AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE E DO RESVERATROL NA
CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS DE PULMÃO**

CAROLINA DOS SANTOS MORENO

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero**

**São Paulo
2016**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Avaliação dos efeitos da Radiação Ionizante e do Resveratrol na cultura de células
tumoriais de pulmão**

Carolina dos Santos Moreno

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2016

***Dedico este trabalho à minha família, sempre muito presente,
em especial à minha mãe, amiga e incentivadora,
Miriam Ap. Cardoso dos Santos.***

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Roberto Rogero, minha eterna gratidão pela orientação, dedicação, apoio, prontidão, conselhos, incentivos e amizade concedidos. Levarei o seu exemplo de vida, retidão e profissionalismo para toda a minha vida. Muito obrigada por tudo.

À Ms. Sizue O. Rogero, pela amizade, apoio, conselhos, conhecimentos compartilhados e atenção fornecida principalmente nos momentos de dificuldades encontrados ao longo do trabalho.

À Dra. Áurea S. Cruz, pela amizade, fornecimento dos materiais biológicos e pelas valiosas sugestões e ajuda.

Ao Dr. Roberto K. Sakuraba, pelos valiosos conhecimentos transmitidos e pela atenção dispensada durante os processos de planejamento e irradiação.

Ao Dr. Eduardo Weltman por gentilmente disponibilizar a infraestrutura do Serviço de Radioterapia do Hospital Israelita Albert Einstein.

Ao Dr. Andrés J. Galisteu Jr., pela amizade, atenção e acolhimento concedidos, disponibilizando condições laboratoriais necessárias para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Daniel P. Vieira, pelo apoio, auxílio e por gentilmente disponibilizar o laboratório e o microscópio de fluorescência.

Ao Dr. Ademar B. Lugão, pelo acolhimento, proporcionando condições laboratoriais para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Heitor F. Andrade Jr., pelas valiosas sugestões e por gentilmente disponibilizar o laboratório e equipamentos.

À equipe do Centro de Química e Meio Ambiente (IPEN/CNEN-SP), em especial ao Dymes R. A. Santos.

À equipe do Centro de Biotecnologia (IPEN/CNEN-SP), em especial à Ivette Z. Ocampo.

À equipe do Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz, pela atenção concedida, em especial a Rezolina P. Santos.

Ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP), em especial à equipe do laboratório de Protozoologia.

Aos colegas do Serviço de Radioterapia do Hospital Israelita Albert Einstein.

Ao IPEN/CNEN-SP, pela oportunidade de desenvolver este trabalho. De forma especial, agradeço ao Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA), Centro de Biotecnologia (CB) e ao Centro de Tecnologia das Radiações (CTR).

À FAPESP, pelo suporte financeiro concedido para o desenvolvimento do presente trabalho.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE E DO RESVERATROL NA CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS DE PULMÃO

Carolina dos Santos Moreno

RESUMO

O carcinoma mucoepidermóide de pulmão, um tipo histológico que deriva das glândulas mucosas traqueobrônquicas, manifesta-se com sintomas obstrutivos e tende a comprometer a traqueia. Com finalidade curativa ou paliativa da doença, atualmente há uma forte tendência na oncologia em desenvolver estratégias terapêuticas que visam à administração de compostos com elevado potencial de otimizar o efeito do tratamento com a radiação ionizante, de modo a aumentar a morte de células tumorais e preservar íntegras as células dos tecidos sadios adjacentes. A intensa busca por tais estratégias evidenciou resultados promissores apresentados pelo composto denominado Resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno), tornando-o amplamente divulgado e alvo de intensas pesquisas. O principal objetivo do presente estudo foi determinar o efeito do resveratrol em cultura celular de carcinoma mucoepidermóide de pulmão exposta a diferentes doses de radiação ionizante. Para tal, os estudos de citotoxicidade utilizando o método de incorporação do vermelho neutro, e da determinação da dose letal 50 % (DL₅₀) da radiação ionizante, foram realizados em cultura de células da linhagem NCI-H292 [H292] (ATCC® CRL-1848™), CCIAL069. Com base nos resultados do IC_{50%} (401,5 µM) e da DL₅₀ (693 Gy) foram realizados o teste *in vitro* do micronúcleo e os ensaios para avaliar o efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular. Os resultados evidenciaram que o resveratrol na concentração de 30 µM apresenta uma importante capacidade em promover danos às células NCI-H292 após 24 h da irradiação.

EVALUATION OF IONIZING RADIATION AND RESVERATROL EFFECTS IN LUNG CANCER CELL CULTURE

Carolina dos Santos Moreno

ABSTRACT

Mucoepidermoid lung carcinoma is a histological type that derives from the tracheobronchial mucous glands. It is manifested by trachea symptoms. Curative or palliative purpose for the disease, nowadays presents a strong oncology tendency to develop therapeutic strategies aimed at the administration of high potential compounds to improve the ionizing radiation treatments, so as to increase the radiation effects on tumor cells while minimizing these effects to surrounding normal tissues. The intensive search for such strategies showed promising results by the compound called Resveratrol, making it widely available and subject of many studies. The main of this study was to determine *in vitro* resveratrol effect in mucoepidermoid lung carcinoma cells NCI-H292 [H292] (ATCC® CRL-1848™), CCIAL069, exposed to ionizing radiation doses. For this purpose, there were performed *in vitro* cytotoxicity studies by neutral red uptake assay, as well as the lethal dose 50 % (LD50) of ionizing radiation. On the basis of the IC50% (401.5 μ M) and LD50 (693 Gy) results, there were performed *in vitro* micronucleus test and other tests in order to evaluate the cell cycle, repair and injury processes, cellular apoptosis and necrosis inductions. The results showed that resveratrol in 30 μ M concentrations showed an important capability to injury NCI-H292 cells after 24 h of irradiation.

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO	26
2 OBJETIVO	29
2.1 Originalidade	29
3 REVISÃO DA LITERATURA	31
3.1 Câncer	31
3.2 Histórico e Incidência do Câncer	31
3.3 Câncer de Pulmão	32
3.4 Modalidades de Tratamento contra o Câncer de Pulmão	34
3.5 Radiação Ionizante e a Radioterapia	36
3.6 Efeitos Biológicos da Radiação Ionizante	38
3.7 Técnicas de Radioterapia	39
3.8 Resveratrol	42
3.9 Histórico do Resveratrol	44
3.10 Estrutura Química do Resveratrol	45
3.11 Fontes de Resveratrol	47
3.12 Biodisponibilidade do Resveratrol	50
3.13 Efeitos Biológicos do Resveratrol	51
4 MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1 Preparo das culturas de células	55
4.2 Preparo das soluções de resveratrol	56
4.3 Curva de crescimento celular	58
4.4 Determinação <i>in vitro</i> do Índice de Citotoxicidade	58
4.5 Cálculo da distribuição de dose da radiação ionizante	64
4.5.1 Aquisição das imagens de tomografia computadorizada de planejamento	65
4.5.2 Planejamento	71
4.5.3 Controle de qualidade dos planejamentos	75

4.6	Determinação <i>in vitro</i> da Dose Letal 50 % da radiação ionizante e Avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular	78
4.7	Teste <i>in vitro</i> do Micronúcleo	80
4.7.1	Grupo A: Exposição ao resveratrol	80
4.7.2	Grupo B: Exposição à radiação ionizante	84
4.7.3	Grupo C: Exposição ao resveratrol e à radiação ionizante	84
4.8	Avaliação do Potencial Clonogênico	85
4.9	Avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida.....	88
4.10	Avaliação do efeito do resveratrol nos processos de apoptose e necrose celular	92
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
5.1	Curva de crescimento celular	95
5.2	Determinação <i>in vitro</i> do Índice de Citotoxicidade	96
5.3	Cálculo da distribuição de dose da radiação ionizante	113
5.4	Controle de qualidade dos planejamentos	131
5.5	Avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular	134
5.6	Determinação <i>in vitro</i> da Dose Letal 50 % da radiação ionizante	137
5.7	Teste <i>in vitro</i> do Micronúcleo	138
5.8	Avaliação do Potencial Clonogênico	150
5.9	Avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular	157
5.10	Avaliação do efeito do resveratrol no reparo da lesão no DNA	162
5.11	Avaliação do efeito do resveratrol no processo de lesão radioinduzida	163
5.12	Avaliação do efeito do resveratrol nos processos de apoptose e necrose celular	164
6	CONCLUSÕES	169
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Concentração das soluções de resveratrol, colchicina e hidroxiuréia utilizadas no ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade	60
TABELA 2 -	Resultado da curva de crescimento celular: médias $\pm$ CV do número de células NCI-H292 contadas durante o período de 96 h	95
TABELA 3 -	Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: médias $\pm$ DP das DO referentes às diferentes concentrações de resveratrol obtidas com a cultura de células NCI-H292	98
TABELA 4 -	Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: médias $\pm$ DP das DO referentes às diferentes concentrações do controle positivo obtidas com a cultura de células NCI-H292	98
TABELA 5 -	Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: médias $\pm$ DP das DO referentes às diferentes concentrações do controle negativo obtidas com a cultura de células NCI-H292	99
TABELA 6 -	Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: médias $\pm$ DP das DO referentes às diferentes concentrações do resveratrol, do controle positivo e do controle negativo obtidas com a cultura de células NCTC Clone 929	100
TABELA 7 -	Resultado do ensaio de citotoxicidade da colchicina: médias $\pm$ DP das DO referentes às diferentes concentrações de colchicina, do controle positivo e do controle negativo obtidas com a cultura de células NCI-H292	100

TABELA 8 -	Resultado do ensaio de citotoxicidade da hidroxiuréia: médias $\pm$ DP das DO referentes às diferentes concentrações de hidroxiuréia, do controle positivo e do controle negativo obtidas com a cultura de células NCI-H292	101
TABELA 9 -	Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: porcentagens de viabilidade celular $\pm$ CV referentes às diferentes concentrações de resveratrol obtidas com a cultura de células NCI-H292.....	102
TABELA 10 -	Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: porcentagens de viabilidade celular $\pm$ CV referentes às diferentes concentrações do controle positivo obtidas com a cultura de células NCI-H292 .	102
TABELA 11 -	Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: porcentagens de viabilidade celular $\pm$ CV referentes às diferentes concentrações do controle negativo obtidas com a cultura de células NCI-H292	103
TABELA 12 -	Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: porcentagens de viabilidade celular $\pm$ CV referentes às diferentes concentrações do resveratrol, do controle positivo e do controle negativo obtidas com a cultura de células NCTC Clone 929	104
TABELA 13 -	Resultado do ensaio de citotoxicidade da colchicina: porcentagens de viabilidade celular $\pm$ CV referentes às diferentes concentrações de colchicina, do controle positivo e do controle negativo obtidas com a cultura de células NCI-H292	104
TABELA 14 -	Resultado do ensaio de citotoxicidade da hidroxiuréia: porcentagens de viabilidade celular $\pm$ CV referentes às diferentes concentrações de hidroxiuréia, do controle positivo e do controle negativo obtidas com a cultura de células NCI-H292	105

TABELA 15 - Análise quantitativa do planejamento IMRT realizado para os testes da Dose Letal 50 % da radiação ionizante e da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular: $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI	121
TABELA 16 - Análise quantitativa do planejamento 3DCRT realizado para o teste da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular: $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI	122
TABELA 17 - Análise quantitativa do planejamento IMRT realizado para o teste do micronúcleo: $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI	124
TABELA 18 - Análise quantitativa do planejamento 3DCRT realizado para o teste do micronúcleo: $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI, sendo uma dose de radiação para cada planejamento	124
TABELA 19 - Análise quantitativa do planejamento IMRT realizado para o teste da avaliação do potencial clonogênico: $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI	125
TABELA 20 - Análise quantitativa do planejamento IMRT realizado para os testes da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular: $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI	126
TABELA 21 - Análise quantitativa do planejamento 3DCRT realizado para os testes da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular: $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI	127
TABELA 22 - Análise quantitativa do planejamento 3DCRT, com dose prescrita de 0,8 Gy, realizado para os testes da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular: $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI	128

TABELA 23 - Análise quantitativa do planejamento 3DCRT, com dose prescrita de 5 Gy, realizado para os testes da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular: D _{2%} , D _{50%} , D _{98%} e HI	129
TABELA 24 - Análise quantitativa do planejamento 3DCRT, com dose prescrita de 10 Gy, realizado para os testes da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular: D _{2%} , D _{50%} , D _{98%} e HI	130
TABELA 25 - Resultado do controle de qualidade dos planejamentos: doses medidas, doses calculadas e a variação entre as doses medidas e calculadas	132
TABELA 26 - Resultado da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular: médias das DO ± DP e porcentagens de viabilidade celular ± CV obtidas após a exposição da cultura de células NCI-H292 a diferentes doses de radiação ionizante com taxa de dose de 6 Gy/min	135
TABELA 27 - Resultado da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular: médias das DO ± DP e porcentagens de viabilidade celular ± CV obtidas após a exposição da cultura de células NCI-H292 a diferentes doses de radiação ionizante com taxa de dose de 14 Gy/min	135
TABELA 28 - Resultado do teste <i>in vitro</i> do micronúcleo referente ao Grupo A: médias de células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas e binucleadas com MN obtidas com a cultura de células NCI-H292 exposta ao resveratrol	140

TABELA 29 - Resultado do teste <i>in vitro</i> do micronúcleo referente ao Grupo B: médias de células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas e binucleadas com MN obtidas com a cultura de células NCI-H292 exposta à radiação ionizante	140
TABELA 30 - Resultado do teste <i>in vitro</i> do micronúcleo referente ao Grupo C: médias de células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas e binucleadas com MN obtidas com a cultura de células NCI-H292 exposta ao resveratrol e à radiação ionizante.....	141
TABELA 31 - Resultado do teste <i>in vitro</i> do micronúcleo referente ao Grupo A: médias do CBPI, RI, células citostáticas e % FMN $\pm$ DP obtidos com a cultura de células NCI-H292 exposta ao resveratrol	143
TABELA 32 - Resultado do teste <i>in vitro</i> do micronúcleo referente ao Grupo B: médias do CBPI, RI, células citostáticas e % FMN obtidos com a cultura de células NCI-H292 exposta à radiação ionizante	144
TABELA 33 - Resultado do teste <i>in vitro</i> do micronúcleo referente ao Grupo C: médias do CBPI, RI, células citostáticas e % FMN $\pm$ DP obtidos com a cultura de células NCI-H292 exposta ao resveratrol e à radiação ionizante	145
TABELA 34 - Resultado da avaliação do potencial clonogênico: número de colônias contadas, EP e FS $\pm$ DP obtidos com a cultura de células NCI-H292 expostas ao resveratrol e à radiação ionizante	153
TABELA 35 - Resultado da avaliação do potencial clonogênico: número de colônias contadas, EP e FS obtidos com a cultura de células NCI-H292 semeadas em diferentes densidades	154

TABELA 36 - Resultado do efeito do resveratrol no ciclo celular: médias $\pm$ CV da intensidade de fluorescência após 3 h do término da irradiação das células NCI-H292	159
TABELA 37 - Resultado do efeito do resveratrol no ciclo celular: médias $\pm$ CV da intensidade de fluorescência após 24 h do término da irradiação das células NCI-H292	160
TABELA 38 - Resultado do efeito do resveratrol nos processos de apoptose e necrose celular: médias $\pm$ CV da intensidade de fluorescência das células NCI-H292 marcadas com Anexina V-FITC, após 24 h do término da irradiação	164
TABELA 39 - Resultado do efeito do resveratrol nos processos de apoptose e necrose celular: médias $\pm$ CV da intensidade de fluorescência das células NCI-H292 marcadas com iodeto de propídio, após 24 h do término da irradiação	165

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 -** Radiografia de tórax em incidência anteroposterior mostrando opacidade em lobo superior direito, em caso de carcinoma mucoepidermóide de pulmão. Imagem ampliada à direita**34**
- FIGURA 2 -** Representação esquemática do processo de biossíntese do resveratrol**43**
- FIGURA 3 -** Representação esquemática dos processos de síntese dos compostos derivados do resveratrol**47**
- FIGURA 4 -** Fórmulas estruturais do resveratrol e dos estilbenos análogos presentes nos vinhos**49**
- FIGURA 5 -** Fotomicrografia das linhagens de células. (A) NCTC Clone 929; (B) NCI-H292. Aumento de 20x**56**
- FIGURA 6 -** Esterilização das soluções de resveratrol em filtro tipo Millex**57**
- FIGURA 7 -** Diluições seriadas efetuadas no fluxo laminar para a obtenção das soluções de diferentes concentrações de resveratrol**57**
- FIGURA 8 -** Controle positivo (látex de borracha natural) e controle negativo (polietileno de alta densidade). (A) Controles positivo e negativo em RPMI1640-uso; (B) Controles positivo e negativo em MEM-uso ..**59**
- FIGURA 9 -** Representação esquemática da distribuição das soluções nos 96 poços da microplaca de cultura celular para a realização do teste de citotoxicidade**61**

FIGURA 10 - Processo de lavagem da microplaca para a remoção do corante não incorporado pelas células. (A) Lavagem com PBS; (B) Lavagem com solução de cloreto de cálcio 10 % em formaldeído 0,5 %	62
FIGURA 11 - Espectrofotômetro integrado ao <i>notebook</i> para leitura das densidades ópticas em microplaca de 96 poços	63
FIGURA 12 - Microplaca disposta entre duas placas de água sólida e dois <i>bolus</i> . Imagem axial da tomografia computadorizada de planejamento à direita. (1) Placas de água sólida; (2) Microplaca de 96 poços; (3) <i>Bolus</i>	66
FIGURA 13 - Imagens de tomografia computadorizada de planejamento nos planos axial e coronal do arranjo formado com duas microplacas de 96 poços utilizadas no teste da Dose Letal 50 % da radiação ionizante	66
FIGURA 14 - Imagens de tomografia computadorizada de planejamento nos planos axial e coronal do arranjo formado com uma microplaca de 96 poços utilizada no teste de avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular	67
FIGURA 15 - Imagens de tomografia computadorizada de planejamento nos planos axial e coronal de dois diferentes arranjos formados com placas de Petri contendo as células NCI-H292 aderidas em lamínulas utilizadas no teste do Micronúcleo	68
FIGURA 16 - Imagens de tomografia computadorizada de planejamento nos planos axial e coronal do arranjo formado com doze placas de Petri com as células aderidas diretamente nas placas utilizadas no teste de avaliação do potencial clonogênico	69

FIGURA 17 - Imagens de tomografia computadorizada de planejamento nos planos axial e coronal do arranjo formado com uma microplaca de 24 poços utilizada nos testes de avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e nos processos de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular	70
FIGURA 18 - Posições geométricas das microplacas e das placas de Petri registradas em papel milimetrado	71
FIGURA 19 - Imagens de tomografia computadorizada de planejamento no plano axial e reconstrução volumétrica (3D) das estruturas de interesse delineadas nos dois arranjos formados com as microplacas de 96 poços	72
FIGURA 20 - Imagens de tomografia computadorizada de planejamento no plano axial e reconstrução volumétrica (3D) das estruturas de interesse delineadas nos dois arranjos formados com as placas de Petri com lamínula	73
FIGURA 21 - Imagem de tomografia computadorizada de planejamento no plano axial e reconstrução volumétrica (3D) das estruturas de interesse delineadas no arranjo formado com as placas de Petri sem lamínula	73
FIGURA 22 - Imagem de tomografia computadorizada de planejamento no plano axial e reconstrução volumétrica (3D) das estruturas de interesse delineadas no arranjo formado com a microplaca de 24 poços	74
FIGURA 23 - Planejamento transferido para o objeto simulador de PMMA para a realização do controle de qualidade	76
FIGURA 24 - Câmara de ionização modelo semiflex e objeto simulador de PMMA posicionados na mesa do acelerador linear <i>TrueBeam™ System</i> .	77

FIGURA 25 - Acelerador Linear <i>TrueBeam™ System</i> com a microplaca posicionada para a irradiação	79
FIGURA 26 - Processo de coloração: células, fixadas em lamínula, depositadas diretamente sobre a lâmina com acridina laranja para leitura no microscópio de fluorescência	82
FIGURA 27 - Microscópio de fluorescência integrado ao computador	83
FIGURA 28 - Processo de coloração: células imersas em solução de Giemsa 20 % e lavagem das placas de Petri em água corrente para a remoção do excesso de corante	87
FIGURA 29 - Microscópio óptico utilizado para a contagem de colônias	87
FIGURA 30 - Representação esquemática da distribuição das soluções nos 24 poços da microplaca de cultura celular	89
FIGURA 31 - Processo de filtragem da solução de brometo de etídio e etapa da coloração das células em cultura	90
FIGURA 32 - Leitor de fluorescência integrado ao computador	91
FIGURA 33 - Representação esquemática da distribuição das soluções nos 24 poços da microplaca de cultura celular	93
FIGURA 34 - Microplacas contendo Anexina V-FITC e solução de PI mantidas protegidas da luz e em temperatura ambiente para a coloração das células	94
FIGURA 35 - Curva de crescimento celular da linhagem NCI-H292	96

FIGURA 36 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade do resveratrol com as células NCI-H292 referente ao Grupo A: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células/poço e período de incubação de 48 h	106
FIGURA 37 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade do resveratrol com as células NCI-H292 referente ao Grupo B: microplaca de 96 poços contendo $1,0 \times 10^5$ células/poço e período de incubação de 24 h	106
FIGURA 38 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade do resveratrol com as células NCI-H292 referente ao Grupo C: microplaca de 96 poços contendo $7,5 \times 10^4$ células/poço e período de incubação de 24 h	107
FIGURA 39 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade do resveratrol com as células NCI-H292 referente ao Grupo D: microplaca de 96 poços contendo $7,0 \times 10^4$ células/poço e período de incubação de 24 h	107
FIGURA 40 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade do resveratrol com as células NCI-H292 referente ao Grupo E: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células/poço e período de incubação de 24 h	108
FIGURA 41 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade do resveratrol pelo método de incorporação do corante vermelho neutro realizado com a cultura de células NCTC Clone 929	110
FIGURA 42 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade da colchicina pelo método de incorporação do corante vermelho neutro realizado com a cultura de células NCI-H292	111

- FIGURA 43** - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade da hidroxiuréia pelo método de incorporação do corante vermelho neutro realizado com a cultura de células NCI-H292 **112**
- FIGURA 44** - Análise qualitativa do planejamento realizado para o teste da Dose Letal 50 % da radiação ionizante com doses de 250, 500, 175 e 1.000 Gy: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronal e sagital apresentando a distribuição de dose obtida com a técnica IMRT **113**
- FIGURA 45** - Análise qualitativa do planejamento realizado para o teste da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular com doses de 100, 200, 400 e 900 Gy: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronal e sagital apresentando a distribuição de dose da radiação ionizante obtida com a técnica 3DCRT **114**
- FIGURA 46** - Análise qualitativa do planejamento realizado para o teste do micronúcleo com doses de 0,8, 5 e 10 Gy: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronal e sagital apresentando a distribuição de dose da radiação ionizante obtida com a técnica IMRT **114**
- FIGURA 47** - Análises qualitativas dos planejamentos realizados para o teste do micronúcleo: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronais e sagitais apresentando as distribuições de dose da radiação ionizante obtidas com a técnica 3DCRT. (A) Dose de 25 Gy; (B) Dose de 34 Gy; (C) Dose de 50 Gy; (D) Dose de 100 Gy **115**

- FIGURA 48** - Análise qualitativa do planejamento realizado para o teste da avaliação do potencial clonogênico com doses de 0,8, 5 e 10 Gy: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronal e sagital apresentando a distribuição de dose da radiação ionizante obtida com a técnica IMRT **116**
- FIGURA 49** - Análise qualitativa do planejamento realizado para o teste da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular com doses de 0,8, 5 e 10 Gy: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronal e sagital apresentando a distribuição de dose da radiação ionizante obtida com a técnica IMRT **117**
- FIGURA 50** - Análise qualitativa do planejamento realizado para os testes da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular com doses de 0,8, 5 e 10 Gy: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronal e sagital apresentando a distribuição de dose da radiação ionizante obtida com a técnica 3DCRT **117**
- FIGURA 51** - Análises qualitativas dos planejamentos realizados para os testes da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronais e sagitais apresentando as distribuições de dose da radiação ionizante obtidas com a técnica 3DCRT. (A) Dose de 0,8 Gy; (B) Dose de 5 Gy; (C) Dose de 10 Gy **118**

FIGURA 52 - Histograma de dose volume com doses recomendadas para a verificação do índice de homogeneidade nos planejamentos de irradiação	119
FIGURA 53 - Placas de Petri identificadas e posicionadas de acordo com os planejamentos realizados com a técnica IMRT referentes aos testes do micronúcleo e da avaliação do potencial clonogênico .	123
FIGURA 54 - Resultado do controle de qualidade dos planejamentos: variações entre as doses medidas com a câmara de ionização e as doses calculadas no sistema de planejamento computadorizado 3D ...	133
FIGURA 55 - Curvas de viabilidade celular obtidas após a irradiação da cultura de células NCI-H292 com diferentes doses de radiação ionizante e taxas de dose de 6 e 14 Gy/min	136
FIGURA 56 - Curva de viabilidade celular obtida após irradiação da cultura de células NCI-H292 com diferentes doses de radiação ionizante e taxa de dose de 14 Gy/min	137
FIGURA 57 - Fotomicrografia das células NCI-H292 coradas com acridina laranja, aumento de 40x. (A) Célula mononucleada; (B) Célula binucleada; (C) Célula multinucleada; (D) Célula binucleada com presença de micronúcleo	139
FIGURA 58 - Índice do bloqueio da citocinese obtido no teste <i>in vitro</i> do Micronúcleo com a cultura de células NCI-H292 referente ao Grupo A: cultura celular exposta ao resveratrol. ★ Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)	146
FIGURA 59 - Índice do bloqueio da citocinese obtido no teste <i>in vitro</i> do Micronúcleo com a cultura de células NCI-H292 referente ao Grupo B: cultura celular exposta à radiação ionizante	146

FIGURA 60 - Índice do bloqueio da citocinese obtido no teste <i>in vitro</i> do Micronúcleo com a cultura de células NCI-H292 referente ao Grupo C: cultura celular exposta ao resveratrol e à radiação ionizante. Diferença estatisticamente significativa ($\star p < 0,05$; $\star\star p < 0,01$; $\star\star\star p < 0,001$)	147
FIGURA 61 - % FMN obtido no teste <i>in vitro</i> do Micronúcleo com a cultura de células NCI-H292 referente ao Grupo A: cultura celular exposta ao resveratrol	147
FIGURA 62 - % FMN obtido no teste <i>in vitro</i> do Micronúcleo com a cultura de células NCI-H292 referente ao Grupo B: cultura celular exposta à radiação ionizante	148
FIGURA 63 - % FMN obtido no teste <i>in vitro</i> do Micronúcleo com a cultura de células NCI-H292 referente ao Grupo C: cultura celular exposta ao resveratrol e à radiação ionizante. Diferença estatisticamente significativa ($\star p < 0,05$; $\star\star p < 0,01$)	148
FIGURA 64 - Fotomicrografia da colônia de células NCI-H292 corada com Giemsa 20%, aumento de 4x	151
FIGURA 65 - Número de colônias contadas referente à cultura de células NCI-H292 exposta ao resveratrol e à radiação ionizante	154
FIGURA 66 - Eficiência de plaqueamento obtida com a cultura de células NCI-H292 exposta ao resveratrol e à radiação ionizante	155
FIGURA 67 - Número de colônias contadas referente à cultura de células NCI-H292 semeadas em diferentes densidades	155
FIGURA 68 - Eficiência de plaqueamento obtida com a cultura de células NCI-H292 semeadas em diferentes densidades	156

FIGURA 69 - Fotomicrografia das células NCI-H292 marcadas com o brometo de etídio, aumento de 20x	158
FIGURA 70 - Curvas da intensidade de fluorescência das células NCI-H292 em função da dose de radiação ionizante na presença de resveratrol, colchicina e hidroxiuréia, 3 h após a irradiação	159
FIGURA 71 - Curvas da intensidade de fluorescência das células NCI-H292 em função da dose de radiação ionizante na presença de resveratrol, colchicina e hidroxiuréia, 24 h após a irradiação	161
FIGURA 72 - Representação gráfica das médias da intensidade de fluorescência das células NCI-H292 em função da dose de radiação ionizante na presença de diferentes concentrações de resveratrol, 3 h e 24 h após a irradiação	162
FIGURA 73 - Representação gráfica das médias da intensidade de fluorescência das células NCI-H292 em função da dose de radiação ionizante na presença de diferentes concentrações de resveratrol, 3 h e 24 h após a irradiação. ★ ★ ★ Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$)	163
FIGURA 74 - Representação gráfica da distribuição das amostras de acordo com as intensidades de fluorescência da anexina V-FITC e PI nas células NCI-H292	166
FIGURA 75 - Representação esquemática da análise da intensidade de fluorescência da anexina V-FITC e PI	167

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3DCRT:** Radioterapia tridimensional conformada
- % FMN:** Frequência de micronúcleo
- AAA:** Algoritmo de cálculo, *Analytical Algorithm Anisotropic*
- ATCC:** Banco de células, *American Type Culture Collection*
- C:** Controle de células
- CBPI:** Índice do bloqueio da citocinese, *Cytokinesis-Block Proliferation Index*
- CBi:** Número de células binucleadas
- CMono:** Número de células mononucleadas
- CMulti:** Número de células multinucleadas
- cGy:** Unidade de medida de dose absorvida, *Centigray*
- CO₂:** Dióxido de carbono, gás carbônico
- CT:** Tomografia Computadorizada, *Computed Tomography*
- CV:** Coeficiente de variação
- D_{2%}:** Valor de dose próximo à máxima na estrutura alvo
- D_{50%}:** Valor de dose média na estrutura alvo
- D_{98%}:** Valor de dose próximo à mínima na estrutura alvo
- DICOM:** Protocolo em formato eletrônico estruturado por um conjunto de normas para tratamento, armazenamento e transmissão de informação médica, *Digital Imaging Communications in Medicine*
- DL₅₀:** Dose Letal 50 % da radiação ionizante
- DNA:** Ácido Desoxirribonucleico
- DO:** Densidade Óptica
- DVH:** Histograma de dose volume, *Dose-Volume Histogram*
- EP:** Eficiência de plaqueamento
- Enzima DNA-PK:** Proteína quinase dependente de DNA
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína
- FS:** Fração de sobrevida
- Gy:** Unidade de medida de dose absorvida, *Gray*

HDPE: Polietileno de alta densidade

HI: Índice de Homogeneidade

IC_{50%}: Índice de Citotoxicidade

ICRU: Comissão Internacional de Medidas e Unidades Radiológicas, *International Commissioning Radiological Measures and Unit*

IMRT: Radioterapia de intensidade modulada, *Intensity Modulation Radiation Therapy*

Kv: Unidade de medida de tensão elétrica, *Quilovolt*

mA: *Miliamperagem*

MEM: Meio de cultura, Meio Mínimo de Eagle

MEM-uso: MEM suplementado com aminoácidos não essenciais 0,1 mM, piruvato de sódio 1,0 mM e soro fetal bovino 10%

MN: Micronúcleo

MV: *Mega volt*

NaCl: Cloreto de sódio

NCI-H292 [H292]: Células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano

NCTC Clone 929: Células de tecido conectivo de camundongo, clone da linhagem L

NTC: Número total de células

PBS: Solução fosfatada tamponada, pH 7,4

PI: Iodeto de propídio

PMMA: Polimetilmetacrilato

RD: Rabdomiossarcoma Humano

RI: Índice de replicação, *Replication Index*

RNA: Ácido Ribonucléico

RPMI1640: Meio de cultura, *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*

RPMI1640-uso: RPMI1640 suplementado com soro fetal bovino 10%

T: Cultura tratada

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

1 INTRODUÇÃO

A integridade do tecido é preservada pelo equilíbrio existente entre a proliferação e a morte celular. Quando esse equilíbrio é alterado, as células apresentam autonomia na proliferação originando uma massa de células neoplásicas, que constituem o câncer (Halperin e col., 2013; Ferreira e Rocha, 2004). Assim sendo, o câncer é considerado como um grupo específico de doenças caracterizado pela presença de células com crescimento excessivo, descoordenado e infiltrativo, com perda da resposta aos controles de crescimento normal (Kumar e col., 1994).

