INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

EFEITO RADIOMODIFICADOR DO RESVERATROL EM CULTURA DE CÉLULAS DE RABDOMIOSSARCOMA HUMANO (RD) APLICANDO O TESTE DO COMETA

VANESSA DANIELLE MAGALHÃES

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações

Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero

Versão Corrigida

Versão Original encontra-se disponível no IPEN

SÃO PAULO

2012

Dedico este trabalho a toda minha amada família e principalmente aos meus pais Rita e Gilberto, afinal de contas, sem vocês o trabalho não existiria! Agradeço profundamente pelo amor, apoio e confiança de todos vocês.

Aos meus amados amigos pelo companheirismo, amor, apoio e alegrias compartilhadas.

Ao meu amado companheiro de jornada Wagner pelo amor, paciência, amizade, infinito bom-humor e companheirismo.

Minha infinita GRATIDÃO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, a força criadora, fonte do supremo amor, pela minha vida e pela vida de todos os seres.

Ao Dr. José Roberto Rogero, pela orientação, apoio, incentivo, paciência e pela oportunidade de conhecer este assunto maravilhoso.

À Mse. Sizue Ota Rogero, pela preciosa ajuda, atenção e apoio tanto na execução dos experimentos quanto na análise dos resultados.

À Dra. Kayo Okazaki pela atenção, apoio e por disponibilizar gentilmente os laboratórios.

Ao Dr. Daniel S. Perez por toda ajuda, ensinamentos e valiosas sugestões.

À Dra. Áurea S. Cruz pelo fornecimento do material biológico e por toda sugestão e ajuda.

À toda equipe do Núcleo de Cultura de Células do Centro de procedimentos interdisciplinares do Instituto Adolfo Lutz, pela gentileza e atenção.

À Elizabeth S.R. Somessari e Carlos G. da Silveira pela agradável e gentil atenção durante todo o processo de irradiação dos materiais biológicos.

Aos queridos amigos de laboratório (CB e CQMA), das salas de aula e espalhados pelo IPEN todo. Gratidão pela amizade, apoio, desabafos, alegrias, ajuda e companheirismo.

À toda equipe de funcionários do IPEN e aos funcionários terceirizados do IPEN pela atenção, ajuda e aprendizado.

À agência de fomento CAPES pela bolsa concedida.

Ao Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) pela intraestrutura oferecida. Em especial ao Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA), ao Centro de Biotecnologia e ao Centro de Tecnologia das Radiações (CTR).

“O passado é história, o futuro é mistério e hoje é uma dádiva. Por isso se chama presente!”

Provérbio Chinês

EFEITO RADIOMODIFICADOR DO RESVERATROL EM CULTURA DE CÉLULAS DE RABDOMIOSSARCOMA HUMANO (RD) APLICANDO O TESTE DO COMETA

Vanessa Danielle Magalhães

RESUMO

O câncer é uma doença de alta incidência e é considerado um problema de saúde pública no mundo todo. O resveratrol é um polifenol de defesa que tem a habilidade de inibir a carcinogênese em múltiplos estágios. Este polifenol é sintetizado por uma grande variedade de plantas em resposta a exposição à radiação ultravioleta (UV) ou também, pelo estresse mecânico produzido pela ação de patógenos, agentes químicos e físicos. As videiras são consideradas as plantas que têm uma capacidade elevada de produzir o resveratrol, portanto suco de uva e vinho, principalmente o vinho tinto são considerados uma boa fonte de resveratrol. Os efeitos protetores exercidos pelo resveratrol promovem efeitos como indução da resposta antiinflamatória, atividade antitumoral, prevenção ou inibição de doenças degenerativas, diminuição da incidência de doenças cardiovasculares, inibição da agregação plaquetária, entre outros. Assim, o resveratrol é considerado um protetor celular. Porém, em concentrações mais elevadas, o resveratrol promove o efeito contrário, sensibilizando as células a algum tipo de efeito, como por exemplo, o efeito da radiação ionizante. O objetivo desse trabalho foi estudar o efeito radiomodificador do resveratrol em cultura de células RD (rabdomiossarcoma humano) aplicando o teste do cometa para avaliação do dano e capacidade de reparo celular. Foi obtida a DL_{50} das células RD em 403 Gy e o índice de citotoxicidade do resveratrol ($IC_{50\%}$) nas células RD foi de 150 µM. A partir destes resultados foram definidas as doses de radiação gama (50 Gy e 100 Gy) e as concentrações de resveratrol (15 µM – 30 µM – 60 µM) que foram analisadas no trabalho. Foram evidenciados os efeitos do resveratrol como protetor celular na concentração de 15 µM e seu efeito citotóxico em 60 µM. Com a interação da radiação gama, a concentração de 60 µM não mostrou efeito radiossensibilizador estatisticamente significante.

RADIOMODIFYING EFFECT OF RESVERATROL IN HUMAN RHABDOMYOSARCOMA (RD) CELL CULTURE APPLYING THE COMET ASSAY

Vanessa Danielle Magalhães

ABSTRACT

Cancer is a disease with high incidence and it is considered a worldwide public health problem. Resveratrol is a defense polyphenol that possesses a pharmacological activity of carcinogenisis inhibition in multiple levels. This polyphenol is synthesized naturally by a wide variety of plants according to response of ultraviolet radiation (UV) exposition or according to mechanical stress resulting of pathogens or chemical and physical agents. In vines this substance is found in elevated concentration. Thus, resveratrol is present in grape juice and wines, especially red wine. The protective effects performed by resveratrol during the process of cell damage, produced by oxidative effects of free radicals, promote anti-inflammatory, anti-platelet and anti- carcinogenic activity, prevent or inhibit degenerative diseases, decrease incidence of cardiovascular diseases. Moreover, resveratrol is considered as a cell radioprotector. On the other hand, in some elevated concentrations resveratrol may be considered as a radiosensitizing. The aim of this work was study the radiomodifying effect of resveratrol in human rhabdomyosarcoma (RD) cell culture applying the comet to assess the cellular damage and repair capacity. The RD cells gamma radiation LD_{50} was 403 Gy and the resveratrol index cytotoxicity ($IC_{50\%}$) was 150 µM. From these results were defined the gamma radiation doses (50 Gy – 100 Gy) and the resveratrol concentrations (15 µM – 30 µM – 60 µM) were used in this study. The 15 µM and 30 µM concentrations showed cell protective and radioprotective effects. The third and higher concentration used in this work shown to be cytotoxic to RD tumor cells; with gamma radiation presence the 60 µM concentration showed no statistically significant radiosensitizing effects.

