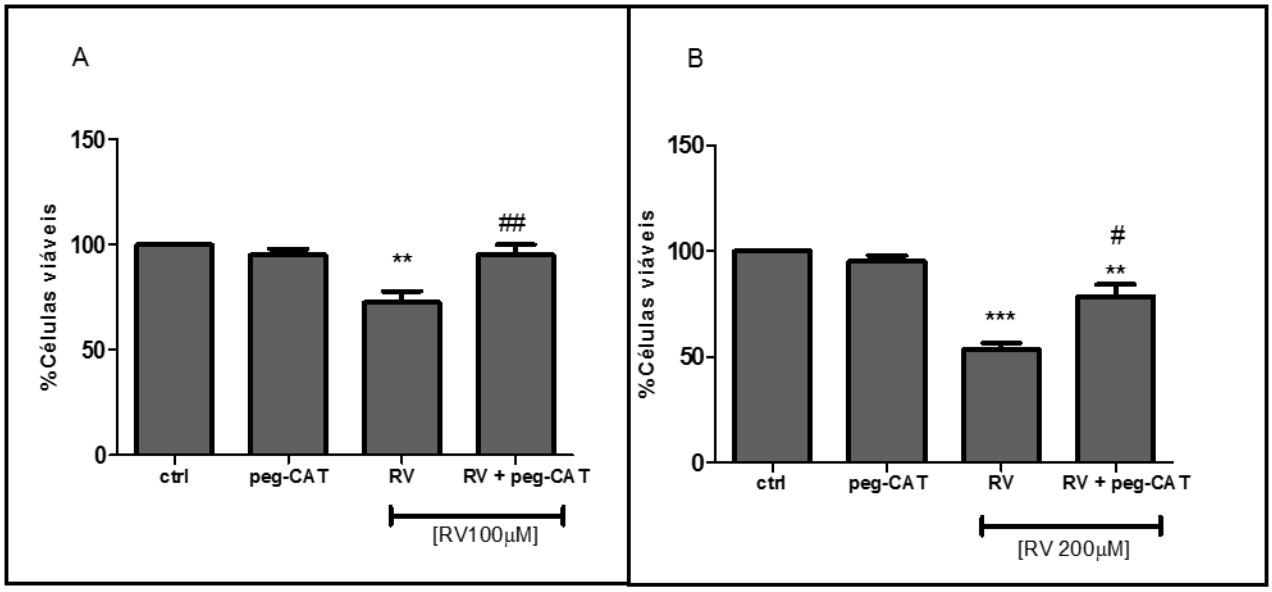


**Figura 20 – Viabilidade celular de MCF-7 tratada com resveratrol e Peg-catalase.** Células MCF-7 foram subcultivadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de $CO_2$. O resveratrol foi adicionado nas concentrações de 100 μM ou 200 μM e PEG-catalase adicionada em concentração de 500 U/ml. As células foram incubadas durante 24 horas. O ensaio de viabilidade por MTT foi realizado logo em seguida Os resultados são expressos relativos ao resultado das células controle, adicionado 0,5% (v/v) de DMSO e os valores representam médias ± EP (n = 3). ** $p \leq 0,05$ em relação ao controle; *** $p \leq 0,01$ em relação ao controle. # $p \leq 0,05$ em relação á célula tratada com resveratrol 100 μM #; $p \leq 0,01$em relação a célula tratada com resveratrol 200 μM. CTRL = controle; RV resveratrol ~~PEG~~ Catalase = PEG catalase.

Tendo em vista o efeito dos antioxidantes e especialmente da enzima da PEG-Catalase sobre a viabilidade das células MCF-7 tratadas com resveratrol, investigamos se esta enzima seria também capaz de inibir a produção de EROs induzida por este composto. Com essa finalidade, utilizamos o indicador celular permeável $H_2$DCFDA e observamos uma diminuição de aproximadamente 50% da produção de EROs quando a célula foi pré-incubada com a enzima e o resveratrol comparada com a MCF-7 que somente recebeu o tratamento com o resveratrol (**Figura 21**).

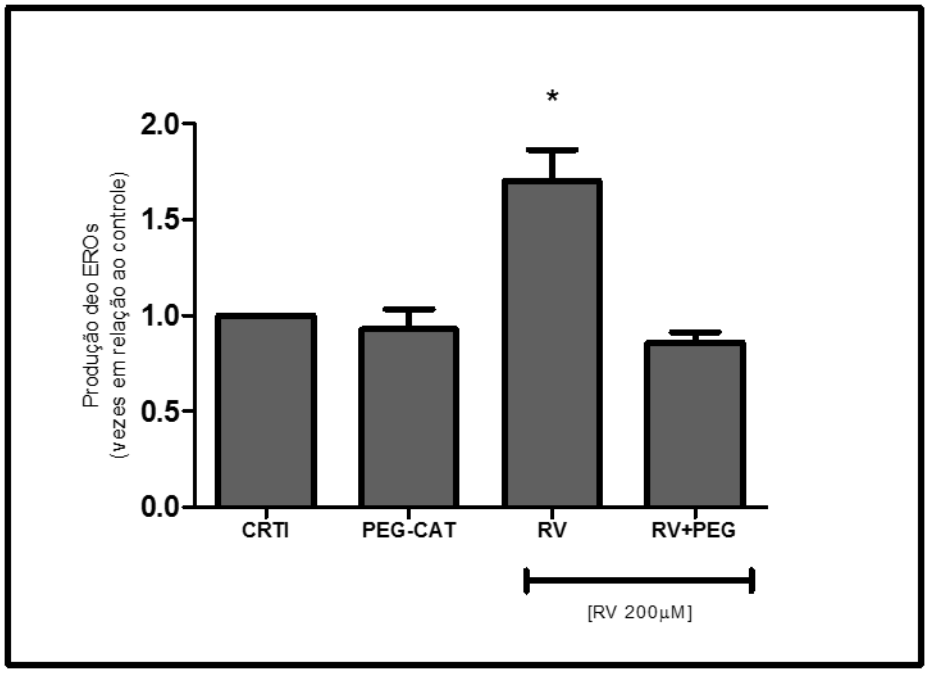


**Figura 21 – Produção de EROs em células MCF-7 tratadas com resveratrol e Peg-catalase**. Células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio D-MEM (com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de $CO_2$. O resveratrol 200 µM e a PEG-catalase 500 UI/ml foram adicionados, como mostrado na abcissa. As células foram incubadas por durante 24 horas e a produção de EROs mensurada utilizando $H_2$DCFDAOs valores representam médias EP (n=3). Os resultados são expressos por meio da comparação com o resultado controle. * $p \leq 0{,}01$em relação ao controle. CTRL = controle; RV = resveratrol; PEG-catalase = PEG- catalase.

### 4.4 Efeito do resveratrol sobre a atividade da CK2

Diferentemente da grande maioria das proteínas cinases, que se tornam ativas apenas em resposta a estímulos específicos, a CK2 é ativa constitutivamente mesmo sob condições normais e sem ganho de função. No entanto, a atividade da CK2 é anormalmente elevada em células de câncer, pois se acredita ser esse um fator importante capaz de gerar um ambiente favorável para o desenvolvimento da malignidade (Ruzzene *et al*., 2010). Sendo assim, a CK2 já foi descrita como alvo molecular para o tratamento de câncer e por isso avaliamos se a produção de EROs observada quando as células MCF-7 foram tratadas com resveratrol teria alguma relação com a atividade da CK2. Primeiramente avaliamos a atividade da CK2 nas células MCF-7 e em uma linhagem de células normais de mama HB2.

A **figura 22** mostra que a CK2 apresentou uma atividade duas vezes maior na célula de câncer MCF-7 quando comparada às células normais. Além disso, quando as células MCF-7 foram tratadas com resveratrol, por 24 horas, a atividade enzimática se equiparou com a das células normais.

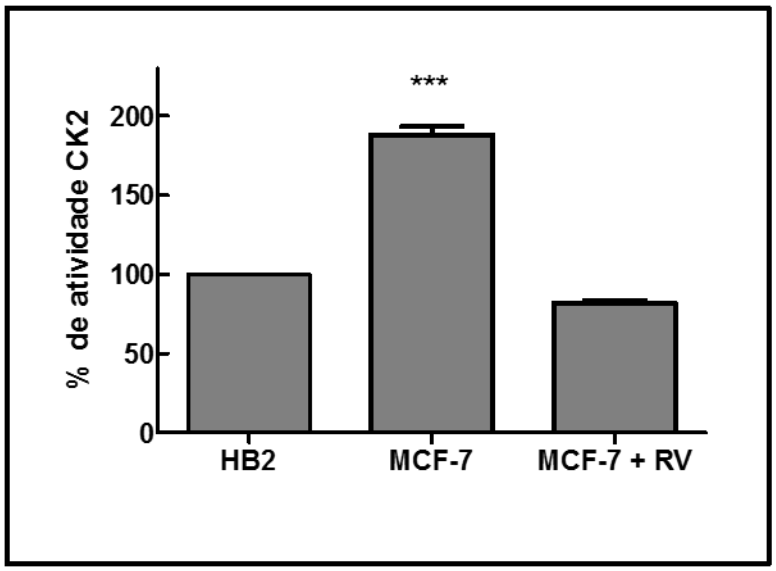


**FIGURA 22- Atividade da CK2 nas células MCF-7 e HB2**. As células MCF-7 foram pré-incubadas com 200 μM resveratrol ou veículo (dimetil sulfóxido, DMSO 0,5%) por 24 horas. A MCF-7 e a HB2 cultivada conforme descrito no item 3.2..Os extratos celulares foram obtidos e a atividade foi determinada utilizando CycLex ® CK2 activity Kit (MBL International, Woburn, MA). Os valores representam médias ± EP (n=3). *** $p \leq 0{,}001$ em relação a HB2. Rv= resveratrol

Em seguida, avaliamos o efeito do resveratrol sobre a atividade da CK2 nas células MCF-7 na presença ou ausência de PEG-catalase e verificamos que a enzima antioxidante foi capaz de manter a atividade da CK2 na presença de resveratrol, uma vez que o mesmo isolado é capaz de diminuir cerca de 50% da atividade da CK2. Considerando que o polifenol reduziu a atividade da CK2 e que essa redução não aconteceu quando a célula foi pré-incubada com a enzima antioxidante (**Figura 23**), sugerimos que as EROs, produzidas pelo composto, são responsáveis por modular a atividade da CK2 nas células de câncer de mama MCF-7.

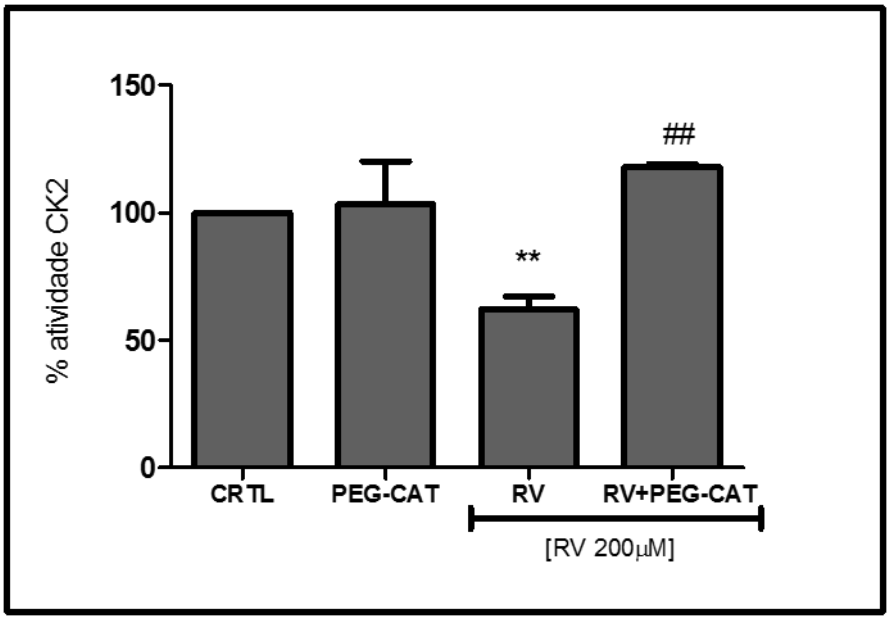


**FIGURA 23- Atividade da caseína cinase 2 (CK2) nas células MCF-7 tratadas com resveratrol por 24 horas na ausência e na presença de PEG-catalase**. As células MCF-7 foram pré-incubadas com 200 μM resveratrol na presença ou ausência de PEG-catalase 500 UI/ml ou veículo (dimetil sulfóxido, DMSO 0,5% (v/v)) por 24 horas. Os extratos celulares foram obtidos e a atividade determinada utilizando CycLex ® CK2 activity Kit (MBL International, Woburn, MA). Os valores representam médias ± EP, (n=3). ** $p \leq 0{,}001$ em relação ao controle ## $p \leq 0{,}001$ em relação ao resveratrol. CRTl= controle; PEG-catalase= PEG-catalase; RV= resveratrol.

### 4.5 Efeito do resveratrol sobre o ΔΨm da MCF-7

Em células de câncer de próstata foi demonstrado que a utilização de um inibidor de atividade de CK2, o TBB, causa alteração do potencial de membrana mitocondrial (Qaiser et al., 2014)). Assim, avaliamos o potencial de membrana mitocondrial das células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de resveratrol utilizando a sonda fluorescente JC-1.

Quando comparadas com as células controle (**Figura 24**), o resveratrol promoveu uma diminuição do ΔΨm em 3 ou 24 horas de incubação.