Durante as últimas décadas, o câncer tornou-se um problema de saúde pública mundial devido ao aumento da incidência de novos casos. Para o ano de 2030 foi estimado 27 milhões de novos casos, com 117 milhões de óbitos pela doença (Ministério da Saúde, 2014). Os países com maior incidência são os em desenvolvimento, dentre eles o Brasil, cuja estimativa da incidência de câncer para o ano de 2016 indica aproximadamente 596.070 novos casos, destacando-se por sua maior incidência, os tumores de pele não melanoma (175.760), próstata (61.200), mama (57.960), cólon e reto (34.280), pulmão (28.190), estômago (20.520), colo de útero (16.340), cavidade oral (15.490), esôfago (10.810), sistema nervoso central (10.270), linfoma não Hodgkin (10.240), leucemia (10.070), bexiga (9.670), laringe (7.350), glândula tireoide (6.960), colo do útero (6.950), ovário (6.150) e linfoma de Hodgkin (2.470) (Ministério da Saúde, 2016).

A incidência de novos casos de câncer de pulmão é de 17,49 para cada 100.000 homens e de 10,54 para cada 100.000 mulheres. Em ambos os sexos, o câncer de pulmão é mais frequente na região Sul, seguida pelas regiões Centro-Oeste, Sudeste, Nordeste e Norte. Em geral, a incidência de câncer de pulmão está relacionada com o consumo de cigarro, visto que 80 % dos casos de câncer de pulmão tem como causa principal o tabaco (Ministério da Saúde, 2016).

O câncer de pulmão apresenta um prognóstico ruim decorrente das características inerentes à doença, tais como: lesão silenciosa nos estágios iniciais, localmente invasiva e insidiosa, elevada agressividade e presença de amplas metástases que tendem a se disseminar, tornando-se irressecáveis cirurgicamente antes de produzirem sintomas (Vieira e col., 2012). Em particular, o carcinoma mucoepidermóide de pulmão, um tipo histológico que deriva das glândulas mucosas traqueobrônquicas, manifesta-se com sintomas obstrutivos e tende a ser localmente invasivo comprometendo a traqueia (Rubin e Farber, 1988).

Dentre as diversas modalidades terapêuticas atualmente disponíveis na medicina, a Radioterapia se destaca por ser amplamente utilizada no tratamento de tumores locais e/ou metastáticos, com finalidade curativa ou paliativa. A eficácia do tratamento é resultante da liberação do feixe de fótons colimado, raios-X de elevada energia ou raios-γ, e consequentemente da absorção da dose no leito tumoral respeitando os limites de restrições de dose nos tecidos sadios adjacentes (Schefter e col., 2006; Sociedade Brasileira de Radioterapia, 2011).

De acordo com o tipo, características histológicas e o estadiamento do tumor, a conduta médica é prescrever a radioterapia combinada com cirurgia e/ou quimioterapia, pois diversos estudos demonstram que essas associações beneficiam o controle local do tumor, erradicam as micrometástases e aumentam a sobrevida do paciente (Jiang e col., 2016; Lei e col., 2016; Levitt e col., 1999; Vieira e col., 2012).

No câncer de pulmão, a radioterapia associada à quimioterapia é indicada para doença localmente avançada ou inoperável (Salvajoli e col., 2013). Embora a fisiopatologia da toxicidade pulmonar causada pelos antineoplásicos seja pouco conhecida, sabe-se que a quimioterapia, realizada concomitante ou sequencialmente à radioterapia, potencializa a toxicidade pulmonar e os efeitos da radiação. Deste modo, os efeitos tardios da radiação tendem a ser mais severos aos pacientes oncológicos submetidos à quimioterapia (Fonseca e col., 2000; Koul e col., 2015).

Atualmente, há um grande interesse científico em desenvolver estratégias que otimizem a radioterapia de modo a aumentar a morte de células

tumorais e preservar ao máximo a integridade do tecido sadio adjacente (Li e col., 2005; Sociedade Brasileira de Radioterapia, 2011). Dentre as novas possibilidades de adjuvância terapêutica, encontra-se a administração de compostos com elevado potencial de alterar a resposta celular à radiação (Levitt e col., 1999; Roth e col., 1998). Nos últimos anos, a busca por tais estratégias evidenciou resultados promissores apresentados pelo composto denominado Resveratrol, tornando-o amplamente divulgado e alvo de intensos estudos.

Resveratrol (*3,4',5'-trihidroxiestilbeno*) é um polifenol pertencente ao conjunto de compostos denominados fitoalexinas que está presente em algumas espécies de espermatófitos tais como amora, amendoim, eucalipto, “Konjo-kon” (*Polygonum cuspidatum*) e uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) (Walle e col., 2004; Wang e col., 2013).

Como composto fenólico, o resveratrol possui potencial antioxidante, exercendo efeitos protetores em determinados danos oxidativos, promovendo principalmente a capacidade anti-inflamatória, proteção contra doenças cardiovasculares e o câncer (Bitterman, e col., 2015; Suh e col., 2013).

No combate ao câncer, o resveratrol apresenta potentes mecanismos de inibição do crescimento tumoral, tais como a ativação de apoptose celular, sincronização das células em determinada fase do ciclo e alteração das principais etapas da carcinogênese (Hosseini e col., 2015; Lang e col., 2015; Whyte e col., 2007).

Atualmente, a prevenção e o controle do câncer de pulmão estão entre os mais importantes desafios científicos e da saúde pública. Assim como, analogamente, a busca por compostos com elevado potencial de alterar a resposta celular à radiação ionizante e com baixa atividade tóxica intrínseca, apresentam um grande interesse na biologia, medicina oncológica e área nuclear. Logo, o estudo do efeito biológico do resveratrol associado à ação da radiação ionizante em cultura celular de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano, torna-se relevante e de grande interesse científico mundial.

2 OBJETIVO

Avaliar *in vitro* o efeito biológico do resveratrol na cultura de células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano exposta à radiação ionizante.

Para atingir tal objetivo, foram realizados os seguintes procedimentos e testes:

- Curva de crescimento celular;
- Determinação *in vitro* do índice de citotoxicidade;
- Cálculo da distribuição de dose da radiação ionizante;
- Controle de qualidade dos planejamentos;
- Avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular;
- Determinação *in vitro* da dose letal 50 % da radiação ionizante;
- Teste *in vitro* do micronúcleo;
- Avaliação do potencial clonogênico;
- Avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida;
- Avaliação do efeito do resveratrol nos processos de apoptose e necrose celular.

2.1 Originalidade

Os quimioterápicos, utilizados com a finalidade de eliminar as células tumorais do organismo, podem promover efeitos colaterais indesejáveis como queda de cabelo, supressão da medula óssea, lesão gastrointestinal, disfunção neurológica, toxicidade cardíaca e resistência a outros medicamentos (Alnajashi, 2013; Vo e Nelson, 2012). No tratamento do câncer de pulmão, os quimioterápicos administrados concomitante ou sequencialmente à radioterapia potencializam a toxicidade pulmonar, tornando, geralmente, os efeitos tardios da radiação mais severos (Fonseca e col., 2000; Koul e col., 2015). Logo, compostos com elevada eficiência e potencial de alterar a resposta celular à radiação ionizante e com baixa atividade tóxica intrínseca são alvos de intensos estudos.

Durante as últimas décadas, o resveratrol tem se destacado por apresentar grande disponibilidade na natureza, baixa toxicidade intrínseca e potencial antitumoral (Ferguson e col., 2015; Hosseini e col., 2015; Jeong e col., 2014), porém há uma deficiência de dados na literatura sobre o potencial do resveratrol em alterar a resposta biológica das células tumorais de pulmão expostas à radiação ionizante. Deste modo, a análise do efeito biológico do resveratrol na cultura de células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano (NCI-H292), como fator modificador da sensibilidade celular à radiação ionizante, torna-se de extrema relevância e de interesse científico e oncológico.

Este trabalho destaca na sua originalidade:

- A determinação do índice de citotoxicidade do resveratrol, colchicina e da hidroxiuréia na cultura de células NCI-H292;
- A aquisição das imagens de tomografia computadorizada de planejamento com as microplacas e placas de Petri dispostas em diferentes geometrias de posicionamento;
- A utilização de um sistema de planejamento computadorizado 3D, com técnicas de radioterapia tridimensional conformada e radioterapia de intensidade modulada, para o cálculo da distribuição de dose da radiação ionizante em testes *in vitro*;
- A avaliação do efeito da taxa de dose da radiação ionizante, provinda do acelerador linear, em cultura de células NCI-H292;
- A determinação da dose letal 50 % da radiação ionizante em cultura de células NCI-H292, utilizando um acelerador linear para a liberação do feixe de radiação;
- A avaliação do potencial clonogênico das células NCI-H292 em cultura expostas ao resveratrol e à radiação ionizante;
- O efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida nas células NCI-H292 expostas à radiação ionizante;
- A avaliação do efeito do resveratrol e da radiação ionizante nos processos de apoptose e necrose na cultura de células NCI-H292.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer

O câncer é definido como um grupo específico de doenças caracterizadas pela presença de células com alterações estruturais e/ou funcionais no material genético. Essas alterações afetam as vias que regulam os processos de proliferação celular, diferenciação e morte celular, proporcionando assim um crescimento excessivo, descoordenado e infiltrativo, com perda de resposta aos controles de crescimento normal (Ferreira e Rocha, 2004; Kumar e col., 1994).

A integridade do tecido é preservada pelo equilíbrio fisiológico existente entre a proliferação e a morte celular. Quando esse equilíbrio é alterado, a célula apresenta uma autonomia na proliferação que possibilita a sua expansão clonal. Durante essa etapa, a célula transmite a alteração genética para as células que, a partir dela, originam-se, formando uma massa de células neoplásicas que constituem o tumor primário (Halperin e col., 2013; Ferreira e Rocha, 2004).

No processo de progressão tumoral, as células do tumor primário perdem a capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido que a originou, atravessam a parede dos vasos sanguíneos, caem na circulação e se instalam em outros tecidos originando as metástases (Ferreira e Rocha, 2004).

3.2 Histórico e Incidência do Câncer

O primeiro diagnóstico de câncer em fóssil humano foi registrado após a análise de milhares de fósseis encontrados na Europa. A múmia, originária da Alemanha no ano de 35.000 a.C., apresentava uma única lesão óssea decorrente de um possível meningioma. Esse estudo, realizado por antropologistas, evidenciou que o câncer em adultos e crianças era raro na Pré-história e na Idade Antiga, apresentando um aumento significativo na Idade Média e na Idade Moderna (Capasso, 2005).

No século XX, o câncer era considerado predominante dos países desenvolvidos, porém, durante as últimas quatro décadas, as estatísticas de incidência da doença mostraram um significativo aumento nos países em desenvolvimento com escassos recursos financeiros (Ministério da Saúde, 2011; Carmo e col., 2003). Assim, acredita-se que o aumento gradativo da incidência de câncer está relacionado com o estilo de vida moderno, desenvolvido após a revolução industrial, no qual ocorreu um aumento da poluição ambiental mundial e da expectativa de vida de algumas populações. Contudo, observa-se que o câncer exerce um importante controle biológico ao limitar a expectativa de vida excessiva das populações que residem em países mais desenvolvidos (Capasso, 2005).

O desenvolvimento de modernas técnicas de diagnóstico, bem como a facilidade de acesso a essas novas tecnologias, contribuíram para a detecção de câncer, e consequentemente para o registro de novos casos (Steel, 1997).

3.3 Câncer de Pulmão

Estudos etiológicos apontam que o câncer de pulmão pode ser resultante de um acúmulo de alterações genéticas proporcionado pela influência de fatores carcinogênicos e que, possivelmente, o efeito mutagênico dos carcinógenos é condicionado por fatores hereditários. Os principais fatores carcinogênicos externos são o tabagismo, as infecções respiratórias de repetição, carência alimentar e, em uma proporção muito inferior, as agressões ambientais com causas ocupacionais como a mineração de urânio e a exposição ao asbesto e ao radônio (Ferreira e Rocha, 2004; Kumar e col., 1994; Rubin e Farber, 1988).

Durante as últimas décadas, o câncer de pulmão tornou-se um problema de saúde pública mundial devido ao aumento da incidência de novos casos em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Torre e col., 2015). No Brasil, a estimativa da incidência de câncer de pulmão para o ano de 2016 indica aproximadamente 28.190 novos casos, sendo estimados 17.330 novos casos para o sexo masculino e 10.860 novos casos para o sexo feminino. Logo, o câncer de pulmão representa um risco de 17,49 novos casos a cada 100 mil homens e de 10,54 para cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde, 2016).

Segundo o Ministério da Saúde (2016), o aumento gradativo da incidência do câncer de pulmão está relacionado ao aumento do consumo de cigarro, visto que 80 % dos casos de câncer de pulmão tem como causa principal o tabaco.

O câncer de pulmão apresenta um prognóstico ruim decorrente das características inerentes à doença, tais como: lesão silenciosa nos estágios iniciais, localmente invasiva e insidiosa, elevada agressividade, presença de amplas metástases que tendem a se disseminar, tornando-se irressecáveis cirurgicamente antes de produzirem sintomas (Vieira e col., 2012). Essas características permitem ao câncer de pulmão ser considerado um dos tumores mais letais, apresentando uma razão mortalidade/incidência de aproximadamente 90 % e uma sobrevida máxima de cinco anos para 10 % a 15 % dos pacientes. (Ministério da Saúde, 2016).

Em particular, o carcinoma mucoepidermóide de pulmão, um tipo histológico que deriva das glândulas mucosas traqueobrônquicas, manifesta-se com sintomas de obstrução de vias aéreas e pneumonias recorrentes (Liu e Adams, 2007; Ogata e col., 2007). Os sintomas são resultantes das características do tumor: insidioso, com crescimento lento que tende a ser localmente invasivo obstruindo a traqueia (Huang e col., 2009; Rubin e Farber, 1988; Xu e col., 2012; Zoberi e col., 2002).

Histologicamente, o carcinoma mucoepidermóide de pulmão tem aspecto sólido-cístico e apresentam elementos celulares escamosos, células secretoras de muco e células intermediárias ou basais. Microscopicamente, os tumores tendem a se localizar na submucosa dos brônquios principais e a presença de calcificações é relatada em diversos casos reportados. Macroscopicamente, apresenta-se como uma massa polipóide endoluminal, bem circunscrita com a mucosa bronquial intacta ou ulcerada (Liu e Adams, 2007; Ogata e col., 2007; Xu e col., 2012).

Casos relatados na literatura indicam que o carcinoma mucoepidermóide de pulmão acomete pacientes com idade entre 3 a 78 anos, sendo que 50 % dos casos ocorreram em pacientes com menos de 30 anos de idade (Liu e Adams, 2007; Ogata e col., 2007; Xu e col., 2012).

A modalidade de tratamento mais adequada a este tipo de tumor é o cirúrgico, visto que os carcinomas mucoepidermóides apresentam resistência à radioterapia e à quimioterapia (Ogata e col., 2007).

A FIG. 1 mostra uma radiografia de tórax de um caso de carcinoma mucoepidermóide de pulmão localizado no lobo superior do pulmão direito.

FIGURA 1 - Radiografia de tórax em incidência anteroposterior mostrando opacidade em lobo superior direito, em caso de carcinoma mucoepidermóide de pulmão. Imagem ampliada à direita. Fonte: Ogata e col., 2007.

3.4 Modalidades de Tratamento contra o Câncer de Pulmão

Atualmente existem três modalidades de tratamento utilizadas contra o câncer de pulmão: cirurgia, quimioterapia e radioterapia (Halperin e col., 2013; Steel, 1997).

A cirurgia é a modalidade de tratamento preferencial para os tumores em estágio inicial, porém apenas 20 % dos pacientes com câncer de pulmão são adequados para a cirurgia com ressecção completa do tumor (Halperin e col., 2013).

A quimioterapia é uma modalidade de tratamento sistêmico que consiste em administrar agentes químicos isolados ou em combinação ao paciente oncológico. Os quimioterápicos são utilizados com a finalidade de

eliminar as células tumorais do organismo, porém, por ser um tratamento sistêmico, podem promover reações adversas indesejáveis como queda de cabelo, supressão da medula óssea, lesão gastrointestinal, disfunção neurológica, toxicidade cardíaca e resistência a outros medicamentos (Alnajashi, 2013; Vo e Nelson, 2012; Roth e col., 1998).

Devido à possível ocorrência de reações adversas, a indicação da quimioterapia é realizada após uma avaliação prévia do paciente para assegurar que seu organismo está em condições de superar tais reações. Nessa avaliação prévia, é verificada a idade do paciente, estado nutricional, funções renal, hepática e pulmonar, presença de infecções, tipo do tumor, presença de metástase e a sua extensão, condições de vida do paciente. Após a avaliação, é escolhido o esquema quimioterápico mais adequado e é determinada a dose e o intervalo entre as aplicações e as vias de administração (Fonseca e col., 2000).

A radioterapia é uma modalidade efetiva de tratamento, cujos benefícios estão associados ao controle local e regional do tumor pela exposição a doses de radiação ionizante respeitando a tolerância clínica (Fajardo e col., 2001; Mettler e Upton, 1995). A indicação da radioterapia abrange principalmente os pacientes com lesão inoperável ou que não tiveram cirurgicamente uma ressecção completa do tumor, sendo indicado com finalidade curativa ou paliativa (Halperin e col., 2013; Salvajoli e col., 2013). Segundo *International Atomic Energy Agency* (2013), nos países desenvolvidos, aproximadamente 50 – 60 % dos pacientes oncológicos serão submetidos à radioterapia.

Nas últimas décadas, estudos sobre o uso combinado de diferentes modalidades terapêuticas para alcançar melhores resultados no tratamento do câncer de pulmão têm mostrado resultados promissores, tanto no controle local da doença como no aumento da sobrevida do paciente (Salvajoli e col., 2013; Singh e col., 2010; Verma e col., 2011; Xi e col., 2012). O objetivo principal da combinação terapêutica é maximizar as vantagens de cada método, minimizando os efeitos indesejados relacionados ao uso individual (Ferreira e Rocha, 2004).

No tratamento do câncer de pulmão, o uso combinado da cirurgia e radioterapia visa à remoção do tumor cirurgicamente e à erradicação das células tumorais viáveis próximas ao leito cirúrgico que não foram removidas. Já a combinação da cirurgia e quimioterapia é indicada para reduzir a frequência de

uma possível falha à distância após o tratamento cirúrgico. O uso combinado da radioterapia com a quimioterapia é normalmente indicada para tumores localmente avançados ou inoperáveis, no qual o quimioterápico potencializa o efeito da radiação proporcionando um aumentando do controle da doença local e a distância. Essa associação promove uma sobrevida média de cinco anos aos pacientes (Ferreira e Rocha, 2004; Fonseca e col., 2000; Koul e col., 2015; Roth e col., 1998; Xu e Pechoux, 2015).

Os efeitos tardios da radiação ionizante no pulmão são relativamente frequentes, pois a tolerância pulmonar é bastante baixa. Os principais efeitos tardios observados são a pneumonite, diagnosticada entre 2 a 6 meses após o término do tratamento, e a fibrose pulmonar, manifestada após meses ou anos. Quando ambos os lobos do pulmão são irradiados, dependendo da severidade desses efeitos, o funcionamento alveolocapilar pode ser afetado e, conseqüentemente, a função cardiorrespiratória do paciente, comprometida (Steel, 1997). Os efeitos tardios da radiação ionizante são mais severos quando a radioterapia é combinada com a administração de quimioterápicos, pois estes potencializam os efeitos da radioterapia, podendo causar uma grave toxicidade pulmonar (Fonseca e col., 2000; Roth e col., 1998).

3.5 Radiação Ionizante e a Radioterapia

A radiação ionizante é definida como a energia propagada através do espaço ou da matéria capaz de deslocar um ou mais elétrons do átomo. O elétron ejetado, com carga negativa, e o átomo remanescente, com carga positiva, formam o par de íons (Fajardo e col., 2001; Salvajoli e col., 2013).

A radioterapia utiliza radiação ionizante para o tratamento de tumores locais e/ou metastáticos, com finalidade curativa ou paliativa. A eficácia da radioterapia é resultante da liberação do feixe de fótons colimado (raios-X de elevada energia) e conseqüentemente da absorção da dose no leito tumoral respeitando os limites de restrições de dose nos tecidos sadios adjacentes (Nair e col., 2001; Schefter e col., 2006).

Nos organismos vivos, a incidência da radiação promove danos às células por mecanismos específicos como as interações por ação direta e indireta

da radiação com o meio celular. A interação direta consiste na incidência da radiação diretamente em macromoléculas biológicas como o ácido desoxirribonucléico (DNA) e o ácido ribonucléico (RNA). Essa interação promove danos que podem ser fatais à célula. As lesões no DNA que não induzem a morte celular, devido aos mecanismos fisiológicos de reparo, podem ser transmitidas para as gerações de células futuras, iniciando-se o processo de neoplasia celular (Dowd e Tilson, 1999). Por sua vez, na interação indireta ocorrem sucessivas interações da radiação incidente com as diversas moléculas presentes no interior celular, destacando-se a água e o oxigênio (Dowd e Tilson, 1999). Sendo assim, a água, por representar 70 % a 85 % do conteúdo celular, é considerada o composto com a maior probabilidade de interagir com a radiação ionizante (Dowd e Tilson, 1999; Mettler Junior e Upton, 1995; Steel, 1997).

A interação da radiação com as moléculas da água produz espécies reativas primárias (OH^* , e_{aq}^- , H^+) e produtos moleculares (H_2 , H_2O_2), denominados “produtos primários da radiólise da água” (Fajardo e col., 2001; Getoff, 1996; Nair e col., 2001).

A radiólise da água é um processo contínuo que pode ser representado pela Equação 1:

(Eq.1)

Altamente reativos, os produtos primários da radiólise da água interagem com as moléculas presentes no meio ou sofrem recombinações, desencadeando uma série de reações tóxicas para as células que promovem alterações químicas e biológicas (Fajardo e col., 2001; Getoff, 1996; Nair e col., 2001).

3.6 Efeitos Biológicos da Radiação Ionizante

Na radioterapia há uma predominância das interações indiretas, nas quais podem ser observadas alterações nos lipídios e nas proteínas das vias sinalizadoras, além da mudança na expressão de genes por uma variedade de mecanismos incluindo a ativação de fatores de transcrição. A ativação radioinduzida destas vias sinalizadoras afeta os processos de regulação do ciclo celular, reparo do DNA, indução da proliferação e repopulação tecidual, diferenciação ou apoptose (Mahrhofer e col., 2006; Sociedade Brasileira de Radioterapia, 2011; Steel, 1997).

A radiação ionizante também pode interagir diretamente com os componentes celulares, sendo a quebra das cadeias duplas da molécula de DNA consideradas as mais prejudiciais, pois podem promover quebras e rearranjos cromossômicos, deleções, translocações, inversões, entre outras lesões que afetam a integridade genômica da célula (Fajardo e col., 2001; Halperin e col., 2013).

O objetivo da radioterapia é induzir a célula tumoral à morte clonogênica ou à morte por apoptose. A morte clonogênica caracteriza-se pela perda da capacidade de divisão celular, a célula com falência reprodutiva pode permanecer exercendo algumas funções no organismo por um determinado período. A morte por apoptose ocorre devido a alterações no interior da célula e se caracteriza pela participação ativa da célula na sua morte programada (Sociedade Brasileira de Radioterapia, 2011).

Estudos realizados com células em cultura evidenciaram que a sensibilidade à radiação ionizante depende da fase do ciclo celular em que as células se encontram quando irradiadas. Em geral, a maioria das células eucarióticas é considerada mais sensível durante a fase de mitose e menos sensível no período tardio da fase de síntese (Halperin e col., 2013; Mettler Junior e Upton, 1995).

A sensibilidade das células à radiação observada na fase de mitose é decorrente da intensa compactação do DNA, a qual além de dificultar o acesso às enzimas de reparo, também aumenta a probabilidade de interações que induzem o surgimento de aberrações cromossômicas e morte celular. A fase de síntese é considerada menos sensível à radiação devido à duplicidade do DNA, a qual

facilita a atuação dos mecanismos de reparo. Na fase de síntese também são verificados elevados níveis da enzima DNA-PK (proteína quinase dependente de DNA), importante para o reparo de quebras duplas do DNA. Logo, uma mesma linhagem celular pode apresentar diferenças quanto à sensibilidade à radiação devido à distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular e à capacidade de reparo (Mettler Junior e Upton, 1995; Sociedade Brasileira de Radioterapia, 2011).

A radiação também pode promover alteração na progressão do ciclo celular, de acordo com o tipo de célula e a dose de radiação, a progressão do ciclo celular é retardada devido à ativação dos genes de reparo ou aos mecanismos de morte celular (Sociedade Brasileira de Radioterapia, 2011).

Desta forma, a resposta radiobiológica das células está relacionada com a capacidade de reparo das lesões radioinduzidas. Para tal, o controle local da doença proporcionado pela radioterapia está diretamente relacionado com a dose prescrita, a precisão na definição do volume-alvo e a exatidão da técnica utilizada (Halperin e col., 20013).

3.7 Técnicas de Radioterapia

A radioterapia possui diferentes técnicas de tratamento, dentre elas a radioterapia tridimensional conformada (3DCRT) e a radioterapia de intensidade modulada (IMRT) (Halperin e col., 2013; Sociedade Brasileira de Radioterapia, 2011).

Na técnica 3DCRT é realizada uma simulação virtual baseada na imagem volumétrica do paciente para compor campos de radiação com formatos compatíveis às reconstruções tridimensionais do volume alvo e dos órgãos de risco (tecidos sadios) (Almeida, 2012; Halperin e col., 2013).

A técnica IMRT é semelhante à técnica 3DCRT, porém permite variar a intensidade de fluência dentro do campo de radiação, possibilitando irradiar diferentes alvos com doses diferentes (Almeida, 2012; Halperin e col., 2013).

As principais etapas envolvidas na radioterapia utilizando as técnicas 3DCRT e IMRT são:

- 1 - Posicionamento e imobilização do paciente;

- 2 - Aquisição das imagens de tomografia computadorizada e outras imagens diagnósticas de planejamento;
- 3 - Definição dos volumes alvos e dos órgãos de risco;
- 4 - Planejamento da administração da dose e cálculo de dose;
- 5 - Avaliação do planejamento;
- 6 - Controle de qualidade;
- 7 - Verificação do posicionamento do paciente;
- 8 - Liberação da dose de tratamento.

A etapa de posicionamento e imobilização do paciente consiste em utilizar e/ou confeccionar acessórios que impeçam ou diminuam as movimentações voluntárias e involuntárias. Uma vez definido o sistema de imobilização, o mesmo será utilizado durante a aquisição das imagens de tomografia computadorizada de planejamento e na liberação da dose de tratamento (Halperin e col., 2013; Levitt e col., 1999).

Na segunda etapa, que consiste na aquisição das imagens de tomografia computadorizada de planejamento do paciente devidamente posicionado, o equipamento de tomografia computadorizada realiza incidências de radiação em 360°, gerando imagens em plano axial (Bushong, 2000; Fleckenstein e Jensen, 2004). As imagens de tomografia computadorizada são a base para o planejamento, pois fornecem o modelo geométrico do paciente com precisão e consistem em um mapa da distribuição espacial dos coeficientes de atenuação de raios X medidos que são convertidos em densidade eletrônica. A densidade eletrônica possibilita o cálculo de dose com correção de heterogeneidade entre os tecidos (Halperin e col., 2013; Sociedade Brasileira de Radioterapia, 2011).

Na etapa da definição dos volumes alvos e dos órgãos de risco, as imagens de tomografia computadorizada de planejamento são transferidas para um sistema de planejamento computadorizado 3D, no qual os volumes alvos e os órgãos de risco são delineados manualmente em cada imagem. Quando necessário, é realizada o registro com as imagens de diagnóstico para auxiliar no delineamento dos volumes alvo. O *software* reconstrói as estruturas delineadas em imagem volumétrica 3D, obtendo, desta forma, a imagem virtual volumétrica do paciente na posição de tratamento (Halperin e col., 2013; Levitt e col., 1999).

Durante a etapa seguinte, que compreende na realização do planejamento da administração da dose e cálculo de dose, o sistema de planejamento computadorizado 3D simula virtualmente a distribuição da dose de radiação na região de interesse com base nos dados dosimétricos e de configuração do acelerador linear e, nas densidades eletrônicas das estruturas fornecidas nas imagens de tomografia computadorizada de planejamento (Khan e Potish, 1998). Essa etapa tem como objetivo concentrar a dose prescrita no volume alvo com diminuição das mesmas nos órgãos de risco (Chao e col., 2005; Halperin e col., 2013; Sociedade Brasileira de Radioterapia, 2011).

A etapa de avaliação do planejamento compreende nas análises quantitativa e qualitativa da distribuição de dose. Na análise qualitativa, as curvas de isodose são avaliadas nas imagens de tomografia computadorizada de planejamento. Na análise quantitativa, os dados fornecidos no histograma de dose volume (DVH) e na estatística da dose são avaliados para cada volume de interesse (Chao e col., 2005; Halperin e col., 2013).

A etapa referente ao controle de qualidade envolve a validação de diversos sistemas independentes, sendo eles: sistema de simulação, sistema de planejamento computadorizado, acelerador linear e sistema de verificação. O controle de qualidade específico por paciente é realizado individualmente e de acordo com a técnica utilizada. Sendo assim, na técnica 3DCRT, verifica-se a unidade monitora por método de cálculo independente. Nos planos realizados com a técnica IMRT, são realizadas medidas no acelerador linear com o plano específico calculado em um objeto simulador e verificado com as medidas absolutas com câmara de ionização. O controle de qualidade deve ser realizado antes da liberação da dose de tratamento no paciente, pois permite verificar se as distribuições de dose planejada serão administradas ao paciente durante o tratamento no acelerador linear (Almeida, 2012; Chao e col., 2005; Halperin e col., 2013).

A etapa de verificação do posicionamento do paciente, que antecede a liberação da dose de tratamento, é realizada com auxílio de sistemas de localização, como os lasers e os Sistemas de Radioterapia Guiada por Imagens (IGRT) (Halperin e col., 2013).

Somente após a conclusão satisfatória de todas as etapas anteriores, a dose de tratamento é liberada com segurança no paciente (Halperin e col., 2013).

Durante as últimas décadas, a radioterapia têm apresentado avanços tecnológicos, que asseguram uma maior precisão na localização do paciente, exatidão na liberação da dose e conformação da distribuição da dose e consequentemente, proporcionam uma maior probabilidade de cura, ganho na sobrevida e na qualidade de vida (Sociedade Brasileira de Radioterapia, 2011).

3.8 Resveratrol

O resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) é um polifenol natural pertencente ao conjunto de compostos denominados fitoalexinas (Jeandet e col., 2002). Fitoalexinas são compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, cuja síntese é naturalmente desencadeada por diversas espécies de plantas em situações de estresse, sendo um mecanismo de auto defesa contra diversos predadores, patógenos, agentes químico e físico (VanEtten e col., 1994).

A biossíntese do resveratrol (FIG. 2) é desencadeada por um sinal químico, gerado pelo estresse, que induz o aumento da expressão do gene estilbeno sintetase, o qual promove o acúmulo de mRNA estilbeno sintetase, responsável pela formação da enzima estilbeno sintetase. Por sua vez, esta enzima catalisa a reação entre uma molécula de *p-coumaroyl*-CoA e três moléculas de *malonyl*-CoA, substratos estes presentes nas plantas, originando o resveratrol na área afetada (Schöppner e Kindl, 1984; Schröder e col., 1988).