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO 12
2 OBJETIVO 15
3 REVISÃO DA LITERATURA 16
3.1 Radiação ionizante 16
3.2 Câncer 17
3.3 Câncer e ciclo celular 19
3.4 Rabdomiossarcoma humano 20
3.5 Resveratrol 22
3.6 Vinho 28
3.7 Teste do cometa 32
4 MATERIAIS E MÉTODOS 34
4.1 Preparo da cultura de células tumorais RD 35
4.2 Determinação *in vitro* do índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$) do resveratrol .. 36
4.3 Determinação *in vitro* da dose letal 50% (DL_{50}) da radiação gama 38
4.4 Teste do cometa (eletroforese em microgel) 38
4.4.1 Incubação das células RD com resveratrol 38
4.4.2 Irradiação das células RD 40
4.4.3 Eletroforese em microgel 41
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 47
5.1 Determinação *in vitro* do índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$) do resveratrol .. 47
5.2 Determinação *in vitro* da dose letal 50% (DL_{50}) da radiação gama 50
5.3 Teste do cometa (eletroforese em microgel) 54
6 CONCLUSÕES 64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Algumas espécies de plantas que sintetizam o resveratrol 24

FIGURA 2 - As videiras têm elevado potencial de síntese do resveratrol 25

FIGURA 3 - Forma isômera *trans*-resveratrol 26

FIGURA 4 - Forma isômera *cis*-resveratrol 26

FIGURA 5 - O vinho tinto é um grande amigo da saúde 31

FIGURA 6 - Representação esquemática da distribuição das soluções de resveratrol, dos controles negativo e positivo e do meio Eagle+L-15 com 15% de SFB na microplca de 96 poços 37

FIGURA 7 - As garrafas de cultura com células RD: uma apenas com meio de cultura Eagle+L-15 e a outra com resveratrol diluído no meio de cultura Eagle+L-15 com 15% SFB..... 39

FIGURA 8 - Processo de esterilização das soluções com a membrana de 0,22 µm de diâmetro 40

FIGURA 9 - Fonte de ^{60}CO GammaCell 200, localizada no CTR 40

FIGURA 10 - Fonte de ^{60}CO GammaCell 200: local onde se colocam as amostras a serem irradiadas 41

FIGURA 11 - Amostras das células RD no gelo após a irradiação, para evitar qualquer tipo de atividade celular 42

FIGURA 12 - Suspensão celular misturada com agarose “low melting” sendo colocada sobre de uma primeira camada de agarose normal 43

FIGURA 13 - Solução de lise sendo colocada no recipiente contendo as lâminas com células RD, preparadas para eletroforese 43

FIGURA 14 - Adição do tampão de eletroforese na cuba de eletroforese horizontal 44

FIGURA 15 - Papel alumínio sendo colocado por cima da cuba de eletroforese, para evitar danos aos nucleóides das células RD 44

FIGURA 16 - Corrida de eletroforese: 25 V e 300 mA por 30 minutos à 4ºC (gelo em volta da cuba de eletroforese..... 45

FIGURA 17 - Curva de viabilidade celular do resveratrol obtida no ensaio *in vitro* de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro 48

FIGURA 18 - Curva dose-resposta de viabilidade celular do resveratrol ajustada (R^2=0,909) 49

FIGURA 19 - Curva de viabilidade celular obtida no ensaio da DL_{50} da radiação gama em cultura de células tumorais RD 51

FIGURA 20 - Curva dose-resposta da DL_{50} de radiação gama ajustada (R^2=0,975) 52

FIGURA 21 - Comparação das curvas de viabilidade celular das linhagens tumorais RD e NCI-H292 54

FIGURA 22 - Micrografia células RD, classificação visual dos cometas: (A) cometa classe 0; (B) cometa classe I; (C) cometa classe II; (D) cometa classe III e (E) cometa classe IV 56

FIGURA 23 - Ensaio do cometa (controle): dano ao DNA das células RD após 24 horas de incubação com resveratrol em diferentes concentrações e não irradiadas: • P <0,05; •• P <0,01; ••• P < 0,001 59

FIGURA 24 - Ensaio do cometa: dano ao DNA das células RD após contato com resveratrol em diferentes concentrações e irradiadas na dose de 50 Gy: ••• P < 0,001 61

FIGURA 25 - Ensaio do cometa: dano ao DNA das células RD após contato com resveratrol em diferentes concentrações e irradiadas na dose de 100 Gy: • P < 0,05; •• P < 0,01; ••• P < 0,001 62

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença de alta incidência e é considerado um problema de saúde pública no mundo todo. Definido como o crescimento desordenado de células anormais que invadem tecidos e órgãos, pode espalhar-se para outras regiões do corpo.

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA/PRO-ONCO), no Brasil, as estimativas, para o ano de 2012, válidas também para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitute do problema do câncer no país. Desconsiderando os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos.

Segundo Murad & Katz (1996), o rabdomiossarcoma é o sarcoma mais comum na infância. Embora incomum, representa um problema sério porque seu manejo correto é difícil. Cresce a partir do mesênquima embrionário, ou tecido mesodérmico, e pode aparecer em qualquer área anatômica, porém, origina-se mais comumente na região genitourinária (21%), extremidades (20%) e região parameníngea (nasofaringe, cavidade nasal, seios paranasais, ouvido médio e fossa infratemporal – 14%), outros locais da cabeça e pescoço excluindo órbitas (13%) e somente órbitas (10%). É menos frequente no tronco e retroperitônio.