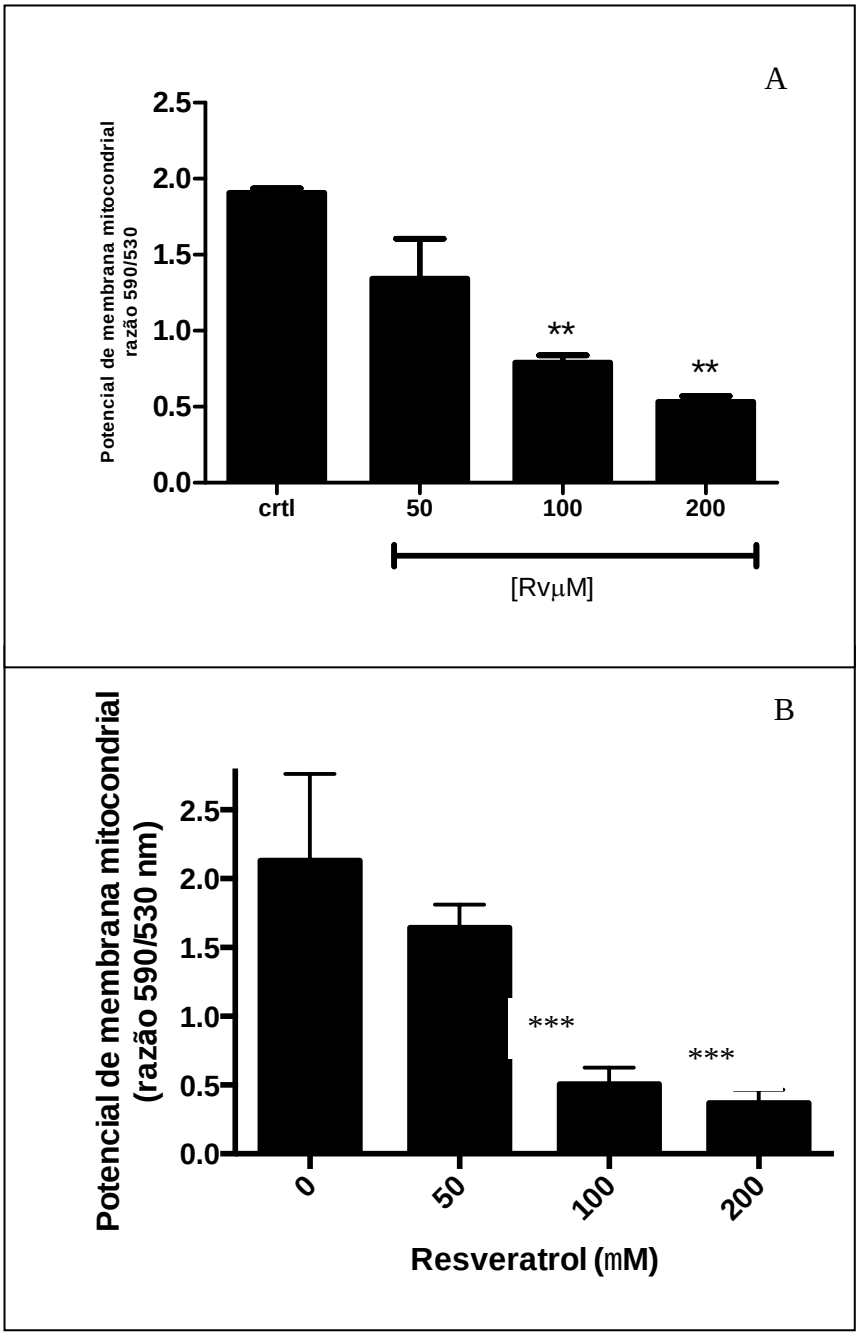


**Figura 24– Avaliação do potencial de membrana mitocondrial da célula MCF-7 tratada com diferentes concentrações de Resveratrol.** Células MCF-7 foram semeadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de $CO_2$. O resveratrol foi adicionado nas concentrações de 100 µM ou 200 µM e PEG-catalase adicionada em concentração de 500 UI/ml por 3 (A) ou 24 (B) horas. Os resultados estão expressos em valores absolutos da razão 590/530 em cada condição. Os valores representam médias ± EP (n = 3). ** $p \leq 0,05$ *** $p \leq 0,0,005$ em relação ao controle sem resveratrol (ANOVA). Rv= resveratrol

Em seguida, com o intuito de verificar se o aumento da produção de EROs estava relacionada à disfunção mitocondrial observada quando as células MCF-7 foram tratadas com resveratrol, a cultura celular foi tratada com resveratrol na presença ou ausência de PEG--catalase por 3 e 24 horas e realizado o ensaio com o JC-1. Com o resultado demonstrado na figura 25 verificamos que a PEG-catalase preveniu a diminuição do potencial de membrana mitocondrial das células MCF-7.

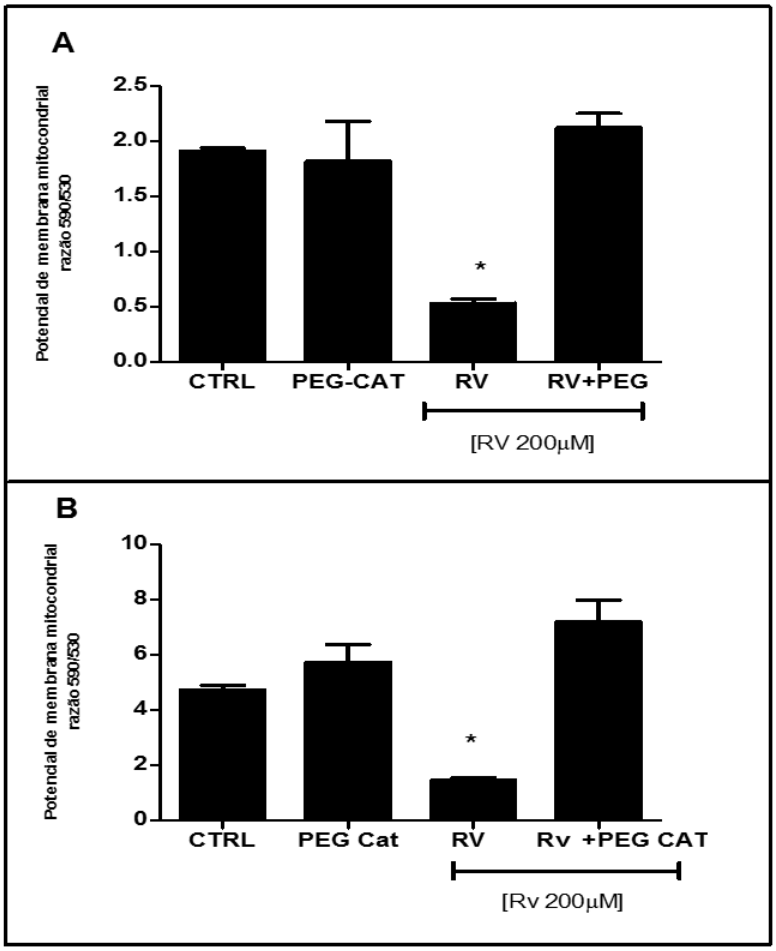


**Figura 25 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial das células MCF-7 tratadas com Resveratrol e/ou PEG-catalase** Células MCF-7 foram subcultivadas em placas de 96 poços em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de $CO_2$. O resveratrol foi adicionado na concentração de 200 µM e PEG-catalase adicionada em concentração de 500 UI/ml. As células foram incubadas durante 3 (A) e 24 (B) horas. Os resultados estão expressos em valores absolutos da razão 590/530 em cada condição. Os valores representam médias ± EP (n = 3). * $p \leq 0{,}01$ em relação ao controle. CRTl=controle; PEG-CAT= PEG-catalase; RV= resveratrol

### 4.6 Efeito do TBB na atividade da CK2 e a viabilidade das células MCF-7

O TBB é um conhecido inibidor de atividade de CK2 (compete com ATP no sítio catalítico da CK2) (Sarno *et al*, 2001). O próximo conjunto de resultados apresenta o efeito do TBB sobre a atividade da CK2 em células MCF-7 tratadas ou não com resveratrol.

Primeiramente, para confirmar se o TBB teria efeito sobre a atividade da CK2, tratamos as células MCF-7 com TBB por 24 horas. Verificamos que 100 µM de TBB inibiu a atividade da CK2 de forma similar ao tratamento com 200 µM de resveratrol (**Figura 26**).

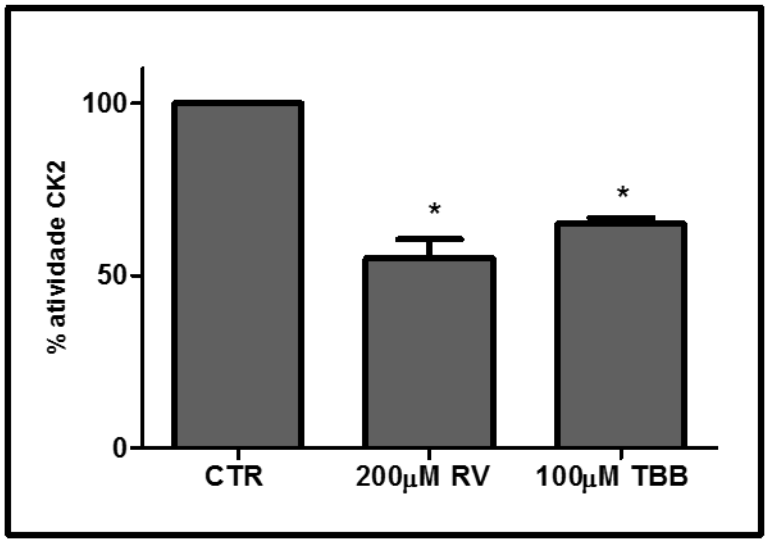


**FIGURA 26 - Atividade da CK2 nas células MCF-7 tratadas com TBB ou RV por 24 horas**. As células MCF-7 foram pré-incubadas com 100 µM de TBB ou 200 µM de resveratrol ou veículo (dimetil sulfóxido, DMSO 0,5%) por 24 horas. As células MCF-7 foram lisadas, e a atividade foi determinada utilizando CycLex ® CK2 activity Kit (MBL International, Woburn, MA). Os valores representam médias ± SE e estão expressos em relação ao controle sem resveratrol e TBB (n=3). * $p \leq 0{,}001$ em relação ao controle.

Em seguida, avaliamos a relação entre inibição da CK2 e viabilidade das células MCF-7. Com esse intuito, realizamos uma curva dose-resposta utilizando o TBB. A cultura de células foi incubada com concentrações crescentes de TBB (0-200 µM) por 24 horas. O resultado apresentou uma diminuição da viabilidade celular de uma maneira dose-dependente apresentando um $IC_{50}$ de 106 µM (**Figura 27**).

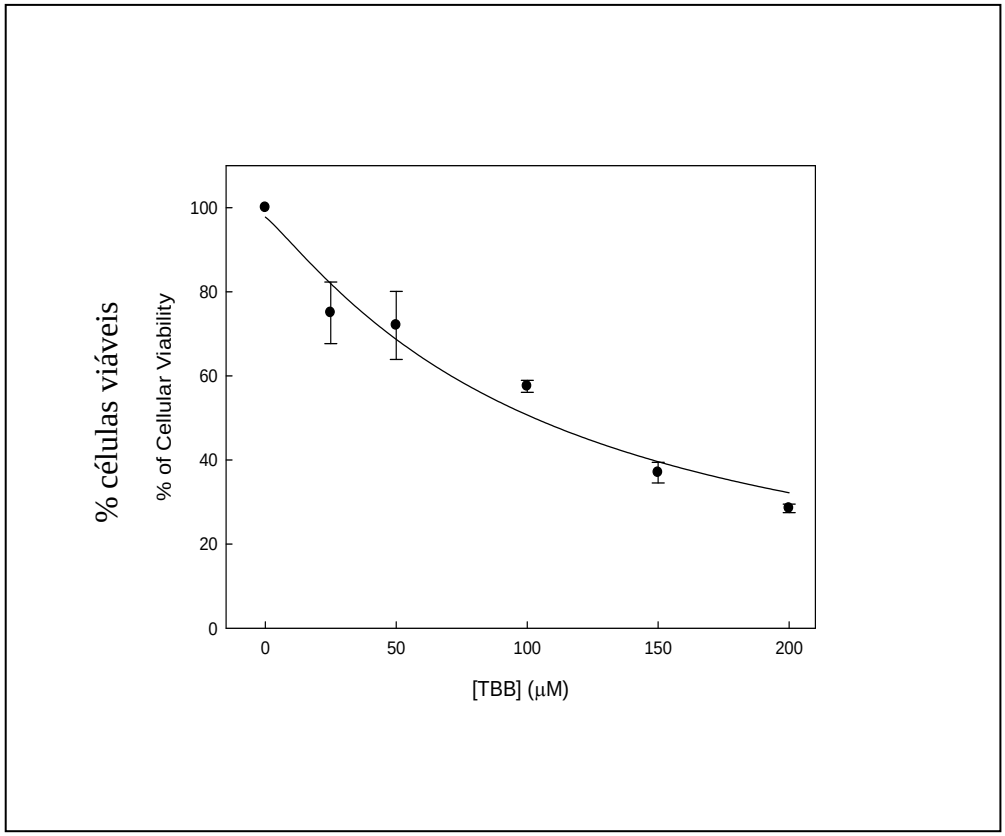


**FIGURA 27- Viabilidade de células MCF-7 tratadas com TBB.** As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços na presença de D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 3,7 g / L HEPES, 2,0 g / L $NaHCO_3$ e 5,0 µg de insulina / ml à 37 º C com atmosfera contendo 5% de $CO_2$. As células foram incubadas com diferentes concentrações de TBB por 24 horas. O ensaio de viabilidade foi realizado pelo método do MTT Os resultados são expressos em % do controle e os valores representam médias ± SE (n = 3) p. < 0,05

## 4.7 Efeito do TBB sobre a produção de EROs nas células MCF-7

Anteriormente sugerimos que o tratamento com resveratrol induziu ao aumento da produção de EROs e que esse efeito estaria relacionado com a inibição da atividade da CK2 na cultura de células MCF-7 Tendo em vista que o TBB é um inibidor específico da atividade da CK2 e que este composto reduziu a viabilidade das células MCF-7, avaliamos se o seu efeito inibitório igualmente ocorreu por meio da produção de EROs.