FIGURA 2 – Representação esquemática do processo de biossíntese do resveratrol.

Em condições fisiológicas, a enzima estilbeno sintetase está presente em baixas concentrações na parede celular das plantas e em menor proporção, nos cloroplastos situados na película do fruto em desenvolvimento. Um acúmulo progressivo da enzima na película do fruto é observado ao longo do seu desenvolvimento (Pan e col., 2009).

Na uva, o resveratrol é sintetizado na casca do fruto em concentrações que dependem tanto do tipo, intensidade e durabilidade do estresse sob o qual se encontra a videira durante a fase frutífera, como do estágio de desenvolvimento do fruto. O estresse pode ser ocasionado por fatores bióticos como ferimentos na uva decorrentes da ação fúngica, principalmente pela espécie *Botrytis cinéria*, e por fatores abióticos, como exposição à radiação ultravioleta emitida pelo sol e agentes químicos. Logo, são de extrema relevância para a obtenção de elevadas concentrações de resveratrol, as condições da viticultura, a origem geográfica, os fatores ambientais no vinhedo e as variedades da uva (Adrian e col., 2000; Pervaiz, 2004; Sautter e col., 2005).

3.9 Histórico do Resveratrol

A uva é uma das frutas mais antigas e mais difundidas no mundo. Estudos arqueológicos e paleobotânicos estimam que as práticas do cultivo da videira e da produção de vinho remontam da época pré-romana sendo procedentes das regiões meridionais do extremo ocidente peninsular; regiões estas, caracterizadas por possuírem acentuadas tradições de contato e intercâmbios com o mundo mediterrâneo (Fabião, 1998).

O primeiro registro escrito referente ao uso medicinal do vinho provém do Antigo Egito, na cidade de Nippur, sendo procedente de anos anteriores a 2000 a.C. Nele há referências que na Suméria, unguentos eram misturados ao vinho para combater as doenças de pele. Outros registros datados de anos posteriores relatam o uso do vinho no tratamento primário das doenças agudas e crônicas existentes na época (Pickeleman, 1990).

Na Grécia Antiga, Homero descreveu na *Ilíada* e na *Odisséia* (850 a.C.) o valor do uso local e sistêmico do vinho no tratamento dos ferimentos de guerra, e Hipócrates (460-370 a.C.) relatou em sua “História da Medicina” as propriedades terapêuticas da bebida quando administrada em dosagens adequadas (Béliveau e Gingras, 2007; Pickeleman, 1990).

Na Idade Média (século V ao século XV), as supostas propriedades curativas, energizante, rejuvenescedora, estimulante do apetite e promotora da higienização dos dentes, tornaram os vinhos aromatizados com ervas parte integrantes da prática médica (Béliveau e Gingras, 2007; Pickeleman, 1990).

Do século XVII ao XIX o vinho foi universalmente descrito como agente promotor de bem estar físico e emocional, tendo intensificada a sua prática na medicina europeia (Béliveau e Gingras, 2007; Pickeleman, 1990).

A partir do século XX, os indícios sobre os efeitos benéficos do vinho à saúde foram comprovados por estudos epidemiológicos, os quais constataram uma correlação inversa entre o consumo moderado de vinho e a incidência de doenças cardiovasculares, fenômeno este denominado “Paradoxo Francês” (Béliveau e Gingras, 2007; Sun e col., 2002).

Os franceses possuem hábitos considerados fatores de alto risco para o desenvolvimento de cardiopatias, como o consumo exacerbado de gordura animal, tabagismo em demasia e sedentarismo, porém exibem uma baixa

incidência de distúrbios cardiovasculares devido ao consumo regular e moderado de vinho tinto durante as refeições (Béliveau e Gingras, 2007; Sun e col., 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2004), nos anos de 1961 a 2000, o consumo mundial de vinho permaneceu constante em decorrência do equilíbrio entre a leve redução do consumo por países tradicionalmente apreciadores da bebida e o discreto aumento em outras culturas, tendo-se estimado um consumo mundial médio de 1,3 litros de vinho por adulto ao ano. Em publicação mais recente (WHO, 2014), a OMS enfatiza os efeitos benéficos à saúde exercidos pelo etanol, presente em bebidas alcoólicas, quando consumido moderadamente.

No vinho, o efeito cardioprotetor também está associado à presença de compostos pertencentes à classe dos polifenóis (WHO, 2009). Dentre os polifenóis contidos no vinho, o resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) é considerado o composto fenólico de maior eficácia biológica (Frémont, 2000; Soleas e col., 1997).

3.10 Estrutura Química do Resveratrol

O resveratrol é constituído por dois anéis aromáticos unidos por uma ponte de metileno ($-\text{CH}_2-$). Na natureza, esta geometria molecular é a base estrutural de diferentes compostos, sendo diferenciados quanto ao número e a posição das hidroxilas; substituição dessas hidroxilas por diferentes radicais como os açúcares $[(\text{CH}_2\text{O})_n]$, metil ($-\text{CH}_3$), grupo metoxila ($\text{CH}_3\text{O}-$); formação de dímeros, trímeros ou extensos polímeros e o isomerismo (isômeros geométricos *trans* e *cis*) (Soleas e col., 1997).

Atualmente, consta na literatura uma ampla descrição desses compostos, sendo enfatizadas as formas isômeras *trans*- e *cis*- resveratrol (3,4',5-trihidroxi-*trans*-estilbeno e 3,4',5-trihidroxi-*cis*-estilbeno); *trans*- e *cis*-piceido (*trans*-resveratrol 3-*O*- β -glucosideo e *cis*-resveratrol 3-*O*- β -glucosideo) e *viniferins* (*trans*-*viniferins*). As formas isômeras *trans*- e *cis*-resveratrol são relativamente estáveis. A conversão do isômero *trans*- em *cis*-resveratrol resulta da exposição à radiação UV, já o processo inverso ocorre em soluções de pH ácido (pH=1). Exposições à radiação UV e a soluções de pH elevado (pH=10) promovem a

degradação dos dois isômeros, sendo a estabilidade alcançada quando mantidos em soluções de pH neutro, para *cis*-resveratrol, e em pH ácido, para *trans*-resveratrol, ambas sob o abrigo da luz (Trela e Waterhouse, 1996).

Como o isômero *cis*-resveratrol não é comercializado devido a sua instabilidade na forma sólida e o isômero *trans*-resveratrol é viabilizado comercialmente, através da conversão pela radiação UV do isômero *trans*-resveratrol, a forma *cis* é facilmente obtida (Goldberg e col., 1995).

O piceído é oriundo do processo de glicosilação que acomete a molécula de resveratrol. A glicosilação compreende na inclusão de uma molécula de glicose na estrutura química do resveratrol, tornando-a mais resistente aos processos de oxidação e degradação enzimática (Pezet e col., 2004).

Os compostos *viniferins* são formados pelo processo de dimerização oxidativa a partir da molécula de resveratrol (Jeandet e col., 2002).

A FIG. 3 ilustra esquematicamente as formas estruturais do resveratrol e dos compostos análogos ao composto, cujas modificações químicas observadas são resultantes das reações de glicosilação e oxidação.

FIGURA 3 – Representação esquemática dos processos de síntese dos compostos derivados do resveratrol.

3.11 Fontes de Resveratrol

Estudos pioneiros sobre o resveratrol abordaram mais intensamente as propriedades do isômero *trans*-resveratrol devido às dificuldades encontradas na detecção e quantificação do isômero *cis*-resveratrol e dos compostos de estruturas químicas derivadas do resveratrol. Com o crescente desenvolvimento e adaptações das metodologias foi possível isolar e caracterizar esses compostos nas amostras de plantas, nos produtos alimentícios e em materiais biológicos após a administração de alimentos e soluções com elevado teor de resveratrol (Careri e col., 2003; Lang e col., 2015; Souto e col., 2001; Walle e col., 2004).

Aproximadamente 72 espécies de plantas distribuídas em 31 gêneros e 12 famílias foram descritas como capazes de sintetizar naturalmente o resveratrol

(Jang e col., 1997). Dentre essas plantas destacam-se, por seus reconhecidos efeitos terapêuticos, o amendoim (*Arachis hypogaea*, Fabaceae), o eucalipto (*Eucalyptus wandoo*, Myrtaceae); Kon-jo-kon (*Polygonum cuspidatum*) e a uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*, Vitaceae) (Afonso e col., 2015; Chukwumah e col., 2009; Du e col., 2007; Hathway e Seakins, 1959; Lang e col., 2015;).

O *Polygonum cuspidatum* é a espécie de planta que possui a maior capacidade de síntese do resveratrol (Wang e col., 2013).

As espécies de videiras *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca* possuem a maior capacidade de sintetizar o resveratrol destacando-se as variedades Pinot Noir, Merlot e Cabernet Sauvignon. Assim, as uvas e os seus produtos industrializados são considerados importantes fontes alimentícias do composto (Romero-Pérez e col., 2001; Vuong, e col., 2014).

Nas análises realizadas em diferentes amostras de uva, o resveratrol apresentou maior concentração na película do fruto (27,5 µg/g), sendo que no bagaço da uva, constituído de caules, cascas e sementes após a extração do sumo, apresentou uma menor concentração (6,0 µg/g). A análise da película do fruto detectou, em ordem decrescente de concentrações, os compostos: *trans*-resveratrol, *trans*- e *cis*- piceído, não sendo constatada a presença do isômero *cis*-resveratrol (Careri e col., 2003; Romero-Pérez e col., 2001).

Nos vinhos, o resveratrol é encontrado em níveis relativamente elevados, principalmente nos vinhos tintos, cujos valores observados (0,82 a 5,75 mg/L) decorrem do longo processo de maceração na presença das cascas e sementes da uva. Nos vinhos brancos os níveis de resveratrol são inferiores a 1,8 mg/L devido à ausência do contato da casca da uva ao mosto. Já os vinhos roses, por resultarem da mistura dos vinhos tintos e brancos ou serem produzidos com um tempo de maceração inferior ao dos vinhos tintos, possuem níveis de resveratrol intermediários, sendo de aproximadamente 2,15 mg/L (Romero-Pérez e col., 1996; Sancho e Mach, 2015; Souto e col., 2001).

Assim como a prática enológica é importante para a obtenção do resveratrol, o processo de estocagem da bebida é um fator preponderante para a conservação dos elevados níveis do composto contido nos vinhos, pois o armazenamento da bebida em recipientes hermeticamente fechados e em locais escuros previnem a oxidação da molécula pela ação do oxigênio e a degradação

pelos raios do sol, respectivamente (Douillet-Breuil e col., 1999; Celotti e col., 1996).

Nos vinhos de diferentes origens geográficas foram detectados compostos fenólicos estilbenos, tais como: trans- e cis-resveratrol, trans- e cis-piceído, trans-astringina, ϵ -viniferin, δ -viniferin, pallidol. A quantificação desses estilbenos nos diferentes vinhos evidenciou um equilíbrio entre as alterações das concentrações desses compostos, sugerindo que tanto o resveratrol como os seus derivados são sujeitos às mesmas variáveis (Goldberg e col., 1995; Sancho e Mach, 2015; Vitrac e col., 2005).

A FIG. 4 ilustra esquematicamente a estrutura química do resveratrol e dos seus derivados contidos nos vinhos.

FIGURA 4 – Fórmulas estruturais do resveratrol e dos estilbenos análogos presentes nos vinhos.

Os demais produtos industrializados derivados da uva como os sucos, geleias e as gelatinas apresentaram concentrações de resveratrol inferiores a 0,15 mg/L (Goldberg e col., 1994).

Os sucos de uva de origem brasileira são considerados uma boa fonte do composto para os abstêmios, pois apresentaram concentrações relativamente elevadas (0,19 a 0,90 mg/L) (Sautter e col., 2005).

3.12 Biodisponibilidade do Resveratrol

Com a presença do resveratrol e de seus derivados em uma ampla variedade de alimentos e bebidas, considerável atenção tem sido dispensada ao percurso desses compostos nos organismos vivos, enfatizando-se os seus mecanismos de ação.

Um estudo realizado em seres humanos, com administração oral e intravenosa de resveratrol, constatou que aproximadamente 70 % do composto são absorvidos pelo organismo. Dessa porcentagem, uma ínfima parte permanece na circulação sistêmica em sua forma inalterada, sendo predominante a presença dos metabólitos formados pelos processos de sulfatação e glicosilação (Walle e col., 2004).

O processo de sulfatação consiste numa rápida reação entre o resveratrol e o sulfato originando o metabólito *trans*-resveratrol-3-sulfato; enquanto a glicosilação ocorre em menor intensidade e é responsável pela formação do metabólito *trans*-resveratrol-3-*O*-glucoronide através da reação do resveratrol com o ácido glicurônico (Walle e col., 2004; Yu e col., 2002).

O processo de distribuição do resveratrol pelos tecidos é realizado pela difusão trans-epitelial (transporte passivo) e pelo processo mediado por uma proteína carreadora. Ambos os processos são facilitados pela característica lipossolúvel do composto e pela elevada afinidade à proteína albumina (Jannin e col., 2004; Walle e col., 2004).

A excreção do resveratrol e de seus metabólitos é eficazmente exercida com o auxílio dos líquidos biológicos como a bile e a urina (Vitrac e col., 2005; Wang e col., 2008).

Em cobaias, constatou-se que após a administração oral ou intravenosa, o resveratrol tende a ser rapidamente eliminado da circulação sanguínea se depositando em diferentes órgãos, tais como: estômago, intestino delgado, duodeno, intestino grosso, fígado, baço, rim, coração, pulmão, cérebro e testículo, cuja ordem citada obedece aos níveis decrescentes das concentrações detectadas. No cólon e no baço, observou-se uma significativa atividade do resveratrol, enquanto que no coração, testículos e no cérebro essa atividade foi considerada moderada (Chen e col., 2007; Vitrac e col., 2005; Wang e col., 2008).

Apesar dos constantes esforços despendidos na tentativa de obter conhecimentos *in vivo* sobre a absorção, metabolismo e distribuição do resveratrol nos diversos tecidos, os estudos encontram dificuldades na detecção e quantificação do composto devido à sua rápida absorção pelo intestino, limitada estabilidade dos metabólitos, ampla distribuição pelos órgãos após a ingestão e rápida eliminação. Assim, para que as conclusões sobre o impacto na saúde humana proporcionado pelas dietas com elevado teor de resveratrol sejam obtidas, é necessário desenvolver estudos mais minuciosos e aprofundados (Bitterman e Chung, 2015; Leonard e col., 2003).

Atualmente, há fortes evidências que o resveratrol acumulado nas células epiteliais ao longo do trato gastrointestinal, juntamente com os metabólitos formados, promove benefícios à saúde. Similarmente, o isômero *cis* possui atividades biológicas complementares ao do isômero *trans*, embora sejam consideradas de menor intensidade (Leiro e col., 2004; Walle e col., 2004).

3.13 Efeitos Biológicos do Resveratrol

A intensidade dos efeitos biológicos proporcionados pelo resveratrol está intimamente relacionada à conformação estrutural do composto sendo a disposição do grupo fenol, apresentada pela molécula do isômero *trans*-resveratrol, o fator essencial para o desenvolvimento da sua atividade antioxidante (Leonard e col., 2003).

A atividade antioxidante é decorrente da capacidade do composto em se ligar aos radicais livres presentes no meio celular (Jung e col., 2013).

Os radicais livres são produtos resultantes do metabolismo celular, considerados como iniciadores de processos oxidativos devido a sua capacidade de desencadear reações envolvidas em distintos processos patológicos em decorrência do aumento e/ou diminuição de antioxidantes. Assim, a capacidade antioxidante do resveratrol é um importante mecanismo de prevenção ou inibição de determinados processos oxidativos que acometem diversas linhagens celulares (Leonard e col., 2003; Sgambato e col., 2001).

Dentre os efeitos proporcionados pela atividade antioxidante do resveratrol, a cardioproteção foi amplamente estudada por resultar de uma variedade de efeitos antioxidantes exercidos pelo composto, tais como a prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), inibição da agregação plaquetária, atividades de vaso relaxamento e vaso dilatação, proteção do endotélio vascular contra disfunções e malefícios decorrentes de dietas inadequadas, atividade estrogênica e redução da obesidade (Bitterman e Chung, 2015; Dolinsky e Dyck, 2011; Gehm e col., 1997; Leonard e col., 2003; Olas e col., 2002).

Extensos estudos sobre a atuação do resveratrol no combate ao HIV-1, inibição das lesões induzidas pelo Herpes dos tipos 1 e 2, inibição do crescimento de *Helicobacter pylori* e controle dos processos inflamatórios constam na literatura (Docherty e col., 2004; Heredia e col., 2000; Mahady e col., 2003; Olas e col., 2002).

Atualmente, um dos campos de pesquisa de notável interesse é o aumento da longevidade com melhora na qualidade de vida. A capacidade do resveratrol em diminuir a incidência ou amenizar os danos decorrentes das doenças degenerativas resultantes do envelhecimento celular e orgânico, tais como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e as isquemias cerebrais são extensamente abordadas pela literatura (Ferretta e col., 2014; Vingtdoux e col., 2008; Yazir e col., 2015).

Estudos voltados para a oncologia evidenciaram diversos mecanismos de ação do resveratrol capazes de atuar tanto na prevenção como no controle das neoplasias já instaladas (Pervaiz, 2004). Dentre os complexos mecanismos de inibição do crescimento tumoral promovidos pelo resveratrol, são destacados: ativação da apoptose, atividade antioxidante, sincronização das células em

determinada fase do ciclo celular e alteração das principais etapas da carcinogênese (Ahmad, 2001; Hosseini e Ghorbani, 2015; Kma, 2013; Lang e col., 2015; Lucas e Kolodziej, 2015).

O ciclo celular de uma célula em proliferação é caracterizado pelos períodos de replicação e divisão do DNA, sendo representado por um círculo subdividido em quatro fases: M, G₁, S e G₂. A fase M representa a etapa de mitose celular; G₁ indica o período entre o término da divisão e o início da síntese de DNA; a fase S refere-se à síntese de DNA; e G₂ inicia-se com a síntese de proteínas e RNA necessários para a divisão que ocorrerá na fase de mitose. Um período G₀ pode ser incluído entre as fases M/G₁ para representar o estado quiescente da célula (Metter e Upton, 1995).

No ciclo celular de linhagens normais, o resveratrol tende a alterar a distribuição das células nas fases, observando-se geralmente uma predominância da fase de síntese associada a uma diminuição das fases G₂/M e em menor frequência, das fases G₀/G₁ (Sgambato e col., 2001).

Sendo assim, o resveratrol apresenta capacidade de suprimir, *in vitro* e *in vivo*, a proliferação de linhagens tumorais de diversos órgãos como o cérebro, mama, pulmão, estômago, esôfago, fígado, pâncreas, próstata, ovário, cólon, pele, incluindo as leucemias e os linfomas (Atten e col., 2001; Barron e col., 2014; Bishayee e Dhir, 2009; Golkar e col., 2007; Guan e col., 2012; Gurunathan e col., 2015; Holcombe, e col., 2015; Khan e col., 2014; Lang e col., 2015; Lin e col., 2002; Miloso e col., 1999; Tang e col., 2013; Wieder e col., 2001).

No câncer de pulmão, recentes estudos evidenciaram a capacidade do resveratrol em potencializar o efeito da radiação, aumentando significativamente a morte celular radioinduzida (Hosseini e Ghorbani, 2015; Whyte e col., 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas de células de duas diferentes linhagens foram utilizadas nos ensaios biológicos: NCI-H292 [H292] (células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano - ATCC[®] CRL-1848TM) e NCTC Clone 929 (células de tecido conectivo de camundongo - ATCC[®] CCL-1TM) do *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, USA), fornecidas pelo Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP, Brasil), cujos números catalogados no acervo são, respectivamente, CCIAL069 e CCIAL020.

O resveratrol (3,4',5-trihidroxi-trans-estilbeno), produzido por Sunrise Chemical Co. Ltd. (Zhangjiagang City, Jiangsu, China) e comercializado por SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA - Pharma Nostra (Anápolis, GO, Brasil) foi extraído da raiz da planta *Polygonum cuspidatum Sieb.* Tais empresas atestam o composto como sendo a forma isômera *trans* padronizada com um teor de pureza de 99,44 %.

Os meios de cultura, Meio Mínimo de Eagle (MEM) e RPMI1640, foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co (São Paulo, SP, Brasil) e processados no Núcleo de Cultura Celular do Instituto Adolfo Lutz.

O kit *Annexin V-FITC*, bem como a hidroxauréia e a colchicina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil).

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau PA da marca Sigma-Aldrich ou Merck (São Paulo, SP, Brasil).

Os equipamentos necessários para o planejamento da distribuição da dose de radiação (CT-Simulador e Sistema de Planejamento Computadorizado 3D), bem como o Acelerador Linear *TrueBeamTM System* foram disponibilizados pelo Serviço de Radioterapia do Hospital Israelita Albert Einstein (São Paulo, SP, Brasil).

As instalações para o desenvolvimento do trabalho foram cedidas pelo Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA - IPEN/CNEN, São Paulo, SP, Brasil), Centro de Biotecnologia (CB - IPEN/CNEN, São Paulo, SP, Brasil) e

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil).

4.1 Preparo das culturas de células

As culturas de células foram preparadas pelo Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz.

As linhagens de células NCI-H292 e NCTC Clone 929 foram cultivadas em garrafas de cultura celular até a formação da monocamada celular.

A linhagem NCI-H292 utilizou o meio RPMI1640 suplementado com soro fetal bovino 10 %, denominado RPMI1640-uso, e a linhagem NCTC Clone 929 foi cultivada utilizando o Meio Mínimo de Eagle - MEM suplementado com soro fetal bovino 10 %, aminoácidos não essenciais 0,1 mM e piruvato de sódio 1,0 mM, denominado MEM-uso.

Em prosseguimento, as culturas de células foram tratadas com tripsina 0,20 % e solução de EDTA 0,02 % para a dispersão da monocamada celular.

Após o destaque das células, com auxílio do hemocitômetro (câmara de Neubauer), as células foram contadas e a suspensão celular, acertada em concentrações adequadas para cada ensaio a ser realizado.

De acordo com a metodologia de cada ensaio, a suspensão celular foi depositada em tubos de ensaio, em microplacas de 96 e 24 poços de fundo chato, nas placas de Petri de 25 cm² e em lâminulas de 26 x 40 mm inseridas em placas de Petri.

A seguir, os tubos de ensaio, as microplacas e as placas de Petri foram mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂ para a adesão celular e, quando necessário, para a formação da monocamada celular (FIG. 5).

FIGURA 5 – Fotomicrografia das linhagens de células. (A) NCTC Clone 929; (B) NCI-H292. Aumento de 20x.

4.2 Preparo das soluções de resveratrol

Uma solução alcoólica de resveratrol (25.000 μM) foi preparada diluindo-se 57 mg de resveratrol em 10 mL de etanol PA. A partir desta, uma solução concentrada (500 μM) foi preparada em meio RPMI1640-uso e outra, em MEM-uso, adicionando-se 0,2 mL da solução alcoólica de resveratrol em 9,8 mL de meio de cultura.

Após o processo de esterilização das soluções concentradas de resveratrol utilizando filtro tipo Millex de 0,22 μm (Sigma-Aldrich Chemical Co, São Paulo, SP, Brasil), foram efetuadas diluições seriadas em meio de cultura, obtendo-se diferentes concentrações a serem utilizadas nos ensaios (FIG. 6 e 7).

FIGURA 6 – Esterilização das soluções de resveratrol em filtro tipo Millex.

FIGURA 7 – Diluições seriadas efetuadas no fluxo laminar para a obtenção das soluções de diferentes concentrações de resveratrol.

4.3 Curva de crescimento celular

Com a finalidade de analisar a capacidade *in vitro* de replicação das células NCI-H292, foi verificada a curva de crescimento celular em conformidade com a metodologia descrita na literatura (Cruz e col., 1992).

A cultura celular foi preparada como descrito no item 4.1. Para tal, volumes de 1,0 mL da suspensão celular de $1,09 \times 10^5$ células/mL foram depositados em doze tubos de ensaio.

Por um período de quatro dias consecutivos, as células contidas em três tubos de ensaios foram contadas em câmara de Neubauer em intervalos de 24 h. Durante esse período, não foi realizada a troca do meio de cultura e os tubos de ensaio foram mantidos em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂.

Os valores obtidos foram projetados em gráfico utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*.

4.4 Determinação *in vitro* do Índice de Citotoxicidade

O teste *in vitro* de citotoxicidade pelo método de incorporação do corante vermelho neutro foi realizado em conformidade com as normas internacionais (ISO 10993-5, 2009) e a metodologia descrita na literatura (Magalhães e col., 2014; Moreno, 2009; Rogero e col., 2003).

Este estudo foi realizado em culturas de células das linhagens NCI-H292 e NCTC Clone 929 preparadas em microplacas de 96 poços como descrito no item 4.1.

Na cultura de células NCI-H292 foram avaliados o IC_{50%} do resveratrol, da colchicina e da hidroxiuréia. Na cultura de células NCTC Clone 929 foi avaliado o IC_{50%} somente do resveratrol.

O meio de cultura utilizado no ensaio com a linhagem NCI-H292 foi o RPMI1640-uso e no ensaio com a linhagem NCTC Clone 929 foi utilizado MEM-uso.

Inicialmente, extratos dos controles positivo e negativo foram preparados. Para o controle positivo, foi utilizado um fragmento de látex de borracha (2,0 x 2,0 cm) em 16 mL de meio de cultura. Como controle negativo,

0,5 g de polietileno de alta densidade (HDPE) foi adicionado em 5,0 mL de meio de cultura (FIG. 8). Ambos os controles permaneceram por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂. A seguir, os extratos dos controles positivo e negativo foram diluídos em série em meio de cultura obtendo-se as concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 %.

FIGURA 8 – Controle positivo (látex de borracha) e controle negativo (polietileno de alta densidade). (A) Controles positivo e negativo em RPMI1640-uso; (B) Controles positivo e negativo em MEM-uso.

Soluções estéreis de resveratrol foram preparadas como descrito no item 4.2, obtendo-se cinco diferentes concentrações em RPMI1640-uso e em MEM-uso (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 %).

Soluções estéreis de colchicina (128 µg/mL) e hidroxiuréia (25,6 mg/mL) foram submetidas aos mesmos procedimentos das soluções de resveratrol, obtendo-se cinco diferentes concentrações (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 %).

A TAB. 1 expressa as concentrações das soluções de resveratrol, colchicina e hidroxiuréia.

TABELA 1 – Concentração das soluções de resveratrol, colchicina e hidroxiuréia utilizadas no ensaio *in vitro* de citotoxicidade.

Concentração dos Extratos (%)	Resveratrol em RPMI1640-uso (µM/L)	Resveratrol em MEM-uso (µM/L)	Colchicina (µg/mL)	Hidroxiuréia (mg/mL)
100	500	250	128	25,6
50	250	125	64	12,8
25	125	62,5	32	6,4
12,5	62,5	31,25	16	3,2
6,25	31,25	15,63	8	1,6

RPMI1640-uso: meio RPMI1640 suplementado com soro fetal bovino 10 %; MEM-uso: meio Mínimo de Eagle suplementado com soro fetal bovino 10 %, aminoácidos não essenciais 0,1 mM e piruvato de sódio 1,0 mM.

Volumes de 0,2 mL de cada diluição das soluções de resveratrol, colchicina, hidroxiuréia, controle positivo e controle negativo foram depositados individualmente nos poços das microplacas contendo a cultura de células NCI-H292 em uma densidade de $9,0 \times 10^4$ células/poço e nas microplacas com a linhagem NCTC Clone 929, em uma densidade de $7,0 \times 10^4$ células/poço. Nos poços que representaram o controle de células foi adicionado 0,2 mL de meio de cultura.

A FIG. 9 ilustra esquematicamente a distribuição das soluções na microplaca de cultura celular.

Soluções da Amostra

A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
B	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%
C	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%
D	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%
E	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%
F			6,25%	12,5%	25%	50%	100%	6,25%	12,5%	25%	50%	100%
G			6,25%	12,5%	25%	50%	100%	6,25%	12,5%	25%	50%	100%
H			6,25%	12,5%	25%	50%	100%	6,25%	12,5%	25%	50%	100%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Controle de Células		Controle Negativo					Controle Positivo				

FIGURA 9 – Representação esquemática da distribuição das soluções nos 96 poços da microplaca de cultura celular para a realização do teste de citotoxicidade.

Concluída a distribuição das soluções, as microplacas foram mantidas por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂. Esse período de incubação foi necessário para a incorporação do resveratrol pelas células em cultura.

Após o período de incubação, as soluções contidas nas microplacas foram substituídas por meio de cultura contendo 50 µg/mL do corante vermelho neutro. Decorrido um novo período de incubação de 3 h, as células foram lavadas duas vezes com solução fosfatada tamponada (PBS), pH 7,4, e uma vez com solução aquosa de cloreto de cálcio 10 % em formaldeído 0,5 % (1:100) (FIG. 10).

FIGURA 10 – Processo de lavagem da microplaca para a remoção do corante não incorporado pelas células. (A) Lavagem com PBS; (B) Lavagem com solução de cloreto de cálcio 10 % em formaldeído 0,5 %.

Em seguida, um volume de 0,2 mL da solução de extração constituída de ácido acético glacial 0,2 % em etanol (1:1) foi adicionado em cada poço. A solução de extração é responsável pela lise da membrana celular, promovendo a liberação do corante incorporado pelas células vivas. Assim, a quantidade de corante liberada é diretamente proporcional ao número de células sobreviventes após o contato direto com os solutos.

Em prosseguimento, as microplacas foram submetidas à leitura de densidade óptica (DO) no espectrofotômetro (*RC Sunrise - Tecan*, Männedorf, Suíça) equipado com filtro de 540 nm e 620 nm como referência (FIG. 11).

FIGURA 11 – Espectrofotômetro integrado ao *notebook* para leitura das densidades ópticas em microplaca de 96 poços.

Os valores das porcentagens de viabilidade celular, calculados em relação ao controle de células do ensaio (100 %), foram projetados em gráfico, obtendo-se as curvas de viabilidade celular. O índice de citotoxicidade - $IC_{50\%}$, que representa a concentração do extrato que induz a morte de 50 % da população celular no ensaio, foi estimado no gráfico com auxílio do programa *GraphPad Prism 5.0*.

A metodologia descrita acima foi obtida após a realização de alguns ajustes referentes à densidade celular e ao período de incubação das microplacas necessário para a adesão e a formação da monocamada celular. Assim, o ensaio realizado para estimar o $IC_{50\%}$ do resveratrol na cultura celular de NCI-H292 foi efetuado em cinco diferentes condições, sendo apresentadas em grupos:

- Grupo A: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 48 h;
- Grupo B: microplaca de 96 poços contendo $1,0 \times 10^5$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h;
- Grupo C: microplaca de 96 poços contendo $7,5 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h;
- Grupo D: microplaca de 96 poços contendo $7,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h;
- Grupo E: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h.

O ensaio do Grupo A foi realizado em uma única microplaca de 96 poços, assim como também os Grupos B, C e D. No Grupo E foram realizados quatro ensaios independentes e com a linhagem NCTC Clone 929, cinco ensaios independentes. Para a obtenção do $IC_{50\%}$ da colchicina e da hidroxiuréia, foi utilizada uma microplaca para cada composto.

4.5 Cálculo da distribuição de dose da radiação ionizante

O cálculo da distribuição de dose da radiação ionizante foi realizado de acordo com a necessidade de cada teste que envolve a exposição da cultura celular à radiação.

Visando uma melhor precisão na localização geométrica das microplacas e placas de Petri, maior exatidão na liberação da dose e melhor conformação na distribuição da dose de radiação nas células em cultura, todas as etapas que constituem o processo de planejamento do tratamento dos pacientes oncológicos utilizando as técnicas de radioterapia tridimensional conformada (3DCRT) e radioterapia de intensidade modulada (IMRT - *Intensity Modulation Radiation Therapy*) foram efetuadas nas células em cultura.