Os rabdomiossarcomas são muito radiorresistentes, necessitando, portanto, de altas doses de radioterapia para morte celular. Parece existir uma predisposição genética para o aparecimento desse tumor. Já foi descrita uma translocação cromossômica em células de rabdomiossarcoma (Murad & Katz, 1996).

Na natureza, existem compostos químicos capazes de inibir a carcinogênese em múltiplos estágios, o resveratrol é um deles. A administração sistêmica do resveratrol tem mostrado a inibição do inicio e crescimento de tumores numa ampla variedade. A eficácia de pequenas doses sugere que mesmo o resveratrol obtido a partir de fontes alimentares, como vinho tinto e a uva, pode ser terapêutico em alguns casos (Baur & Sinclair, 2006).

O resveratrol (3, 4`, 5-thihidroxiestilbeno) é um polifenol pertencente ao conjunto de compostos denominados fitoalexinas (Jeandet *et al*., 2002). Esse polifenol de defesa é sintetizado por uma grande variedade de plantas em resposta à exposição a radiação ultravioleta (UV), ou também, pelo estresse mecânico produzido pela ação de patógenos, agentes químicos e físicos (Van Etten *et al*., 1994).

As videiras são consideradas plantas que têm uma capacidade elevada de produzir o resveratrol (Frémont, 2000). Nos vinhos, em especial, no vinho tinto, a concentração de resveratrol é relativamente alta. Os sucos de uva, principalmente o suco tinto de uva, são considerados excelentes fontes de resveratrol para abstêmios, embora sua concentração seja inferior a do vinho tinto (Sautter *et al*., 2005).

Os efeitos protetores exercidos pelo resveratrol, durante o processo de danos no material genético da célula produzido pelo resultado oxidativo dos radicais livres, promovem consequências como: indução da resposta anti-inflatória (Leonard *et al.*, 2003); atividade antitumoral (Frémont, 2000); prevenção ou inibição de doenças degenerativas (Vingtdeux *et al*., 2008); diminuição da incidência de doenças cardiovasculares (Goldberg *et al*., 1995a); inibição da agregação plaquetária (Frémont, 2000), e inibição ou diminuição da incidência de doenças neurodegenerativas, como as síndromes de Alzheimer e Parkinson (Vasanthi *et al*., 2012).

No ciclo celular, tanto de células normais quanto de células tumorais, a presença do resveratrol faz com que as células permaneçam na fase S da mitose (fase de síntese). Essa fase do ciclo celular apresenta uma elevada resistência aos efeitos deletérios promovidos pela incidência da radiação ionizante nas células (Metter Junior & Upton, 1995; Sgambato *et al*., 2001).

O resveratrol é tido como um composto radiomodificador: em baixas concentrações apresenta um efeito protetor das células e em altas concentrações acaba por promover o efeito contrário à proteção (Caddeo *et al*., 2008; Stocco *et al*., 2012), sensibilizando as células a algum tipo de efeito, como, por exemplo, o efeito da radiação ionizante, que é considerado um agente carcinogênico completo, atuando como iniciador e promotor tumoral da carcinogênese (Kondo, 1988).

A radiação ionizante interage no organismo vivo por reações diretas: incidência da radiação ionizante diretamente em macromoléculas biológicas como o DNA e RNA; e por reações indiretas: indução da formação de radicais livres durante a incidência de radiação com as diversas moléculas presentes no interior das células. A água é a substância com maior probabilidade de interagir com a radiação ionizante, já que representa até 85% do conteúdo celular (Dowd & Tilson, 1999; Metter Junior & Upton,1995).

A junção da radiação com moléculas de água produzem os “produtos primários da radiólise da água”, cujos componentes são extremamente reativos e capazes de desencadear inúmeras reações tóxicas no interior das células (Getoff, 1996):

$$\mathbf{H_2O + radiação = H \bullet + OH \bullet + é_{aq} + H_2 + H_20_2 + H_30^+}$$

Diversas metodologias vêm sendo desenvolvidas e aperfeiçoadas para detectar e quantificar danos induzidos ao DNA pela radiação ionizante. Dentre elas, a técnica bioquímica conhecida como teste do cometa, ou também chamado de eletroforese em microgel, que foi pioneiramente descrito por Östling & Johanson (1984), utilizando condições neutras para lise e eletroforese das células, o que permitia apenas a observação de quebras nas duplas fitas de DNA.

Em 1988, Singh *et al*. descreveram a versão alcalina do teste do cometa, que possibilita detectar as quebras ocorridas tanto nas fitas simples quanto nas duplas e nos sítios álcali-lábeis. Por isso, a técnica alcalina é mais eficaz na detecção de lesões primárias radioinduzidas.

2. OBJETIVO

Estudar o efeito radiomodificador do resveratrol em cultura de células tumorais de rabdomiossarcoma humano (RD).

Para atingir o objetivo do trabalho, foi necessário:

- Determinar a dose letal 50% da radiação gama em cultura de células tumorais RD;
- Determinar o nível de citotoxicidade do resveratrol em cultura de células tumorais RD;
- Analisar os efeitos radiomodificadores do resveratrol em cultura de células tumorais RD aplicando o teste do cometa.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Radiação ionizante

O termo radiação refere-se a propagação de energia em forma de fótons, ondas eletromagnéticas ou partículas subatômicas com ou sem carga elétrica. A radiação ionizante apresenta energia suficientemente alta, capaz de arrancar elétrons orbitais de átomos ou moléculas do meio por onde se propaga, produzindo pares de íons. A radiação ionizante é considerada um agente carcinogênico completo, pois pode atuar como um iniciador e promotor tumoral da carcinogênese (Kondo, 1988).

A radiação ionizante interage no organismo vivo por reações diretas: incidência da radiação ionizante diretamente em macromoléculas biológicas como o ácido desoxirribonucléico (DNA) e o ácido ribonucléico (RNA), podendo promover danos fatais à célula. As lesões no DNA que não induzem à morte celular são lesões irreparáveis, devido aos mecanismos de reparo celular, podem ser passadas para as gerações futuras dessas células, iniciando o processo de neoplasia celular (Dowd & Tilson, 1999).