Desta forma, primeiramente tratamos as células com TBB, na concentração de 100 µM (próximo ao seu $IC_{50}$) por 3 ou 24 horas e em seguida utilizamos $H_2$DCFDA. Como observamos na figura 28, o TBB foi capaz de diminuir a produção de EROs em 3 horas (**Figura 28 A**) e em 24 horas gerou um pequeno aumento na produção de EROs, no entanto, não foi estatisticamente significativo (**Figura 28 B**).

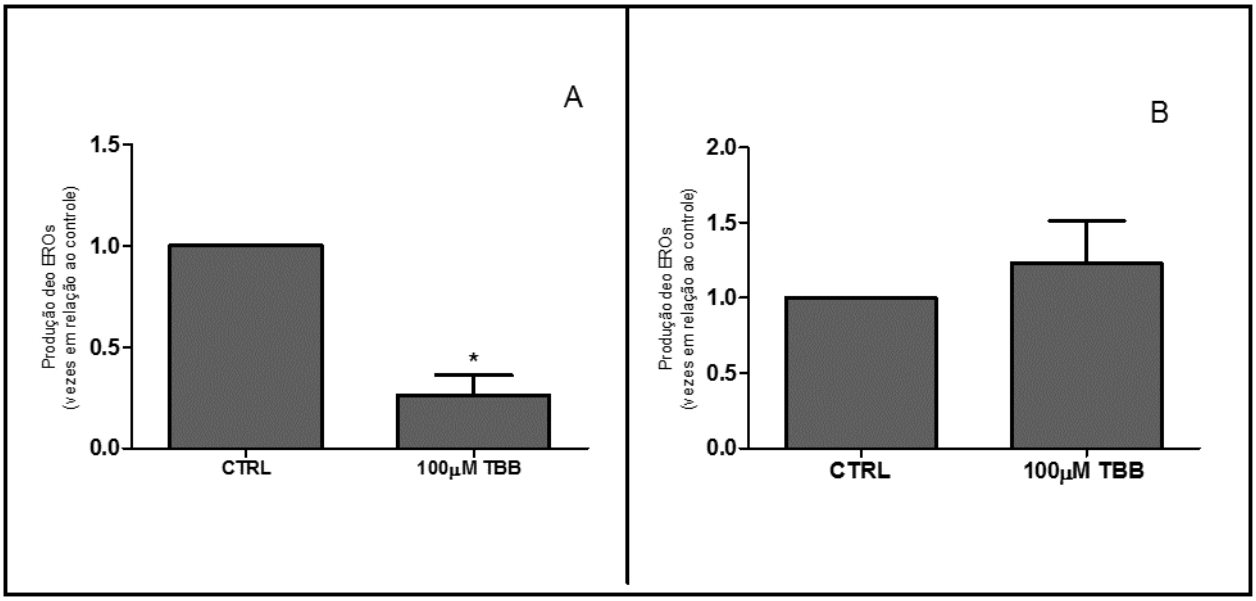


**FIGURA 28 – Produção de EROs nas células MCF-7 na presença de TBB**. As células MCF-7 foram plaqueadas em placa de 24 poços com meio D-MEM, 10% de soro fetal bovino, 2.0 g/L HEPES e 5.0 µg/ml insulina a 37ºC e atmosfera com 5% de $CO_2$. 100 µM de TBB foi adicionado e o ensaio de produção de EROs foi realizado com $H_2$DCFDA. (A) tempo de incubação 3h e (B) tempo de incubação 24 horas. Os valores representam médias ± SE (n=3). * $p \leq 0{,}001$ em relação ao controle. CRTL=controle

Não tendo sido observado um aumento na produção de EROs nas células MCF-7 incubadas com TBB por 24 horas, procuramos avaliar se a viabilidade destas células tratadas com TBB na concentração aproximadamente duas vezes maior do que seu $IC_{50}$ seria ou não influenciada na presença de antioxidantes e enzimas antioxidantes.

Com esse objetivo, pré-incubamos as células MCF-7 com NAC, em seguida realizamos o tratamento com TBB por 24 horas e por fim realizamos o ensaio de MTT. O TBB reduziu a viabilidade da MCF-7, contudo, o antioxidante em questão não protegeu a célula deste efeito (**Figura 29**).

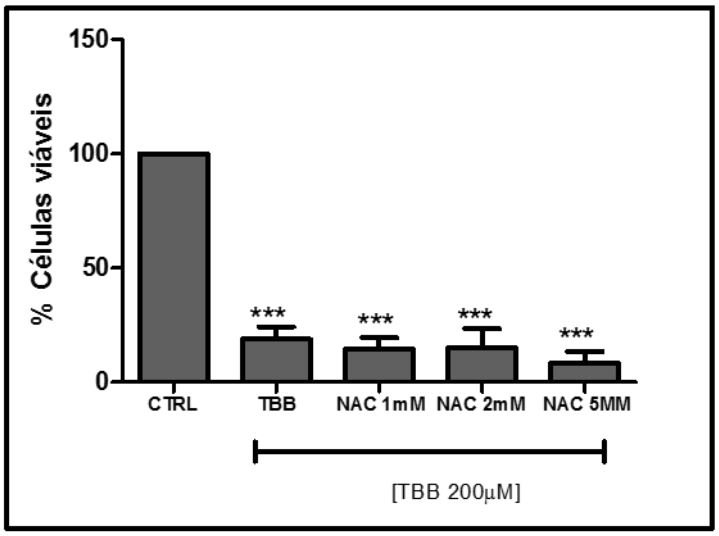


**FIGURA 29 – Viabilidade das células MCF-7 tratadas com NAC na ausência e presença de TBB.** As células MCF-7 foram plaqueadas em placa de 96 poços com meio D-MEM, 10% de soro fetal bovino, 2.0 g/L HEPES e 5.0 μg/ml insulina a 37ºC e atmosfera com 5% de $CO_2$. Foram adicionadas diferentes concentrações de NAC na presença de 200 μM de TBB por 24 horas. O ensaio de viabilidade foi realizado pelo método do MTT. Os valores representam médias ± EP (n=3) expressos em relação ao controle, sem TBB. *** $p \leq 0{,}005$ em relação ao controle. CTRL=controle

O passo seguinte foi verificar se outros antioxidantes ou enzimas antioxidantes apresentariam resultado semelhante ao NAC. Deste modo a cultura de células MCF-7 foi pré-incubada com GSH, catalase, posteriormente adicionado TBB por 24 horas e por fim, realizado o ensaio com o MTT. O TBB inibiu a viabilidade celular, porém o GSH, catalase, assim como o NAC, não protegeram as células do seu efeito (**Figuras 30 e 31**).

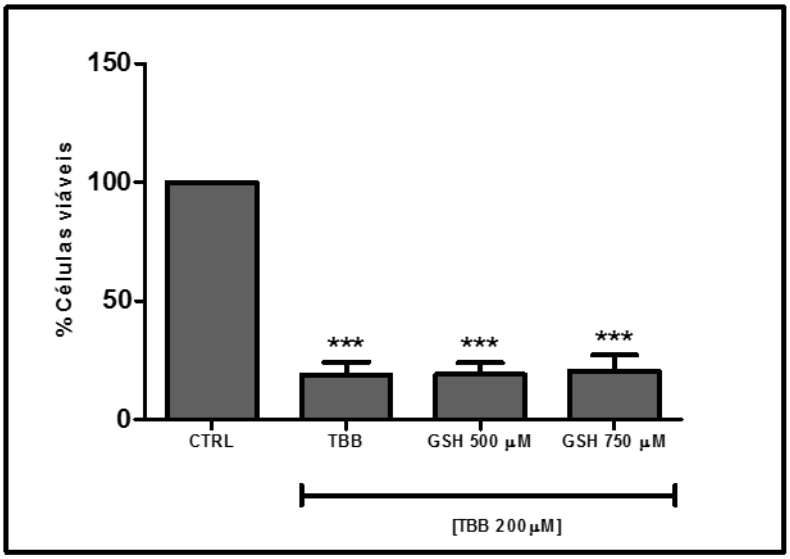


**FIGURA 30– Viabilidade das células MCF-7 tratadas com GSH na ausência e presença de TBB.** As células MCF-7 foram plaqueadas em placa de 96 poços com meio D-MEM, 10% de soro fetal bovino, 2.0 g/L HEPES e 5.0 µg/ml insulina a 37ºC e atmosfera com 5% de $CO_2$. Foram adicionadas diferentes concentrações de GSH na presença de 200 µM de TBB por 24 horas. O ensaio de e viabilidade foi realizado pelo método do MTT. Os valores representam médias ± EP (n=3). *** significativo em relação ao controle $p \leq 0{,}005$.

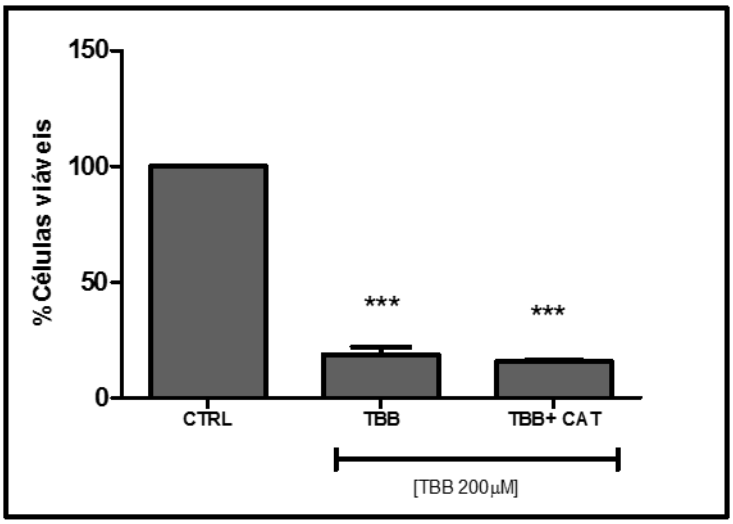


**FIGURA 31– Viabilidade das células MCF-7 tratadas com catalase na ausência e presença de TBB.** As células MCF-7 foram plaqueadas em placa de 96 poços com meio D-MEM, 10% de soro fetal bovino, 2.0 g/L HEPES e 5.0 µg/ml insulina a 37ºC e atmosfera com 5% de $CO_2$. Foi adicionado 500UI/ml na presença de 200µM de TBB por 24 horas. O ensaio de viabilidade foi realizado pelo método do MTT. Os valores representam médias ± EP (n=3). *** significativo em relação ao controle $p \leq 0{,}005$. CRTL= controle; CAT = Catalase

Como observamos que NAC e GSH e catalase não foram capazes de proteger a célula MCF-7 da ação de 200µM de TBB, avaliamos a viabilidade celular de MCF-7 tratadas com 100µM de TBB, concentração próximo a seu $IC_{50}$ (na presença ou ausência de PEG-catalase. O resultado da figura 32 demonstrou que a PEG-catalase da mesma forma que o NAC, GSH e catalase não protegeu a viabilidade celular da MCF-7 do efeito do TBB.

Esses dados indicam que, independente da concentração de TBB 100 µM (próximo a seu IC50) ou 200µM (semelhante a concentração utilizada no tratamento com resveratrol), os antioxidantes e enzimas antioxidantes utilizadas não protegeram a viabilidade da célula MCF-7.

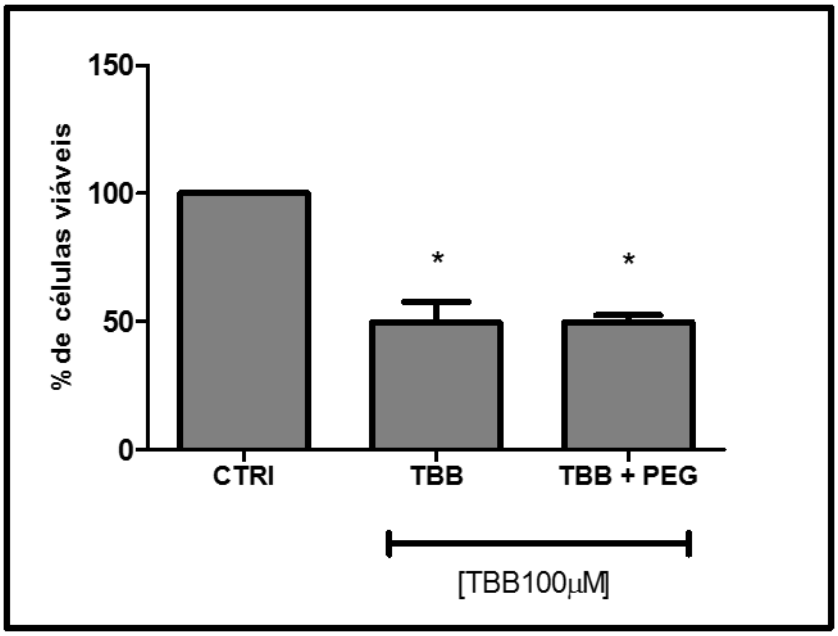


**Figura 32– Viabilidade das células MCF-7 tratadas com TBB e PEG-catalase.** Células MCF-7 foram semeadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de $CO_2$. O TBB foi adicionado nas concentrações de 100 µM e PEG-catalase adicionada em concentração de 500UI/ml. As células foram incubadas durante 24 horas. O ensaio de viabilidade foi realizado pelo método do MTT. Os resultados são expressos por meio da comparação com o resultado controle e os valores representam médias ± SE (n = 3). * significativo em relação ao controle $p \leq 0,05$. CTRL = Controle; PEg=PEG-catalase

### 4.8 Atividade da CK2 nas células MCF-7 tratadas com TBB e PEG-Catalase

A fim de verificar se o TBB poderia reduzir a atividade da CK2 em células de câncer de mama MCF-7 sem ter ocorrido produção de EROs, verificamos, nessas células, se a PEG-catalase seria capaz de proteger a atividade da CK2 do efeito do TBB.