Logo, para a obtenção da densidade eletrônica e uma maior precisão espacial da(s) microplaca(s) e da(s) placa(s) de Petri com a cultura celular aderida, imagens de tomografia computadorizada de planejamento foram adquiridas em um CT-Simulador *LightSpeed RT16 Systems* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom) e diretamente transferidas ao

Sistema de Planejamento Computadorizado 3D (*Eclipse™ Treatment Planning System software* versão 11, Varian Medical System, Inc., Palo Alto, CA, USA). O algoritmo de cálculo de dose utilizado foi o *Analytical Algorithm Anisotropic* ("AAA" versão 31, Varian Medical System, Inc., Palo Alto, CA, USA).

Ao término dos planejamentos de irradiação, foi realizado o controle de qualidade efetuando medidas da dose com câmara de ionização. O controle de qualidade foi realizado para validar e verificar se a dose calculada no planejamento é compatível com a dose medida no acelerador linear.

4.5.1 Aquisição das imagens de tomografia computadorizada de planejamento

Foram utilizadas seis diferentes geometrias de posicionamento da(s) microplaca(s) e placa(s) de Petri e, para cada geometria, foi adquirida uma série de imagens de tomografia computadorizada de planejamento. Para tal, as microplacas e as placas de Petri foram preparadas conforme descrito no item 4.1.

Inicialmente, o meio de cultura RPMI1640-uso contido nas microplacas de 96 e 24 poços foi substituído por 0,2 e 1,0 mL de PBS em cada poço, respectivamente. Já nas placas de Petri, o meio de cultura foi substituído por 5,0 mL de PBS em cada placa.

Para favorecer a homogeneidade das doses de radiação na cultura celular, as séries de imagens da tomografia computadorizada de planejamento foram adquiridas com a(s) microplaca(s) e placa(s) de Petri dispostas separadamente entre duas placas de água sólida de 30 x 30 x 4,0 cm (*Solid Water® Phantom*, Gammex RMI, Wisconsin, USA) e dois *bolus* de 30 x 30 x 1,0 cm (CIVCO Medical Solutions, Iowa, EUA) formando diferentes arranjos geométricos (FIG. 12). A placa de água sólida e o *bolus* são materiais com propriedades dosimétricas de absorção similares ao tecido humano.

FIGURA 12 – Microplaca disposta entre duas placas de água sólida e dois *bolus*. Imagem axial da tomografia computadorizada de planejamento à direita. (1) Placas de água sólida; (2) Microplaca de 96 poços; (3) *Bolus*.

Cada série de imagens da tomografia computadorizada de planejamento adquirida correspondeu a um diferente arranjo geométrico formado por microplaca(s) ou placa(s) de Petri. Sendo assim, para o teste da Dose Letal 50 % da radiação ionizante foi adquirida uma série com duas microplacas de 96 poços, dispostas paralelamente, contendo a monocamada celular aderida e 0,2 mL de PBS em cada poço (FIG. 13).

FIGURA 13 – Imagens de tomografia computadorizada de planejamento nos planos axial e coronal do arranjo formado com duas microplacas de 96 poços utilizadas no teste da Dose Letal 50 % da radiação ionizante.

No teste da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular foi utilizada uma única microplaca de 96 poços contendo a monocamada celular e 0,2 mL de PBS em cada poço (FIG. 14).

FIGURA 14 - Imagens de tomografia computadorizada de planejamento nos planos axial e coronal do arranjo formado com uma microplaca de 96 poços utilizada no teste da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular.

No teste do Micronúcleo foram adquiridas duas séries, a primeira com um arranjo de doze placas de Petri e a segunda, com apenas uma placa; em ambas as séries, as placas de Petri continham as células NCI-H292 aderidas em lamínulas (26 x 40 mm) e um volume de 5,0 mL de PBS (FIG. 15).

FIGURA 15 - Imagens de tomografia computadorizada de planejamento nos planos axial e coronal de dois diferentes arranjos formados com placas de Petri contendo as células NCI-H292 aderidas em lamínulas utilizadas no teste do Micronúcleo.

No teste da avaliação do potencial clonogênico foi adquirida uma série com doze placas de Petri contendo as células aderidas diretamente nas placas e um volume de 5,0 mL de PBS (FIG. 16).

FIGURA 16 - Imagens de tomografia computadorizada de planejamento nos planos axial e coronal do arranjo formado com doze placas de Petri com as células aderidas diretamente nas placas utilizadas no teste da avaliação do potencial clonogênico.

Nos testes de avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, apoptose e necrose celular, foi adquirida uma única série utilizando uma microplaca de 24 poços contendo a monocamada celular e 1,0 mL de PBS por poço (FIG. 17).

FIGURA 17 - Imagens de tomografia computadorizada de planejamento nos planos axial e coronal do arranjo formado com uma microplaca de 24 poços utilizada nos testes de avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e nos processos de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular.

A técnica utilizada para a aquisição das imagens de tomografia computadorizada de planejamento foi 140 Kv, 180 mA, espessura de corte de 0,625 mm e matrix de 512 x 512.

As posições das microplacas e das placas de Petri foram desenhadas em papel milimetrado, para que o posicionamento fosse milimetricamente reproduzido durante a irradiação da cultura celular no acelerador linear (FIG. 18).

FIGURA 18 – Posições geométricas das microplacas e das placas de Petri registradas em papel milimetrado.

4.5.2 Planejamento

O sistema de planejamento computadorizado 3D simula virtualmente a distribuição da dose de radiação na região de interesse com base nos dados dosimétricos e de configuração do acelerador linear e, nas densidades eletrônicas das estruturas fornecidas nas imagens de tomografia computadorizada (Khan e Potish, 1998).

Assim, as imagens de tomografia computadorizada de planejamento das microplacas e das placas de Petri foram diretamente transferidas ao sistema de planejamento computadorizado 3D via *DICOM* (*Digital Imaging Communications in Medicine*). *DICOM* é um protocolo em formato eletrônico estruturado por um conjunto de normas para tratamento, armazenamento e transmissão de informações médicas.

Estruturas de interesse foram delineadas visando à obtenção da sua imagem volumétrica (3D) e a estimativa da dose volumétrica e pontual em cada uma delas, o que possibilitou um maior controle e exatidão nas doses de radiação a serem liberadas na cultura celular. Nas séries da tomografia computadorizada de planejamento com as microplacas de 96 e 24 poços, cada poço foi delineado individualmente, e nas imagens com as placas de Petri, cada placa foi contornada separadamente. O conjunto formado pelas placas de água sólida, o *bolus* e a(s) microplaca(s) ou placa(s) de Petri foi delineado nas seis séries da tomografia computadorizada de planejamento (FIG. 19, 20, 21 e 22).

FIGURA 19 - Imagens de tomografia computadorizada de planejamento no plano axial e reconstrução volumétrica (3D) das estruturas de interesse delineadas nos dois arranjos formados com as microplacas de 96 poços.

FIGURA 20 - Imagens de tomografia computadorizada de planejamento no plano axial e reconstrução volumétrica (3D) das estruturas de interesse delineadas nos dois arranjos formados com as placas de Petri com lamínula.

FIGURA 21 - Imagem de tomografia computadorizada de planejamento no plano axial e reconstrução volumétrica (3D) das estruturas de interesse delineadas no arranjo formado com as placas de Petri sem lamínula.

FIGURA 22 - Imagem da tomografia computadorizada de planejamento no plano axial e reconstrução volumétrica (3D) das estruturas de interesse delineadas no arranjo formado com a microplaca de 24 poços.

Após o delineamento das estruturas de interesse nas seis séries da tomografia computadorizada de planejamento, foram calculados 13 planos de irradiação utilizando tanto a técnica 3DCRT como IMRT. Todos os planos de irradiação da cultura celular foram calculados para o acelerador linear *TrueBeam™ System* utilizando o algoritmo de cálculo de dose AAA (Varian Medical System, Inc., Palo Alto, CA, USA).

Para obter uma melhor exatidão e homogeneidade da dose de radiação, os planejamentos foram realizados com campos posteriores, evitando assim a entrada do feixe de radiação pela superfície anterior da(s) microplaca(s) e da(s) placa(s) de Petri, nas quais há um maior volume de ar atmosférico contido entre a tampa e o meio de cultura celular; porém, devido à presença de ar atmosférico no interior da microplaca e da placa de Petri, os cálculos da distribuição de dose foram realizados com correções por heterogeneidades.

Para o teste da Dose Letal 50 % da radiação ionizante foi realizado um planejamento com fração única de fótons, energia de 6 MV, taxa de dose de 14 Gy/min e doses de 250, 500, 750 e 1.000 Gy utilizando a técnica IMRT.

Para o teste da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular foi realizado um planejamento utilizando a técnica 3DCRT, fração única de fótons com energia de 6 MV, taxa de dose de 6 Gy/min e doses de 100, 200, 400 e 900 Gy. O planejamento com a taxa de dose de 14 Gy/min, calculado para o teste da Dose Letal 50 % da radiação ionizante, forneceu os dados complementares para a avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular.

Para o teste do Micronúcleo, foram realizados cinco planejamentos. Um planejamento foi calculado com a técnica IMRT, fração única de fótons com energia de 6 MV, taxa de dose de 14 Gy/min e doses de 0,8, 5 e 10 Gy. Os demais planejamentos foram realizados utilizando a técnica 3DCRT, fração simples de 6 MV, taxa de dose de 14 Gy/min e doses de 25, 34, 50 e 100 Gy, sendo uma dose para cada planejamento.

Para o teste da avaliação do potencial clonogênico, o planejamento com a técnica IMRT consistiu em uma simples fração de fótons com energia de 6 MV, taxa de dose de 14 Gy/min e doses de 0,8, 5, 10 Gy.

Para os testes de avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular, foram realizados cinco planejamentos. Dois planejamentos foram calculados com a técnica 3DCRT e IMRT, que consistiram em uma fração de fótons com energia de 6 MV, taxa de dose de 14 Gy/min e doses de 0,8, 5 e 10 Gy. Os três planejamentos restantes foram realizados utilizando a técnica 3DCRT, fração única de fótons com energia de 6 MV, taxa de dose de 14 Gy/min e doses de 0,8, 5 e 10 Gy, sendo uma dose para cada planejamento.

A avaliação de todos os planejamentos foi realizada individualmente de forma qualitativa, por meio da análise da distribuição de dose visualizada nas imagens axiais da tomografia computadorizada de planejamento, e quantitativa, por meio do histograma de dose volume (DVH - *Dose-Volume Histogram*) e estatística de dose.

4.5.3 Controle de qualidade dos planejamentos

Como procedimento de rotina do Serviço de Radioterapia do Hospital Israelita Albert Einstein, o acelerador linear *TrueBeamTM System* foi calibrado com uma câmara Farmer com volume de 0,6 cc, modelo FC65 SN25678 (IBA Dosimetry GmbH, Schwarzenbruck, Alemanha), calibrada no IPEN, com certificado de calibração datada de 12/01/2014.

O controle de qualidade dos planejamentos consistiu em realizar medidas de dose com uma câmara de ionização para comparar a dose medida no

acelerador linear com a dose calculada no sistema de planejamento computadorizado 3D, verificando possíveis diferenças.

Para tal, no sistema de planejamento computadorizado 3D, os treze planejamentos foram transferidos para um objeto simulador de polimetilmetacrilato (PMMA) (FIG. 23).

FIGURA 23 - Planejamento transferido para o objeto simulador de PMMA para a realização do controle de qualidade.

No acelerador linear *TrueBeam™ System*, a câmara de ionização modelo semiflex com volume de 0,125 cc, modelo 310010 PTW® (IBA Dosimetry GmbH, Schwarzenbruck, Alemanha), foi posicionada no objeto simulador de PMMA e foram executados os planejamentos de irradiação separadamente (FIG. 24).

FIGURA 24 - Câmara de ionização modelo semiflex e objeto simulador de PMMA posicionados na mesa do acelerador linear *TrueBeam™ System*.

Ao término das medidas de dose realizadas com a câmara de ionização, foram calculadas as diferenças entre as doses medidas no acelerador linear e as doses calculadas no Sistema de Planejamento Computadorizado 3D. As diferenças de dose foram projetadas em gráfico.

Para aprovação dos planejamentos, foram utilizados os mesmos critérios clínicos de pacientes, considerando adequados os planos que apresentaram uma variação de dose menor que 3 %.

4.6 Determinação *in vitro* da Dose Letal 50 % da radiação ionizante e Avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular

A dose letal 50 % (DL₅₀) foi determinada para verificar a dose de radiação ionizante que induz a morte de 50 % da população celular.

Com a finalidade de verificar a DL₅₀ e o efeito da taxa de dose na resposta celular, microplacas de 96 poços, contendo a cultura de células NCI-H292 em uma densidade de $9,0 \times 10^4$ células/poço, foram preparadas como descrito no item 4.1.

O meio de cultura RPMI1640-uso contido nas microplacas foi substituído por 0,2 mL PBS (pH = 7,4) em cada poço e as microplacas foram submetidas à radiação ionizante provinda do acelerador linear utilizando as técnicas 3DCRT e IMRT, conforme exposto no item 4.5.

A irradiação consistiu na exposição das microplacas a uma simples fração de fótons com energia de 6 MV e doses de 100, 200, 400 e 900 Gy com taxa de dose de 6 Gy/min, e 250, 500, 750 e 1.000 Gy com taxa de dose de 14 Gy/min. Para tal, as microplacas foram colocadas nas mesmas posições em que foram adquiridas as imagens de tomografia computadorizada de planejamento, descritas no item 4.5.1.

O controle foi representado pelas microplacas não irradiadas (0 Gy) que permaneceram protegida da luz e em temperatura semelhante à da sala do acelerador linear (19 a 21 °C) durante o período de irradiação das demais microplacas.

A FIG. 25 mostra o Acelerador Linear *TrueBeam*TM System com a microplaca posicionada entre as placas de água sólida e os *bolus*.

FIGURA 25 - Acelerador Linear *TrueBeam™* System com a microplaca posicionada para a irradiação.

Após a irradiação, o PBS foi substituído por meio RPMI1640-uso e as microplacas foram incubadas por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂. Em sequência, os procedimentos de incorporação do corante vermelho neutro, lavagem das células e leitura das densidades ópticas foram realizados conforme descrito no item 4.4.

Para determinar a DL₅₀ da radiação ionizante e avaliar o efeito da taxa de dose na resposta celular, foram projetadas em gráfico as porcentagens de células sobreviventes (viabilidade celular) em função das doses de radiação utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*.

Visando à verificação da reprodutibilidade destes testes biológicos, foram realizados três ensaios independentes com a taxa de dose de 6 Gy/min e dois ensaios independentes com a taxa de dose de 14 Gy/min.

4.7 Teste *in vitro* do Micronúcleo

O teste *in vitro* do Micronúcleo pelo método do bloqueio citocinético utilizando a citocalasina-B foi realizado em conformidade com a metodologia descrita na literatura, porém com algumas modificações associadas à ausência de controles positivo e negativo (Fenech, 2000; Ocampo e col., 2013; OECD 487, 2012).

Este teste utilizou a cultura de células NCI-H292 aderida em lamínulas de 26 x 40 mm depositadas em placas de Petri de 25 cm², preparadas conforme descrito no item 4.1. Para tal, volumes de 500 µL da suspensão celular de $1,0 \times 10^5$ células/mL foram colocados sobre as lamínulas e, após a adesão celular, foi acrescentado 1,5 mL de RPMI1640-uso em cada placa contendo a lamínula. Em seguida, as placas de Petri permaneceram por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂.

O teste do micronúcleo foi aplicado em três grupos distintos, sendo eles:

- Grupo A: cultura celular exposta ao resveratrol em concentrações inferiores ao IC_{50%};
- Grupo B: cultura celular exposta à radiação ionizante em doses inferiores a DL₅₀;
- Grupo C: cultura celular exposta a diferentes concentrações de resveratrol e doses de radiação ionizante em valores inferiores ao IC_{50%} e a DL₅₀, respectivamente.

Os Grupos A e C foram realizados em triplicata. O Grupo B foi realizado uma única vez.

4.7.1 Grupo A: Exposição ao resveratrol

Este teste biológico foi realizado para avaliar a capacidade do resveratrol em induzir danos cromossômicos em cultura de células NCI-H292.

Inicialmente, soluções estéreis de resveratrol foram preparadas como descrito no item 4.2, obtendo-se três diferentes concentrações: 15, 30 e 60 μM . Em sequência, um volume de 5,0 mL de cada solução de resveratrol foi depositado individualmente nas placas de Petri contendo a cultura de células NCI-H292. As placas que representaram o controle de células (0 μM de resveratrol) receberam 5,0 mL de RPMI1640-uso. Concluída a distribuição das soluções, as placas de Petri permaneceram por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO_2 .

Decorrido esse período, as soluções de resveratrol e o meio de cultura foram descartados e um volume de 3,0 mL da solução de citocalasina-B em meio RPMI1640-uso (4,0 $\mu\text{g/mL}$) foi distribuído em cada placa de Petri. As placas foram mantidas por 48 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO_2 . A citocalasina-B induz a formação de células binucleadas devido ao bloqueio da citocinese (divisão do citoplasma) sem alteração da cariocinese (divisão nuclear). Assim, o número de núcleos apresentado pela célula é diretamente proporcional ao número de divisões celulares ocorridas.

Em sequência, as células foram lavadas uma vez com PBS (pH = 7,4), tratadas com solução isotônica de NaCl 0,9 % por 15 minutos e fixadas com uma solução de formaldeído 4 % em água por 15 minutos. Após este período, as células fixadas foram lavadas duas vezes com PBS, para a remoção do excesso de formaldeído, e secas à temperatura ambiente. As lamínulas com as células fixadas foram coradas com solução de acridina laranja (0,003 % em PBS) e depositadas sobre lâminas de vidro de 26 x 76 mm (FIG. 26).

FIGURA 26 – Processo de coloração: células, fixadas em lamínula, depositadas diretamente sobre a lâmina com acridina laranja para leitura no microscópio de fluorescência.

A visualização dos micronúcleos foi realizada em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) utilizando filtros adequados (Excitação: 450 - 490 nm, Emissão: 515 nm) e objetivas de 20x e 40x (FIG. 27).

FIGURA 27 - Microscópio de fluorescência integrado ao computador.

A leitura das lamínulas obedeceu aos critérios pré-estabelecidos na literatura (Fenech, 2007; Heddle e col., 2011; OECD 487, 2012). Desta forma, foram contabilizadas apenas as células com o citoplasma íntegro, sendo diferenciadas em mononucleadas (um núcleo por célula), binucleada (dois núcleos por célula), multinucleada (três a quatro núcleos por célula) e células binucleadas com presença de micronúcleo. O término da contagem das células ocorreu quando foram contabilizadas 1.000 células binucleadas por lamínula.

Nesta análise, três parâmetros foram avaliados:

- Índice do bloqueio da citocinese (CBPI - *Cytokinesis-Block Proliferation Index*);
- Índice de replicação (RI - *Replication Index*);
- Frequência de micronúcleo (% FMN).

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*.

4.7.2 Grupo B: Exposição à radiação ionizante

Para avaliar o efeito da radiação ionizante na indução de danos cromossômicos, o meio de cultura contido nas placas de Petri foi substituído por 5,0 mL/placa de PBS (pH = 7,4) e as placas foram submetidas à radiação ionizante provida do Acelerador Linear *TrueBeam™ System* utilizando a técnica 3DCRT, como descrito no item 4.5.

A irradiação consistiu em submeter as placas, colocadas nas mesmas posições em que foram adquiridas as imagens de tomografia computadorizada de planejamento, a uma simples fração de fótons com energia de 6 MV, doses de 25, 34, 50 e 100 Gy e taxa de dose de 14 Gy/min. As placas não irradiadas (0 Gy), que representaram o controle de células, permaneceram protegida da luz e em temperatura semelhante à da sala do acelerador linear (19 a 21 °C) durante o período de irradiação das demais.

Após a irradiação, o PBS foi substituído por 3,0 mL/placa da solução de citocalasina-B em meio RPMI1640-uso (4,0 µg/mL) e as placas permaneceram por 48 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂.

Em sequência, os procedimentos de lavagem, tratamento com solução isotônica, fixação, coloração, leitura e análise estatística decorreram conforme descritos no item 4.7.1.

4.7.3 Grupo C: Exposição ao resveratrol e à radiação ionizante

Para avaliar o efeito do resveratrol em concomitância com o efeito da radiação ionizante na indução de danos cromossômicos, soluções estéreis de resveratrol foram preparadas como descrito no item 4.2, obtendo-se três diferentes concentrações: 15, 30 e 60 µM.

Um volume de 5,0 mL de cada solução de resveratrol foi depositado individualmente nas placas de Petri contendo a cultura de células NCI-H292. As placas que representaram a concentração de 0 µM de resveratrol receberam 5,0 mL de meio RPMI1640-uso. As placas de Petri foram incubadas por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂.

Após esse período, as soluções de resveratrol e o meio de cultura foram substituídos por 5,0 mL/placa de PBS (pH = 7,4) e as placas foram

submetidas à radiação ionizante provinda do Acelerador Linear *TrueBeam™* *System* utilizando a técnica IMRT, conforme descrito no item 4.5.

A irradiação consistiu em submeter as placas de Petri, colocadas nas mesmas posições em que foram adquiridas as imagens de tomografia computadorizada de planejamento, a uma simples fração de fótons com energia de 6 MV, taxa de dose de 14 Gy/min e doses de 0,8, 5 e 10 Gy.

As placas não irradiadas (0 Gy) permaneceram protegida da luz e em temperatura semelhante à da sala do acelerador linear (19 a 21 °C) durante o período de irradiação das demais. O controle de células foi representado pelas placas com 0 µM de resveratrol e não irradiadas.

Após a irradiação, o PBS foi substituído por 3,0 mL da solução de citocalasina-B em meio RPMI1640-uso (4,0 µg/mL) e as placas de Petri permaneceram por 48 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂.

Em sequência, os procedimentos de lavagem, tratamento com solução isotônica, fixação, coloração, leitura e análise estatística decorreram conforme descritos no item 4.7.1.

4.8 Avaliação do Potencial Clonogênico

A avaliação do potencial clonogênico da linhagem celular NCI-H292, exposta ao resveratrol e à radiação ionizante, foi realizada em paralelo com o teste *in vitro* do micronúcleo, descrito no item 4.7.

Inicialmente, um volume de 2,0 mL da suspensão celular de $2,5 \times 10^2$ células/mL foi depositado em cada placa de Petri de 25 cm² e as placas permaneceram por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂, como descrito no item 4.1.

Soluções estéreis de resveratrol foram preparadas conforme exposto no item 4.2, obtendo-se três diferentes concentrações: 15, 30 e 60 µM. Em sequência, um volume de 5,0 mL de cada solução de resveratrol foi depositado individualmente nas placas de Petri contendo a cultura de células NCI-H292. As placas que representaram o controle de células (0 µM de resveratrol) receberam 5,0 mL de RPMI1640-uso. Concluída a distribuição das soluções, as placas foram mantidas por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂. Esse

período de incubação foi necessário para a incorporação do resveratrol pelas células em cultura.

Após esse período, as soluções de resveratrol e o meio RPMI1640-uso foram substituídos por 5,0 mL/placa de PBS (pH = 7,4) e as placas foram submetidas à radiação ionizante provinda do Acelerador Linear *TrueBeam™ System* utilizando a técnica IMRT, como descrito no item 4.5.

A irradiação consistiu em submeter as placas de Petri, colocadas nas mesmas posições em que foram adquiridas as imagens de tomografia computadorizada de planejamento, a uma simples fração de fótons com energia de 6 MV, taxa de dose de 14 Gy/min e doses de 0,8, 5 e 10 Gy. As placas não irradiadas (0 Gy) permaneceram protegida da luz e em temperatura semelhante à da sala do acelerador linear (19 a 21 °C) durante o período de irradiação das demais. O controle de células foi representado pelas placas de Petri com 0 µM de resveratrol e 0 Gy de radiação.

Após a irradiação, o PBS foi substituído por 5,0 mL de meio RPMI1640-uso contendo 1 % de antibiótico (Penicilina $2,0 \times 10^4$ unidades/mL e Estreptomicina 10 mg/mL). As placas foram mantidas por 10 dias em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂, período este necessário para a formação de colônias com aproximadamente 50 células.

Em sequência, o meio de cultura das placas foi aspirado com auxílio de uma bomba de vácuo - Compressor Aspirador (FANEN Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e as células foram lavadas uma vez com PBS, fixadas com uma solução de formaldeído 4 % em água por 15 minutos e coradas com uma solução de Giemsa 20 % por 15 minutos.

Após este período, as células coradas foram lavadas duas vezes em água corrente, para a remoção do excesso de corante, e secas à temperatura ambiente (FIG. 28).

FIGURA 28 - Processo de coloração: células imersas em solução de Giemsa 20 % e lavagem das placas de Petri em água corrente para a remoção do excesso de corante.

As colônias formadas em cada placa de Petri foram analisadas e contadas no microscópio óptico HEMO 0028 (Coleman Equipamentos para Laboratório Com. e Imp. Ltda., Santo André, SP, Brasil), utilizando a objetiva acromática de 4x/0.10 (FIG. 29).

FIGURA 29 - Microscópio óptico utilizado para a contagem das colônias.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*. Para avaliar o potencial clonogênico da linhagem celular NCI-H292, exposta ao resveratrol e à radiação ionizante, foram realizados três ensaios independentes em triplicata.

Devido à dificuldade encontrada em obter uma curva de sobrevivência das células NCI-H292 em cultura expostas ao resveratrol e à radiação ionizante, foi realizado um ensaio em duplicata adicionando um volume de 2,0 mL da suspensão celular nas concentrações de $1,25 \times 10^3$ células/mL, $6,25 \times 10^2$ células/mL, $5,0 \times 10^2$ células/mL e $2,5 \times 10^2$ células/mL. Em sequência, as placas de Petri foram mantidas em estufa úmida a 37 °C com 5 % de CO₂ por 10 dias. Os procedimentos de fixação celular, coloração, lavagem das placas, leitura e análise estatística seguiram conforme a metodologia descrita acima. Neste ensaio não foi adicionado antibiótico.

4.9 Avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida

Inicialmente, 1,0 mL da suspensão celular com $1,7 \times 10^5$ células/mL foi depositado nos poços das microplacas de 24 poços e permaneceram por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂, conforme descrito no item 4.1.

Soluções estéreis de resveratrol foram preparadas em meio RPMI-uso conforme exposto no item 4.2, obtendo-se três diferentes concentrações: 15, 30 e 60 µM. Soluções estéreis de colchicina (0,08 µg/mL) e hidroxiuréia (152,12 µg/mL), preparadas em meio de cultura RPMI1640-uso, foram utilizadas como referência para a sincronização do ciclo celular nas fases de mitose e de síntese. Para tal, as concentrações das soluções de hidroxiuréia e de colchicina utilizadas foram inferiores aos valores do IC_{50%}, obtidos no teste *in vitro* de citotoxicidade, e adequadas para promover a sincronização do ciclo celular em diferentes linhagens celulares, conforme relatado na literatura (Adams e Lindsay, 1967; Banfalvi, 2011; Taylor, 1965).

Volumes de 0,5 mL de cada solução de resveratrol, colchicina e hidroxiuréia foram depositados individualmente nos poços das microplacas contendo a cultura de células da linhagem NCI-H292. Nos poços D1 a D6, que

representaram o controle de células, foi adicionado 0,5 mL de meio RPMI1640-uso (FIG. 30).

	1	2	3	4	5	6
A	Resveratrol 15 μ M	Resveratrol 60 μ M	Resveratrol 15 μ M	Resveratrol 60 μ M	Resveratrol 15 μ M	Resveratrol 60 μ M
B	Resveratrol 30 μ M	Resveratrol 30 μ M	Resveratrol 30 μ M	Resveratrol 30 μ M	Resveratrol 30 μ M	Resveratrol 30 μ M
C	Hidroxiuréia	Colchicina	Hidroxiuréia	Colchicina	Hidroxiuréia	Colchicina
D	Controle de Células	Controle de Células	Controle de Células	Controle de Células	Controle de Células	Controle de Células

FIGURA 30 – Representação esquemática da distribuição das soluções nos 24 poços da microplaca de cultura celular.

Concluída a distribuição das soluções, as microplacas foram mantidas por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂.

Decorrido esse período, as soluções foram substituídas por 1,0 mL de PBS (pH = 7,4) e as microplacas foram submetidas à radiação ionizante provida do Acelerador Linear *TrueBeam™ System* utilizando as técnicas IMRT e 3DCRT, como descrito no item 4.5.

A irradiação consistiu em submeter as microplacas, colocadas nas mesmas posições em que foram adquiridas as imagens de tomografia computadorizada de planejamento, a uma simples fração de fótons com energia de 6 MV, taxa de dose de 14 Gy/min e doses de 0,8, 5 e 10 Gy. A microplaca não irradiada (0 Gy) permaneceu protegida da luz e em temperatura semelhante à da sala do acelerador linear (19 a 21 °C) durante o período de irradiação das demais.

O efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida foi verificado 3 h e 24 h após o término da irradiação das células em cultura. Para a avaliação realizada 3 h após o término

da irradiação celular, foram irradiadas quatro microplacas, sendo duas microplacas para cada técnica (IMRT e 3DCRT). Para a avaliação realizada após 24 h, foram irradiadas seis microplacas, sendo uma microplaca irradiada utilizando a técnica IMRT e as demais, utilizando a técnica 3DCRT com uma única dose para cada microplaca.

Assim, nas microplacas referentes às leituras realizadas após 3 h, foi adicionado 1,0 mL da solução de brometo de etídio (0,2 µg/mL) em cada poço e as microplacas permaneceram protegidas da luz e em temperatura ambiente por 5 minutos.

A FIG. 31 mostra a solução de brometo de etídio sendo filtrada para uso e a microplaca na etapa de coloração.

FIGURA 31 – Processo de filtragem da solução de brometo de etídio e etapa da coloração das células em cultura.

Decorrido esse período, o corante foi descartado e 500 µL de PBS foram adicionados em cada poço.

A detecção da fluorescência emitida pelo brometo de etídio foi efetuada no leitor *FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) com filtros adequados (Excitação: 360, Emissão: 590) .

Nas microplacas correspondentes as leituras realizadas após 24 h da irradiação, o PBS foi substituído por um volume de 1,0 mL/poço de meio RPMI1640-uso e permaneceram por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂. Em sequência, as células foram coradas com a solução de brometo de etídio (0,2 µg/mL), permanecendo em temperatura ambiente e protegidas da luz por 5 minutos. A detecção da fluorescência foi realizada no leitor *FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader* (FIG. 32).

FIGURA 32 - Leitor de fluorescência integrado ao computador.

Os valores de intensidade de fluorescência obtidos foram projetados em gráfico utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*.

4.10 Avaliação do efeito do resveratrol nos processos de apoptose e necrose celular

Para avaliar o efeito do resveratrol nos processos de apoptose e necrose celular, foi utilizado o kit *Annexin V-FITC* conforme a instrução do fabricante (*Sigma-Aldrich Chemical Co*, St. Louis, MO). Tal kit é composto pelos reagentes: iodeto de propídio (PI) e anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Volume de 1,0 mL da suspensão celular com $1,7 \times 10^5$ células/mL foi depositado nos poços de quatro microplacas de 24 poços e permaneceram por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂, conforme descrito no item 4.1.

Soluções estéreis de resveratrol foram preparadas como exposto no item 4.2, obtendo-se três diferentes concentrações: 15, 30 e 60 µM. Soluções estéreis de colchicina (0,08 µg/mL) e hidroxiuréia (152,12 µg/mL), preparadas em meio de cultura RPMI1640-uso, foram utilizadas como referência para a sincronização do ciclo celular nas fases de mitose e de síntese, respectivamente.