Nas reações indiretas ocorrem sucessivas interações da radiação ionizante com as diversas moléculas presentes no interior das células, resultando na formação de radicais livres e outras moléculas reativas. A água é a molécula que existe em maior abundância no interior celular (cerca de 85%), portanto é a molécula que mais interage com a radiação ionizante. Devido à abundância de água, as reaçôes indiretas são mais frequentes (Dowd & Tilson, 1999)

A junção da radiação ionizante com as moléculas de água resulta nos “produtos primários da radiólise da água”, cujos componentes são extremamente reativos e capazes de desencadear inúmeras reações tóxicas no interior das células (Getoff, 1996):

$$\mathbf{H_2O + radiação = H \bullet + OH \bullet + é_{aq} + H_2 + H_20_2 + H_30^+}$$

A radiação gama é uma forma de radiação ionizante eletromagnética que possue elevada energia de penetração. A radiação gama interage mais frequentemente nos organismos vivos por reações indiretas (Mettler Junior & Upon, 1995).

A maioria das células são mais senssíveis durante a fase da mitose e mais resistentes na fase S, fase de síntese. Assim, uma mesma linhagem celular pode ter diferenças quanto à sensibilidade a radiação, por estarem, as células, distriuídas em diferentes fases da divisão celular (Mettler Junior & Upton, 1995).

3.2 Câncer

O câncer, diferentemente do que pensamos, é uma doença que existe há milhares de anos. Foram encontrados fósseis de ossos de dinossauros, com evidências claras de tumores. Arqueólogos descobriram um esqueleto humano de 2.700 anos, com evidências de metástase nos ossos, provinda de um câncer de próstata. O físico grego Hipócrates chamou a doença de “caranguejo”, provavelmente por causa do tumor e sua rede de ramificações de vasos sanguíneos que lembra o crustáceo com seu corpo e as diversas patas (Dunn, 2012).

O câncer era uma doença rara antigamente. Porém, durante o século passado, a incidência de câncer na população vem aumentando drasticamente. Esse aumento é devido a dois fatores: o primeiro deles é que o homem vive mais hoje; e o segundo, é que a modernidade está fazendo aumentar a exposição de produtos químicos cancerígenos no meio ambiente e a exposição a radiação pelos raios-X, como nas viagens de avião entre outras formas (David & Zimmerman, 2010).

O câncer é uma doença crônica não transmissível que vêm se tornando cada vez mais comum no mundo, causando danos devastadores para famílias inteiras, principalmente, quando o chefe da família adoece, sendo ele o provedor da única fonte de renda (INCA/PRO-ONCO, 2012).

Segundo Dunn (2012), há um século, a expectativa de vida nos Estados Unidos era de 49 anos. As pessoas costumavam morrer por infecções, ataque do coração e por complicações de diabetes. No entanto, com os melhoramentos nos sistemas de tratamento de esgoto e o aumento da higiene das comunidades, as pessoas ficaram menos expostas às infecções. Além disso, os antibióticos

modernos ajudam a sobreviver às infecções. Há também os medicamentos que ajudam a reduzir as mortes por diabetes e doenças do coração. Tais progressos, de um lado, permitem que a população viva, hoje, em média, 30 anos a mais do que em 1.900, mas, de outro, a longividade faz aumentar as possibilidades de as pessoas virem a ter um câncer.

Segundo INCA/PRO-ONCO, o câncer é um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano de 2030, haverá: 27 milhões de casos de câncer; 17 milhões de mortes por câncer, e 75 milhões de pessoas vivas com câncer. O maior efeito desse aumento ocorrerá em países de baixa e média rendas.

Para reduzir os casos de câncer, algumas medidas preventivas devem ser introduzidas o quanto antes, e, dentre elas: o controle do tabagismo; a vacinação para hepatite (contra o câncer de fígado), e o incentivo a uma boa dieta alimentar e a prática de exercícios físicos, para evitar o sedentarismo e o estresse diário, que contribuem cada vez mais para os aumentos de casos de câncer no mundo.

Com o aumento rápido e alarmante do número de casos de câncer, as consequências poderão ser devastadoras para o setor socioeconômico; e o câncer pode se tornar um grande obstáculo para o desenvolvimento desse setor, principalmente, em países emergentes como o Brasil.

O câncer já foi conhecido como uma doença de países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Porém, há quatro décadas, a situação vem mudando, e a maior ocorrência dos casos pode ser observada nos países em desenvolvimento. Seguindo a tendência mundial, notam-se, no Brasil, processos de transição que têm produzido importantes mudanças no perfil das enfermidades que acometem a população. A partir dos anos 1960, as doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte, sendo substituídas pelas doenças do aparelho circulatório e pelas neoplasias. Essa transição epidemiológica tem como principal fator o envelhecimento da população, resultante do intenso processo de urbanização e das ações de promoção e recuperação da saúde (INCA/PRO-ONCO, 2012).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um

total de 385 mil casos novos. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon/reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon/reto e glândula tireóide para o sexo feminino. São esperados 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Se confirmadas as expectativas, o câncer de pele não melanoma (134 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon/reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (INCA/PRO-ONCO, 2012).

3.3 Ciclo Celular e Câncer

O câncer é o resultado de um acúmulo de alterações genéticas, que envolvem genes que, direta ou indiretamente, controlam importantes funções biológicas, como a proliferação e a morte celular. Nas células cancerosas, existem alterações no controle genético da divisão celular, resultando na proliferação inadequada das células. Essas mutações ocorrem, principalmente, em dois genes diferentes: proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Em células normais, os proto-oncogenes agem no estimulo da proliferação celular. Já, nas versões mutadas de proto-oncogenes, ou também conhecidos como oncogenes, podem promover o crescimento tumoral. A inativação dos genes supressores tumorais, como pRb e p53, resulta na disfunção de proteínas que normalmente inibem a progressão do ciclo celular. A desregulação do ciclo celular associada ao câncer ocorre através de mutações de proteínas importantes na manutenção de diferentes níveis do ciclo celular, como as proteínas do “checkpoint” (Vermulen *et al*., 2003).