Com esse intuito, as células MCF-7 foram tratadas com 100 µM de TBB na presença ou ausência de PEG-catalase por 24h e a atividade da CK2 foi mensurada. Verificamos que a inibição da atividade da CK2 após o tratamento com TBB persistiu mesmo quando a PEG-catalase foi utilizada em conjunto (**Figura 33**). Desta forma sugerimos que a inibição da CK2 pelo TBB não ocorre pela produção de EROs, ao contrário do que observamos na cultura de células tratada com resveratrol.

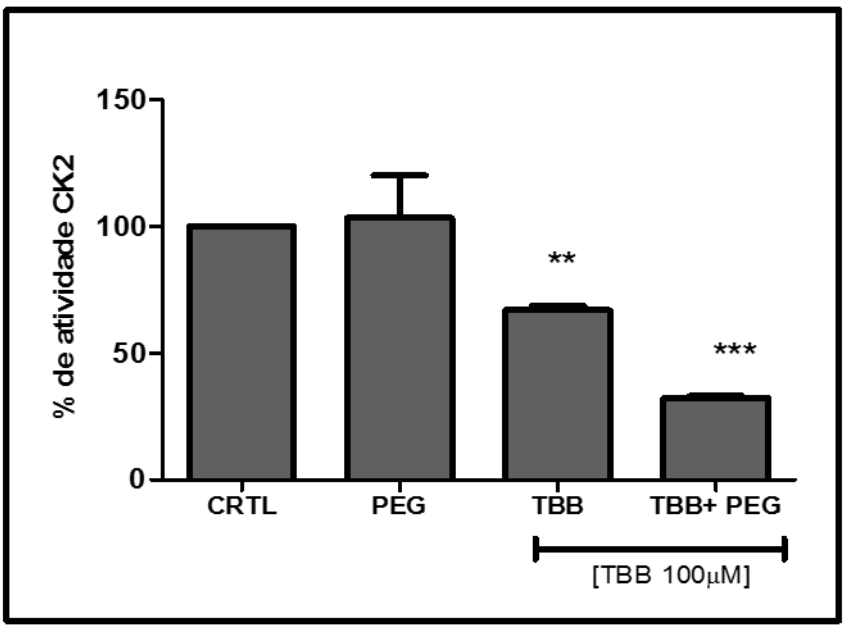


**FIGURA 33- Atividade da CK2 nas células MCF-7 tratadas com TBB por 24 horas na ausência e na presença de PEG-catalase**. As células MCF-7 foram pré-incubadas com 100 μM TBB na presença ou ausência de PEG-catalase 500 UI/ml ou veículo (dimetil sulfóxido, DMSO 0,5% (v/v)) por 24 horas. A atividade enzimática foi determinada utilizando CycLex ® CK2 activity Kit (MBL International, Woburn, MA). Os resultados são expressos por meio da comparação com o resultado controle e os valores representam médias ± EP (n = 3). ANOVA ***p*≤ 0,05 ***p≤0,005. CRTl= controle; PEg=PEG-catalase

### 4.9 Mensuração do potencial de ΔΨm das células MCF-7 tratadas com TBB

Como o resveratrol em células MCF-7 mostrou-se capaz de levar a produção de EROs que acarretou na diminuição da atividade da CK2 ocasionando diminuição do potencial de membrana mitocondrial **(ΔΨm)**, tornou-se imprescindível a mesma análise na célula tratada com TBB.

Verificamos que o TBB, assim como o resveratrol, interfere no **ΔΨm** tanto em 3 horas como em 24 horas, uma vez que o **ΔΨm** reduziu significativamente na presença de 100 e 200 μM de TBB (**Figura 34**).

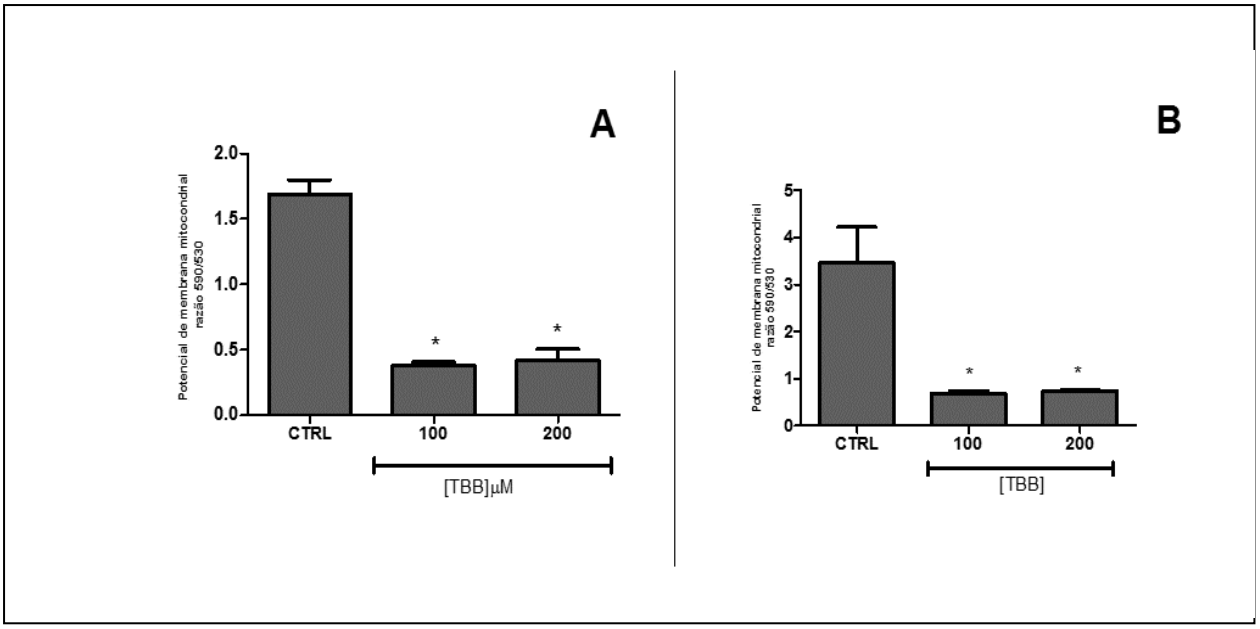


**Figura 34 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial das células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de TBB.** Células MCF-7 foram subcultivadas em placas de 96 poços em meio D-MEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de $CO_2$. O TBB foi adicionado nas concentrações de 100 µM ou 200 µM por 3 (painel A) ou 24 horas (painel B). Os resultados estão expressos em valores absolutos da razão 590/530 em cada condição. Os valores representam médias ± EP (n = 3). * $p \leq 0,05$ (ANOVA). CRTl=controle.

Contudo, buscando confirmar que o mecanismo pelo qual o resveratrol inibe a CK2 e causa alteração do potencial de membrana mitocondrial é diferente do atribuído pelo TBB, tratamos primeiramente as células MCF-7 com PEG-catalase e em seguida incubamos com TBB por 3 ou 24 horas. Como resultado (**Figura 35**), observamos que a PEG-catalase não foi capaz de inibir o efeito provocado pelo TBB nos dois tempos analisados.

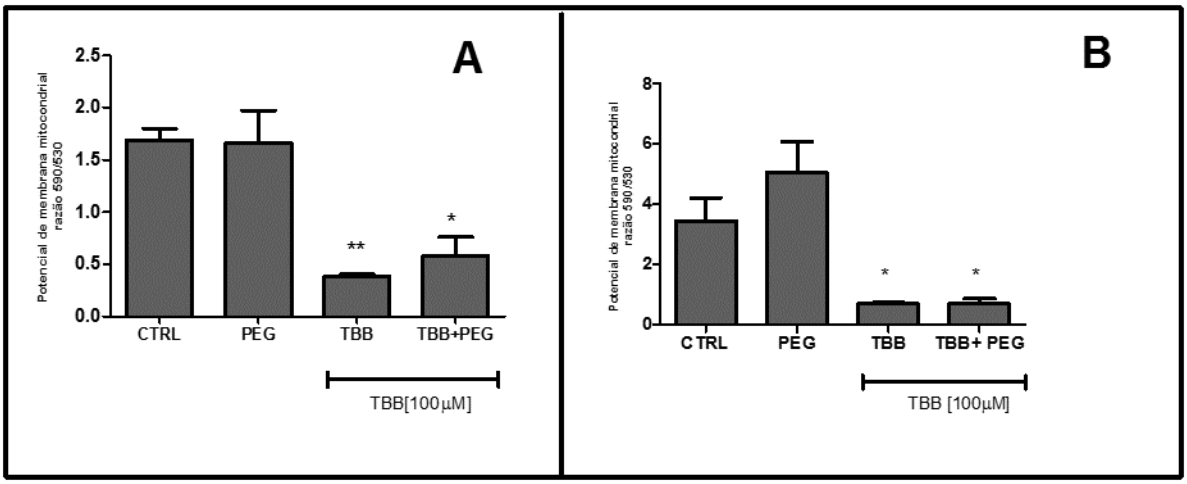


**Figura 35– Avaliação do potencial de membrana mitocondrial das células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de TBB na presença ou ausência de PEG-catalase.** Células MCF-7 foram subcultivadas em placas de 96 poços em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, 2,0 g/L de HEPES, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 5,0 ng/ml de insulina a 37 º C em ar umidificado contendo 5% de $CO_2$. A PEG-catalase (500 UI/ml) foi adicionada e em seguida as células foram incubadas com concentrações de 100 µM ou 200µM de TBB por 3 (painel A) ou 24 horas (painel B). Os resultados estão expressos em valores absolutos da razão 590/530 em cada condição. Os valores representam médias ± EP (n = 3). * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,005$ em relação ao controle (ANOVA). CRTL=controle; PEG=PEG-catalase

### 4.10 Análise da viabilidade oral e das propriedades moleculares e ADMET do resveratrol

Estudos recentes de intervenção clínica realizados com resveratrol são poucos e além disso, existem algumas discrepâncias entre os estudos *in vivo* com animais e ensaios (Park & Pezzuto, 2015) no entanto após demostramos um possível mecanismo do resveratrol sobre células de câncer de mama, o próximo passo foi confirmar o potencial deste composto em ser utilizado por via oral, encorajando assim mais futuros estudos *in vivo*,

Segundo Lipinski *et al*. (1997), um fármaco para ter boa biodisponibilidade oral deve satisfazer os seguintes parâmetros: peso molecular menor do que 500 g/mol; clogP menor do que 5; máximo de cinco grupos doadores de ligação hidrogênio; máximo de dez grupos aceptores de ligação hidrogênio. Esses parâmetros físico-químicos são associados com a solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal e compreendem os primeiros passos para uma boa biodisponibilidade oral. Essa condição é conhecida como “Regra dos Cinco”, porque para

cada um dos quatro parâmetros, os valores encontrados são próximos a cinco ou múltiplos de cinco.

Na análise *in sílico*, o resveratrol apresenta propriedades ADMET favoráveis e preencheu a "regra dos 5s" de Lipinski, mostrando ser bem absorvido, permeável, biodisponível e oralmente viável. Em relação à absorção, há probabilidade maior do que 50% do resveratrol ser permeável a barreira hemato-encefálica além de elevada probabilidade de ser absorvido no intestino humano e à linhagem de adenocarcinoma de cólon humano que mimetiza o epitélio gastrointestinal (Caco-2). Em relação à toxicidade, ele não se mostrou mutagênico, carcinogênico e com potencial de toxicidade aguda elevada (**Tabela 3**). .

| | Resveratrol | |
|---|---|---|
| | Resultado | Probabilidade (%) |
| | Absorção | |
| Barreira Hemato-encefálica | + | 59,0 |
| Absorção intestinal Humana | + | 99,5 |
| Permeabilidade em Caco-2 | + | 89,5 |
| | Toxicidade | |
| Toxicidade de AMES | Não tóxica | 84,1 |
| Carcinogênese | Não carcinogênica | 78,2 |
| Toxicidade oral aguda | III | 68,2 |
| | Descritores moleculares de Lipinski | |
| Número de aceptores ligantes de hidrogênio (HBA ≤ 10) 5 | 3 | |
| Número de doadores ligantes de hidrogênio (HBD ≤ 5) | 3 | |
| clogP (≤5) | 2,97 | |
| Peso molecular | 228,24 | |

**TABELA 3**: **Viabilidade oral, propriedades moleculares e propriedades ADMET do resveratrol**: clogP, logaritmo do coeficiente de partição entre n-octanol e água do composto. A toxicidade oral aguda de compostos foi classificada em quatro categorias com base no critério da EPA dos EUA. A categoria III inclui compostos com valores de DL50 superiores a 500 mg/kg, porém menores do que 5000 mg/kg.