Volumes de 0,5 mL de cada solução de resveratrol, colchicina e hidroxiuréia foram depositados individualmente nos poços das microplacas contendo a cultura de células da linhagem NCI-H292. Nos poços D1 a D6, que representaram o controle de células, foi adicionado 0,5 mL de meio de cultura (FIG. 33).

	1	2	3	4	5	6
A	Resveratrol 15 μ M	Resveratrol 15 μ M	Resveratrol 15 μ M	Resveratrol 60 μ M	Resveratrol 60 μ M	Resveratrol 60 μ M
B	Resveratrol 30 μ M	Resveratrol 30 μ M	Resveratrol 30 μ M	Resveratrol 30 μ M	Resveratrol 15 μ M	Resveratrol 60 μ M
C	Hidroxiuréia	Hidroxiuréia	Hidroxiuréia	Colchicina	Colchicina	Colchicina
D	Controle de Células	Controle de Células	Controle de Células	Controle de Células	Controle de Células	Controle de Células

FIGURA 33 – Representação esquemática da distribuição das soluções nos 24 poços da microplaca de cultura celular.

Concluída a distribuição das soluções, as microplacas foram mantidas por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂.

Após o período de incubação, as soluções foram substituídas por 1,0 mL/poço de PBS e as microplacas foram submetidas à radiação ionizante provinda do Acelerador Linear *TrueBeam™ System* utilizando a técnica 3DCRT, conforme descrito no item 4.5.

A irradiação consistiu em submeter as microplacas, colocadas nas mesmas posições em que foram adquiridas as imagens de tomografia computadorizada de planejamento, a uma simples fração de fótons com energia de 6 MV, taxa de dose de 14 Gy/min e doses de 0,8, 5, 10 Gy, sendo uma dose para cada microplaca. A microplaca não irradiada (0 Gy) permaneceu protegida da luz e em temperatura semelhante à da sala do acelerador linear (19 a 21 °C) durante o período de irradiação das demais.

Após a irradiação, o PBS foi substituído por 1,0 mL de RPMI1640-uso e as microplacas foram incubadas por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera úmida com 5 % de CO₂.

Em sequência, volumes de 5,0 μ L de Anexina V-FITC + 10,0 μ L da solução de PI foram adicionados em cada poço das microplacas, as quais

permaneceram protegidas da luz e em temperatura ambiente por 10 minutos (FIG. 34).

FIGURA 34 - Microplacas contendo Anexina V-FITC e solução de PI mantidas protegidas da luz e em temperatura ambiente para a coloração das células.

Decorrido esse período, os corantes foram descartados e 500 μ L de PBS foram adicionados em cada poço.

A detecção da fluorescência emitida por FITC e por PI foi realizada no leitor *FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader*, *Molecular Devices*, com filtros adequados à detecção de FITC (Excitação: 495, Emissão: 519) e PI (Excitação: 305, Emissão: 620).

Os valores de intensidade de fluorescência obtidos foram projetados em gráfico utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva de crescimento celular

Para obter a curva de crescimento celular, foram efetuadas contagens do número de células em cada tubo de ensaio e calculados os valores médios diários.

A TAB. 2 expressa os valores médios e seus respectivos coeficientes de variação obtidos nas contagens de células.

TABELA 2 - Resultado da curva de crescimento celular: médias $\pm$ CV do número de células NCI-H292 contadas durante o período de 96 h.

Tempo (h)	24	48	72	96
Média de células	114.000 $\pm$ 13,91	238.000 $\pm$ 9,46	355.000 $\pm$ 17,65	303.000 $\pm$ 5,83

CV: coeficiente de variação.

Com os dados da TAB. 2, foram projetadas em gráfico as médias de células e seus respectivos coeficientes de variação em função do tempo, como apresentado na FIG. 35.

FIGURA 35 - Curva de crescimento celular da linhagem NCI-H292.

Considerando que foram inicialmente semeadas $1,09 \times 10^5$ células/tubo de ensaio, pode-se observar que ocorreu a multiplicação das células no período de 48 - 72 h, sendo que a maior multiplicação celular decorreu em torno de 72 h, seguindo em declínio até 96 h.

Segundo as especificações técnicas da linhagem NCI-H292, o tempo de duplicação celular é de 48 h (*American Type Culture Collection*, 2014). Logo, o resultado obtido neste ensaio foi semelhante ao fornecido pela ATCC.

A verificação da curva de crescimento da linhagem NCI-H292, foi importante para padronizar o tempo de incubação das células nos demais ensaios biológicos realizados.

5.2 Determinação *in vitro* do Índice de Citotoxicidade

O índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$) indica a concentração da amostra que induz a morte de 50 % da população celular utilizada no ensaio.

Para verificar a toxicidade do resveratrol, da colchicina e da hidroxiuréia, foram calculados os valores médios das DO e seus respectivos desvios padrão, bem como as porcentagens de viabilidade celular e seus coeficientes de variação.

Os ensaios realizados para estimar o IC_{50%} do resveratrol na cultura de células NCI-H292 foram divididos em cinco grupos, sendo eles:

- Grupo A: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 48 h;
- Grupo B: microplaca de 96 poços contendo $1,0 \times 10^5$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h;
- Grupo C: microplaca de 96 poços contendo $7,5 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h;
- Grupo D: microplaca de 96 poços contendo $7,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h;
- Grupo E: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h.

O período de incubação foi necessário para a adesão e a formação da monocamada celular adequada para a realização do ensaio.

Os valores médios das DO obtidos nos cinco grupos de ensaio realizado com a linhagem NCI-H292, após serem expostas a diferentes concentrações de resveratrol e dos controles positivo e negativo, estão expressos nas TAB. 3, 4 e 5, respectivamente.

TABELA 3 - Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: médias $\pm$ DP das DO referentes às diferentes concentrações de resveratrol obtidas com a cultura de células NCI-H292.

Resveratrol (μ M/L)	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
500,00	0,05 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,01
250,00	0,32 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,02
125,00	0,28 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,02
62,50	0,31 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,02
31,25	0,32 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,02

DP: desvio padrão; DO: densidade óptica; Grupo A: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 48 h; Grupo B: microplaca de 96 poços contendo $1,0 \times 10^5$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h; Grupo C: microplaca de 96 poços contendo $7,5 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h; Grupo D: microplaca de 96 poços contendo $7,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h; Grupo E: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h.

TABELA 4 – Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: médias $\pm$ DP das DO referentes às diferentes concentrações do controle positivo obtidas com a cultura de células NCI-H292.

Controle Positivo (%)	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
100,00	-0,01 $\pm$ 0,00	-0,01 $\pm$ 0,00	-0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
50,00	0,38 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
25,00	0,34 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,00
12,50	0,38 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,02
6,25	0,35 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,02

DP: desvio padrão; DO: densidade óptica.

TABELA 5 – Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: médias $\pm$ DP das DO referentes às diferentes concentrações do controle negativo obtidas com a cultura de células NCI-H292.

Controle Negativo (%)	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
100,00	0,32 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,02
50,00	0,35 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01
25,00	0,36 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,00	0,32 $\pm$ 0,01
12,50	0,32 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,01
6,25	0,38 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,01

DP: desvio padrão; DO: densidade óptica; Grupo A: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 48 h; Grupo B: microplaca de 96 poços contendo $1,0 \times 10^5$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h; Grupo C: microplaca de 96 poços contendo $7,5 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h; Grupo D: microplaca de 96 poços contendo $7,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h; Grupo E: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h.

A TAB. 6 apresenta os valores médios das DO obtidos nas microplacas contendo a cultura de células NCTC Clone 929 após serem expostas a diferentes concentrações de resveratrol e dos controles positivo e negativo.

TABELA 6 – Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: médias $\pm$ DP das DO referentes às diferentes concentrações do resveratrol, do controle positivo e do controle negativo obtidas com a cultura de células NCTC Clone 929.

Concentração (%)	Resveratrol	Controle Positivo	Controle Negativo
100,00	0,04 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00	0,26 $\pm$ 0,02
50,00	0,05 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01
25,00	0,06 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,02
12,50	0,17 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,02
6,25	0,24 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,02

DP: desvio padrão; DO: densidade óptica.

As TAB. 7 e 8 expressam os valores médios das DO obtidos nas microplacas contendo a cultura de células NCI-H292 submetidas a diferentes concentrações de colchicina e de hidroxiuréia, respectivamente.

TABELA 7 - Resultado do ensaio de citotoxicidade da colchicina: médias $\pm$ DP das DO referentes às diferentes concentrações de colchicina, do controle positivo e do controle negativo obtidas com a cultura de células NCI-H292.

Concentração (%)	Colchicina	Controle Positivo	Controle Negativo
100,00	0,21 $\pm$ 0,02	0,00 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,02
50,00	0,19 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,02
25,00	0,19 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,02
12,50	0,19 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,00
6,25	0,20 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,01

DP: desvio padrão; DO: densidade óptica.

TABELA 8 - Resultado do ensaio de citotoxicidade da hidroxiuréia: médias $\pm$ DP das DO referentes às diferentes concentrações de hidroxiuréia, do controle positivo e do controle negativo obtidas com a cultura de células NCI-H292.

Concentração (%)	Hidroxiuréia	Controle Positivo	Controle Negativo
100,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,02
50,00	0,08 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,01
25,00	0,22 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,01
12,50	0,23 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,02
6,25	0,20 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,02

DP: desvio padrão; DO: densidade óptica.

O controle de células, que representa 100 % de viabilidade celular, juntamente com os valores médios das DO, permite o cálculo das porcentagens de viabilidade celular utilizando a Equação 2:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \left(\frac{DO_{SL} \times 100}{DO_{CC}} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde, DO_{SL} representa o valor médio das densidades ópticas de cada diluição das amostras e dos extratos dos controles positivo e negativo; DO_{CC} , o valor médio das densidades ópticas referente ao controle de células do ensaio.

Os valores de viabilidade celular obtidos nos cinco grupos de ensaio com a exposição direta da cultura de células NCI-H292 às soluções de resveratrol e aos controles positivo e negativo estão registrados nas TAB. 9, 10 e 11.

TABELA 9 - Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: porcentagens de viabilidade celular $\pm$ CV referentes às diferentes concentrações de resveratrol obtidas com a cultura de células NCI-H292.

Resveratrol (μ M/L)	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
500,00	13,42 $\pm$ 13,60	1,75 $\pm$ 16,50	27,13 $\pm$ 12,90	3,91 $\pm$ 12,81	30,76 $\pm$ 13,07
250,00	84,29 $\pm$ 7,10	42,34 $\pm$ 17,12	83,12 $\pm$ 15,07	119,43 $\pm$ 3,52	80,89 $\pm$ 7,74
125,00	73,79 $\pm$ 9,22	51,45 $\pm$ 19,91	92,86 $\pm$ 7,61	106,57 $\pm$ 7,60	91,94 $\pm$ 6,01
62,50	81,80 $\pm$ 9,92	72,09 $\pm$ 14,76	91,56 $\pm$ 8,25	100,86 $\pm$ 3,74	99,37 $\pm$ 7,18
31,25	83,87 $\pm$ 6,32	78,10 $\pm$ 9,60	91,92 $\pm$ 17,40	100,36 $\pm$ 7,91	99,52 $\pm$ 7,53

CV: coeficiente de variação; Grupo A: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 48 h; Grupo B: microplaca de 96 poços contendo $1,0 \times 10^5$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h; Grupo C: microplaca de 96 poços contendo $7,5 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h; Grupo D: microplaca de 96 poços contendo $7,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h; Grupo E: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h.

TABELA 10 – Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: porcentagens de viabilidade celular $\pm$ CV referentes às diferentes concentrações do controle positivo obtidas com a cultura de células NCI-H292.

Controle Positivo (%)	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
100,00	-2,21 $\pm$ 18,33	-2,00 $\pm$ 12,50	2,40 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 15,41	1,13 $\pm$ 0,00
50,00	100,18 $\pm$ 5,91	68,36 $\pm$ 8,26	9,78 $\pm$ 0,00	10,99 $\pm$ 7,87	2,96 $\pm$ 0,72
25,00	90,91 $\pm$ 3,98	93,62 $\pm$ 14,14	102,32 $\pm$ 2,93	102,82 $\pm$ 3,00	96,76 $\pm$ 1,40
12,50	99,74 $\pm$ 12,53	95,37 $\pm$ 14,05	110,17 $\pm$ 4,03	109,92 $\pm$ 3,78	94,06 $\pm$ 6,37
6,25	93,47 $\pm$ 13,18	98,67 $\pm$ 3,41	109,21 $\pm$ 0,51	109,28 $\pm$ 1,04	96,67 $\pm$ 7,68

CV: coeficiente de variação.

TABELA 11 – Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: porcentagens de viabilidade celular $\pm$ CV referentes às diferentes concentrações do controle negativo obtidas com a cultura de células NCI-H292.

Controle Negativo (%)	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
100,00	85,17 $\pm$ 16,27	92,54 $\pm$ 6,23	98,99 $\pm$ 6,62	73,44 $\pm$ 3,82	91,60 $\pm$ 6,68
50,00	93,12 $\pm$ 6,77	75,16 $\pm$ 11,53	100,14 $\pm$ 4,09	101,31 $\pm$ 2,96	98,18 $\pm$ 3,16
25,00	94,35 $\pm$ 5,31	77,53 $\pm$ 1,37	107,94 $\pm$ 8,03	105,14 $\pm$ 1,27	102,51 $\pm$ 2,67
12,50	84,33 $\pm$ 2,44	98,96 $\pm$ 9,56	95,82 $\pm$ 4,46	102,75 $\pm$ 3,02	104,40 $\pm$ 2,49
6,25	99,65 $\pm$ 11,77	101,71 $\pm$ 15,69	103,61 $\pm$ 5,56	102,27 $\pm$ 3,96	105,19 $\pm$ 3,82

CV: coeficiente de variação; Grupo A: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 48 h; Grupo B: microplaca de 96 poços contendo $1,0 \times 10^5$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h; Grupo C: microplaca de 96 poços contendo $7,5 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h; Grupo D: microplaca de 96 poços contendo $7,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h; Grupo E: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células NCI-H292/poço e período de incubação de 24 h.

A TAB. 12 apresenta as porcentagens de viabilidade celular obtidas nas microplacas contendo a cultura de células NCTC Clone 929 após serem expostas a diferentes concentrações de resveratrol e dos controles positivo e negativo.

TABELA 12 – Resultado do ensaio de citotoxicidade do resveratrol: porcentagens de viabilidade celular $\pm$ CV referentes às diferentes concentrações do resveratrol, do controle positivo e do controle negativo obtidas com a cultura de células NCTC Clone 929.

Concentração (%)	Resveratrol	Controle Positivo	Controle Negativo
100,00	14,44 $\pm$ 9,60	20,23 $\pm$ 4,93	93,87 $\pm$ 7,64
50,00	21,24 $\pm$ 13,36	55,09 $\pm$ 3,82	93,66 $\pm$ 5,71
25,00	22,23 $\pm$ 10,99	78,78 $\pm$ 5,97	95,61 $\pm$ 9,41
12,50	62,02 $\pm$ 11,34	93,75 $\pm$ 5,81	98,24 $\pm$ 6,12
6,25	84,86 $\pm$ 7,90	92,43 $\pm$ 7,75	98,65 $\pm$ 8,50

CV: coeficiente de variação.

As TAB. 13 e 14 expressam as porcentagens de viabilidade celular apresentadas pelas microplacas contendo a cultura de células NCI-H292 submetidas a diferentes concentrações de colchicina e de hidroxauréia, respectivamente.

TABELA 13 - Resultado do ensaio de citotoxicidade da colchicina: porcentagens de viabilidade celular $\pm$ CV referentes às diferentes concentrações de colchicina, do controle positivo e do controle negativo obtidas com a cultura de células NCI-H292.

Concentração (%)	Colchicina	Controle Positivo	Controle Negativo
100,00	100,81 $\pm$ 9,28	1,13 $\pm$ 0,00	102,93 $\pm$ 8,54
50,00	92,28 $\pm$ 4,58	1,41 $\pm$ 0,00	111,06 $\pm$ 6,72
25,00	92,28 $\pm$ 4,06	91,96 $\pm$ 0,00	111,06 $\pm$ 9,75
12,50	94,96 $\pm$ 10,11	89,05 $\pm$ 14,12	107,15 $\pm$ 1,31
6,25	96,18 $\pm$ 13,35	94,03 $\pm$ 7,37	103,41 $\pm$ 6,80

CV: coeficiente de variação.

TABELA 14 - Resultado do ensaio de citotoxicidade da hidroxiuréia: porcentagens de viabilidade celular $\pm$ CV referentes às diferentes concentrações de hidroxiuréia, do controle positivo e do controle negativo obtidas com a cultura de células NCI-H292.

Concentração (%)	Hidroxiuréia	Controle Positivo	Controle Negativo
100,00	2,44 $\pm$ 0,00	0,98 $\pm$ 0,00	97,72 $\pm$ 11,45
50,00	38,86 $\pm$ 12,87	0,98 $\pm$ 0,00	113,82 $\pm$ 3,46
25,00	106,10 $\pm$ 11,00	105,32 $\pm$ 0,33	107,80 $\pm$ 3,26
12,50	111,87 $\pm$ 6,56	101,96 $\pm$ 4,92	112,36 $\pm$ 9,12
6,25	97,64 $\pm$ 9,91	110,64 $\pm$ 13,85	105,04 $\pm$ 7,44

CV: coeficiente de variação.

O índice de citotoxicidade do resveratrol foi estimado em gráfico, com auxílio do programa *GraphPad Prism 5.0*, traçando a viabilidade celular (%) em função da concentração das amostras e dos extratos dos controles positivo e negativo (%).

As FIG. 36, 37, 38, 39 e 40 apresentam as curvas de viabilidade celular do resveratrol e dos extratos dos controles positivo e negativo, obtidas no ensaio *in vitro* de citotoxicidade do resveratrol realizado com a cultura de células NCI-H292.

FIGURA 36 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade do resveratrol com as células NCI-H292 referente ao Grupo A: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células/poço e período de incubação de 48 h.

FIGURA 37 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade do resveratrol com as células NCI-H292 referente ao Grupo B: microplaca de 96 poços contendo $1,0 \times 10^5$ células/poço e período de incubação de 24 h.

FIGURA 38 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade do resveratrol com as células NCI-H292 referente ao Grupo C: microplaca de 96 poços contendo $7,5 \times 10^4$ células/poço e período de incubação de 24 h.

FIGURA 39 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade do resveratrol com as células NCI-H292 referente ao Grupo D: microplaca de 96 poços contendo $7,0 \times 10^4$ células/poço e período de incubação de 24 h.

FIGURA 40 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade do resveratrol com as células NCI-H292 referente ao Grupo E: microplaca de 96 poços contendo $9,0 \times 10^4$ células/poço e período de incubação de 24 h.

Na análise gráfica da toxicidade dos compostos, é observada a posição das curvas de viabilidade celular em relação à linha do $IC_{50\%}$. Assim, compostos, cuja curva de viabilidade celular se projeta acima da linha do $IC_{50\%}$ são considerados atóxicos. Já os compostos que exibem uma curva de viabilidade celular abaixo ou transpondo a linha do $IC_{50\%}$ são considerados tóxicos. O $IC_{50\%}$ é estimado na intersecção entre a linha do $IC_{50\%}$ e a curva de viabilidade celular do composto.

Os controles positivo e negativo são utilizados para a verificação da eficácia do ensaio. Na análise gráfica referente às FIG. 36, 37, 38, 39 e 40, o controle negativo apresentou valores de viabilidade celular acima de 70 % indicando não citotoxicidade nos cinco grupos analisados com a cultura de células NCI-H292. O controle positivo apresentou valores de $IC_{50\%}$ de 73,8 no Grupo A; 63,8 no Grupo B; 39,3 no Grupo C; 39,3 no Grupo D e 36,8 no Grupo E, portanto, é considerado tóxico.

O resveratrol apresentou curvas de viabilidade celular semelhantes às do controle positivo, com IC_{50%} de 73,3 no Grupo A; 26,8 no Grupo B; 78,8 no Grupo C; 79,8 no Grupo D e 80,3 no Grupo E, que correspondem às concentrações de 366,5 µM/L; 134 µM/L; 394 µM/L; 399 µM/L e 401,5 µM/L, respectivamente.

Durante a realização dos ensaios, os Grupos A e B apresentaram uma monocamada celular densa com células contendo grande quantidade de vacúolos no seu interior, o que possivelmente proporcionou os valores discrepantes de IC_{50%} do controle positivo e do resveratrol. Nos Grupos C e D, a monocamada celular não estava inteiramente formada e as células apresentavam uma grande quantidade de vacúolos em seu interior, sendo considerada baixa a densidade celular inicialmente semeada. O Grupo E apresentou a monocamada celular mais uniforme e as células com aspecto mais íntegro, quando comparado aos demais grupos analisados. Sendo assim, foi considerado que o IC_{50%} do resveratrol em cultura de células NCI-H292 é de 401,5 µM/L.

Este ensaio foi importante para auxiliar na padronização das concentrações de resveratrol, no período de incubação das células e na densidade celular a serem utilizados nos demais ensaios biológicos realizados com a cultura NCI-H292. Logo, foram considerados adequados o uso do resveratrol em concentrações não tóxicas $\leq 60 \mu\text{M}$, o período de incubação de 24 h para a adesão e a formação da monocamada celular e a utilização da cultura de células em densidades proporcionais a $9,0 \times 10^4$ células/poço, que corresponde a $9,0 \times 10^4$ células por $0,31 \text{ cm}^2$.

Devido à dificuldade encontrada para definir uma metodologia adequada à cultura de células NCI-H292, foi realizado paralelamente o ensaio de citotoxicidade com a cultura de células NCTC Clone 292, cujo valor do IC_{50%} do resveratrol encontra-se relatado na literatura (Moreno, 2009; Moreno e col., 2012).

A FIG. 41 apresenta as curvas de viabilidade celular do resveratrol e dos extratos dos controles positivo e negativo, obtidas nos ensaios *in vitro* de citotoxicidade do resveratrol realizado com a cultura de células NCTC Clone 929.

FIGURA 41 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade do resveratrol pelo método de incorporação do corante vermelho neutro realizado com a cultura de células NCTC Clone 929.

Na análise gráfica da FIG. 41, observa-se que o controle negativo apresentou valores de viabilidade celular acima de 90 % indicando não citotoxicidade. O controle positivo apresentou valor de $IC_{50\%}$ de 56,8, portanto, citotoxicidade.

O resveratrol apresentou uma curva de viabilidade celular semelhante ao do controle positivo, com $IC_{50\%}$ de 17,3, que corresponde à concentração de 43,25 $\mu\text{M/L}$. O $IC_{50\%}$ obtido neste ensaio encontra-se em conformidade com os valores relatados na literatura, 20 - 100 $\mu\text{M/L}$ (Sgambato e col.; 2001).

Este ensaio foi importante para verificar as condições de estudo. Em um trabalho anterior (Moreno, 2009), o valor do $IC_{50\%}$ do resveratrol na cultura de células NCTC Clone 929 foi de 50 $\mu\text{M/L}$. Assim sendo, concluiu-se que as condições de estudo permaneceram adequadas, pois o valor do $IC_{50\%}$ do resveratrol foi reproduzido satisfatoriamente.

A comparação dos $IC_{50\%}$ obtidos nas duas culturas de células analisadas evidencia que a linhagem tumoral NCI-H292 é mais resistente ao resveratrol quando comparada a células normais como a linhagem NCTC Clone 929.

As FIG. 42 e 43 mostram as curvas de viabilidade celular da colchicina e da hidroxiuréia, assim como dos extratos dos controles positivos e negativo, obtidas nos ensaios *in vitro* de citotoxicidade realizados com a cultura de células NCI-H292.

FIGURA 42 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade da colchicina pelo método de incorporação do corante vermelho neutro realizado com a cultura de células NCI-H292.

FIGURA 43 - Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade da hidroxiuréia pelo método de incorporação do corante vermelho neutro realizado com a cultura de células NCI-H292.

Na análise gráfica das FIG. 42 e 43, o controle negativo apresentou curvas de viabilidade celular que se projetaram acima da linha do $IC_{50\%}$ indicando não toxicidade; o controle positivo apresentou $IC_{50\%}$ de 36,8 e 38,6 nos ensaios de citotoxicidade da colchicina e da hidroxiuréia, respectivamente.

Nas concentrações analisadas, a curva de viabilidade celular da colchicina demonstrou um perfil semelhante a do controle negativo, não atingindo o $IC_{50\%}$ em concentrações $\leq 128 \mu\text{g/mL}$.

A hidroxiuréia apresentou uma curva de viabilidade celular com um perfil semelhante a do controle positivo, sendo obtido um $IC_{50\%}$ de 46,1, valor este correspondente à concentração de 11,80 mg/mL.

Este teste biológico proporcionou a estimativa de uma faixa de concentração do resveratrol, da colchicina e da hidroxiuréia a ser utilizada nos demais testes para verificar os efeitos desses compostos em concentrações inferiores ao $IC_{50\%}$ em cultura de células NCI-H292.

5.3 Cálculo da distribuição de dose da radiação ionizante

A avaliação dos planos calculados no sistema de planejamento computadorizado 3D foi realizada individualmente. A análise qualitativa dos planos de irradiação foi obtida a partir da avaliação da distribuição de doses visualizada nas imagens de tomografia computadorizada de planejamento.

As FIG. 44 e 45 apresentam as distribuições de dose nas imagens de tomografia computadorizada de planejamento referente aos planos calculados para os testes da Dose Letal 50 % da radiação ionizante e da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular, respectivamente.

FIGURA 44 - Análise qualitativa do planejamento realizado para o teste da Dose Letal 50 % da radiação ionizante com doses de 250, 500, 175 e 1.000 Gy: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronal e sagital apresentando a distribuição de dose obtida com a técnica IMRT.

FIGURA 45 - Análise qualitativa do planejamento realizado para o teste da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular com doses de 100, 200, 400 e 900 Gy: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronal e sagital apresentando a distribuição de dose da radiação ionizante obtida com a técnica 3DCRT.

As FIG. 46, 47 e 48 apresentam as distribuições de dose nas imagens de tomografia computadorizada de planejamento referentes aos planos calculados para os testes do micronúcleo e da avaliação do potencial clonogênico.

FIGURA 46 - Análise qualitativa do planejamento realizado para o teste do micronúcleo com doses de 0,8, 5 e 10 Gy: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronal e sagital apresentando a distribuição de dose da radiação ionizante obtida com a técnica IMRT.

FIGURA 48 - Análise qualitativa do planejamento realizado para o teste da avaliação do potencial clonogênico com doses de 0,8, 5 e 10 Gy: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronal e sagital apresentando a distribuição de dose da radiação ionizante obtida com a técnica IMRT.

As FIG. 49, 50 e 51 apresentam as distribuições de dose nas imagens de tomografia computadorizada de planejamento referente aos planos calculados para os testes de avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular.

FIGURA 49 - Análise qualitativa do planejamento realizado para o teste da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular com doses de 0,8, 5 e 10 Gy: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronal e sagital apresentando a distribuição de dose da radiação ionizante obtida com a técnica IMRT.

FIGURA 50 - Análise qualitativa do planejamento realizado para os testes da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular com doses de 0,8, 5 e 10 Gy: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronal e sagital apresentando a distribuição de dose da radiação ionizante obtida com a técnica 3DCRT.

FIGURA 51 - Análises qualitativas dos planejamentos realizados para os testes da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular: imagens da tomografia computadorizada de planejamento nos planos coronais e sagitais apresentando as distribuições de dose da radiação ionizante obtidas com a técnica 3DCRT. (A) Dose de 0,8 Gy; (B) Dose de 5 Gy; (C) Dose de 10 Gy.

Na análise qualitativa da distribuição de dose foi possível verificar que, nos treze planejamentos de irradiação, 100 % do volume das microplacas de 96 e 24 poços e das placas de Petri recebem as doses de radiação prescritas.

O histograma de dose volume (DVH) fornece uma estatística da dose de radiação ionizante que possibilita uma análise quantitativa da distribuição de dose nas estruturas de interesse. Os dados fornecidos pelo DVH são apresentados em gráfico, o qual relaciona a dose, em porcentagem ou em *centigray* (cGy), com o volume de cada estrutura inicialmente delineada.

A estatística da dose fornece as doses mínima, média e máxima das estruturas delineadas. Logo, no DVH dos planejamentos de irradiação foram observadas as doses em cada coluna das microplacas de 96 poços. Já nas microplacas de 24 poços foi verificada a dose em cada poço e, nas placas de Petri, em cada placa.

Seguindo a recomendação do ICRU 83 (2010) para o cálculo do índice de homogeneidade (HI) da dose nos planejamentos de irradiação, foram obtidos no DVH a $D_{2\%}$, que representa o valor de dose próximo à dose máxima na estrutura, a $D_{50\%}$, que corresponde à dose média e a $D_{98\%}$, que representa o valor de dose próximo à dose mínima na estrutura (FIG. 52).

FIGURA 52 - Histograma de dose volume com doses recomendadas para a verificação do índice de homogeneidade dos planejamentos de irradiação.

O índice de homogeneidade da dose foi obtido utilizando a Equação 3:

$$HI = \left(\frac{D_{2\%} - D_{98\%}}{D_{50\%}} \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde, HI é o índice de homogeneidade da dose; $D_{2\%}$ representa o valor de dose próximo à dose máxima na estrutura; $D_{98\%}$ corresponde ao valor de dose próximo à dose mínima na estrutura; $D_{50\%}$ representa a dose média.

As TAB. 15 e 16 apresentam os valores da $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI obtidos na avaliação dos planejamentos de irradiação realizados para os testes da Dose Letal 50 % da radiação ionizante e da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular, realizados com as técnicas IMRT e 3DCRT, respectivamente.

TABELA 15 - Análise quantitativa do planejamento IMRT realizado para os testes da Dose Letal 50 % da radiação ionizante e da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular: D_{2%}, D_{50%}, D_{98%} e HI.

Posição da Microplaca	Coluna da Microplaca	Dose Prescrita (Gy)	D _{2%} (Gy)	D _{50%} (Gy)	D _{98%} (Gy)	HI
Direita	1	250	261,29	252,26	240,66	0,08
	2	250	259,10	251,81	243,73	0,06
	3	250	277,09	258,54	248,89	0,11
	4	500	544,09	527,61	508,31	0,07
	5	500	546,77	531,50	514,00	0,06
	6	500	534,78	513,66	500,74	0,07
	7	750	777,27	753,07	727,56	0,07
	8	750	767,76	751,60	734,01	0,04
	9	750	782,97	749,69	730,07	0,07
	10	1.000	1.040,11	1.005,63	957,18	0,08
	11	1.000	1.042,62	1.013,64	983,47	0,06
	12	1.000	1.051,74	1.013,12	970,85	0,08
Esquerda	1	250	258,61	249,36	237,43	0,08
	2	250	270,05	262,19	253,67	0,06
	3	250	273,18	258,49	249,59	0,09
	4	500	543,27	528,62	511,28	0,06
	5	500	542,06	528,85	512,74	0,06
	6	500	548,71	530,81	515,16	0,06
	7	750	776,30	753,18	729,66	0,06
	8	750	769,87	753,84	737,84	0,04
	9	750	780,21	755,19	733,12	0,06
	10	1.000	1.044,81	1.012,11	974,16	0,07
	11	1.000	1.049,83	1.020,45	988,98	0,06
	12	1.000	1.051,24	1.016,78	980,18	0,07

Posição da microplaca: posição em que foram colocadas as microplacas durante a irradiação, tendo como referência o acelerador linear; IMRT: radioterapia de intensidade modulada; D_{2%}: valor de dose próximo à dose máxima na estrutura; D_{50%}: dose média; D_{98%}: valor de dose próximo à dose mínima na estrutura; HI: índice de homogeneidade.