O principal evento da proliferação celular é o ciclo de divisão celular, que é o processo pelo qual as células crescem, replicam seu DNA e então se dividem para dar origem a duas células-filhas. Esse processo é dividido em quatro fases sequenciais: G1, S, G2 e mitose (M). Na fase S e na fase da mitose, é onde ocorre, respectivamente, a duplicação do material genético e a distribuição de DNA para as duas células-filhas, e são consideradas etapas essenciais para célula. Uma fase não inicia até que a outra esteja finalizada e vice-versa, dessa forma, a integridade do genoma é mantida. Existe ainda uma quinta fase da divisão celular, conhecida como G0 (fase de repouso), em que a célula pode sair

de G1, sem as características apropriadas de crescimento. Células que se dividem menos, ou seja, células não proliferativas se encontram na fase G0 (Garrett, 2001).

A transição de uma fase à outra do ciclo celular, acontece de maneira organizada e é regulada por uma série de diferentes proteínas que atuam em pontos estratégicos do ciclo celular, conhecidos como “checkpoints”. Os “checkpoints” do ciclo celular têm como principal função verificar se a integridade do genoma permanece intacta através do ciclo celulare e, assim sendo, prosseguir com as demais fases do ciclo celular (Hartwell & Weinert, 1989).

O primeiro “checkpoint” ocorre na fase de transição G1/S e é o principal sensor do dano ao DNA. O próximo vem do “checkpoint” G2/M, que monitora a fidelidade da replicação do DNA e, como o “checkpoint” G1/S, é um importante sensor do dano ao DNA. E o terceiro, é o “checkpoint” mitótico, que averigua se há fuso mitótico funcional que não tenha sido corretamente formado, e também é nesse “checkpoint” que pode ocorrer o bloqueio do ciclo celular, caso haja algum problema com a integridade do genoma (Vermeulen *et al*., 2003).

Existe ainda o ponto de restrição R, que ocorre entre o meio e o final da fase G1. Nesse ponto, a célula avalia se tem recebido sinais de crescimento necessários e, a partir disso, pode passar da fase G1 para S, replicar seu DNA e completar o ciclo celular. Caso a célula não tenha recebido estimulos suficientes, não passará do ponto de restrição e, em vez disso, entrará na fase de repouso G0. O ponto de restrição R difere dos outros “checkpoints” por não determinar se a integridade do genoma está ou não abalada. Então, se por algum motivo os “checkpoints” do ciclo celular são bloqueados, podem resultar numa proliferação celular inadequada, o que podem vir a levar a uma indução tumoral. Certamente, todos os tumores humanos carregam alterações genéticas tanto nos genes que controlam a progressão do ciclo celular como nos genes que controlam a função dos “checkpoints” (Vermeulen *et al*., 2003).

3.4 Rabdomiossarcoma humano

O rabdomiossarcoma é o sarcoma de partes moles mais comum na infância, sendo bastante raro em adultos (cerca de 1% dos casos, localizado mais frequentemente no tronco e extremidades). Sua faixa etária de preferência são

crianças menores de cinco anos e no início da puberdade, sendo mais comum no sexo masculino. Esse tipo de sarcoma é incomum (constitue 10 a 12% dos tumores sólidos na infância), representa um problema sério devido ao fato de seu tratamento ser muito complexo. Parece existir uma predisposição genética para o aparecimento desse tumor. Já foi descrita uma translocação cromossômica em células de rabdomiossarcoma (Murad &Katz, 1996).

Por crescer a partir do mesênquima embrionário, ou também conhecido como tecido mesodérmico, pode originar-se em qualquer parte do corpo. Os locais mais comuns que os rabdomiossarcomas aparecem são: região genitourinária (21%); extremidades (20%); região parameníngea (nasofaringe, cavidade nasal, seios paranasais, ouvido médio e fossa infratemporal – 14%); outros locais da cabeça e pescoço excluindo as órbitas (13%); somente órbitas (10%), e, menos frequente, no tronco e retroperitônio (22%). Os locais de preferência de metástase são os pulmões (mais da metade dos casos), linfonodos regionais, ossos, fígado e cérebro (Murad &Katz, 1996).

No momento do diagnóstico, cerca de 80% dos casos apresentam doença localizada ou regional. A biópsia é o procedimento definitivo para o diagnóstico do rabdomiossarcoma. Porém, uma avaliação detalhada da extensão da doença, com tomografia computadorizada, ultra-sonografia, cintilografia de esqueleto e análise do tórax também são essenciais. O diagnóstico e tratamento dependem do local primário da lesão (Murad &Katz, 1996).

A melhora da sobrevida se dá a partir de tratamentos que utilizam em conjunto quimioterapia, cirurgia e radioterapia. A cirúrgia é eficaz quando ocorre a retirada completa com margens adequadas. Porém, a retirada deve ser feita somente em locais sem prejuízo funcional e estético. Para tumores primários de cabeça e pescoço, órbita ou locais específicos nas extremidades, devem ser evitadas amputações. Nesses casos, após a biópsia comprovatória deve-se iniciar a quimioterapia, com futura revisão e radioterapia. Após a diminuição do tumor primário, a massa residual deve ser retirada. Quando a redução tumoral se deve somente a ação da quimioterapia, deve ser indicada a cirurgia, seguida de radioterapia, devido a probabilidade de existirem células tumorais residuais nos locais de envolvimento, inicialmente ocupados pela massa tumoral (Murad &Katz, 1996).

A grande maioria dos pacientes com rabdomiossarcoma necessitam de radioterapia para controle do local primário do tumor ou da doença regional. Por ser extremamente radiorresistente, os rabdomiossarcomas necessitam de altas doses de radioterapia para morte celular. Somente pacientes diagnosticados com primeiro estágio de rabdomiossarcoma, que tenham tido uma retirada completa e eficaz da lesão primária, é que não necessitam de radioterapia. O tratamento por quimioterapia é indicado em qualquer estágio da doença. A intensidade da quimioterapia depende do estadiamento, local primário e subtipo histológico (Murad &Katz, 1996).