# 5. Discussão

## 5 Discussão

Os alimentos vegetais são fontes valiosas para a triagem de metabólitos secundários bioativos com ações importantes contra várias doenças (Fulda, 2010). Muitos desses compostos naturais têm mostrado eficácia contra diferentes tipos de cânceres, representando uma grande oportunidade para o descobrimento de novos medicamentos nesta área (Cragg 2005; Yang & Piao, 2013). Dentre eles, os polifenóis vem recebendo grande destaque, tendo sido observada atividade contra câncer de pele, próstata colorretal, mama, entre outros (Chakrabarti & Jahandideh, 2014; Abbas *et al* 2013, Pampaloni *et al.*, 2014).

O resveratrol é um polifenol, presente abundantemente em frutas, oleaginosas e no vinho tinto, com variadas funções biológicas, como antinflamatório, antiviral e antioxidante (Kulkarni & Cantó, 2014). Contudo, pouca atenção foi conferida às suas propriedades quimiopreventivas e quimioterápicas, até que Jang e colaboradores (1997) descreveram sua capacidade em inibir o crescimento de células tumorais.

Atualmente, este composto foi descrito como indutor de parada do ciclo celular e apoptose em células de câncer de mama (Ferraz *et al.*, 2012; Casanova *et al*., 2012). Além disso, apesar dos polifenóis serem geralmente reconhecidos como antioxidantes, eles também foram relatados podendo atuar como pró-oxidantes, causando danos ao DNA (Khan *et al*, 2012; Kulkarni & Cantó, 2014).

Pesquisas realizadas *in vitro* mostraram o efeito antiproliferativo do resveratrol em células de câncer de próstata, no qual se verificou que o composto em questão foi capaz de inibir o crescimento tanto em células hormônio sensível, quanto independentes de androgênio. Da mesma forma, investigamos o efeito do resveratrol sobre a viabilidade celular de células de câncer de mama estrogênio positiva (MCF-7). Observamos primeiramente que o tratamento com diferentes concentrações do resveratrol (0-400 µM) diminuíram a viabilidade das células de maneira tempo e dose dependentes, apresentando um $IC_{50}$ de 238 µM para 24 horas e $IC_{50}$ de 151 µM para 48 horas. Outros trabalhos descreveram que, esse mesmo composto causou diminuição da viabilidade celular em outras linhagens de câncer de mama não responsiva a estrogênio (MDA MB231) além de bexiga, pulmão e sangue, entretanto, apresentando $IC_{50}$ distintos (Aziz *et al*., 2006; Morris *et al*., 2002; Bai *et al*., 2009; Nguyen, 2008).

Cabe ressaltar que em células normais rim de macaco (VERO) já foi mostrado que o resveratrol apresenta um efeito citotóxico menor do que observado nas células MCF-7

(Casanova *et al.*, 2012). Sendo assim, seu efeito citotóxico irá depender não somente do tempo e concentração, mas também do tipo e linhagem celular em questão.

Estudos epidemiológicos sugerem que dietas ricas em polifenóis são associadas a menores riscos de desenvolvimento de algumas doenças em humanos. Este efeito protetor muitas vezes é atribuído a atividade antioxidante desses compostos (Halliwell, 2008). Contudo, seu papel no estado redox pode depender da sua concentração, reação com outros componentes do meio de cultura como íons metal de transição, do número total de grupos hidroxila na estrutura molecular ou da natureza do estresse oxidativo (Lapidot *et al*, 2002;)

A epigalocatequina-3-galato (EGCG), um dos principais polifenóis constituintes do chá verde, foi capaz de suprimir a proliferação de células de linfoma de Burkitt e induzir a apoptose devido ao aumento da produção de EROs intracelular (Noda *et a*l., 2007). Igualmente, em diferentes linhagens de células de câncer de pulmão, o resveratrol foi capaz de produzir EROs e causar dano ao DNA (Luo, 2013). Tal como ocorreu em células de câncer de pulmão, observamos, na cultura de células de câncer de mama MCF-7 tratada com 200 µM resveratrol, um aumento significativo na produção de EROs quando o tratamento foi realizado por 24h. Porém, em 3 horas de tratamento com resveratrol não observamos aumento da concentração de EROs

Interessantemente já foi descrito que os polifenóis podem atuar como pró-oxidantes também devido à presença de níveis elevados de íons metálicos, como cobre, em células cancerosas (Khan *et al.*, 2012). Este fato favorece a transferência de elétrons entre esses íons e polifenóis gerando EROs. Consequentemente, esse mecanismo quimiopreventivo pró-oxidante pode ser comum para vários polifenóis mesmo que tenham diferentes estruturas químicas, além de explicar a citotoxicidade preferencial destes compostos em relação às células normais (Khan *et al*, 2013).

N- acetilcisteína (NAC) é um derivado de cisteína com um grupo acetil ligado ao seu átomo de nitrogênio podendo ser oxidado por uma grande variedade de radicais, além de ter a capacidade de aumentar os níveis de glutationa (GSH). A GSH é um tripéptido, γ-L-glutamil-L-cisteinilglicina, presente em todos os tecidos de mamíferos sendo o principal mecanismo de defesa antioxidante contra EROs (Shelly *et al.*, 2013; Ribas *et al.*, 2014). Desta forma, tanto o NAC quanto o GSH, têm sido utilizados para investigar sensibilidade redox de processos biológicos ou patológicos (Zafarullah *et al.*, 2013). Sendo assim, se a elevação observada nos níveis de EROs nas células MCF-7 tratadas com resveratrol fosse responsável pela diminuição da viabilidade celular, a pré-incubação com esses antioxidantes poderia evitar o efeito promovido pelo composto. Primeiramente, o NAC e GSH foram empregados em

diferentes concentrações na cultura celular e observamos que os mesmos não interferiram sobre a viabilidade da célula estudada. Em seguida esses mesmos antioxidantes foram adicionados à cultura celular juntamente com o resveratrol protegendo-a do efeito citotóxico deste composto bioativo, confirmando que a viabilidade foi suprimida em decorrência da produção de EROs.

As células de mamíferos apresentam outro eficiente mecanismo antioxidante composto pela catalase, capaz de depurar o peróxido de hidrogênio transformando-o em oxigênio e água (Schrader & Fahimi, 2006). Com a finalidade de analisar se as EROs geradas pelo resveratrol nas células MCF-7 era $H_2O_2$, verificamos se a catalase, igualmente ao NAC e GSH, inibiria a ação do resveratrol. Entretanto, a catalase não foi capaz de proteger do efeito promovido pelo resveratrol na viabilidade celular. Contudo, a catalase não pode penetrar nas membranas celulares, tendo sua ação restrita à conversão em água de peróxido de hidrogênio extracelular e por consequência, esse fato indicou que a produção de EROs observada poderia ser intracelular. Por isso utilizamos em seguida a polietilenglicol catalase (PEG-catalase).

O polietileno glicol torna enzimas como a catalase mais permeáveis à membrana plasmática, facilitando sua a passagem para o meio intracelular. A incubação das células MCF-7 com PEG-catalase por 24 horas não alterou sua viabilidade. Adicionalmente, a pré-incubação com PEG-catalase antes da adição do resveratrol protegeu a cultura de células do efeito citotóxico da molécula bioativa. Por fim, confirmamos que a produção de EROs nas células MCF-7 igualmente pré tratada com PEG-catalase, seguidas da adição de resveratrol foi equivalente à produção verificada nas células controle que, por sua vez, foi quase duas vezes menor do que a conferida na célula tratada apenas com resveratrol. Estes resultados sugerem que a EROs produzida pelo resveratrol (possivelmente peróxido de hidrogênio) estariam causando a diminuição da viabilidade celular das células MCF-7 assim como observado em diferentes linhagens de células de câncer de pulmão (Luo, 2013).

A CK2, enzima chave envolvida em eventos como proliferação e apoptose celular, já foi referida como sendo inibida por peróxido de hidrogênio (Ryu, *et al*, 2006). Desta forma, no presente estudo buscamos avaliar em células de câncer de mama MCF-7, o efeito do resveratrol sobre a produção de espécies reativas de oxigênio EROs e sua relação com a modulação da atividade da caseína cinase 2. Essa cinase é amplamente distribuída em todos os organismos eucariotos, presente em vários compartimentos celulares, que atua fosforilando e interagindo com várias proteínas (Litchfield *et al*, 2003). Ela é conhecida por participar de processos fundamentais como proliferação e morte celular, assim como interagir com múltiplas vias de sinalização e apresenta atividade elevada em uma ampla variedade de

tumores como de próstata, cabeça e pescoço, entre outros (Faust *et al*., 1996, Kim *et al*., 2007). Comparando a atividade da CK2 em uma linhagem de célula normal de mama HB2 com a linhagem de célula de câncer de mama MCF-7, constatamos que ela era duas vezes maior na célula cancerosa, corroborando com o que já foi observado em outros tipos celulares.

Fortes indícios indicam que esta enzima atua controlando as células de câncer por criar um ambiente favorável e assim proporcionar o crescimento neoplásico em vários aspectos (Ruzzene *et al*, 2010). Sua atividade elevada é capaz de aumentar o potencial transformador de oncogênes e neutralizar a eficácia de drogas antitumorais conhecidas, como por exemplo o melfalan. Da mesma forma, proporciona suporte a angiogênese e o mais importante, gera um amplo espectro de sinais pró-sobrevivência cuja vantagem seletiva é particularmente evidente para aqueles tumores cujo fenótipo é largamente dependente de defeitos apoptóticos (Hanahan *et al*, 2002). Desta forma, a CK2 tem se destacado como um alvo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos contra câncer e consequentemente estratégias diferentes têm sido utilizadas para inibir a CK2 (Garay & Gray, 2014).

Nessa tese mostramos que nas células MCF-7, o resveratrol foi capaz de produzir EROs quando realizada a incubação do composto a cultura por 24h. Da mesma forma já foi demonstrado que peróxido de hidrogênio reduz a atividade da CK2 (Ryu, *et al.*, 2006). Nesse contexto, observamos que o resveratrol foi capaz de diminuir a atividade da enzima. Corroborando com este resultado, observamos que, ao pré incubar as células MCF-7 com PEG-catalase, antes de adicionarmos o resveratrol, com o intuito de inibir a produção de EROs, a atividade da enzima CK2 foi preservada do efeito do composto bioativo. Estes resultados sugerem que o EROs produzido nas células MCF-7 incubadas com resveratrol ocasionou a diminuição da atividade da CK2, consequentemente reduzindo a viabilidade celular.

Já é conhecido que a CK2 pode estar localizada tanto em frações nucleares quanto citoplasmáticas da célula e que esta localização depende do estado em que a enzima se encontra. Somando-se a este fato, resultados recentes indicaram, em células de próstata, a presença da CK2 também em mitocôndrias. Além disso, foi sugerido que a CK2 mitocondrial possui um papel na regulação da permeabilidade da mitocôndria e consequentemente, no $\Delta\Psi m$ (Qaiser *et al*, 2014).

Desde a descoberta de que alterações na membrana interna mitocondrial representa um passo crítico na regulação da via apoptótica intrínseca, as mitocôndrias têm sido vistas como organelas importantes no que se refere ao controle, morte celular, bem como vários aspectos

da sobrevivência da célula (Galluzz, 2014). Com o propósito de verificar se a inibição da atividade da CK2 ocorrida na presença de resveratrol causou nas células MCF-7, utilizou-se a sonda fluorescente JC-1 sabendo-se que, se concentra de forma agregada na mitocôndria viável quanto maior o ΔΨm. Assim, como relatado em células de câncer de próstata, onde inibidores de atividade de CK2 como o TBB causaram dissipação do ΔΨm após duas horas de tratamento (Qaiser *et al*, 2014), o resveratrol causou uma diminuição acentuada do ΔΨm nas células tratadas tanto por 3 como por 24h com o polifenol.

Previamente discutimos que o resveratrol inibiu a atividade da CK2 por aumentar os níveis de EROs celulares EROs e já foi descrito que a diminuição da atividade da CK2 causa diminuição do ΔΨm em linhagens de células de câncer de próstata (Qaiser *et al*., 2014). Sendo assim, foi plausível avaliarmos se a PEG-catalase protegeria o potencial de membrana mitocondrial da célula MCF-7 tratada com resveratrol EROs. Para isso, pré incubamos com PEG-catalase por 30 minutos e em seguida adicionamos resveratrol por 3 e 24 horas. Como resultado, verificamos que a enzima antioxidante conseguiu evitar a redução do ΔΨm nos dois tempos. Desta forma, os indícios de que as EROs levaram a redução do ΔΨm da célula MCF-7 por causar diminuição da atividade da CK2 foram reforçados.

Métodos que modulam a CK2 podem causar morte celular por diferentes vias, portanto o mecanismo dependerá do fator que causou a inibição. Esta observação nos levou a analisar se existem variações na resposta intracelular após tratamento das células MCF-7 com resveratrol e o conhecido inibidor de CK2, o TBB. De modo semelhante ao observado com o polifenol, o TBB também reduziu a viabilidade das células de câncer de mama de maneira dose dependente, assim como reduziu a atividade da CK2. Contudo, a PEG- catalase, não protegeu a atividade enzimática do efeito do TBB, sugerindo que a produção de EROs responsável pela inibição da CK2 pelo resveratrol poderia não ser a responsável pela inibição da enzima quando o tratamento fora realizado com o TBB.