TABELA 16 - Análise quantitativa do planejamento 3DCRT realizado para o teste da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular: $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI.

Coluna da Microplaca	Dose Prescrita (Gy)	$D_{2\%}$ (Gy)	$D_{50\%}$ (Gy)	$D_{98\%}$ (Gy)	HI
1	100	99,30	93,81	84,80	0,15
2	100	104,04	99,61	91,65	0,12
3	100	117,94	109,57	100,15	0,16
4	200	202,95	196,38	181,42	0,11
5	200	208,43	202,12	185,88	0,11
6	200	236,13	217,59	200,40	0,16
7	400	399,83	386,96	362,67	0,10
8	400	417,50	402,33	369,50	0,12
9	400	505,28	446,72	404,55	0,23
10	900	954,20	908,64	809,99	0,16
11	900	970,94	936,12	863,28	0,12
12	900	955,96	911,91	834,34	0,13

3DCRT: radioterapia tridimensional conformada; $D_{2\%}$: valor de dose próximo à dose máxima na estrutura; $D_{50\%}$: dose média; $D_{98\%}$: valor de dose próximo à dose mínima na estrutura; HI: índice de homogeneidade.

Para a identificação da posição das placas de Petri utilizadas nos planejamentos realizados para os testes do micronúcleo e da avaliação do potencial clonogênico, ambos utilizando a técnica IMRT, as placas de Petri foram numeradas conforme ilustrado na FIG. 53.

FIGURA 53 - Placas de Petri identificadas e posicionadas de acordo com os planejamentos realizados com a técnica IMRT referentes aos testes do micronúcleo e da avaliação do potencial clonogênico.

As TAB. 17, 18 e 19 apresentam os valores da $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI obtidos na análise quantitativa dos planejamentos realizados para os testes do micronúcleo e da avaliação do potencial clonogênico.

TABELA 17 - Análise quantitativa do planejamento IMRT realizado para o teste do micronúcleo: D_{2%}, D_{50%}, D_{98%} e HI.

Posição das placas de Petri	Dose Prescrita (Gy)	D _{2%} (Gy)	D _{50%} (Gy)	D _{98%} (Gy)	HI
1	0,8	0,88	0,86	0,84	0,05
2	0,8	0,88	0,86	0,83	0,07
3	0,8	0,88	0,86	0,83	0,06
4	0,8	0,88	0,86	0,83	0,05
5	5,0	5,52	5,42	5,31	0,04
6	5,0	5,48	5,42	5,34	0,03
7	5,0	5,50	5,41	5,30	0,04
8	5,0	5,54	5,47	5,35	0,04
9	10,0	10,61	10,31	9,98	0,06
10	10,0	10,63	10,37	10,00	0,06
11	10,0	10,59	10,37	10,09	0,05
12	10,0	10,56	10,36	10,05	0,05

IMRT: radioterapia de intensidade modulada; D_{2%}: valor de dose próximo à dose máxima na estrutura; D_{50%}: dose média; D_{98%}: valor de dose próximo à dose mínima na estrutura; HI: índice de homogeneidade.

TABELA 18 - Análise quantitativa do planejamento 3DCRT realizado para o teste do micronúcleo: D_{2%}, D_{50%}, D_{98%} e HI, sendo uma dose de radiação para cada planejamento.

Dose Prescrita (Gy)	D _{2%} (Gy)	D _{50%} (Gy)	D _{98%} (Gy)	HI
25	25,83	25,06	23,80	0,08
34	35,13	34,09	32,36	0,08
50	51,66	50,13	47,59	0,08
100	103,31	100,26	95,21	0,08

3DCRT: radioterapia tridimensional conformada.

TABELA 19 - Análise quantitativa do planejamento IMRT realizado para o teste da avaliação do potencial clonogênico: $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI.

Posição das placas de Petri	Dose Prescrita (Gy)	$D_{2\%}$ (Gy)	$D_{50\%}$ (Gy)	$D_{98\%}$ (Gy)	HI
1	0,8	0,83	0,81	0,79	0,05
2	0,8	0,83	0,81	0,78	0,07
3	0,8	0,83	0,81	0,78	0,06
4	0,8	0,83	0,81	0,78	0,05
5	5,0	5,19	5,09	4,99	0,04
6	5,0	5,15	5,10	5,02	0,03
7	5,0	5,17	5,08	4,98	0,04
8	5,0	5,21	5,14	5,03	0,04
9	10,0	9,97	9,70	9,38	0,06
10	10,0	10,00	9,75	9,40	0,06
11	10,0	9,96	9,75	9,48	0,05
12	10,0	9,93	9,74	9,44	0,05

IMRT: radioterapia de intensidade modulada; $D_{2\%}$: valor de dose próximo à dose máxima na estrutura; $D_{50\%}$: dose média; $D_{98\%}$: valor de dose próximo à dose mínima na estrutura; HI: índice de homogeneidade.

As TAB. 20, 21, 22, 23, 24 e 25 apresentam os valores da $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI obtidos na avaliação dos planejamentos realizados para os testes de avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular.

TABELA 20 - Análise quantitativa do planejamento IMRT realizado para os testes da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular: D_{2%}, D_{50%}, D_{98%} e HI.

Poços da Microplaca	Dose Prescrita (Gy)	D _{2%} (Gy)	D _{50%} (Gy)	D _{98%} (Gy)	HI
A6	0,8	0,84	0,83	0,82	0,02
A5	0,8	0,83	0,81	0,80	0,04
A4	5,0	5,15	5,05	4,95	0,04
A3	5,0	5,18	5,04	4,94	0,05
A2	10,0	10,20	10,01	9,85	0,04
A1	10,0	10,30	9,99	9,80	0,05
B6	0,8	0,84	0,83	0,82	0,03
B5	0,8	0,84	0,81	0,80	0,05
B4	5,0	5,16	5,08	4,99	0,03
B3	5,0	5,23	5,07	5,00	0,04
B2	10,0	10,22	10,03	9,89	0,03
B1	10,0	10,32	10,04	9,87	0,04
C6	0,8	0,84	0,83	0,82	0,02
C5	0,8	0,85	0,81	0,80	0,06
C4	5,0	5,15	5,07	4,98	0,03
C3	5,0	5,21	5,06	4,99	0,04
C2	10,0	10,23	10,02	9,87	0,04
C1	10,0	10,35	10,05	9,87	0,05
D6	0,8	0,84	0,83	0,82	0,02
D5	0,8	0,83	0,81	0,79	0,05
D4	5,0	5,14	5,05	4,92	0,04
D3	5,0	5,21	5,04	4,95	0,05
D2	10,0	10,19	10,00	9,84	0,04
D1	10,0	10,33	10,02	9,82	0,05

IMRT: radioterapia de intensidade modulada; D_{2%}: valor de dose próximo à dose máxima na estrutura; D_{50%}: dose média; D_{98%}: valor de dose próximo à dose mínima na estrutura; HI: índice de homogeneidade.

TABELA 21 - Análise quantitativa do planejamento 3DCRT realizado para os testes da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular: D_{2%}, D_{50%}, D_{98%} e HI.

Poços da Microplaca	Dose Prescrita (Gy)	D _{2%} (Gy)	D _{50%} (Gy)	D _{98%} (Gy)	HI
A6	0,8	0,74	0,69	0,63	0,16
A5	0,8	1,42	0,87	0,78	0,74
A4	5,0	4,93	4,73	4,45	0,10
A3	5,0	7,82	5,08	4,77	0,60
A2	10,0	10,57	10,30	10,02	0,05
A1	10,0	10,07	9,60	7,92	0,22
B6	0,8	0,78	0,73	0,66	0,17
B5	0,8	1,50	0,95	0,84	0,70
B4	5,0	5,15	4,99	4,70	0,09
B3	5,0	8,47	5,37	5,17	0,61
B2	10,0	10,95	10,77	10,60	0,03
B1	10,0	10,42	9,98	8,10	0,23
C6	0,8	0,78	0,72	0,66	0,17
C5	0,8	1,53	0,96	0,83	0,73
C4	5,0	5,14	4,98	4,71	0,09
C3	5,0	8,20	5,35	5,16	0,57
C2	10,0	10,94	10,76	10,58	0,03
C1	10,0	10,43	10,01	8,08	0,23
D6	0,8	0,73	0,69	0,62	0,16
D5	0,8	1,41	0,87	0,77	0,74
D4	5,0	4,90	4,68	4,35	0,12
D3	5,0	8,00	5,08	4,73	0,64
D2	10,0	10,56	10,27	9,94	0,06
D1	10,0	10,67	9,60	7,77	0,30

3DCRT: radioterapia tridimensional conformada; D_{2%}: valor de dose próximo à dose máxima na estrutura; D_{50%}: dose média; D_{98%}: valor de dose próximo à dose mínima na estrutura; HI: índice de homogeneidade.

TABELA 22 - Análise quantitativa do planejamento 3DCRT, com dose prescrita de 0,8 Gy, realizado para os testes da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular: $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI.

Poços da Microplaca	$D_{2\%}$ (Gy)	$D_{50\%}$ (Gy)	$D_{98\%}$ (Gy)	HI
A6	0,82	0,81	0,79	0,05
A5	0,83	0,82	0,80	0,03
A4	0,83	0,82	0,80	0,03
A3	0,83	0,82	1,02	-0,23
A2	0,83	0,82	0,80	0,03
A1	0,82	0,81	0,78	0,05
B6	0,82	0,81	0,79	0,05
B5	0,83	0,82	0,82	0,02
B4	0,83	0,82	0,81	0,02
B3	0,83	0,82	0,82	0,02
B2	0,83	0,82	0,81	0,03
B1	0,83	0,81	0,79	0,05
C6	0,82	0,81	0,79	0,04
C5	0,83	0,82	0,81	0,03
C4	0,83	0,82	0,80	0,03
C3	0,83	0,82	0,81	0,03
C2	0,83	0,82	0,82	0,02
C1	0,83	0,81	0,79	0,05
D6	0,82	0,80	0,78	0,05
D5	0,83	0,82	0,80	0,03
D4	0,83	0,82	0,81	0,02
D3	0,83	0,82	0,81	0,03
D2	0,83	0,82	0,81	0,02
D1	0,82	0,81	0,78	0,05

3DCRT: radioterapia tridimensional conformada; $D_{2\%}$: valor de dose próximo à dose máxima na estrutura; $D_{50\%}$: dose média; $D_{98\%}$: valor de dose próximo à dose mínima na estrutura; HI: índice de homogeneidade.

TABELA 23 - Análise quantitativa do planejamento 3DCRT, com dose prescrita de 5 Gy, realizado para os testes da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular: $D_{2\%}$, $D_{50\%}$, $D_{98\%}$ e HI.

Poços da Microplaca	$D_{2\%}$ (Gy)	$D_{50\%}$ (Gy)	$D_{98\%}$ (Gy)	HI
A6	5,01	4,92	4,79	0,05
A5	5,06	5,00	4,89	0,03
A4	5,06	5,01	4,91	0,03
A3	5,07	5,02	4,97	0,02
A2	5,07	5,01	4,90	0,03
A1	5,03	4,94	4,77	0,05
B6	5,03	4,94	4,79	0,05
B5	5,06	5,02	4,98	0,02
B4	5,05	5,01	4,97	0,02
B3	5,06	5,02	4,97	0,02
B2	5,08	5,03	4,94	0,03
B1	5,04	4,96	4,79	0,05
C6	5,02	4,93	4,81	0,04
C5	5,06	5,01	4,92	0,03
C4	5,05	5,00	4,91	0,03
C3	5,06	5,01	4,92	0,03
C2	5,07	5,03	4,98	0,02
C1	5,05	4,96	4,82	0,05
D6	5,00	4,91	4,78	0,05
D5	5,05	4,99	4,90	0,03
D4	5,05	5,00	4,95	0,02
D3	5,06	5,01	4,91	0,03
D2	5,06	5,00	4,94	0,02
D1	5,02	4,93	4,78	0,05

3DCRT: radioterapia tridimensional conformada; $D_{2\%}$: valor de dose próximo à dose máxima na estrutura; $D_{50\%}$: dose média; $D_{98\%}$: valor de dose próximo à dose mínima na estrutura; HI: índice de homogeneidade.

TABELA 24 - Análise quantitativa do planejamento 3DCRT, com dose prescrita de 10 Gy, realizado para os testes da avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular, reparo da lesão no DNA e processo de lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular: D_{2%}, D_{50%}, D_{98%} e HI.

Poços da Microplaca	D _{2%} (Gy)	D _{50%} (Gy)	D _{98%} (Gy)	HI
A6	10,12	9,84	9,58	0,06
A5	10,13	10,00	9,79	0,03
A4	10,13	10,02	9,82	0,03
A3	10,14	10,04	9,94	0,02
A2	10,13	10,02	9,80	0,03
A1	10,06	9,87	9,55	0,05
B6	10,06	9,87	9,59	0,05
B5	10,13	10,04	9,95	0,02
B4	10,11	10,01	9,93	0,02
B3	10,13	10,03	9,95	0,02
B2	10,15	10,06	9,88	0,03
B1	10,08	9,92	9,58	0,05
C6	10,05	9,86	9,61	0,04
C5	10,12	10,03	9,84	0,03
C4	10,10	10,01	9,82	0,03
C3	10,13	10,02	9,83	0,03
C2	10,14	10,05	9,96	0,02
C1	10,09	9,92	9,65	0,05
D6	10,01	9,82	9,56	0,05
D5	10,10	9,97	9,80	0,03
D4	10,11	10,00	9,89	0,02
D3	10,13	10,02	9,82	0,03
D2	10,12	10,00	9,89	0,02
D1	10,04	9,86	9,56	0,05

3DCRT: radioterapia tridimensional conformada; D_{2%}: valor de dose próximo à dose máxima na estrutura; D_{50%}: dose média; D_{98%}: valor de dose próximo à dose mínima na estrutura; HI: índice de homogeneidade.

Na análise da homogeneidade da distribuição de dose, $HI = 0$ (zero) indica que a distribuição de dose é homogênea. O HI calculado nos 13 planejamentos realizados tanto com a técnica 3DCRT quanto com a técnica IMRT apresentaram valores de HI próximos a zero, o que indica que a distribuição de dose obtida nos planejamentos é satisfatória.

5.4 Controle de qualidade dos planejamentos

O controle de qualidade dos planejamentos consistiu em realizar medidas de dose com a câmara de ionização no plano total para comparar a dose medida no acelerador linear com a dose calculada no sistema de planejamento computadorizado 3D, verificando possíveis diferenças (TAB. 25).

TABELA 25 - Resultado do controle de qualidade dos planejamentos: doses medidas, doses calculadas e a variação entre as doses medidas e calculadas.

Nº do Teste	Teste	Técnica	Dose Prescrita (Gy)	Dose Medida (Gy)	Dose Calculada (Gy)	Variação (%)
1	Dose Letal 50 % da radiação ionizante	IMRT	250, 500, 750, 1000	616,60	625,50	-1,4
2	Efeito da taxa de dose	3DCRT	100, 200, 400, 900	221,14	220,98	0,1
3	Micronúcleo	IMRT	0,8, 5, 10	4,72	4,69	0,6
4	Micronúcleo	3DCRT	25	22,50	22,18	1,4
5	Micronúcleo	3DCRT	34	30,72	30,16	1,8
6	Micronúcleo	3DCRT	50	44,97	44,35	1,4
7	Micronúcleo	3DCRT	100	89,73	88,71	1,1
8	Potencial clonogênico	IMRT	0,8, 5, 10	5,04	4,99	1,0
9	Ciclo celular, reparo da lesão, lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular	IMRT	0,8, 5, 10	4,68	4,64	0,9
10	Ciclo celular, reparo da lesão, lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular	3DCRT	0,8, 5, 10	4,73	4,65	1,7
11	Ciclo celular, reparo da lesão, lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular	3DCRT	0,8	0,73	0,74	1,4
12	Ciclo celular, reparo da lesão, lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular	3DCRT	5	4,01	3,95	1,5
13	Ciclo celular, reparo da lesão, lesão radioinduzida, necrose e apoptose celular	3DCRT	10	8,39	8,25	1,7

IMRT: radioterapia de intensidade modulada; 3DCRT: radioterapia tridimensional conformada.

A variação entre as doses medidas com a câmara de ionização e as doses calculadas no sistema de planejamento computadorizado 3D foram projetadas em gráfico (FIG. 54). Para melhor visualização gráfica, os planejamentos de controle de qualidade foram representados por números, conforme expresso na TAB 25.

FIGURA 54 - Resultado do controle de qualidade dos planejamentos: variações entre as doses medidas com a câmara de ionização e as doses calculadas no sistema de planejamento computadorizado 3D.

A tolerância na variação entre a dose medida e a dose calculada para o plano total considera variações < 3 % como condizentes a um planejamento adequado, variação de 3 % a 5 % indica que o planejamento deve ser revisado e valores acima de 5 % torna o planejamento inadequado (Almeida, 2012).

Nos treze planejamentos medidos com a câmara de ionização, foi verificada uma faixa de variação de -1,4 a 1,8 % com relação às doses calculadas no sistema de planejamento computadorizado 3D. Essas variações indicam que os planejamentos são adequados.

5.5 Avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular

Para avaliar o efeito da taxa de dose de radiação ionizante na resposta celular, a porcentagem de sobrevivência celular em relação ao controle de células dos ensaios foi calculada utilizando a Equação 4:

$$\% \textit{Viabilidade Celular} = \left(\frac{DO_{RAD} \times 100}{DO_{CC}} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde, DO_{RAD} representa o valor médio das densidades ópticas das microplacas irradiadas; DO_{CC} , o valor médio das densidades ópticas referente ao controle de células do ensaio.

As TAB. 26 e 27 apresentam os valores médios das DO, com seus respectivos desvios padrão, assim como as porcentagens de viabilidade celular com os coeficientes de variação, obtidos após a exposição da cultura celular NCI-H292 a diferentes doses de radiação ionizante e taxas de doses de 6 e 14 Gy/min, respectivamente.

TABELA 26 - Resultado da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular: médias das DO $\pm$ DP e porcentagens de viabilidade celular $\pm$ CV obtidas após a exposição da cultura de células NCI-H292 a diferentes doses de radiação ionizante com taxa de dose de 6 Gy/min.

Radiação Ionizante (Gy)	Médias das DO	Viabilidade Celular (%)
0	0,34 $\pm$ 0,02	100,00 $\pm$ 5,09
100	0,30 $\pm$ 0,01	90,05 $\pm$ 4,01
200	0,28 $\pm$ 0,01	83,51 $\pm$ 4,21
400	0,27 $\pm$ 0,01	80,16 $\pm$ 3,86
900	0,22 $\pm$ 0,01	67,13 $\pm$ 3,47

DO: densidade óptica; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

TABELA 27 - Resultado da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular: médias das DO $\pm$ DP e porcentagens de viabilidade celular $\pm$ CV obtidas após a exposição da cultura de células NCI-H292 a diferentes doses de radiação ionizante com taxa de dose de 14 Gy/min.

Radiação Ionizante (Gy)	Médias das DO	Viabilidade Celular (%)
0	0,36 $\pm$ 0,01	100,00 $\pm$ 3,47
250	0,34 $\pm$ 0,01	93,71 $\pm$ 3,46
500	0,28 $\pm$ 0,01	78,08 $\pm$ 3,43
750	0,15 $\pm$ 0,01	42,27 $\pm$ 3,90
1000	0,06 $\pm$ 0,00	15,96 $\pm$ 4,07

DO: densidade óptica; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Com os dados das TAB. 26 e 27, foram projetadas em gráfico as porcentagens de viabilidade celular em função das doses de radiação ionizante utilizada no ensaio, obtendo-se as curvas de sobrevida celular correspondentes as taxa de dose de 6 e 14 Gy/min, como ilustradas na FIG. 55.

FIGURA 55 – Curvas de viabilidade celular obtidas após a irradiação da cultura de células NCI-H292 com diferentes doses de radiação ionizante e taxas de dose de 6 e 14 Gy/min.

A análise estatística dos dados, utilizando o teste t, confirmou uma diferença significativa ($p < 0,05$) nas porcentagens de viabilidade celular obtidas entre os ensaios realizados com as taxas de dose de 6 e 14 Gy/min. Na análise comparativa entre as duas curvas de viabilidade celular, apresentadas na FIG. 55, observa-se que 6 Gy/min apresentou maior proveito em induzir a morte celular em doses inferiores a 400 Gy; já a taxa de dose de 14 Gy/min apresentou maior eficácia em doses superiores a 500 Gy.

Devido à taxa de dose de 14 Gy/min proporcionar uma otimização no tempo de irradiação e apresentar uma curva de viabilidade celular mais eficaz

para obter o valor da Dose Letal 50 % da radiação ionizante, foi definido o uso da taxa de dose de 14 Gy/min para os demais ensaios com radiação.

5.6 Determinação *in vitro* da Dose Letal 50 % da radiação ionizante

Na determinação da dose letal 50 % da radiação ionizante (DL_{50}), o controle de células do ensaio representa 100 % de viabilidade celular e consistiu na microplaca não submetida à radiação.

Logo, a porcentagem de sobrevivência celular em relação ao controle de células do ensaio foi calculada utilizando a Equação 3, descrita no item 5.5.

A TAB. 27, apresentada no item 5.5, mostra os valores médios das DO, com seus respectivos desvios padrão, bem como as porcentagens de viabilidade celular com os coeficientes de variação, obtidas nos ensaios da avaliação do efeito da taxa de dose na resposta celular e na determinação *in vitro* da Dose Letal 50 % da radiação ionizante.

Com os dados da TAB. 27, foi projetada em gráfico a viabilidade celular (%) em função da dose de radiação ionizante (Gy), como apresentado na FIG. 56.

FIGURA 56 – Curva de viabilidade celular obtida após a irradiação da cultura de células NCI-H292 com diferentes doses de radiação ionizante.

A análise gráfica da curva de viabilidade celular, apresentada na FIG. 56, permitiu estimar a DL_{50} na intersecção entre a linha que representa 50 % de viabilidade celular e a curva de sobrevivência celular obtida no ensaio. Assim, na cultura de células NCI-H292, a dose de radiação ionizante que apresenta a DL_{50} foi de 693 Gy.

O teste biológico da Dose Letal 50 % da radiação ionizante foi realizado para definir a dose de radiação que promove 50 % de morte celular da população utilizada no ensaio. Com o valor da DL_{50} foi possível determinar uma faixa de dose de interesse de radiação ionizante para verificar o efeito biológico do resveratrol na cultura de células NCI-H292.

5.7 Teste *in vitro* do Micronúcleo

Os micronúcleos (MN) são corpúsculos contendo DNA que se encontram separados do núcleo principal da célula. Esses corpúsculos se originam dos fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo da célula filha durante a fase da telófase do ciclo celular (OECD 487, 2012).

A presença de micronúcleos nas células pode ser indicativa da existência de alterações cromossômicas e a análise da sua frequência permite avaliar a genotoxicidade de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos (OECD 487, 2012).

O teste *in vitro* do micronúcleo foi realizado para verificar o efeito genotóxico do resveratrol e da radiação ionizante, bem como o efeito concomitante do resveratrol e da radiação.

A FIG. 57 apresenta as imagens das células NCI-H292 coradas com laranja de acridina, mostrando coloração laranja-avermelhada do citoplasma celular e, esverdeada brilhante dos núcleos e micronúcleos visualizados no microscópio de fluorescência.

FIGURA 57 - Fotomicrografia das células NCI-H292 coradas com acridina laranja, aumento de 40x. (A) Célula mononucleada; (B) Célula binucleada; (C) Célula multinucleada; (D) Célula binucleada com presença de micronúcleo.

O teste do micronúcleo foi aplicado em três grupos distintos, sendo eles:

- Grupo A: cultura celular exposta ao resveratrol;
- Grupo B: cultura celular exposta à radiação ionizante;
- Grupo C: cultura celular exposta a diferentes concentrações de resveratrol e doses de radiação ionizante.

As TAB. 28, 29 e 30 apresentam os valores médios obtidos nas contagens de células dos três grupos analisados.

TABELA 28 - Resultado do teste *in vitro* do micronúcleo referente ao Grupo A: médias das células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas e binucleadas com MN obtidas com a cultura de células NCI-H292 exposta ao resveratrol.

Resveratrol (μM)	Célula Mononucleada	Célula Binucleada	Célula Multinucleada	Célula Binucleada com MN
0	557,0	1.000,0	384,5	4,0
15	588,5	1.000,0	376,5	8,5
30	488,0	1.000,0	521,0	9,0
60	563,0	1.000,0	478,5	7,5

MN: Micronúcleo.

TABELA 29 - Resultado do teste *in vitro* do micronúcleo referente ao Grupo B: médias de células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas e binucleadas com MN obtidas com a cultura de células NCI-H292 exposta à radiação ionizante.

Radiação Ionizante (Gy)	Célula Mononucleada	Célula Binucleada	Célula Multinucleada	Célula Binucleada com MN
0	300,0	1.000,0	403,0	8,0
25	541,0	1.000,0	402,0	25,0
34	479,0	1.000,0	446,0	32,0
50	514,0	1.000,0	513,0	34,0
100	657,0	1.000,0	567,0	39,0

MN: Micronúcleo.

TABELA 30 - Resultado do teste *in vitro* do micronúcleo referente ao Grupo C: médias de células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas e binucleadas com MN obtidas com a cultura de células NCI-H292 exposta ao resveratrol e à radiação ionizante.

Resveratrol (μM)	Radiação Ionizante (Gy)	Célula Mononucleada	Célula Binucleada	Célula Multinucleada	Célula Binucleada com MN
0	0	496,0	1.000,0	248,5	7,0
	0,8	661,5	1.000,0	182,5	9,0
	5	883,0	1.000,0	245,0	10,5
	10	956,5	1.000,0	390,5	25,5
15	0	687,5	1.000,0	301,5	18,0
	0,8	929,5	1.000,0	339,0	12,5
	5	1.281,0	1.000,0	226,0	24,0
	10	1.416,0	1.000,0	324,5	24,5
30	0	906,5	1.000,0	299,5	19,0
	0,8	924,5	1.000,0	389,0	26,0
	5	1.066,0	1.000,0	293,5	20,5
	10	1.346,0	1.000,0	360,0	31,0
60	0	803,5	1.000,0	404,0	18,0
	0,8	1.041,0	1.000,0	346,5	13,0
	5	1.271,5	1.000,0	338,0	27,0
	10	1.702,0	1.000,0	318,5	26,0

MN: Micronúcleo.

Com os dados das TAB. 28, 29 e 30, três parâmetros foram avaliados:

- Índice do bloqueio da citocinese (CBPI - *Cytokinesis-Block Proliferation Index*);
- Índice de replicação (RI - *Replication Index*);
- Frequência de micronúcleo (% FMN).

O CBPI representa o número médio de ciclos celulares sofrido por célula durante o período de exposição à solução de citocalasina-B. A citocalasina-B induz a formação de células binucleadas devido ao bloqueio da citocinese (divisão do citoplasma) sem alteração da cariocinese (divisão nuclear). Assim, o número de núcleos presentes na célula é diretamente proporcional ao número de divisões celulares ocorridas (OECD 487, 20112; Fenech, 2000). O CBPI foi calculado utilizando a Equação 5:

$$CBPI = \left(\frac{(CMono) + (2 \times CBi) + (3 \times CMulti)}{\text{Número Total de Células}} \right) \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde, CMono representa o número de células mononucleares; CBi, o número de células binucleadas; CMulti, o número de células multinucleadas.

O RI indica o número relativo de núcleos formados por células presente na cultura tratada em relação ao controle de células. O RI foi calculado utilizando a Equação 6:

$$RI = \left(\frac{((CBi) + (2 \times CMulti)) \div (NTC)_T}{((CBi) + (2 \times CMulti)) \div (NTC)_C} \times 100 \right) \quad (\text{Eq.6})$$

Onde, CBi representa o número de células binucleadas; CMulti, o número de células mononucleares; NTC, o número total de células; T, cultura tratada; C, controle de células.

A porcentagem de células citostáticas foi obtida utilizando a Equação 7:

$$\% \text{ Células Citostáticas} = (100 - \text{RI}) \quad (\text{Eq. 7})$$

Porcentagens de células citostáticas superiores a 50 ± 5 , ou seja, $\text{RI} < 50$, indica a ocorrência de possíveis danos cromossômicos, sendo considerados como efeito secundário à citotoxicidade. Portanto quanto maior a porcentagem de células citostáticas, maior a citotoxicidade do agente em estudo (OECD 487, 2012).

As TAB. 31, 32 e 33 apresentam os valores médios de CBPI, RI, porcentagem de células citostáticas e % FMN, com seus respectivos desvios padrão, obtidos nos três grupo analisados.

TABELA 31 - Resultado do teste *in vitro* do micronúcleo referente ao Grupo A: médias do CBPI, RI, células citostáticas e % FMN $\pm$ DP obtidos com a cultura de células NCI-H292 exposta ao resveratrol.

Resveratrol (μM)	CBPI	RI	Células Citostáticas (%)	FMN (%)
0	1,91 $\pm$ 0,02	99,89 $\pm$ 1,69	0,11 $\pm$ 1,69	0,40 $\pm$ 0,00
15	1,89 $\pm$ 0,00	97,93 $\pm$ 0,39	2,07 $\pm$ 0,39	0,85 $\pm$ 0,07
30	2,02 $\pm$ 0,01	111,53 $\pm$ 1,18	-11,53 $\pm$ 1,18	0,90 $\pm$ 0,14
60	1,96 $\pm$ 0,03	105,05 $\pm$ 3,38	-5,05 $\pm$ 3,38	0,75 $\pm$ 0,49

CBPI: índice do bloqueio da citocinese; RI: índice de replicação; % FMN: frequência de micronúcleo; DP: desvio padrão.

TABELA 32 - Resultado do teste *in vitro* do micronúcleo referente ao Grupo B: médias do CBPI, RI, células citostáticas e % FMN obtidos com a cultura de células NCI-H292 exposta à radiação ionizante.

Radiação Ionizante (Gy)	CBPI	RI	Células Citostáticas (%)	FMN (%)
0	2,06	100,00	0,00	0,80
25	1,93	87,55	12,45	2,50
34	1,98	92,68	7,32	3,20
50	2,00	94,25	5,75	3,40
100	1,96	90,48	9,52	3,90

CBPI: índice do bloqueio da citocinese; RI: índice de replicação; % FMN: frequência de micronúcleo.

TABELA 33 - Resultado do teste *in vitro* do micronúcleo referente ao Grupo C: médias do CBPI, RI, células citostáticas e % FMN $\pm$ DP obtidos com a cultura de células NCI-H292 exposta ao resveratrol e à radiação ionizante.