3.5 Resveratrol

Muitas reações metabólicas produzem “espécies reativas de oxigênio”, consideradas moléculas extremamente instáveis, conhecidas também como radicais livres (Waterhouse *et al*., 2006). Essas moléculas podem provocar danos às proteínas, lipídeos e, principalmente, ao DNA. Alguns fatores exógenos, como a fumaça do cigarro, radiações ionizantes, solventes orgânicos e pesticidas, podem potencializar a produção de radicais livres, superando a capacidade antioxidante do próprio organismo, resultando num estresse oxidativo. A ingestão de antioxidantes, por meio da dieta alimentar, auxilia o organismo a neutralizar essas ações, mantendo o equilíbrio do organismo, evitando excessos de estresse oxidativo no interior das células (Ramos *et al*., 2000; Yildirim *et al*., 2001). O vinho é considerado uma excelente fonte de antioxidante, sendo muito importante seu composto denominado resveratrol (Baur & Sinclair, 2006).

O resveratrol (3, 4`, 5-thihidroxiestilbeno) é um polifenol pertencente ao conjunto de compostos denominados fitoalexinas (Jeandet *et al*., 2002). Esse polifenol de defesa é sintetizado por uma grande variedade de plantas em resposta à exposição a radiação ultravioleta (UV), ou também, pelo estresse mecânico produzido pela ação de patógenos, agentes químicos e físicos (Van Etten *et al*., 1994).

A biossíntese do resveratrol é desencadeada por sinais químicos, induzidos por qualquer tipo de estresse na planta, aumentando os níveis de resveratrol, principalmente no local afetado (Jeandet *et al*., 2002). Em condições fisiológicas normais, as enzimas que sintetizam o resveratrol, conhecidas como enzimas

estilbeno sintetase, estão presentes em baixas concentrações na parede celular e, em menor proporção, nos cloroplastos, situados na película do fruto em desenvolvimento (Pan *et al*., 2009).

Na uva, a síntese do resveratrol é feita, principalmente, na película do fruto, porém a concentração do composto depende do tipo, intensidade e durabilidade do estresse da videira durante a fase frutífera, assim como do estágio de desenvolvimento do fruto (Pan *et al*., 2009). Esse estresse pode ser causado por fatores bióticos (ferimentos na uva causados pela ação de patógenos – principalmente os fungos *Botrytis cinéria*), e por fatores abióticos (exposição à radiação ultravioleta emitida naturalmente pelo sol, estresse químico e mecânico).

Aproximadamente, 72 espécies de plantas, distribuídas em 31 gêneros e 12 famílias, foram descritas como capazes de sintetizar naturalmente o resveratrol (Jang *et al*., 1997). Dentre essas plantas (FIG. 1), destacam-se, por seus reconhecidos efeitos terapêuticos, o amendoim (*Arachis hypogacea*, Fabaceae), o eucalipto (*Eucalyptus wandoo*, Myrtaceae), a amora (*Morus rubra*, Moráceae), o kojo-kon (*Polygonum cuspidatum,* Polygonaceae) e a uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*, Vitaceae).

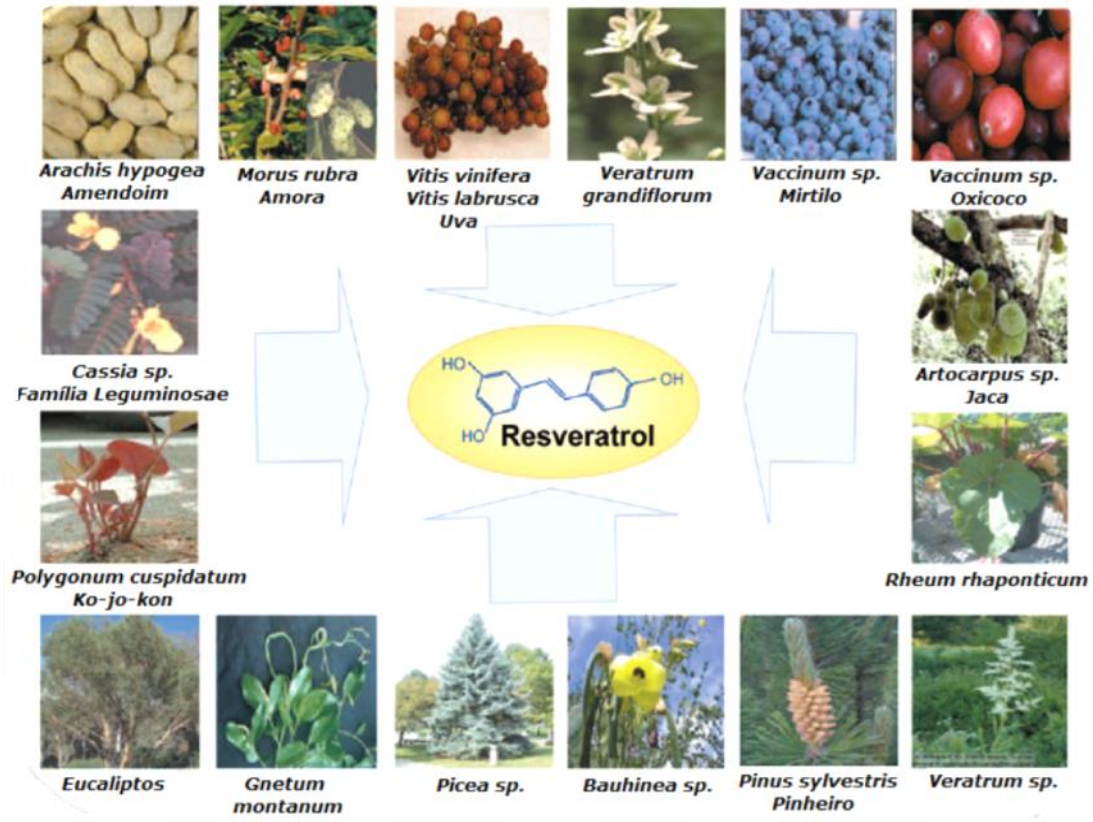

FIGURA 1 – Algumas espécies de plantas que sintetizam o resveratrol.