Schneider e colaboradores (2009) detectaram em células de câncer de próstata, a diminuição da atividade da CK2 por TBB e outro conhecido inibidor, o 2-dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol (DMAT). Nos dois casos, essa inibição foi acompanhada igualmente por redução na viabilidade celular e fragmentação do DNA. Entretanto foi detectado que o TBB, ao contrário do DMAT, não induziu produção de EROs. Ao mensurarmos a produção de EROs na célula MCF-7 tratada com TBB por 3h verificamos uma redução da mesma. Adicionalmente, após 24 horas de incubação não se observou aumento de EROs reforçando a hipótese de que o resveratrol e o TBB podem inibir a atividade da CK2 por mecanismos distintos. Somando-se a esse fato, na MCF-7 tratada com

TBB também não constatamos proteção da viabilidade desta célula pré-incubada com NAC, GSH, catalase e PEG-catalase. Além disso, mesmo tendo sido observado que semelhante ao resveratrol, o TBB também reduziu o ΔΨm, em 3 e 24 horas após o tratamento, a PEG-catalase não foi capaz de impedir a ação deste inibidor de CK2. Consequentemente, os presentes resultados mostram que as duas moléculas, o TBB e o resveratrol, induzem diferentes vias de sinalização na célula, mesmo que atuem igualmente inibindo a atividade da mesma enzima, causando diminuição do ΔΨm e levando a morte celular.

Contudo, antes de usar o resveratrol como um inibidor de CK2 na terapia do câncer faz-se também necessário se atentar aos efeitos secundários tóxicos, principalmente se a proposta é conseguir uma alternativa terapêutica a já existente. Assim, outro resultado bastante interessante que obtivemos foi que o polifenol exibiu propriedades ADMET favoráveis e preencheu a "regra dos 5" de Lipinski. A análise das propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) desempenha um papel fundamental na descoberta de candidatos a fármacos, pesticidas e produtos químicos industriais, e na avaliação de seus perigos ambientais. O banco de dados de relação estrutura-atividade AdmetSAR fornece os mais recentes e abrangentes dados de diversos produtos químicos relacionados à esta propriedade, sendo muito útil para triagem *in silico* de candidatos a medicamentos (Cheng *et al*, 2012).

Por questões de conveniência e segurança, a via de administração oral de fármacos é preferencial. Após a administração, o fármaco deve se dissolver e ser solubilizado no trato gastrointestinal para poder ser absorvido através da membrana intestinal. Entre as propriedades moleculares que influenciam a absorção destacam-se a solubilidade e a lipofilia (associada ao coeficiente de partição octanol/água - clogP). Em relação à absorção, há elevada probabilidade do resveratrol ser permeável a barreira hemato-encefálica, ao intestino humano e à linhagem de adenocarcinoma de cólon humano que mimetiza o epitélio gastrointestinal (Caco-2).

A "regra dos 5" de Lipinski afirma que a má absorção ou penetração é mais provável quando: há mais de 5 doadores ligantes de hidrogênio (HBD) (o resveratrol tem 3); o peso molecular do composto é superior a 500 (o do resveratrol é 228,24); o clogP é inferior a 5 (o do resveratrol é 2,97) e há mais de 10 receptores ligantes de hidrogênio (Halliwell, *et al.*) (o resveratrol tem 3). Classes de compostos que são substratos para transportadores biológicos são exceções à regra (Lipinski et al., 2001). O resveratrol enquadrou-se positivamente em todos os critérios de Lipinski, mostrando ser bem absorvido, permeável, biodisponível e oralmente viável.

Além disso, na avaliação *in silico*, o resveratrol não mostrou ser mutagênico, carcinogênico e ter toxicidade oral aguda elevada. Estes dados, juntos aos resultados de atividade dose-dependente *in vitro*, nos entusiasmam em propor o resveratrol como um composto suplementar no tratamento do câncer podendo então encorajar estudos *in vivo* e futuramente ensaios clínicos.

# 7. Conclusão

## 7. CONCLUSÃO

- O resveratrol e o TBB apresentam efeito citotóxico em células de carcinoma mamário Humano MCF-7.

- O pré-tratamento com o NAC, GSH e PEG- catalase protegeu as células MCF-7 do efeito do resveratrol sobre a sua viabilidade, o mesmo não foi observado quando o Resveratrol foi substituído pelo TBB.

- Observamos aumento na produção de e EROS em 24 horas de tratamento com o resveratrol, aproximadamente duas vezes maior do que na célula controle, o mesmo não observamos com o TBB.

- Observamos diminuição da produção de EROs causada pelo resveratrol quando as células foram pré-incubadas com a PEG-catalase.

- A atividade de CK2 foi duas vezes maior nas células MCF-7 do que a célula HB2 e quando a mesma foi tratada com resveratrol, por 24 horas, a atividade se equiparou com a célula normal.

- A inibição da atividade da CK2 pelo TBB na MCF-7 foi semelhante quando utilizou o resveratrol.

- A PEG-catalase protegeu a atividade da CK2 na MCF-7 tratada com Resveratrol, mas não com TBB.

- Quando comparadas com as células controle, o resveratrol e o TBB mostraram disfunção mitocondrial, em 3 e 24 horas de tratamento.

- Verificamos que a PEG-catalase protegeu o potencial de membrana mitocondrial da MCF-7 tratada com o resveratrol e não com o TBB.

- Na avaliação *in silico*, o resveratrol exibiu propriedades ADMET desejáveis e preencheu a "regra dos 5” de Lipinski, mostrando ser bem absorvido, permeável e um composto oralmente viável.

Baseado nas conclusões realizamos um esquema do mecanismo de ação do resveratrol em células de carcinoma humano MCF-7 **(Figura 36).** Desta forma propomos que, o resveratrol causa um desbalanço redox com um aumento da concentração de EROs, levando a inibição da atividade da CK2, causando perda do potencial de membrana mitocondrial culminando com a diminuição da viabilidade celular. Por outro lado, o TBB inibe a atividade da CK2, alterando o potencial de membrana mitocondrial e reduzindo a viabilidade celular, contudo sem o envolvimento de EROS. Somando-se aos resultados *in silico* podemos inferir o potencial desse polifenol como uma possível ferramenta para o tratamento do câncer de mama.

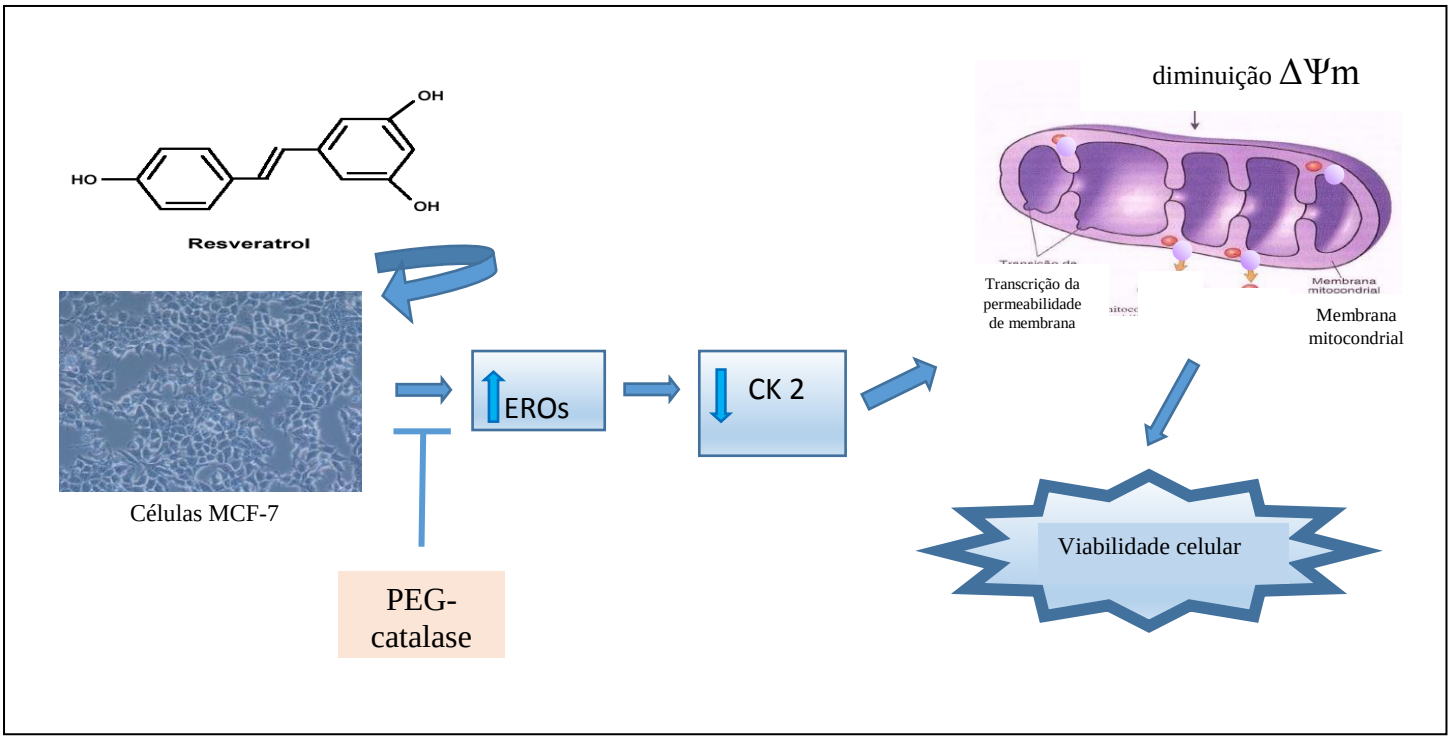


**Figura 36** – Mecanismo de ação proposto do resveratrol em células MCF-7 associando EROs e CK2.

# 8.Referências Bibliográficas

Abbas, A., Patterson, W. 3rd, Georgel, P.T. (2013). “The epigenetic potentials of dietary polyphenols in prostate cancer management.” Biochem Cell Biol. 91(6):361-8.

Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S. and Takada, Y. (2004). "Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies." Anticancer Res., 24, 2783- 2840.

Ahmad, K.A, Wang G., Ahmed K. (2006). “Intracellular hydrogen peroxide production is an upstream event in apoptosis induced by down-regulation of casein kinase 2 in prostate cancer cells.”Mol Cancer Res; 4(5):331-8.

Ahmad, K.A., Harris N.H., Johnson A.D., Lindvall H.C., Wang G., Ahmed K. (2007). “Protein kinase CK2 modulates apoptosis induced by resveratrol and epigallocatechin-3-gallate in prostate cancer cells.” Mol Cancer Ther.; 6(Abbas, *et al.*): 1006-12.

Ahmed, K. (1999) “Nuclear matrix and protein kinase CK2 signaling.” Crit Rev Eukaryot Gene Expr. ; 9 (3-4):329-36.

Ahmed, K, Gerber DA, Cochet C. (2002). “Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2.”Trends Cell Biol.; 12(5):226-30.

Amri, A., Chaumeil, J.C., Sfar, S., Charrueau, C. (2012). “Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations?” J Control Release. 10(2):182-93.

Athar, M.; Back, J. H.; Kopelovich, L.; Bickers, D. R.; Kim, A. L. (2009). “Multiple Molecular Targets of Resveratrol: Anti-Carcinogenic Mechanisms.” Archives of Biochemistry and Biophysics, 486, 95–102.

Athar, M.; Back, J. H.; Tang, X.; Kim, K. H.; Kopelovich, L.; Bickers, D. R.; Kim, A. L.(2007). “Resveratrol: A Review of Preclinical Studies for Human Cancer Prevention.” Toxicol. Appl. Pharmacol., 224, 274–283.

Aziz, M. H.; Nihal, M.; Fu, V. X.; Jarrard, D. F.; 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.

Bai, Y., Mao Q.Q., Qin J. Zheng X.Y., Wang Y.B., Yang K., Shen H.F., Xie L.P. (2009) “Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo.” Cancer Sci.; 101(2):488-93.

Baur, J. A. and D. A. Sinclair (2006). "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence." Nat Rev. Drug Discov 5(6): 493-506.

Béliveau, R. and Gingras, D. (2007). Os alimentos contra o câncer: A prevenção e o tratamento do câncer pela alimentação. Rio de Janeiro, Editora Vozes

Bertelli, A.A., Das, D.K.J (2009). “Grapes, wines, resveratrol, and heart health.” Cardiovasc Pharmacol.54 (6):468-76.

Bertelli, AA, Giovannini, L, Stradi, R, Urien, S, Tillement, JP, Bertelli, A. (1996). “Kinetics of trans- and cis-resveratrol (3, 4’, 5-trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats.”

Block, K. I.; Koch, A. C.; Mead, M. N.; Tothy, P. K.; Newman, R. A.; Gyllenhaal, C. ( 2008) “Impact Of Antioxidant Supplementation On Chemotherapeutic Toxicity: A Systematic Review Of The Evidence From Randomized Controlled Trials”. Int J Cancer, 123, 1227–1239.

Boehm, J.S. and Hahn, W.C. (2005). "Understanding transformation: progress and gaps." Curr Opin Genet Dev 15(1): 13-17.

Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J. Jr., Krause, K.H. (2012). “Reactive oxygen species: from health to disease.” Swiss Med Wkly. 17, 142.