Resveratrol (μ M)	Radiação Ionizante (Gy)	CBPI	RI	Células Citostáticas (%)	FMN (%)
0	0	1,86 $\pm$ 0,01	100,02 $\pm$ 1,11	-0,02 $\pm$ 1,11	0,70 $\pm$ 0,14
	0,8	1,74 $\pm$ 0,04	86,51 $\pm$ 5,01	13,49 $\pm$ 5,01	0,90 $\pm$ 0,00
	5	1,70 $\pm$ 0,05	81,41 $\pm$ 5,37	18,59 $\pm$ 5,37	1,05 $\pm$ 0,49
	10	1,76 $\pm$ 0,03	88,48 $\pm$ 3,93	11,52 $\pm$ 3,93	2,55 $\pm$ 0,21
15	0	1,81 $\pm$ 0,01	94,02 $\pm$ 1,14	5,98 $\pm$ 1,14	1,80 $\pm$ 0,14
	0,8	1,74 $\pm$ 0,03	86,67 $\pm$ 3,50	13,33 $\pm$ 3,50	1,25 $\pm$ 0,64
	5	1,59 $\pm$ 0,08	68,30 $\pm$ 9,11	31,70 $\pm$ 9,11	2,40 $\pm$ 0,57
	10	1,60 $\pm$ 0,04	70,12 $\pm$ 4,37	29,88 $\pm$ 4,37	2,45 $\pm$ 0,64
30	0	1,72 $\pm$ 0,00	84,48 $\pm$ 0,31	15,52 $\pm$ 0,31	1,90 $\pm$ 0,42
	0,8	1,77 $\pm$ 0,02	89,51 $\pm$ 2,89	10,49 $\pm$ 2,89	2,60 $\pm$ 0,42
	5	1,67 $\pm$ 0,04	78,36 $\pm$ 4,32	21,64 $\pm$ 4,32	2,05 $\pm$ 0,35
	10	1,64 $\pm$ 0,06	74,45 $\pm$ 6,69	25,55 $\pm$ 6,69	3,10 $\pm$ 0,28
60	0	1,82 $\pm$ 0,00	95,44 $\pm$ 0,10	4,56 $\pm$ 0,10	1,80 $\pm$ 0,14
	0,8	1,71 $\pm$ 0,01	82,68 $\pm$ 1,49	17,32 $\pm$ 1,49	1,30 $\pm$ 0,42
	5	1,64 $\pm$ 0,01	74,85 $\pm$ 1,42	25,15 $\pm$ 1,42	2,70 $\pm$ 0,42
	10	1,54 $\pm$ 0,04	63,24 $\pm$ 5,17	36,76 $\pm$ 5,17	2,60 $\pm$ 0,42

CBPI: índice do bloqueio da citocinese; RI: índice de replicação; % FMN: frequência de micronúcleo; DP: desvio padrão.

Os valores de CBPI e de % FMN, expressos nas TAB. 31, 32 e 33, foram projetados em gráficos como ilustrado nas FIG. 58, 59, 60, 61, 62 e 63.

FIGURA 58 – Índice do bloqueio da citocinese obtido no teste *in vitro* do Micronúcleo com a cultura de células NCI-H292 referente ao Grupo A: cultura celular exposta ao resveratrol. ★ Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

FIGURA 59 – Índice do bloqueio da citocinese obtido no teste *in vitro* do Micronúcleo com a cultura de células NCI-H292 referente ao Grupo B: cultura celular exposta à radiação ionizante.

FIGURA 60 – Índice do bloqueio da citocinese obtido no teste *in vitro* do Micronúcleo com a cultura de células NCI-H292 referente ao Grupo C: cultura celular exposta ao resveratrol e à radiação ionizante. Diferença estatisticamente significante (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

FIGURA 61 – % FMN obtido no teste *in vitro* do Micronúcleo com a cultura de células NCI-H292 referente ao Grupo A: cultura celular exposta ao resveratrol.

FIGURA 62 – % FMN obtido no teste *in vitro* do Micronúcleo com a cultura de células NCI-H292 referente ao Grupo B: cultura celular exposta à radiação ionizante.

FIGURA 63 - % FMN obtido no teste *in vitro* do Micronúcleo com a cultura de células NCI-H292 referente ao Grupo C: cultura celular exposta ao resveratrol e à radiação ionizante. Diferença estatisticamente significativa (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

As análises estatísticas do CBPI e da % FMN foram realizadas utilizando a análise de variância, *One-way* ANOVA e o teste de Bonferroni.

Segundo a recomendação da OECD 487 (2012), para a análise da indução da formação de MN, é essencial a ocorrência de no mínimo uma mitose por célula durante o período de exposição das células à solução de citocalasina-B. Os valores do CBPI obtidos nos três grupos analisados foram superiores a 1,5, o que indica a ocorrência de mais de uma mitose por célula nos três grupos. Na análise estatística do CBPI, o Grupo A apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no número de ciclos celulares, referente à amostra exposta ao resveratrol (30 μ M).

No Grupo B, foram obtidos valores de CBPI superiores a 1,9, sendo satisfatório.

No Grupo C, foi observada uma diminuição significativa no valor do CBPI nas células expostas ao resveratrol e à radiação ionizante. Assim, foi verificada uma diminuição no número de ciclos celulares sofrido por célula durante o período de exposição à solução de citocalasina-B nas células expostas ao resveratrol (15 μ M) associado às doses de 5 e 10 Gy, ao resveratrol (30 μ M) associado a 0 e 10 Gy e ao resveratrol (60 μ M) associado à dose de 10 Gy.

Os valores de RI obtidos nos três grupos foram superiores a 60 %, portanto a porcentagem de células citostáticas foram inferiores a 60 %, o que indica que foi preservada a integridade celular durante a realização do teste nos três grupos analisados.

Na análise microscópica da % FMN realizada nos três grupos, foi observada a presença de apenas um MN por célula binucleada.

Na análise estatística, o Grupo A não apresentou uma diferença significativa ($p > 0,05$) na indução da % FMN proporcionada pelo resveratrol, porém, pode-se observar um aumento no valor da % FMN nas amostras expostas ao resveratrol (15 e 30 μ M).

O Grupo B apresentou um aumento progressivo nos valores de % FMN associado ao aumento da dose de radiação ionizante.

No Grupo C foi verificado um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) na frequência de micronúcleos nas células em cultura exposta ao

resveratrol nas concentrações de 15 e 60 μM associado à dose de radiação de 5 Gy, e ao resveratrol (30 μM) associado às doses de 0 e 0,8 Gy.

O efeito genotóxico do resveratrol foi recentemente verificado em cultura de células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês e em células de linfoma de camundongo. Neste estudo, realizado por Jeong e col. (2014), foi verificado que a atividade genotóxica do resveratrol é baixa quando em concentrações inferiores a 62 $\mu\text{g/mL}$, que corresponde a 272 μM . Em outro estudo realizado por Fox e col. (2012), foi verificado que o resveratrol induz efeitos genotóxicos severos sem induzir o processo de mutagênese celular. Esse estudo mostrou que o resveratrol na concentração de 92 μM apresenta um elevado potencial genotóxico na cultura de células KB-V1 (carcinoma humano), as quais são resistentes aos quimioterápicos.

Como, nas condições propostas de estudo, o resveratrol nas concentrações de 15, 30 e 60 μM proporcionou um aumento na frequência de micronúcleos em células NCI-H292 expostas a diferentes doses de radiação ionizante, este resultado corrobora com os dados demonstrados pelos pesquisadores acima citados, os quais observaram efeito genotóxico em concentrações superiores a 90 μM .

O teste *in vitro* do micronúcleo apresenta vantagens metodológicas referentes ao custo reduzido, rapidez na obtenção de resultados confiáveis e principalmente à redução do uso de animais de laboratório (Flores e Yamaguchi, 2008). Logo, o teste *in vitro* do micronúcleo é uma excelente opção para novos estudos de verificação do efeito genotóxico do resveratrol em diferentes linhagens celulares.

5.8 Avaliação do Potencial Clonogênico

A avaliação do potencial clonogênico está relacionada com a verificação da morte clonogênica das células. A morte clonogênica ocorre quando uma célula, após exposição a agentes físicos ou químicos, transmite aberrações letais durante a divisão celular para as novas células formadas. Essas aberrações letais causam a esterilidade da célula, tornando-a incapaz de realizar mitoses, porém o seu aspecto morfológico permanece temporariamente íntegro até serem

fagocitadas. Logo, a morte clonogênica impede a repopulação do tumor e seu estudo é de suma importância para o controle local da doença.

Para avaliar o potencial clonogênico da cultura de células NCI-H292, as colônias que apresentavam aproximadamente 50 células foram contadas e a porcentagem, calculada.

A FIG. 64 mostra a imagem obtida no microscópio óptico de uma colônia contendo mais de 50 células coradas com Giemsa 20%.

FIGURA 64 - Fotomicrografia da colônia de células NCI-H292 corada com Giemsa 20%, aumento de 4x.

A fração de sobrevivência (FS) foi calculada utilizando a Equação 8:

$$FS = \left(\frac{N^{\circ} \text{ Colônias em Cultura Tratada}}{N^{\circ} \text{ Células Semeadas}} \right) \times \left(\frac{EP \text{ em Cultura Controle}}{100} \right) \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde, EP representa a eficiência de plaqueamento.

A eficiência de plaqueamento (EP) foi calculada utilizando a Equação 9:

$$EP = \left(\frac{N^{\circ} \text{ de colônias contadas}}{N^{\circ} \text{ de células semeadas}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

As TAB. 34 e 35 mostram a porcentagem de colônias contadas, a fração de sobrevivência e a eficiência de plaqueamento com seus respectivos desvios padrão.

TABELA 34 - Resultado da avaliação do potencial clonogênico: número de colônias contadas, EP e FS $\pm$ DP obtidos com a cultura de células NCI-H292 expostas ao resveratrol e à radiação ionizante.

Resveratrol (μ M)	Radiação Ionizante (Gy)	Número de Colônias Contadas	EP (%)	FS
0	0	42,00 $\pm$ 8,49	8,40 $\pm$ 1,70	0,01 $\pm$ 0,00
	0,8	25,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
	5	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
	10	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
15	0	10,00 $\pm$ 2,83	2,00 $\pm$ 0,57	0,00 $\pm$ 0,00
	0,8	5,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
	5	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
	10	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
30	0	11,67 $\pm$ 1,53	2,33 $\pm$ 0,31	0,00 $\pm$ 0,00
	0,8	2,50 $\pm$ 0,71	0,50 $\pm$ 0,14	0,00 $\pm$ 0,00
	5	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
	10	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
60	0	6,50 $\pm$ 2,12	1,30 $\pm$ 0,42	0,00 $\pm$ 0,00
	0,8	5,50 $\pm$ 0,71	1,10 $\pm$ 0,14	0,00 $\pm$ 0,00
	5	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
	10	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

EP: eficiência de plaqueamento; FS: fração de sobrevivência; DP: desvio padrão.

TABELA 35 - Resultado da avaliação do potencial clonogênico: número de colônias contadas, EP e FS obtidos com a cultura de células NCI-H292 semeadas em diferentes densidades.

Número de células semeadas	Número de colônias contadas	EP (%)	FS
2.500	87	3,48	0,00
1.250	12	0,96	0,00
1.000	8	0,80	0,00
500	4	0,80	0,00

EP: eficiência de plaqueamento; FS: fração de sobrevivência; DP: desvio padrão.

Com os valores das TAB. 34 e 35, foram projetadas em gráfico a porcentagem de colônias contadas e a EP (FIG. 65, 66, 67 e 68).

FIGURA 65 - Número de colônias contadas referente à cultura de células NCI-H292 exposta ao resveratrol e à radiação ionizante.

FIGURA 66 – Eficiência de plaqueamento obtida com a cultura de células NCI-H292 exposta ao resveratrol e à radiação ionizante.

FIGURA 67 - Número de colônias contadas referente à cultura de células NCI-H292 semeadas em diferentes densidades.

FIGURA 68 – Eficiência de plaqueamento obtida com a cultura de células NCI-H292 semeadas em diferentes densidades.

O número de colônias formadas representa o número de células semeadas viáveis que permaneceram com a sua integridade reprodutiva. De acordo com os dados referentes às células expostas ao resveratrol e à radiação ionizante, o controle de células da cultura NCI-H292 apresentou uma porcentagem de número de colônias formadas de $42,00 \pm 8,49$, sendo esse valor ainda menor quando a cultura foi exposta a diferentes concentrações de resveratrol e doses de radiação ionizante e, ausente nas doses de 5 e 10 Gy. O baixo número de colônias formadas refletiu no valor da EP, sendo inferior a 10,10 % em todas as amostras analisadas e apresentando valores ainda menores quando a cultura de células foi exposta ao resveratrol e à radiação ionizante.

A fração de sobrevivência não apresentou valores acima de zero nas amostras expostas ao resveratrol e à radiação ionizante.

O efeito da radiação ionizante na capacidade clonogênica da célula é usualmente descrito por uma curva de sobrevivência. Como a FS apresentou valores inferiores a zero, não foi possível obter uma curva de sobrevivência para a cultura de células NCI-H292.

No ensaio realizado com as células NCI-H292 em diferentes densidades, também foi verificada uma baixa formação de colônias, o que refletiu nos baixos valores de EP e FS.

Segundo a experiência do Núcleo de Cultura Celular do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, a linhagem NCI-H292 possui baixo valor de EP, o que dificulta realizar uma avaliação do seu potencial clonogênico.

5.9 Avaliação do efeito do resveratrol no ciclo celular

Para verificar o potencial do resveratrol em promover a sincronização do ciclo celular, a cultura de células NCI-H292 foi tratada individualmente com soluções de resveratrol, hidroxauréia e colchicina por 24 h, e expostas a diferentes doses de radiação ionizante. A colchicina e a hidroxauréia foram utilizadas como referências para as fases de Mitose e Síntese do ciclo celular, respectivamente. Em 3 e 24 h após o término da irradiação, as células em cultura foram coradas com solução de brometo de etídio e a intensidade de fluorescência, medida.

O brometo de etídio é um marcador da molécula de DNA em células com alterações na membrana, decorrentes dos processos de apoptose tardia e necrose celular (Punt e col., 1994). Células marcadas com o brometo de etídio apresentam uma coloração vermelha fluorescente, como mostra a FIG. 69.

FIGURA 69 – Fotomicrografia das células NCI-H292 marcadas com o brometo de etídio, aumento de 20x.

A TAB. 36 apresenta as médias, com seus respectivos coeficientes de variação, dos valores de intensidade de fluorescência do brometo de etídio obtidos 3 h após o término da irradiação da cultura de células NCI-H292 exposta a soluções de resveratrol, colchicina e hidroxiuréia.

TABELA 36 - Resultado do efeito do resveratrol no ciclo celular: médias $\pm$ CV da intensidade de fluorescência após 3 h do término da irradiação das células NCI-H292.

Radiação Ionizante (Gy)	0	0,8	5	10
Controle de células	6.794 $\pm$ 8	6.926 $\pm$ 7	6.962 $\pm$ 2	7.211 $\pm$ 5
Resveratrol (15 μ M)	6.618 $\pm$ 4	6.708 $\pm$ 0	6.817 $\pm$ 3	6.604 $\pm$ 9
Resveratrol (30 μ M)	6.658 $\pm$ 8	7.170 $\pm$ 7	7.098 $\pm$ 7	6.458 $\pm$ 7
Resveratrol (60 μ M)	6.351 $\pm$ 6	6.484 $\pm$ 6	6.699 $\pm$ 3	6.395 $\pm$ 13
Colchicina (0,08 μ g/mL)	7.041 $\pm$ 9	7.144 $\pm$ 1	7.184 $\pm$ 11	6.344 $\pm$ 8
Hidroxiuréia (152,12 μ g/mL)	6.832 $\pm$ 6	7.204 $\pm$ 11	7.163 $\pm$ 5	7.270 $\pm$ 9

CV: coeficiente de variação.

Com os dados da TAB. 36, as médias dos valores de intensidade de fluorescência do brometo de etídio nas células NCI-H292 foram projetadas em gráfico em função da dose de radiação ionizante (FIG. 70).

FIGURA 70 – Curvas da intensidade de fluorescência das células NCI-H292 em função da dose de radiação ionizante na presença de resveratrol, colchicina e hidroxiuréia, 3 h após a irradiação.

A análise estatística para a avaliação do efeito do resveratrol no processo de sincronização do ciclo celular após a irradiação foi realizada utilizando a análise de variância e o teste de Bonferroni. As análises estatística e gráfica referentes à TAB. 36 e a FIG. 70, respectivamente, mostraram que os resultados obtidos, 3 h após a irradiação, foram similares para todas as amostras analisadas, não apresentando diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

A TAB. 37 e FIG. 71 apresentam os resultados da intensidade de fluorescência do brometo de etídio obtidos 24 h após a irradiação das células em cultura, na presença de resveratrol, colchicina e hidroxiuréia.

TABELA 37 - Resultado do efeito do resveratrol no ciclo celular: médias $\pm$ CV da intensidade de fluorescência após 24 h do término da irradiação das células NCI-H292.

Radiação Ionizante (Gy)	0	0,8	5	10
Controle de células	6.819 $\pm$ 4	7.776 $\pm$ 3	7.841 $\pm$ 5	7.337 $\pm$ 3
Resveratrol (15 μM)	6.743 $\pm$ 7	6.625 $\pm$ 10	6.971 $\pm$ 6	8.373 $\pm$ 6
Resveratrol (30 μM)	22.265 $\pm$ 5	22.377 $\pm$ 4	22.694 $\pm$ 2	33.196 $\pm$ 7
Resveratrol (60 μM)	7.198 $\pm$ 3	6.987 $\pm$ 3	6.957 $\pm$ 3	6.733 $\pm$ 3
Colchicina (0,08 μg/mL)	7.315 $\pm$ 4	8.300 $\pm$ 16	8.363 $\pm$ 11	8.123 $\pm$ 0
Hidroxiuréia (152,12 μg/mL)	7.357 $\pm$ 5	7.362 $\pm$ 7	7.425 $\pm$ 7	3.858 $\pm$ 12

CV: coeficiente de variação.

FIGURA 71 – Curvas da intensidade de fluorescência das células NCI-H292 em função da dose de radiação ionizante na presença de resveratrol, colchicina e hidroxiuréia, 24 h após a irradiação.

De acordo com a análise estatística para a avaliação do efeito do resveratrol no processo de sincronização do ciclo celular após 24 h da irradiação, as amostras analisadas apresentaram resultados semelhantes ($p > 0,05$), exceto as amostras expostas ao resveratrol (30 µM), nas quais foi observado um aumento da intensidade de fluorescência estatisticamente significativa ($p < 0,001$), conforme observado na TAB. 37 e FIG. 71.

Como, nas condições utilizadas no estudo, não foi verificada uma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as intensidades de fluorescência apresentadas nas amostras expostas à colchicina e à hidroxiuréia, não foi possível associar o efeito do resveratrol (30 µM) à indução da sincronização celular. Logo, nas condições de estudo, a sincronização do ciclo celular não foi detectada nas células expostas ao resveratrol, hidroxiuréia e colchicina em 3 h e 24 h após o término da irradiação.

Os resultados obtidos contrastam com os dados encontrados na literatura (Ahmad e col., 2001; Suh e col., 2013; Zoberi e col., 2002); porém, o potencial de um composto em promover a sincronização do ciclo celular está diretamente relacionado com o tipo de célula e os estudos relatados na literatura não foram realizados com a linhagem celular NCI-H292.

5.10 Avaliação do efeito do resveratrol no reparo da lesão no DNA

Para avaliar o efeito do resveratrol no reparo da lesão no DNA de células NCI-H292 expostas à radiação ionizante, foram analisadas as intensidades de marcação do brometo de etídio nas células expostas a diferentes concentrações de resveratrol e doses de radiação ionizante. A análise consistiu em comparar a intensidade de fluorescência das células obtidas 3 h e 24 h após o término da irradiação celular.

Com os dados das TAB. 36 e 37 expressos no item 5.9, os valores da intensidade de fluorescência em função da dose de radiação ionizante foram projetados em gráfico como ilustrado na FIG. 72.

FIGURA 72 – Representação gráfica das médias da intensidade de fluorescência das células NCI-H292 em função da dose de radiação ionizante na presença de diferentes concentrações de resveratrol, 3 h e 24 h após a irradiação.

A comparação dos valores de intensidade de fluorescência referentes às leituras realizadas 3 h e 24 h após a irradiação das células mostra que o reparo da lesão no DNA não foi observado nas amostras analisadas ($p > 0,05$). Similarmente, um recente estudo realizado em cultura de células de Rabdomyossarcoma Humano (RD) mostrou que o resveratrol não induziu o processo de reparo celular. Neste estudo, a cultura de células RD foi exposta a diferentes concentrações de resveratrol (15, 30 e 60 µM) e doses de radiação

gama (50 e 100 Gy), com energia média de 1,25 MeV; a análise foi realizada 24 h e 48 h após o término da irradiação (Magalhães e col., 2014). Logo, o resveratrol mostrou não ser eficaz na indução do processo de reparo da lesão no DNA das duas linhagens tumorais (NCI-H292 e RD).

5.11 Avaliação do efeito do resveratrol no processo de lesão radioinduzida

Para verificar a capacidade do resveratrol em potencializar a indução de lesão nas células NCI-H292 expostas à radiação ionizante, a intensidade da marcação do brometo de etídio foi medida 3 h e 24 h após o término da irradiação.

A FIG. 73 mostra que o resveratrol (30 μ M) induziu um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) de células danificadas em 24 h após a exposição a diferentes doses de radiação ionizante. As demais amostras analisadas não apresentaram uma diferença significativa ($p > 0,05$).

FIGURA 73 – Representação gráfica das médias da intensidade de fluorescência das células NCI-H292 em função da dose de radiação ionizante na presença de diferentes concentrações de resveratrol, 3 h e 24 h após a irradiação. * * * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

Nas condições utilizadas no estudo, o resveratrol (30 μ M) apresentou um elevado potencial em induzir lesão celular nas células NCI-H292 na presença e na ausência da radiação ionizante, após 24 h, sendo mais eficaz quando associado à dose de 10 Gy.

5.12 Avaliação do efeito do resveratrol nos processos de apoptose e necrose celular

Com a finalidade de averiguar a capacidade do resveratrol em potencializar a indução de lesão nas células expostas a diferentes doses de radiação ionizante, resultado apresentado no item 5.11, foi analisado o efeito do resveratrol na indução de apoptose e necrose celular na cultura de células NCI-H292 exposta à radiação ionizante.

As TAB. 38 e 39 apresentam os valores de intensidade de fluorescência da Anexina V-FITC e PI obtidos 24 h após a irradiação das células em cultura.

TABELA 38 - Resultado do efeito do resveratrol nos processos de apoptose e necrose celular: médias $\pm$ CV da intensidade de fluorescência das células NCI-H292 marcadas com Anexina V-FITC, após 24 h do término da irradiação.

Amostra	Radiação Ionizante (Gy)			
	0	0,8	5	10
Controle de células	13.010 $\pm$ 5	15.462 $\pm$ 3	14.237 $\pm$ 6	15.036 $\pm$ 1
Resveratrol (15 μ M)	10.891 $\pm$ 15	14.020 $\pm$ 6	15.984 $\pm$ 9	11.905 $\pm$ 9
Resveratrol (30 μ M)	80.131 $\pm$ 2	15.611 $\pm$ 2	18.566 $\pm$ 6	84.828 $\pm$ 6
Resveratrol (60 μ M)	12.765 $\pm$ 10	25.287 $\pm$ 9	27.573 $\pm$ 9	15.963 $\pm$ 2
Colchicina (0,08 μ g/mL)	14.368 $\pm$ 11	16.331 $\pm$ 9	14.627 $\pm$ 9	21.352 $\pm$ 10
Hidroxiuréia (152,12 μ g/mL)	12.041 $\pm$ 0	14.045 $\pm$ 6	15.107 $\pm$ 10	14.860 $\pm$ 0

CV: coeficiente de variação.

TABELA 39 - Resultado do efeito do resveratrol nos processos de apoptose e necrose celular: médias $\pm$ CV da intensidade de fluorescência das células NCI-H292 marcadas com iodeto de propídio, após 24 h do término da irradiação.

Amostra	Radiação Ionizante (Gy)			
	0	0,8	5	10
Controle de células	139 $\pm$ 6	20 $\pm$ 7	204 $\pm$ 5	169 $\pm$ 5
Resveratrol (15 μ M)	143 $\pm$ 15	14 $\pm$ 0	114 $\pm$ 11	119 $\pm$ 7
Resveratrol (30 μ M)	529 $\pm$ 5	20 $\pm$ 14	144 $\pm$ 18	631 $\pm$ 1
Resveratrol (60 μ M)	153 $\pm$ 4	30 $\pm$ 19	104 $\pm$ 16	156 $\pm$ 1
Colchicina (0,08 μ g/mL)	167 $\pm$ 13	20 $\pm$ 9	159 $\pm$ 9	195 $\pm$ 11
Hidroxiuréia (152,12 μ g/mL)	153 $\pm$ 18	24 $\pm$ 15	100 $\pm$ 1	153 $\pm$ 8

CV: coeficiente de variação.

Com dados das TAB. 38 e 39, os valores da intensidade de fluorescência correspondentes aos marcadores nas células NCI-H292 foram projetados em gráfico, como ilustrado na FIG. 74.

FIGURA 74 – Representação gráfica da distribuição das amostras de acordo com as intensidades de fluorescência da anexina V-FITC e PI nas células NCI-H292.

A anexina V é considerada um marcador dos sítios fosfatidilserina presentes na superfície da membrana celular. O fluorocromo PI é um marcador da molécula de DNA em células necróticas, cuja membrana celular se apresenta totalmente danificada. Desta forma, a combinação da anexina V-FITC com o PI permite a diferenciação entre células apoptóticas iniciais (anexina V positivo e PI negativo), células necróticas (anexina V positivo e PI positivo) e células viáveis (anexina V negativo, PI negativo), conforme ilustrado na FIG. 75.

FIGURA 75 – Representação esquemática da análise da intensidade de fluorescência da anexina V-FITC e PI.

De acordo com os dados apresentados na FIG. 74, as amostras de células NCI-H292 expostas ao resveratrol (30 μ M), não irradiadas e irradiadas com dose de 10 Gy, foram marcadas com a Anexina V-FITC e o PI, indicando presença de indução de necrose celular. Células apoptóticas não foram detectadas nesta análise, pois tais células são marcadas somente pela Anexina V-FITC. As demais amostras, localizadas na porção inferior à esquerda do gráfico, que não apresentaram marcação por Anexina V-FITC e PI, correspondem ao grupo com maior número de células viáveis. Assim, o resveratrol na concentração de 30 μ M apresentou um elevado potencial em induzir necrose celular nas células NCI-H292 não irradiadas e irradiadas com dose de 10 Gy, após 24 h.

Resultados semelhantes foram relatados na literatura, indicando que o resveratrol induz apoptose tardia e necrose por diversos mecanismos e em diferentes linhagens celulares (Lang e col., 2015; Luo e col., 2013; Whyte e col., 2007). O estudo *in vitro* com carcinoma de pulmão de não pequenas células, NCI-H838, exposto a radiação com feixe de elétrons, energia de 6 MV e dose de 2 Gy, mostrou que o resveratrol (25 μ M) induz fragmentação nuclear (Liao e col., 2005).

Contudo, há na literatura trabalhos que relatam o efeito radioprotetor do resveratrol. Em cultura de células RD, o resveratrol (15 μ M) apresentou um efeito

radioprotetor observado 48 h após a irradiação das células com radiação gamma (50 Gy) (Magalhães e col., 2014). Em cultura de células de tecido conectivo de camundongo, NCTC Clone 929, o resveratrol (25 μ M e 30 μ M) protegeu as células do efeito da radiação gama (500 e 800 Gy), sendo observado 24 h após a irradiação (Moreno e col., 2012). Em camundongos, a análise das células da medula óssea dos animais mostrou uma significativa redução na incidência de aberrações cromossômicas nos grupos de animais tratados com o resveratrol (100 mg/Kg/dia) quando comparados ao grupo que foi submetido somente à radiação gama (3 Gy em dose única), sem o prévio tratamento com o resveratrol (Carsten e col., 2008).

Os compostos com potencial radioprotetor possuem elevada capacidade de prevenir os diferentes danos ocasionados pela interação dos radicais livres com os constituintes das células, pois o principal mecanismo de ação desses compostos é a captura dos radicais livres presentes no meio celular (Fajardo e col., 2001).

Sendo assim, o resveratrol possui potencial de atuar como radiosensibilizador e como radioprotetor de acordo com a linhagem celular, visto que esse potencial está relacionado com o tipo de célula, a concentração do resveratrol, o tipo e a dose de radiação (Heiduschka e col., 2014; Sebastià e col., 2013).

6 CONCLUSÕES

No modelo experimental, as conclusões foram:

- 1 - A multiplicação das células NCI-H292 ocorreu no período de 48 - 72 h, sendo que o maior índice de multiplicação celular decorreu em torno de 72 h, resultado semelhante ao fornecido pela ATCC.
- 2 - O índice de citotoxicidade do resveratrol ($IC_{50\%}$) na linhagem celular NCI-H292 foi de 401,5 μ M e 43,25 μ M na linhagem celular NCTC Clone 929, demonstrando que a linhagem de células tumorais foi cerca de 9 vezes mais resistente que a de células normais. A $IC_{50\%}$ da hidroxiuréia foi de 11,80 mg/mL, sendo que a colchicina apresentou um $IC_{50\%}$ maior que 128 μ g/mL em NCI-H292.
- 3 - Os planejamentos de irradiação com as técnicas 3DCRT e IMRT foram satisfatórios, obedecendo aos mesmos critérios clínicos de pacientes.
- 4 - O controle de qualidade dos planejamentos apresentou uma faixa de variação entre as doses calculadas e medidas de -1,4 a 1,8%, sendo considerada satisfatória.
- 5 - A taxa de dose de 14 Gy/min apresentou maior otimização do tempo de irradiação e maior efetividade na morte celular.
- 6 - A dose letal 50 % (DL_{50}) da radiação ionizante para a linhagem celular NCI-H292 foi de 693 Gy.
- 7 - O teste *in vitro* do micronúcleo apresentou:
 - Índice de bloqueio da citocinese (CBPI) com valores superiores a 1,5, o que indica a ocorrência de mais de uma mitose por célula.
 - Índice de replicação (RI) > 60 % e porcentagem de células citostáticas < 60 %, indicando preservação da integridade celular durante o teste.
 - Frequência do micronúcleo (% FMN) com aumento significativo nas células expostas ao resveratrol nas concentrações de 15 e 60 μ M associado à dose de radiação de 5 Gy, e ao resveratrol 30 μ M associado às doses de 0 e 0,8 Gy.

- 8 - Não foi possível obter uma curva de sobrevivência para avaliar o potencial clonogênico do resveratrol na cultura de células NCI-H292.
- 9 - A avaliação do efeito do resveratrol nos processos de sincronização do ciclo celular e reparo de lesão no DNA, não apresentou resultados estatisticamente significantes ($p > 0,05$) após 3 h e 24 h do término da irradiação da cultura de células NCI-H292.
- 10 - O resveratrol (30 $\mu\text{M/L}$) induziu um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) de células danificadas em 24 h após a exposição a diferentes doses de radiação ionizante.
- 11 - Os resultados obtidos nos diferentes testes realizados demonstraram uma importante capacidade do resveratrol (30 $\mu\text{M/L}$) em promover danos às células NCI-H292 em cultura após 24 h da irradiação.
- 12 - O dano celular proporcionado pelo resveratrol (30 μM) pode estar correlacionado com a indução de necrose celular verificada nas células não irradiadas e irradiadas com dose de 10 Gy.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ADAMS, R.L.P.; LINDSAY, J.G. Hydroxyurea reversal of inhibition and uses a cell-synchronizing agent. ***The Journal of Biological Chemistry***, v. 242, p. 1314-1317, 1967.
- 2 ADRIAN, M.; JEANDET, P.; DOUILLET-BREUIL, A.C.; TESSON, L.; BESSIS, R. Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 48, p. 6103-6105, 2000.
- 3 AFONSO, M.S.; FERREIRA, S.; DOMINGUES, F.C.; SILVA, F. Resveratrol production in bioreactor: assessment of cell physiological states and plasmid segregational stability. ***Biotechnonology Reports***, v. 5, p. 7-13, 2015.
- 4 AHMAD, N.; ADHAMI, V.M.; AFAQ, F.; FEYES, D.K.; MUKHTAR, H. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. ***Clinical Cancer Research***, v. 7, p. 1466-1473, 2001.
- 5 ALMEIDA, C.E. ***Bases físicas de um programa de garantia de qualidade em IMRT***. Rio de Janeiro, RJ: Centro de Estudos do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes/UERJ, 2012.
- 6 ALNAJASHI, H.A. Irreversible methotrexate induced luckencephalopathy presenting as recurrent stroke like episodes: a case report and brief literature review. ***Saudi Journal of Internal Medicine***, v. 3, p. 29-33, 2013.
- 7 AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. The Global Bioresource Center. ***NCI-H292 [H292] (ACTT® CRL-1848™)***, 2014. Disponível em: <http://www.atcc.org/products/all/CRL-1848.aspx#specifications>. Acessado em: 29/04/2011.
- 8 ATTEN, M.J.; ATTAR, B.M.; MILSON, T.; HOLIAN, O. Resveratrol-induced inactivation of human gastric adenocarcinoma cells through a protein kinase C-mediated mechanism. ***Biochemical Pharmacology***, v. 62, p. 1423-1432, 2001.