Como representado na FIG. 2, as videiras são consideradas plantas que têm uma elevada capacidade de produção do resveratrol (Frémont, 2000). Nos vinhos, principalmente no vinho tinto, a concentração de resveratrol é relativamente alta. Crianças, gestantes, lactantes (Giglia *et al*., 2008), doentes hepáticos (Zakhari *et al*., 2007), hiperuricemia, cardiomiopatia alcóolica e em uso de medicamentos que possuam alguma interação com o álcool, como ansiolíticos e anti-epiléticos, entre outros, não devem ingerir vinho. Para esses indivíduos, ou outros abstêmios, é recomendado o suco de uva (principalmente o suco de uva integral), que também é uma excelente fonte de resveratrol, embora sua concentração seja inferior a do vinho tinto (Sautter *et al*., 2005).

FIGURA 2 – As videiras têm elevado potencial de síntese do resveratrol.

No vinho tinto, a maceração e a fermentação das uvas são feitas a partir da película do fruto, portanto, é no vinho tinto que se encontram as maiores concentrações de resveratrol que podemos obter pela alimentação.

As concentrações de resveratrol encontradas nos diferentes tipos de vinhos variam em função da infecção com *Botrytis cinérea*, cultivo da uva, origem geográfica, tipo de vinho e práticas enológicas (Lamuela-Raventos & De La Torre-Boronat, 1993).

O resveratrol é sintetizado naturalmente pela planta em duas formas isômeras: *trans*- e *cis*-resveratrol (3,4`,5-trihidroxi-*trans*-estilbeno e 3,4`,5-trihidroxi-*cis*-estilbeno) e em diversas formas análogas, dentre elas, os isômeros *trans*- e *cis*-piceido (*trans*-resveratrol *3-O-β-glucoside* e *cis*-resveratrol *3-O-β-glucoside*). O isômero *trans*- resveratrol é a forma ativa do composto, sendo convertido em *cis*-resveratrol quando exposto à radiação UV. Estudos referentes ao metabolismo e aos efeitos biológicos exercidos pelo isômero *trans*-resveratrol confirmam o elevado potencial antioxidante proporcionado pela sua capacidade de absorver os radicais livres presentes no meio (Goldberg *et al*., 1995b).

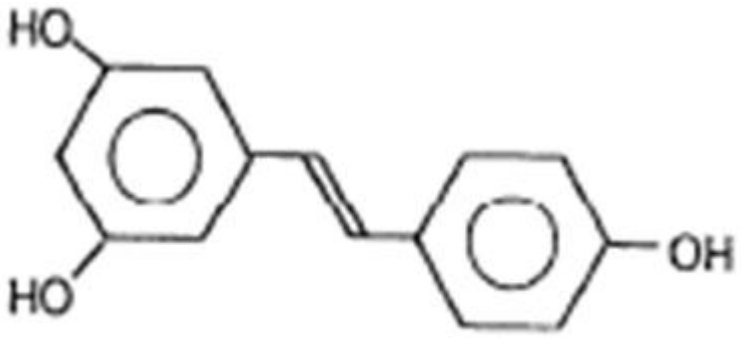

FIGURA 3 – Forma isômera *trans*-resveratrol.

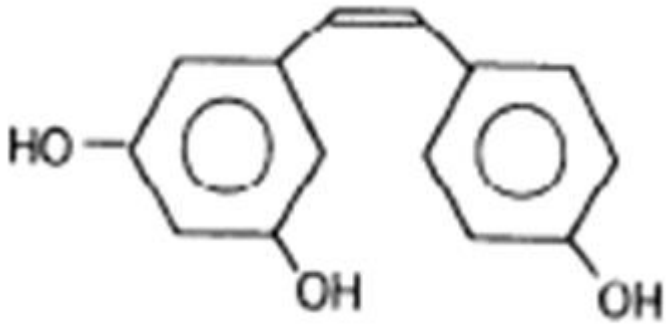

FIGURA 4 – Forma isômera *cis*-resveratrol.

O resveratrol já era conhecido (por outro nome talvez) e amplamente utilizado pelas medicinas orientais há séculos. Com esse composto eram tratados problemas de pele supurativos, gonorréia, pé-de-atleta, arteriosclerose, problemas de colesterol, doenças alérgicas e inflamatórias (Frémont, 2000). Para os ocidentais, o resveratrol ganhou reconhecimento a partir de um episódio conhecido como “paradoxo francês”.

A população da França tem hábitos de vida que não são considerados saudáveis. Os franceses, comparados com outros povos europeus, são os que mais fumam, têm vida sedentária e dieta alimentar com elevados níveis de gordura animal, diretamente ligada às doenças do coração. Porém, mesmo com esses hábitos, os franceses são, na europa, os que menos morrem por doenças cardiovasculares (Gorinstein, 1999). Isso se deve ao alto consumo de vinho,

principalmente o vinho tinto (cerca de 60 litros anuais *per capita*), ingerido regularmente durante as refeições, que faz aumentar o HDL (lipoproteína de alta densidade – bom colesterol) e diminuir o LDL (lipoproteína de baixa densidade – mau colesterol).

O LDL tende a se depositar nas artérias, já o HDL ajuda a remover os LDL das artérias, reduzindo o risco de arteriosclerose e infarto (Frankel *et al*., 1993; Meyer *et al*., 1997). Isso ocorre devido às substâncias fenólicas, entre elas o resveratrol, existentes no vinho tinto, impedindo a oxidação de componentes das LDLs. E mais, essas substâncias são capazes de agir sobre placas de gorduras (ateromas), que se localizam nas artérias e que levam à redução da luz do vaso, assim como também inibem a formação de coágulos sanguíneos (trombos), que consistem em uma das maiores causas dos problemas vasculares (Kinsella *et al*., 1993).