Buchou T., Vernet M., Blond O., Jensen H.H., Pointu H., Olsen B.B., Cochet C., Issinger O.G., Boldyreff B.( 2003). ‘Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality” Mol Cell Biol. 23(Abbas *et al.*): 908-15.

Cairns, R.A., Harris I.S., Mak T.W. (2011). “Regulation of cancer cell metabolism.” Nature Reviews Cancer; 11:85–95.

Casanova, F., Quarti, J., da Costa, D.C., Ramos, C.A., da Silva, J.L, Fialho, E.(2012) “Resveratrol chemosensitizes breast cancer cells to melphalan by cell cycle arrest”. J Cell Biochem. 113.

Chakrabarti, Jahandideh, F., Wu, J. (2014). “Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress.” Biomed Res Int. Epub 1-11.

Chen, R., Zhong, Z., Shi, Z., Chen, M., Wang, Y. (2014). “Epigallocatechin-3-gallate potentiates the effect of curcumin in inducing growth inhibition and apoptosis of resistant breast cancer cells.” Am J Chin Med.; 42(5):1279-300.

Chen, W., Sun Z., Wang X.J., Jiang T., Huang Z., Fang D., (2009). “Direct interaction between Nrf2 and p21 (Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. Molecular Cell; 34:663–73

Coseri S. (2009) “Natural products and their analogues as efficient anticancer drugs.” Mini Rev Med Chem.; 9(5):560-71.

Cragg G.M., Newman D.J. (2005). “Plants as a source of anti-cancer agents.” J Ethnopharmacol. 22; 100(1-2):72-9.

Cucciolla, V., A. Borriello, A. Oliva, P. Galletti, V. Zappia and F. Della Ragione (2007). "Resveratrol: from basic science to the clinic." Cell Cycle 6(20): 2495-2510.

Das, S. and D. K. Das (2007). "Anti-inflammatory responses of resveratrol." Inflamm Allergy Drug Targets 6(Abbas *et al.*): 168-173.

Dollery, C. (1993). “Therapeutic Drugs”. N. Engl. J. Med. 328

Duffy, M.J., (2013) “The war on cancer: are we winning?” Tumor Biol ;34(Abbas *et al.*): 1275-84.

Dulak J. (2005). “Nutraceuticals as anti-angiogenic agents: hopes and reality.” J Physiol Pharmacol.; 56, 1:51-67.

Fabris, S., Momo, F., Ravagnan, G. and Stevanato, R. (2008). "Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes." Biophys Chem 135(1-3): 76-83.

Faust, R.A., Gapany, M., Tristani, P., Davis, A., Adams, G.L., Ahmed, K. (1996). “Elevated protein kinase CK2 activity in chromatin of head and neck tumors: association with malignant transformation.” Cancer Lett. ; 101(1):31-5.

Ferraz ,da Costa D.C., Casanova, F.A., Quarti, J., Malheiros, M.S., Sanches, D., Dos Santos, P.S., Fialho, E., Silva, J.L.,(2012) “Transient transfection of a wild-type p53 gene triggers resveratrol-induced apoptosis in cancer cells.” PLoS One.7(11):48746.

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, 1a Edição, 2010, 555-571.

Fremont, L., Gozzelino, M.T. and Linard, A. (2000). "Response of plasma lipids to dietary cholesterol and wine polyphenols in rats fed polyunsaturated fat diets." Lipids 35(9): 991-999.

Fulda, S. (2010). “Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy.” Planta Med.; 76(11):1075-9

Fulda, S.; Debatin, K. (2004). “Sensitization for Anticancer Drug-Induced Apoptosis by the Chemopreventive Agent Resveratrol.” Oncogene, 23, 6702–6711.

Fulgenzi, A., A. A. Bertelli, E. Magni, E. Ferrero and M. E. Ferrero (2001). "In vivo inhibition of TN alpha-induced vascular permeability by resveratrol." Transplant Proc., 33(Abbas *et al.*): 2341-2343.

Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., Kroemer, G. (2014). “Mitochondrial Control of Cellular Life, Stress, and Death.” Circulation Research, 1198-1207

Garay, J.P., Gray, J.W. (2012) “Omics and therapy - a basis for precision medicine” Mol Oncol.; 6(2):128-39.

Giovannini, L., Migliori, M., Longoni, B.M., Das, D.K., Bertelli, A.A., Panichi, V., Filippi, C., Bertelli A. (2001). “Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys” J Cardiovasc Pharmacol. 37(Abbas *et al.*): 262-70.

Glasauer, A, Chandel, N.S., (2014). “Targeting antioxidants for cancer therapy.”Biochem Pharmacol.1;(1):90-101.

Gorrini, C., Harris, I.S., Mak, T.W., (2013) “Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy.” Nat Rev Drug Discov. 12(12):931-47.

Goswami, S. K. and D. K. Das (2009). "Resveratrol and chemoprevention." Cancer Lett 284(1): 1-6.

Granados-Soto, V., C. F. Arguelles and M. I. Ortiz (2002). "The peripheral antinociceptive effect of resveratrol is associated with activation of potassium channels." Neuropharmacology 43(5): 917-923.

Granzotto, A1, Zatta, P. (2014). “Resveratrol and Alzheimer's disease: message in a bottle on red wine and cognition.” Front Aging Neurosci 14; 6:95.

Grass, G.M. and Sinko, P.J. (2002). "Physiologically-based pharmacokinetic simulation modelling." Adv Drug Deliv Rev **54**(3): 433-451.

Gray, G.K., McFarland, B.C., Rowse, A.L., Gibson, S.A., Benveniste, E.N. (2014). “Therapeutic CK2 inhibition attenuates diverse prosurvival signaling cascades and decreases cell viability in human breast cancer cells.” Oncotarget, 15; 5(15):6484-96.

Greaves M., Maley C.C. (2012) “Clonal evolution in cancer.” Nature. 18; 481(7381):306-13.

Gusman, J., Malonne, H. and Atassi, G. (2001). "A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol." Carcinogenesis 22, 1111-1117

Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J. and Aruoma, O.I. (1995). "The characterization of antioxidants." Food Chem Toxicol **33**(7): 601-617.

Halliwell, B., (2008). “Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?” Arch Biochem Biophys., 15; 476(2):107-12.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. (2002). ‘The Hallmarks of Cancer. Cell”, 100, 57-70,

Hanif, I.M., Shazib, M.A., Ahmad, K.A, Pervaiz, S., (2010). “Casein Kinase II: an attractive target for anti-cancer drug design.” Int J Biochem Cell Biol.; 42(10):1602-5.

Harmer, V. (2008). "Breast cancer. Part 3: advanced cancer and psychological implications." Br J Nurs., 17, 1090-1092.

Harper, C. E., B. B. Patel, J. Wang, A. Arabshahi, I. A. Eltoum and C. A. Lamartiniere (2007). "Resveratrol suppresses prostate cancer progression in transgenic mice." Carcinogenesis 28(9): 1946-1953.

Higgins, C. F. (2007) “Multiple Molecular Mechanisms for Multidrug Resistance Transporters.” Nature, 446, 749-757.

Holmes-McNary, M. and A. S. Baldwin, Jr. (2000). "Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IkappaB kinase." Cancer Res 60(13): 3477-3483.

Howells, F.M., Russell, V.A., Mabandla, M.V. and Kellaway, L.A. (2005). "Stress reduces the neuroprotective effect of exercise in a rat model for Parkinson's disease." Behav Brain Res 165(2): 210-220.

Hsieh, T., Halicka, D., Lu, X., Kunicki, J., Guo, J., Darzynkiewicz, Z. and Wu, J. (2002). "Effects of resveratrol on the G (0)-G (1) transition and cell cycle progression of mitogenically stimulated human lymphocytes." Biochem Biophys Res Commun., 297, 1311-1317.

Hunter, T. (1995). "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling." Cell 80, 225-236.

Inca – Instituto Nacional Do Câncer. “Estimativa De Incidência De Câncer No Brasil Para 2012”. Ministério Da Saúde, 2011

Izeradjene, K., Douglas, L., Delaney, A. and Houghton, J.A. (2005). "Casein kinase II (CK2) enhances death-inducing signaling complex (DISC) activity in TRAIL-induced apoptosis in human colon carcinoma cell lines." Oncogene 24(12): 2050-2058.

Jang, M., L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. Beecher, H. H. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon and J. M. Pezzuto (1997). "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes." Science 275(5297): 218-220.

Jannin, B., M. Menzel, J. P. Berlot, D. Delmas, A. Lancon and N. Latruffe (2004). "Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake." Biochem Pharmacol 68(6): 1113-1118.

Jeandet, P., Bessis, R., Gaugheron, B. (1991). "The production of resveratrol (3, 5', 4'-trihydroxystilibene) by grape berries in differents developmental stages." Am J Enol Vitic 42(1): 41-46.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.

Jin, S., Q. Y. Zhang, X. M. Kang, J. X. Wang and W. H. Zhao (2009). "Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway." Ann Oncol.

Karpozilos, A., Pavlidis, N.(2004). "The treatment of cancer in Greek antiquity." Eur J Cancer.; 40(14):2033-40.

Khan, H.Y., Zubair, H., Ullah, M.F., Ahmad, A., Hadi, S.M. (2012). "A Prooxidant Mechanism for the Anticancer and Chemopreventive Properties of Plant Polyphenols" Current Drug Targets, 13, 1738-1749

Kim, J.S., Eom J.I., Cheong, J.W., Choi, A.J., Lee, J.K., Yang, W.I., Min, Y.H.(2007). "Protein kinase CK2alpha as an unfavorable prognostic marker and novel therapeutic target in acute myeloid leucemia." Clin Cancer Res. 1, (Abbas *et al.*):1019-28.

Kimura, Y. and Okuda, H. (2001). "Resveratrol isolated from Polygonum cuspidatum root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumorinduced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice." J Nutr., 131, 1844-1849.

Korolkiewicz, R. P., M. Ujda, J. Dabkowski, J. Ruczynski, P. Rekowski and J. Petrusewicz (2003). "Differential salutary effects of nonselective and selective COX-2 inhibitors in postoperative ileus in rats." J Surg Res 109(2): 161-169.

Kulkarni, S.S. and Cantó, C., (2014) “The molecular targets of Resveratrol” Biochim Biophys Acta. 11

Kundu, J. K.; Surh, Y. J. (2008). “Cancer Chemopreventive And Therapeutic Potential Of Resveratrol: Mechanistic Perspectives.” Cancer Letters, 269, 243-261.

Kuo, P.L., Chiang, L.C. and Lin, C.C. (2002). "Resveratrol- induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells." Life Sci., 72, 23- 34.

Kuwajerwala, N.; Cifuentes, E.; Gautam, S.; Menon, M.; Barrack, E. R., Reddy, G. P. ( 2000) “Resveratrol Induces Prostate Cancer Cell Entry Into S Phase And Inhibits DNA Synthesis.” Cancer Res. 62, 2488-2492.

Lancon, A., D. Delmas, H. Osman, J. P. Thenot, B. Jannin and N. Latruffe (2004). "Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process." Biochem Biophys Res Commun 316(4): 1132-1137.

Latruffe, N., D. Delmas, B. Jannin, M. Cherkaoui Malki, P. Passilly-Degrace and J. P. Berlot (2002). "Molecular analysis on the chemopreventive properties of resveratrol, a plant polyphenol microcomponent." Int J Mol Med 10(6): 755-760.

Lee, S. Y., Y. W. Shin and K. B. Hahm (2008). "Phytoceuticals: mighty but ignored weapons against Helicobacter pylori infection." J Dig Dis 9(Abbas *et al.*): 129-139.

Leonard, S. S., C. Xia, B. H. Jiang, B. Stinefelt, H. Klandorf, G. K. Harris and X. Shi (2003). "Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses." Biochem Biophys Res Commun 309(4): 1017-1026.

Li, Y., Z. Cao and H. Zhu (2006). "Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress." Pharmacol Res 53, 6-15.

Liang, Y. C.; Tsai, S. H.; Chen, L.; Lin-Shiau, S. Y.; Lin, J. K. (20030. “Resveratrol-Induced G(2) Arrest Through The Inhibition Of Cdk7 And P34(Cdc2) Kinases In Colon Carcinoma Ht29 Cells.” Biochem Pharmacol, 65, 1053–1060.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. (2001) “Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings”. Adv Drug Deliv Rev., 46, 3-26.

Litchfield, D. W. (2003). "Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death." Biochem J 369(Pt 1): 1-15.

Lopez-Velez, M., F. Martinez-Martinez and C. Del Valle-Ribes (2003). "The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine." Crit Rev Food Sci Nutr 43(Abbas *et al.*): 233-244.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem., 193, 265- 275.

Lugarini, F., B. J. Hrupka, G. J. Schwartz, C. R. Plata-Salaman and W. Langhans (2002). "A role for cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced anorexia in rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 283(4): R862-868.

Luo, H., Yang, A., Schulte, B.A, Wargovich, M.J., Wang, G.Y.,(2013). “Resveratrol induces premature senescence in lung cancer cells via ROS-mediated DNA damage.” PLoS One.8(Abbas *et al.*).

Mahon, S.M.(2006). “What are the chances? Risk in the real world.” Clin J Oncol Nurs.;10(1):99-101, 107.

Markus, M.A. and Morris, B.J. (2008). "Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging." Clin Interv Aging., 3, 331-339.

McClintock, S.D., Till, G.O., Smith, M.G. and Ward, P.A. (2002). "Protection from half-mustard-gas-induced acute lung injury in the rat." J Appl Toxicol **22**(4): 257-262.

McCoy, M.L., Mueller, C.R. and Roskelley, C.D. (2003). "The role of the breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) in sporadic epithelial ovarian cancer." Reprod Biol Endocrinol **1**: 72.