- 9 BANFALVI, G. ***Cell Cycle Synchronization Methods and Protocols***. New York, NY: Humana Press, 2011.
- 10 BARRON, C.C.; MOORE, J.; TSAKIRIDIS, T.; PICKERING, G.; TSIANI, E. Inhibition of human lung cancer cell proliferation and survival by wine. ***Cancer Cell International***, v. 14, p. 1-13, 2014.
- 11 BÉLIVEAU, R.; GINGRAS, D. ***Os alimentos contra o câncer: a prevenção e o tratamento do câncer pela alimentação***. Petrópolis, RJ: Editora Vozes, 2007.
- 12 BISHAYEE, A.; DHIR, N. Resveratrol-mediated chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis: inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. ***Chemico-Biological Interactions***, v. 179, p. 131-144, 2009.
- 13 BITTERMAN, J.L.; CHUNG, J.H. Metabolic effects of resveratrol: addressing the controversies. ***Cellular and Molecular Life Sciences***, v. 72, p. 1473-1488, 2015.
- 14 BUSHONG, S.C. ***Computed Tomography***. New York, NY: McGraw-Hill Companies, 2000.
- 15 CAPASSO, L.L. Mini Review: Antiquity of cancer. ***International Journal of Cancer***, v. 113, p. 2-13, 2005.
- 16 CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; NICOLETTI, I.; ZAGNONI, I. Direct HPLC analysis of quercetin and *trans*-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 51, p. 5226-5231, 2003.
- 17 CARMO, E.H.; BARRETO, M.L.; SILVA, J.B. Mudanças nos padrões de morbimortalidade da população brasileira: os desafios para um novo século. ***Epidemiologia e Serviços de Saúde***, v. 12, p. 61-73, 2003.
- 18 CARSTEN, R.E.; BACHAND, A.M.; BAILEY, S.M.; ULLRICH, R.L. Resveratrol reduces radiation-induced chromosome aberration frequencies in mouse bone marrow cells. ***Radiation Research***, v. 169, p. 633-638, 2008.
- 19 CELOTTI, E.; FERRARINI, R.; ZIRONI, R.; CONTE, L.S. Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone. ***Journal of Chromatography A***, v. 730, p. 47-52, 1996.

- 20 CHAO, K.S.C.; APISARNTHANARAX, S.; OZYIGIT, G. ***Practical Essentials of Intensity Modulated Radiation Therapy***. 2. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- 21 CHEN, X.; HE, H.; WANG, G.; YANG, B.; REN, W.; MA, L.; YU, Q. Stereospecific determination of *cis*- and *trans*-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. ***Biomedical Chromatography***, v. 21, p. 257-265, 2007.
- 22 CHUKWUMAH, Y.C.; WALKER, L.T.; VERGHESE, M.; OGUTU, S. Effect of frequency and duration of ultrasonication on the extraction efficiency of selected isoflavones and *trans*-resveratrol from peanuts (*Arachis hypogaea*). ***Ultrasonics Sonochemistry***, v. 16, p. 293-299, 2009.
- 23 CRUZ, A.S.; FIGUEIREDO, C.A.; BARBOSA, M.L.; MARTINEZ, C.H.O.; GOMES, L.F.S. RC-IAL: linhagem celular contínua de rim de coelho - características e substrato para replicação de vírus. ***Revista de Saúde Pública***, v. 26, p. 392-399, 1992.
- 24 DOCHERTY, J.J.; SMITH, J.S.; FU, M.M.; STONER, T.; BOOTH, T. Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice. ***Antiviral Research***, v. 61, p. 19-26, 2004.
- 25 DOLINSKY, V.W.; DYCK, J.R.B. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. ***Biochimica et Biophysica Acta***, v. 1812, p. 1477-1489, 2011.
- 26 DOUILLET-BREUIL, A.C.; JEANDET, P.; ADRIAN, M.; BESSIS, R. Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* Spp. in response to ultraviolet C elicitation. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 47, p. 4456-4461, 1999.
- 27 DOWD, S.B.; TILSON, E.R. ***Practical radiation protection and applied radiobiology***. 2. ed. Philadelphia, PA: Saunders Company, 1999.
- 28 DU, F.Y.; XIAO, X.H.; LI, G.K. Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of *trans*-resveratrol from *Rhizma Polygoni Cuspidati*. ***Journal of Chromatography A***, v. 1140, p. 56-62, 2007.
- 29 FABIÃO, C. O vinho na Lusitânia: reflexões em torno de um problema arqueológico. ***Revista Portuguesa de Arqueologia***, v. 1, p. 169-198, 1998.

- 30 FAJARDO, L.F.; BERTHRONG, M.; ANDERSON, R.E. **Radiation pathology**. New York, NY: Oxford, 2001.
- 31 FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.
- 32 FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1084-1104, 2007.
- 33 FERGUSON, L.R.; CHEN, H.; COLLINS, A.R.; CONNELL, M.; DAMIA, G.; DASGUPTA, S.; MALHOTRA, M.; MEEKER, A.K.; AMEDEI, A.; AMIN, A.; ASHRAF, S.S.; AQUILANO, K.; AZMI, A.S.; BHAKTA, D.; BILSLAND, A.; BOOSANI, C.S.; CHEN, S.; CIRIOLO, M.R.; FUJII, H.; GUHA, G.; HALICKA, D.; HELFERICH, W.G.; KEITH, W.N.; MOHAMMED, S.I.; NICCOLAI, E.; YANG, X.; HONOKI, K.; PARLOW, V.R.; PRAKASH, S.; REZAZADEH, S.; SHACKELFORD, R.E.; SIDRANSKY, D.; TRAN, P.T.; YANG, E.S.; MAXWELL, C.A. Review: Genomic instability in human cancer: molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S5-S24, 2015.
- 34 FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C.C. **Oncologia Molecular**. 1. ed. São Paulo, SP: Editora Atheneu, 2004.
- 35 FERRETTA, A.; GABALLO, A.; TANZARELLA, P.; PICCOLI, C.; CAPITANIO, N.; NICO, B.; ANNESE, T.; PAOLA, M.; AQUILA, C.D.; MARI, M.; FERRANINI, E.; BONIFATI, V.; PACELLI, C.; COCCO, T. Effect of resveratrol on mitochondrial function: implications in parkin-associated familiar Parkinson's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, p. 902-915, 2014.
- 36 FLECKENSTEIN, P.; JENSEN, J.T. **Anatomia em Diagnóstico por Imagens**. 2. ed. Barueri, SP: Editora Manole Ltda., 2004.
- 37 FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, p. 337-340, 2008.
- 38 FONSECA, S.M.; MACHADO, R.C.L.; PAIVA, D.R.S.; ALMEIDA, E.P.M.; MASSUNAGA, V.M.; ROTEJA JR, W.; KOIKE, C.T.; TADOKORO, H. **Manual de quimioterapia antineoplásica**. 1. ed. Rio de Janeiro, RJ: Reichmann & Affonso Ed., 2000.

- 39 FOX, J.T.; SAKAMURU, S.; HUANG, R.; TENEVA, N.; SIMMONS, S.O.; XIA, M.; TICE, R.R.; AUSTIN, C.P.; MYUNG, K. High-throughput genotoxicity assay identifies antioxidants as inducers of DNA damage response and cell death. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, PNAS***, v. 109, p. 5423-5428, 2012.
- 40 FRÉMONT, L. Minireview: Biological effects of resveratrol. ***Life Sciences***, v. 66, p. 663-673, 2000.
- 41 GEHM, B.D.; MC ANDREWS, J.M.; CHIEN, P.Y.; JAMESON, J.L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, v. 94, p. 14138-14143, 1997.
- 42 GETOFF, N. Radiation-induced degradation of water pollutants-state of the art. ***Radiation Physics and Chemistry***, v. 47, p. 581-593, 1996.
- 43 GOLDBERG, D.M.; KARUMANCHIRI, A.; NG, E.; YAN, J.; DIAMANDIS, E.P.; SOLEAS, G.J. Direct gas chromatographic – mass spectrometric method to assay *cis*-resveratrol in wines: preliminary survey of its concentration in commercial wines. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 43, p. 1245-1250, 1995.
- 44 GOLDBERG, D.M.; YAN, J.; NG, E.; DIAMANDIS, E.P.; KARUMANCHIRI, A.; SOLEAS, G.; WATERHOUSE, A.L. Direct injection gas chromatographic mass spectrometric assay for *trans*-resveratrol. ***Analytical Chemistry***, v. 66, p. 3959-3963, 1994.
- 45 GOLKAR, L.; DING, X.Z.; UJIKI, M.B.; SALABAT, M.R.; KELLY, D.L.; SCHOLTENS, D.; FOUGHT, A.J.; BENTREM, D.J.; TALAMONTI, M.S.; BELL, R.H.; ADRIAN, T.E. Resveratrol inhibits pancreatic cancer cell proliferation through transcription induction of macrophage inhibitory cytokine-1. ***Journal of Surgical Research***, v. 138, p. 163-169, 2007.
- 46 GUAN, H.; SINGH, N.P.; SINGH, U.P.; NAGARKATTI, P.S.; NAGARKATTI, M. Resveratrol prevents endothelial cells injury in high-dose Interleukin-2 therapy against melanoma. ***Plos One Journal Pone***, v. 7, p. 1-12, 2012.
- 47 GURUNATHAN, S.; HAN, J.W.; KIM, E.S.; PARK, J.H.; KIM, J.H. Reduction of grapheme oxide by resveratrol: a novel and simple biological method for the synthesis of an effective anticancer nanotherapeutic molecule. ***International Journal of Nanomedicine***, v. 10, p. 2951-2969, 2015.

- 48 HALPERIN, E.C.; WAZER, D.E.; PEREZ, C.A.; BRADY, L.W. **Perez & Brady's principles and practice of radiation oncology**. 5. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- 49 HATHWAY, D.E.; SEAKINS, J.W.T. Hydroxystilbenes of *Eucalyptus wandoo*. **Biochem**, v. 72, p. 369-374, 1959.
- 50 HEDDLE, J.A.; FENECH, M.; HAYASHI, M.; MACGREGOR, J.T. Reflections on the development of micronucleus assays. **Mutagenesis**, v. 26, p. 3-10, 2011.
- 51 HEIDUSCHKA, G.; LILL, C.; SEEMANN, R.; BRUNNER, M.; SCHMID, R.; HOUBEN, R.; BIGENZAHN, J.; THURNHER, D. The effect of resveratrol in combination with irradiation and chemotherapy, study using Merkel cell carcinoma cell lines. **Strahlenther Onkol**, v. 190, p. 75-80, 2014.
- 52 HEREDIA, A.; DAVIS, C.; REDFIELD, R. Synergistic inhibition of HIV-1 in activated and resting peripheral blood mononuclear cells, monocyte-derived macrophages, and selected drug-resistant isolates with nucleoside analogues combined with a natural product, resveratrol. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 25, p. 246-255, 2000.
- 53 HOLCOMBE, R.F.; MARTINEZ, M.; PLANUTS, K.; PLANUTIENE, M. Effects of a grape-supplemented diet on proliferation and Wnt signaling in the colonic mucosa are greatest for those over age 50 and with high arginine consumption. **Nutrition Journal**, v. 14, p. 1-8, 2015.
- 54 HOSSEINI, A.; GHORBANI, A.; Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 5, p. 84-97, 2015.
- 55 HUANG, H.K.; CHENG, Y.L.; GANG, H.; TZAO, C.; LEE, S.C. Mucoepidermoid carcinoma of the lung. **Journal of Medical Sciences**, v. 29, p. 305-308, 2009.
- 56 INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **The advisory group on increasing access to radiotherapy**. Vienna, 2013.
- 57 INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS (ICRU, Report No. 83). Prescribing, recording, and reporting photon-beam IMRT. International Commission on Radiation Units and Measurements, **Journal of the ICRU**, v. 10, 2010.

- 58 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO document 10 993-5). **Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods**, 2009.
- 59 JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G.O.; SLOWING, K.V.; THOMAS, C.F.; BEECHER, C.W.W.; FONG, H.H.S.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; MEHTA, R.G.; MOON, R.C.; PEZZUTO, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, p. 218-220, 1997.
- 60 JANNIN, B.; MENZEL, M.; BERLOT, J.P.; DELMAS, D.; LANÇON, A.; LATRUFFE, N. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 1113-1118, 2004.
- 61 JEANDET, P.; DOUILLET-BREUIL, A.C.; BESSIS, R.; DEBORD, S.; SBAGHI, M.; ADRIAN, M. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2731-2741, 2002.
- 62 JEONG, M.H.; YANG, K.; LEE, C.G.; JEONG, D.H.; PARK, Y.S.; CHOI, Y.J.; KIM, J.S.; OH, S.J.; JEONG, S.K.; JO, W.S. *In vitro* genotoxicity assessment of a novel resveratrol analogue, HS-1793. **Toxicological Research**, v. 3, p. 211-220, 2014.
- 63 JIANG, T.; MIN, W.; LI, Y.; YUE, Z.; WU, C.; ZHOU, C. Radiotherapy plus EGFR TKIs in non-small cell lung cancer patients with brain metastases: an update meta-analysis. **Cancer Medicine**, não paginado, 2016.
- 64 JUNG, K.H.; LEE, J.H.; QUACH, C.H.T.; PAIK, J.Y.; OH, H.; PARK, J.W.; LEE, E.J.; MOON, S.H.; LEE, K.H. Resveratrol suppresses cancer cell glucose uptake by targeting reactive oxygen species-mediated hypoxia-inducible factor-1 α activation. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 54, p. 2161-2167, 2013.
- 65 KHAN, A.; ALJARBOU, A.N.; ALDEBASI, Y.H.; FAISAL, S.M.; KHAN, M.A. Resveratrol suppresses the proliferation of breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase signaling pathway. **Cancer Epidemiology**, v. 38, p. 765-772, 2014.

- 66 KHAN, F.M.; POTISH, R.A. ***Treatment Planning in Radiation Oncology***. Pennsylvania, USA: Williams & Wilkins, 1998.
- 67 KMA, L. Synergistic effect of resveratrol and radiotherapy in control of cancer. ***Asian Pacific Journal of Cancer Prevention***, v. 14, p. 6197-6208, 2013.
- 68 KOUL, R.; TSE, R.; KARREMAN, E.; DUBEY, A.; TAI, P. Overall quality of life assessment in the patients undergoing external beam radiation in outpatient radiation oncology department. ***International Journal of Hematology - Oncology and Stem Cell Research***, v. 9, p. 122-127, 2015.
- 69 KUMAR, V.; COTRAN, R.S.; ROBBINS, S.L. ***Patologia Básica***. 5. ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan, 1994.
- 70 LANG, F.; QIN, Z.; LI, F.; ZHANG, H.; FANG, Z.; HAO, E. Apoptotic cell death induced by resveratrol is partially mediated by the autophagy pathway in human ovarian cancer cells. ***Plos One Journal Pone***, v. 10, p. 1-17, 2015.
- 71 LEI, T.; XU, X.L.; CHEN, W.; XU, Y.P.; MAO, W.M. Adjuvant chemotherapy plus radiotherapy is superior to chemotherapy following surgical treatment of stage IIIA N2 non-small-cell lung cancer. ***OncoTargets and Therapy***, v. 9, p. 921-928, 2016.
- 72 LEIRO, J.; ÁLVAREZ, E.; ARRANZ, J.A.; LAGUNA, R.; URIARTE, E.; ORALLO, F. Effects of *cis*-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. ***Journal of Leukocyte Biology***, v. 75, p. 1156-1165, 2004.
- 73 LEONARD, S.S.; XIA, C.; JIANG, B.H.; STINEFELT, B.; KLANDORF, H.; HARRIS, G.K.; SHI, X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, v. 309, p. 1017-1026, 2003.
- 74 LEVITT, S.H.; KHAN, F.M.; POTISH, R.A.; PEREZ, C.A. ***Technological basis of radiation therapy***. 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999.
- 75 LI, J.; HUANG, S.; ARMSTRONG, E.A.; FOWLER, J.F.; HARARI, P.M. Angiogenesis and radiation response modulation after vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2) blockade. ***International Journal of Radiation Oncology Biology Physics***, v. 62, p. 1477-1485, 2005.

- 76 LIAO, H.F.; KUO, C.D.; YANG, Y.C.; LIN, C.P.; TAI, H.C.; CHEN, Y.Y.; CHEN, Y.J. Resveratrol enhances radiosensitivity of human non-small cell lung cancer NCI-H838 cells accompanied by inhibition of nuclear factor-kappa B activation. **Journal of Radiation Research**, v. 46, p. 387-393, 2005.
- 77 LIN, H.Y.; SHIH, A.; DAVIS, F.B.; TANG, H.Y.; MARTINO, L.J.; BENNETT, J.A.; DAVIS, P.J. Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line. **Journal of Urology**, v. 168, p. 748-755, 2002.
- 78 LIU, X.; ADAMS, A.L. Mucoepidermoid carcinoma of the bronchs. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 131, p. 1400-1404, 2007.
- 79 LUCAS, I.K.; KOLODZIEJ, H. Trans-resveratrol induces apoptosis through ROS-triggered mitochondria-dependent pathways in A549 human lung adenocarcinoma epithelial cells. **Planta Med**, v. 81, p. 1038-1044, 2015.
- 80 LUO, H.; WANG, L.; SCHULTE, B.A.; YANG, A.; TANG, S.; WANG, G. Resveratrol enhances ionizing radiation-induced premature senescence in lung cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 43, p. 1999-2006, 2013.
- 81 MAGALHÃES, V.D.; ROGERO, S.O.; CRUZ, A.S.; VIEIRA, D.P.; OKAZAKI, K.; ROGERO, J.R. *In vitro* tests of resveratrol radiomodifying effect on rhabdomyosarcoma cells by comet assay. **Toxicology in Vitro**, v. 28, p. 1436-1442, 2014.
- 82 MAHADY, G.B.; PENDLAND, S.L.; CHADWICK, L.R. Resveratrol and red wine extracts inhibit the growth of *CagA* + strains of *Helicobacter pylori* *in vitro*. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, p. 1440-1441, 2003.
- 83 MAHRHOFER, H.; BÜRGER, S.; OPPITZ, U.; FLENTJE, M.; DJUZENOVA, C.S. Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H₂AX phosphorylation. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 64, p. 573-580, 2006.
- 84 METTLER JR, F.A.; UPTON, A.C. **Medical effects of ionizing radiation**. 2. ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 1995.

- 85 MILOSO, M.; BERTELLI, A.A.E.; NICOLINI, G.; TREDICI, G.; Resveratrol-induced activation of the mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Neuroscience Letters**, v. 264, p. 141-144, 1999.
- 86 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>>. Acesso em 09/12/2012.
- 87 MINISTÉRIO DA SAÚDE; Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: http://www.inca.gov.br/rbc/n_60/v01/pdf/11-resenha-estimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf. Acessado em: 10/02/2014.
- 88 MINISTÉRIO DA SAÚDE; Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; Coordenação de Prevenção e Vigilância. **INCA estimativa que haverá 596.070 novos casos de câncer em 2016**. Rio de Janeiro: INCA, 2016. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/estimativa_incidencia_cancer_2016. Acessado em: 04/01/2016.
- 89 MORENO, C.S. **Estudo do efeito radioprotetor do resveratrol**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 90 MORENO, C.S.; ROGERO, S.O.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S.; ROGERO, J.R. Resveratrol and radiation biological effects. **International Journal of Nutrology**, v. 5, p. 28-33, 2012.
- 91 NAIR, C.K.K.; PARIDA, D.K.; NOMURA, T. Radioprotectors in radiotherapy. **Journal of Radiation Research**, v. 42, p. 21-37, 2001.
- 92 OCAMPO, I.Z.; OKAZAKI, K.; VIEIRA, D.P. An improved *in vitro* micronucleus assay to biological dosimetry. In: 2013 INTERNATIONAL NUCLEAR ATLANTIC CONFERENCE - INAC 2013, November 24-29, 2013, Recife, PE, Brasil. ISBN: 978-85-99141-05-4.

- 93 OGATA, D.C.; IOSHII, S.O.; BLUM, R.R.; DONDONI, P.H.; AKAMINE, S.K.; BATTAGLIN, F.S.; PIANOVSKI, M.A.D. Carcinoma mucoepidermóide de brônquio: uma rara causa de pneumonia recorrente em uma criança. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 129-132, 2007.
- 94 OLAS, B.; WACHOWICZ, B.; SALUK-JUSZCZAK, J.; ZIELINSKI, T. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on platelet activation induced by endotoxin or thrombin. **Thrombosis Research**, v. 107, p. 141-145, 2002.
- 95 ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD 487). **Guideline for the testing of chemicals, Proposal for updating test guideline 487: in vitro mammalian cell micronucleus test**, 2012.
- 96 PAN, Q.H.; WANG, L.; LI, J.M. Amounts and subcellular localization of stilbene synthase in response of grape berries to UV irradiation. **Plant Science**, v. 176, p. 360-366, 2009.
- 97 PERVAIZ, S. Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 333-344, 2004.
- 98 PEZET, R.; GINDRO, K.; VIRET, O.; SPRING, J.L. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65, p. 297-303, 2004.
- 99 PICKELMAN, J. A glass a day keeps the doctor. **The American Journal of Surgery**, v. 56, p. 395-397, 1990.
- 100 PUNT, J.; OSBORNE, B.A.; TAKAHAMA, Y.; SHARROW, S.O. Negative selection of CD4+CD8+thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, p. 709-713, 1994.
- 101 ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317-329, 2003.

- 102 ROMERO-PÉREZ, A.I.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; LA TORRE-BORONAT, M.C. Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 49, p. 210-215, 2001.
- 103 ROMERO-PÉREZ, A.I.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; WATERHOUSE, A.L.; LA TORRE-BORONAT, M.C. Levels of *cis*- and *trans*-resveratrol and their glucosides in white and rosé *Vitis vinifera* wines from Spain. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 44, p. 2124-2128, 1996.
- 104 ROTH, J.A; COX, J.A.; HONG, W.K. ***Lung Cancer***. 2. ed. Malden, MA: Blackwell Science, Inc., 1998.
- 105 RUBIN, E.; FARBER, J.L. ***Patologia***. Rio de Janeiro, RJ: Interlivro Edições, 1988.
- 106 SALVAJOLI, J.V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S.L. ***Radioterapia em Oncologia***. 2. ed. São Paulo, SP: Editora Atheneu, 2013.
- 107 SANCHO, M.; MACH, N. Revisión efecto de los polifenoles del vino sobre la prevención del cáncer. ***Nutrición Hospitalaria***, v. 31, p. 535-551, 2015.
- 108 SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVES, A.O.; MALLMANN, C.A.; PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, v. 25, p. 437-442, 2005.
- 109 SCHEFTER, T.E.; KAVANAGH, B.D.; RABEN, D.; KANE, M.; CHEN, C.; STUHR, K.; KELLY, K.; MITCHELL, J.D.; BUNN, P.A.; GASPAR, L.E. A phase I/II trial of stereotactic body radiation therapy (SBRT) for lung metastases: initial report of dose escalation and early toxicity. ***International Journal of Radiation Oncology Biology Physics***, v. 66, p. S120-S127, 2006.
- 110 SCHÖPPNER, A.; KINDL, H. Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. ***The Journal of Biological Chemistry***, v. 259, p. 6806-6811, 1984.
- 111 SCHRÖDER, G.; BROWN, J.W.S.; SCHRÖDER, J. Molecular analysis of resveratrol synthase cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. ***European Journal of Biochemistry***, v. 172, p. 161-169, 1988.

- 112 SEBASTIÀ, N.; ALMONACID, M.; VILLAESCUSA, J.I.; CERVERA, J.; SUCH, E.; SILLA, M.A.; SORIANO, J.M.; MONTORO, A. Radioprotective activity and cytogenetic effect of resveratrol in human lymphocytes: an *in vitro* evaluation. ***Food and Chemical Toxicology***, v. 51, p. 391-395, 2013.
- 113 SGAMBATO, A.; ARDITO, R.; FARAGLIA, B.; BONINSEGNA, A.; WOLF, F.I.; CITTADINI, A. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. ***Mutation Research***, v. 496, p. 171-180, 2001.
- 114 SINGH, A.; PANDEY, K.C.; PANT, N.K. Cavitory mucoepidermoid carcinoma of lung with metastases in skeletal muscles as presenting features: a case report and review of the literature. ***Journal of Cancer Research and Therapeutics***, v. 6, p. 350-352, 2010.
- 115 SOCIEDADE BRASILEIRA DE RADIOTERAPIA. ***Radioterapia Baseada em Evidências - Recomendações da Sociedade Brasileira de Radioterapia (SBRT)***. São Paulo. SP: Lemar, 2011.
- 116 SOLEAS, G.J.; DIAMANDIS, E.P.; GOLDBERG, D.M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? ***Clinical Biochemistry***, v. 30, p. 91-113, 1997.
- 117 SOUTO, A.A.; CARNEIRO, M.C.; SEFERIN, M.; SENNA, M.J.H.; CONZ, A.; GOBBI, K. Determination of *trans*-resveratrol concentrations in brazilian red wines by HPLC. ***Journal of Food Composition and Analysis***, v. 14, p. 441-445, 2001.
- 118 STEEL, G.G. ***Basic Clinical Radiobiology***. 2. ed. New York, NY: Oxford University Press, 1997.
- 119 SUH, D.H.; KIM, M.K.; KIM, H.S.; CHUNG, H.H; SONG, Y.S. Cancer-specific therapeutic potential of resveratrol: metabolic approach against hallmarks of cancer. ***The Journal of Functional Food in Health and Disease***, v. 3, p. 332-343, 2013.
- 120 SUN, A.Y.; SIMONYI, A.; SUN, G.Y. The “french paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. ***Free Radical Biology & Medicine***, v. 32, p. 314-318, 2002.

- 121 TANG, Q.; LI, G.; WEI, X.; ZHANG, J.; CHIU, J.F.; HASENMAYER, D.; ZHANG, D.; ZHANG, H. Resveratrol-induced apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Letter**, v. 336, p. 325-337, 2013.
- 122 TAYLOR, E.W. The mechanism of colchicine inhibition of mitosis: I. kinetics of inhibition and the binding of H³-Colchicine. **The Journal of Cell Biology**, v. 25, p. 145-160, 1965.
- 123 TORRE, L.A.; BRAY, F.; SIEGEL, R.L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, p. 87-108, 2015.
- 124 TRELA, B.C.; WATERHOUSE, A.L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1253-1257, 1996.
- 125 VAN ETEN, H.D.; MANSFIELD, J.W.; BAILEY, J.A.; FARMER, E.E. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins". **The Plant Cell**, v. 6, p. 1191-1192, 1994.
- 126 VERMA, J.; TEH, B.S.; PAULINO, A.C. Characteristics and outcome of radiation and chemotherapy-related mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 57, p. 1137-1141, 2011.
- 127 VIEIRA, S.C.; LUSTOSA, A.M.L.; BARBOSA, C.N.B.; TEIXEIRA, J.M.R.; BRITO, L.X.E.; SOARES, L.F.M.; FERREIRA, M.A.T. **Oncologia Básica**. 1. ed. Teresina, PI: Editora Fundação Quixote, 2012.
- 128 VINGTDEUX, V.; DRESES-WERRINGLOER, U.; ZHAO, H.; DAVIES, P.; MARAMBAUD, P. Review: Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. **BMC Neuroscience**, v. 9, suppl. 2-S6, 2008.
- 129 VITRAC, X.; BORNET, A.; VANDERLINDE, R.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DELAUNAY, J.C.; MÉRILLON, J.M.; TEISSÉDRE, P.L. Determination of stilbenes (δ -viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin) in brazilian wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5664-5669, 2005.

- 130 VO, T.T.; NELSON, J.J. Cardiovascular events in cancer patients treated with highly or moderately emetogenic chemotherapy: results from a population-based study. ***Journal of Cancer Epidemiology***. v. 2012, p. 1-12, Article ID 529357, 2012.
- 131 VUONG, T.V.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Treatment strategies for high resveratrol induction in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. ***Biotechnology Reports***, v. 1-2, p. 15-21, 2014.
- 132 WALLE, T.; HSIEH, F.; DE LEGGE, M.H.; OATIS JUNIOR, J.E.; WALLE, U.K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. ***Drug Metabolism and Disposition***, v. 32, p. 1377-1382, 2004.
- 133 WANG, D.G.; LIU, W.Y.; CHEN, G.T. A simple method for the isolation and purification of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. ***Journal of Pharmaceutical Analysis***, v. 4, p. 241-247, 2013.
- 134 WANG, D.; XU, Y.; LIU, W. Tissue distribution and excretion of resveratrol in rat after oral administration of *Polygonum cuspidatum* extract (PCE). ***Phytomedicine***, v. 15, p. 859-866, 2008.
- 135 WHYTE, L.; HUANG, Y.Y.; TORRES, K.; MEHTA, R.G. Molecular mechanisms of resveratrol action in lung cancer cells using dual protein and microarray analyses. ***Cancer Research***, v. 67, p. 12007-12017, 2007.
- 136 WIEDER, T.; PROKOP, A.; BAGCI, B.; ESSMANN, F.; BERNICKE, D.; SCHUZE-OSTHOFF, K.; DÖRKEN, B.; SCHMALZ, H.G.; DANIEL, P.T.; HENZE, G. Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts. ***Leukemia***, v. 15, p. 1735-1742, 2001.
- 137 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol 2004**. Geneva: WHO, 2004. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241562722_\(425KB\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241562722_(425KB).pdf)>. Acesso em: 07/04/2015.
- 138 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol and health 2014**. Geneva: WHO, 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf>. Acesso em: 07/04/2015.

- 139 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO public hearing on harmful used of alcohol**. Geneva: WHO, v. 6, 2009. Disponível em: http://www.who.int/substance_abuse/activities/6individuals.pdf. Acesso em: 07/04/2015.
- 140 XI, J.; JIANG, W.; LU, S.; ZHANG, C.; FAN, H.; WANG, Q. Primary pulmonary mucoepidermoid carcinoma: an analysis of 21 cases. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 10, p. 232-238, 2012.
- 141 XU P.; PECHOUX, C.L. Chemoradiotherapy for stage III non-small cell lung cancer: have we reached the limit? **Chinese Clinical Oncology**, v. 4, p. 45-53, 2015.
- 142 XU, H.T.; LIN, X.Y.; LI, Q.C.; WANG, E.H. The alveolar epithelial differentiation of glandular inner lining cells in a mucoepidermoid carcinoma of the lung: a case report. **Diagnostic Pathology**, v. 7, p. 1-5, 2012.
- 143 YAZIR, Y.; UTKAN, T.; GACAR, N.; ARICIOGLU, F. Resveratrol exerts anti-inflammatory and neuroprotective effects to prevent memory deficits in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **Physiology & Behavior**, v. 138, p. 297-304, 2015.
- 144 YU, C.; SHIN, Y.G.; CHOW, A.; LI, Y.; KOSMEDER, J.W.; LEE, Y.S.; HIRSCHMANN, W.H.; PEZZUTO, J.M.; MEHTA, R.G.; BREEMEN, R.B. van. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. **Pharmaceutical Research**, v. 19, p. 1907 - 1914, 2002.
- 145 ZOBERI, I.; Bradbury; C. M.; CURRY; H. A.; BISHT, K.S; GOSWAMI, P.C; ROTI, J.L.R; GIUS, D. Radiosensitizing and anti-proliferative effects of resveratrol in two human cervical tumor cell lines. **Cancer Letters**, v. 175, p. 165-173, 2002.