Mehta, R.G.,Murillo, G.,Naithani, R.,Peng, X.(2010). “Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come?” Pharm Res. 27(6):950-61.

Meng, X., Maliakal, P., Lu, H., Lee, M.J. and Yang, C.S. (2004). "Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice." J Agric Food Chem 52, 935-942

Miller, N. J. and C. A. Rice-Evans (1995). "Antioxidant activity of resveratrol in red wine." Clin Chem 41(12 Pt 1): 1789.

Miloso, M., A. A. Bertelli, G. Nicolini and G. Tredici (1999). "Resveratrol-induced activation of the mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells." Neurosci Lett 264(1-3): 141-144.

Mokni, M., S. Elkahoui, F. Limam, M. Amri and E. Aouani (2007). "Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat." Neurochem Res 32(6): 981-987.

Moran, M.F., Tong, J., Taylor, P. and Ewing, R.M. (2006). "Emerging applications for phospho-proteomics in cancer molecular therapeutics." Biochim Biophys Acta., 1766, 230-241.

Mossman, T. (1983). “Rapid Colorimetric Assay For Cellular Growth And Survival: Application To Proliferation And Cytotoxity Assays.” J. Immunol. Methods 65, 63-66.

Muller, H., W. Klinkhammer, M. U. Kassack, N. Eckstein and M. Wiese (2004). "Novel modulators to overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells." Int J Clin Pharmacol Ther 42(11): 644-645.

Newman, D.J. (2008)” Natural Products as Leads to Potential Drugs: Old Process or the New Hope for Drug Discovery?” J. Med. Chem 8; (9):2589-99.

Niles, R.M., McFarland, M., Weimer, M.B., Redkar, A., Fu, Y.M. and Meadows, G.G. (2003). "Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells." Cancer Lett., 190, 157-163.

Noda, C., He J., Takano T., Tanaka C., Kondo T., Tohyama K., Yamamura H., Tohyama Y.(2007).” Induction of apoptosis by epigallocatechin-3-gallate in human lymphoblastoid B cells.” Biochem Biophys Res Commun. 3;362(4):951-7.

Olas, B. and B. Wachowicz (2005). "Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions." Platelets 16(5): 251-260.

Pampaloni, B., Palmini, G., Mavilia, C., Zonefrati, R., Tanini, A., Brandi, M.L.(2014). “In vitro effects of polyphenols on colorectal cancer cells.” World J Gastrointest Oncol. 15;(8):289-300.

Parry, R., D. Schneider, D. Hudson, D. Parkes, J. A. Xuan, A. Newton, P. Toy, R. Lin, R. Harkins, B. Alicke, S. Biroc, P. J. Kretschmer, M. Halks-Miller, H. Klocker, Y. Zhu, B. Larsen, R. R. Cobb, P. Bringmann, G. Roth, J. S. Lewis, H. Dinter and G. Parry (2005). "Identification of a novel prostate tumor target, mindin/RG-1, for antibody-based radiotherapy of prostate cancer." Cancer Res 65(18): 8397-8405.

Patil, B.S., Jayaprakasha, G.K., Chidambara Murthy, K.N. and Vikram, A. (2009). "Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges." J Agric Food Chem., 57, 8142-8160.

Pervaiz, S. E Holme, A. L. (2009). “Resveratrol: Its Biologic Targets And Functional Activity.” Antioxidants & Redox Signaling, 11,2851-2897.

Pierce, J.P., Natarajan, L., Caan, B.J., Parker, B.A., Greenberg, E.R., Flatt, S.W., Rock, C.L., Kealey, S., Al-Delaimy, W.K., Bardwell, W.A., Carlson, R.W., Emond, J.A., Faerber, S., Gold, E.B., Hajek, R.A., Hollenbach, K., Jones, L.A., Karanja, N., Madlensky, L., Marshall, J., Newman, V.A., Ritenbaugh, C., Thomson, C.A., Wasserman, L. and Stefanick, M.L. (2007). "Influence of a diet very high in vegetables, fruit, and fiber and low in fat on prognosis following treatment for breast cancer: the 70 Women's Healthy Eating and Living (WHEL) randomized trial." JAMA 298, 289-298.

Pitot, H. C. (2007) “Adventures In Hepatocarcinogenesis”. Annu Rev Pathol., 2, 1-29.

Qaiser,F.,Trembley, J.H.,Kren, B.T.,Wu, J.J.,Naveed, A.K.,Ahmed, K.(2014). Protein kinase CK2 inhibition induces cell death via early impact on mitochondrial function. J Cell Biochem.115(12):2103-15.

Raj, L., Ide, T., Gurkar, A.U., Foley, M., Schenone, M., Li, X., Tolliday, N.J., Golub, T.R., Carr, S.A., Shamji, A.F., Stern, A.M., Mandinova, A., Schreiber, S..L, Lee, S.W. (2011) “Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS.” Nature. 13, 231-234.

Ruzzene, M., Di Maira, G., Tosoni,K., Pinna, L.A. (2010). “Assessment of CK2 constitutive activity in cancer cells.” Methods Enzymol., 484:495-514

Ryu, S.W., Woo, J.H., Kim, Y.H., Lee, Y.S., Park, J.W., Bae, Y.S (2006). “Downregulation of protein kinase CKII is associated with cellular senescence.”FEBS Lett. 6;580(Abbas *et al.*):988-94.

Saiko, P., A. Szakmary, W. Jaeger and T. Szekeres (2008). "Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?" Mutat Res 658(1-2): 68-94.

Sakamoto, T.; Horiguchi, H.; Oguma, E.; Kayama, F. (2010). “Effects Of Diverse Dietary Phytoestrogens On Cell Growth, Cell Cycle And Apoptosis In Estrogen-Receptor-Positive”Breast Cancer Cells.” J Nutr Biochem., 21, 856-864.

Samy, R.P. and Gopalakrishnakone, P. (2010). "Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery." Evid Based Complement Alternat Med., (Abbas *et al.*):283-94

Schneider, Y.; Vincent, F.; Duranton, B.; Badolo, L.; Gosse, F. (2000). “Anti-Proliferative Effect Of Resveratrol, A Natural Component Of Grapes And Wine, On Human Colonic” Cancer Cells. Cancer Lett, 159, 85-91.

Seidman, M., S. Babu, W. Tang, E. Naem and W. S. Quirk (2003). "Effects of resveratrol on acoustic trauma." Otolaryngol Head Neck Surg 129(5): 463-470.

Sena, L.A., Chandel, N.S. (2012). “Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species.” Mol Cell. 26;48(2):158-67

Servick, K., (2014) “Breast cancer.Breast cancer: a world of differences.” Science. 28; (6178):1452-3.

Sgarbieri, V.C., Pacheco, M.T.B. (1999) “Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos”. Braz. J. Food Technol., 2, 7-19,

Sies, H.,(1999). “Glutathione and its role in cellular functions.” Free Radic Biol Med.,27(9-10):916-21.

Signorelli, P. and R. Ghidoni (2005). "Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises." J Nutr Biochem., 16(8): 449-466.

Simstein, R., Burow, M., Parker, A., Weldon, C. and Beckman, B. (2003). "Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system." Exp Biol Med (Maywood) **228**(9): 995-1003.

Soleas, G. J., E. P. Diamandis and D. M. Goldberg (1997). "Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?" Clin Biochem.,30(2): 91-113.

Soleas, G. J., E. P. Diamandis and D. M. Goldberg (1997). "Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention." J Clin Lab Anal 11(5): 287-313.

Stebbing, J. J.; Gaya, A. (2001) “The Evidence-Based Use Of Induction Chemotherapy In Breast Cancer”. Breast Cancer, 8,23–37

Stratton, M.R. (2011). “Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise.”Science. 25; (6024):1553-8.

Su, H. C.; Hung, L. M.; Cheng, J. K. (2006). “Resveratrol, A Red Wine Antioxidant, Possesses An Insulin-Like Effect In Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.” Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 290, 1339–1346.

Subbaramaiah, K., W. J. Chung, P. Michaluart, N. Telang, T. Tanabe, H. Inoue, M. Jang, J. M. Pezzuto and A. J. Dannenberg (1998). "Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells." J Biol Chem 273(34): 21875-21882.

Surh, Y. (2003) “Cancer Chemoprevention With Dietary Phytochemicals”. Nature, 3, 768-780

Szewczuk, L. M. and T. M. Penning (2004). "Mechanism-based inactivation of COX-1 by red wine m-hydroquinones: a structure-activity relationship study." J Nat Prod 67(11): 1777-1782.

Szewczuk, L. M., L. Forti, L. A. Stivala and T. M. Penning (2004). "Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: a mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents." J Biol Chem 279(21): 22727-22737.

Szkudelski, T., Szkudelska, K. (2011). “Anti-diabetic effects of resveratrol.” Ann N Y Acad Sci. 1215:34-9.

Tang, F.Y.; Chiang, E. P.; Sun, Y. C. (2008). “Resveratrol Inhibits Heregulin-B1-Mediated Matrix Metalloproteinase-9 Expression And Cell Invasion In Human Breast Cancer Cells.” J. Nutr. Biochem., 19, 287–294.

Tawfic, S., Yu, S., Wang, H., Faust, R., Davis, A. and Ahmed, K. (2001). "Protein kinase CK2 signal in neoplasia." Histol Histopathol., 16, 573- 582.

Thambi, D., Bharat, B. Aggarwa, (2004). “Role of chemopreventive agents in cancer therapy” Cancer Letters 215, 129–140.

Trachootham, D., Zhou, Y., Zhang, H., Demizu, Y., Chen, Z., Pelicano, H., Chiao, P.J, Achanta, G., Arlinghaus, R.B., Liu, J., Huang, P. (2006) “Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate.” Cancer Cell. 10, 241-252.

Tseng, S.H., Lin, S.M., Chen, J.C., Su, Y.H., Huang, H.Y., Chen, C.K., Lin, P.Y. and Chen, Y. (2004). "Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats." Clin Cancer Res., 10, 2190-2202.

Turan, B., Tuncay, E., Vassort, G.,(2012). “Resveratrol and diabetic cardiac function: focus on recent in vitro and in vivo studies.” J Bioenerg Biomembr. 44(2):281-96.

Umar, A., Dunn, B.K., Greenwald, P.,(2012). “Future directions in cancer prevention.” Nat Rev Cancer;12, 835-848.

Valerie, K., Yacoub, A., Hagan, M.P., Curiel, D.T., Fisher, P.B., Grant, S. and Dent, P. (2007). "Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in." Mol Cancer Ther **6**(3): 789-801.

van de Waterbeemd, H. and Gifford, E. (2003). "ADMET in silico modelling: towards prediction paradise?" Nat Rev Drug Discov **2**(3): 192-204.

Vincent, T. L.; Gatenby, R. A. (2008) “An Evolutionary Model For Initiation, Promotion, And Progression In Carcinogenesis”. Int J Of Oncol., 32, 729-737.

Vitrac, X., A. Desmouliere, B. Brouillaud, S. Krisa, G. Deffieux, N. Barthe, J. Rosenbaum and J. M. Merillon (2003). "Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration." Life Sci 72(20): 2219-2233.

Wang, G., Unger, G., Ahmad, K.A., Slaton, J.W. and Ahmed, K. (2005). "Downregulation of CK2 induces apoptosis in cancer cells--a potential approach to cancer therapy." Mol Cell Biochem 274, 77-84.

Wattenberg, L.W. (1990). "Inhibition of carcinogenesis by minor anutrient constituents of the diet." Proc Nutr Soc **49**(2): 173-183

Whitsett, T.; Carpenter, M.; Lamartiniere, C. A. (2007). “Resveratrol, But Not Egcg, In The Diet Suppresses Dmba-Induced Mammary Cancer In Rats.” J. Carcinog., 5, 15–25.

Wolter, F.; Akoglu, B.; Clausnitzer, A.; Stein, J. ( 2001). “Downregulation Of The Cyclin D1/Cdk4 Complex Occurs During Resveratrol-Induced Cell Cycle Arrest In Colon Cancer Cell Lines.” J. Nutr., 131, 2197-2203.

World Health Organization. (1998) “The World Health Report 1998: Life in the 21st century a vision for all.” Geneva:.61-111.

Xu, X., Rich, E.S., Jr. and Seldin, D.C. (1998). "Murine protein kinase CK2 alpha': cDNA and genomic cloning and chromosomal mapping." Genomics 48, 79-86.

Yamane, K., Kinsella, T.J., (2005) . “Casein kinase 2 regulates both apoptosis and the cell cycle following DNA damage induced by 6-thioguanine.” Clin Cancer Res. 15, 2355-2363.

Yang, Y. B. and Y. J. Piao (2003). "Effects of resveratrol on secondary damages after acute spinal cord injury in rats." Acta Pharmacol Sin 24, 703-710.

Yoon, S.H., Kim, Y.S., Ghim, S.Y., Song, B.H. and Bae, Y.S. (2002). "Inhibition of protein kinase CKII activity by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes." Life Sci., 71, 2145-2152.

Yu, S., H. Wang, A. Davis and K. Ahmed (2001). "Consequences of CK2 signaling to the nuclear matrix." Mol Cell Biochem 227, 67-71.

Ziegler, R.G., Hoover, R.N., Pike, M.C., Hildesheim, A., Nomura, A.M., West, D.W., Wu-Williams, A.H., Kolonel, L.N., Horn-Ross, P.L., Rosenthal, J.F. and Hyer, M.B. (1993). "Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women." J Natl Cancer Inst., 85; 1819-1827.