Os efeitos protetores exercidos pelo resveratrol, durante o processo de danos ao material genético da célula produzido pelo efeito oxidativo dos radicais livres, promovem efeitos como: a indução da resposta anti-inflatória (Leonard *et al.*, 2003); a atividade antitumoral (Frémont, 2000); a prevenção ou inibição de doenças degenerativas (Vingtdeux *et al*., 2008); a diminuição da incidência de doenças cardiovasculares (Goldberg *et al*., 1995a); a inibição da agregação plaquetária (Frémont, 2000), e a inibição ou diminuição da incidência de doenças neurodegenerativas, como as síndromes de Alzheimer e Parkinson (Vasanthi *et al*., 2012; Vingtdeux *et al*., 2008).

Sendo um potente antioxidante, o resveratrol tem a capacidade de bloquear, ou “neutralizar”, a ação dos radicais livres que produzem danos ao material genético das células, resultando no envelhecimento natural do organismo, e favorecem o aparecimento de diferentes tipos de câncer. O resveratrol é um agente químico responsável pelo bloqueio da evolução do câncer, atuando nos seus três estágios de formação: iniciação, promoção e progressão tumorais (Jang *et al*., 1997). O resveratrol também tem uma potente ação anti-inflatória, ligada diretamente às suas atividades antitumorais. O resveratrol age bloqueando a ação das prostaglandinas, que são substâncias químicas presentes nos processos inflamatórios, intimamente relacionadas com a transformação de lesãos pré-cancerosas em lesões malignas (Penna & Hecktheuer, 2004).

No ciclo celular, tanto de células normais quanto de células tumorais, a presença do resveratrol faz com que as células permaneçam na fase S da mitose (fase de síntese). Essa fase do ciclo celular apresenta uma elevada resistência aos efeitos deletérios promovidos pela incidência da radiação ionizante (Metter Junior & Upton, 1995; Sgambato *et al*., 2001).

Um recente estudo em seres humanos, submetidos à admistração oral e intravenosa de resveratrol, mostrou que cerca de 70% do composto são absorvidos pelo organismo (Walle *et al*., 2004). O processo de distribuição do resveratrol pelos tecidos é realizado por transporte passivo (difusão trans-epitelial) e por um processo mediado por uma proteína carreadora. Ambos os processos são realizados com facilidade devido a característica lipossolúvel do resveratrol e sua elevada afinidade com a proteína albumina (Jannin *et al*., 2004).

O composto químico atua tanto como radioprotetor (protegendo o DNA das células da radiação ionizante) quanto como radiossensibilizador celular (sensibilizando as células à radiação ionizante, mimetizando a ação do oxigênio, que é considerado um sensibilizador universal) sendo considerado um composto radiomodificador, como o resveratrol. O processo de oxidação das células e produção de radicais livres (e outras moléculas reativas) é natural, por esse motivo os organismo vivos envelhecem e morrem.

No caso do resveratrol, em baixas concentrações apresenta um efeito radioprotetor às células e em altas concentrações acaba promovendo o efeito contrário à proteção (Caddeo *et al*., 2008; Stocco *et al*., 2012), sensibilizando as células.

3.6 Vinho

Importantes civilizações antigas, como a dos egípcios, dos gregos e dos romanos, além dos hindus, utilizavam vinho como remédio para o corpo e para alma. Registros históricos apontam que o uso medicinal do vinho pelo homem tem sido uma prática há mais de 2000 anos (Johnson, 1989).

O vinho é uma das primeiras criações da humanidade e está relacionado a uma série de descobertas ligadas às primeiras reações químicas encontradas pelo homem: a fermentação e a oxidação. As grandes civilizações antigas da Grécia e de Roma cultivaram e cultuaram a origem do vinho e sua pré-história, e

cercavam o nascimento do deus Baco Dioniso por muitos mitos (*Hino Homérico a Dioniso, I, II e III*). O antigo Egíto nos deixou listas de vinhos. Em suas jarras, os egípcios mencionavam até o ano, o vinhedo e o nome do vinhateiro. Graças aos açúcares concentrados em seus bagos e ao seu sumo abundante, a uva é a única fruta que tem tendência natural a fermentar. E a fermentação produz o álcool. Basta que a uva esteja madura e que seu sumo entre em contato com leveduras – presentes naturalmente em forma selvagem na casca dos bagos. Se o seu sumo for armazenado em um recipiente, o vinho se fará sozinho (LAROUSSE , 2004).

Segundo Larousse (2004) os primeiros vinhedos surgiram em locais onde havia uva em estado selvagem e, ao mesmo tempo, povoamento humano. Sementes de uva cultivadas por mais de 7 mil anos foram descobertas no Cáucaso, a leste do Mar Negro. Sugerindo que o primeiro vinhedo foi plantado em algum lugar entre as atuais Turquia, Geórgia e Armênia.

Acredita-se que a descoberta do vinho tenha sido por “acaso”. Podemos visualizar um homem da idade da pedra depositando uvas maduras em um recipiente – pote de argila, tigela de madeira, saco de pele – e deixando-as fermentar, quiçá por esquecê-las. Se o tempo estivesse quente, seria uma questão de horas. Depois de alguns dias, o líquido obtido era uma espécie de vinho (LAROUSSE , 2004).

O vinho tinha papel principal em rituais religiosos, por esse motivo acabou se transformando em um dos elementos mais importantes da civilização ocidental. A prática e as crenças cristãs ligadas ao vinho derivam dos rituais gregos e romanos. Na mitologia grega, há Baco Dionísio, o deus do vinho, nomeado como Baco na mitologia romana (LAROUSSE , 2004).

Na Idade Média, os vinhedos sofreram com as guerras, e, como a uva tivesse papel essencial nos rituais religiosos, quando o clima se acalmou, em torno dos mosteiros e das catedrais, encontravam-se os vinhedos. Com a calmaria, houve expansão gigantesca dos vinhedos, o que reanimou o comércio europeu (LAROUSSE , 2004).

No século XIV, a exportação de vinho para a Inglaterra era tão importante que sua média anual só foi superada em 1979. Sob o reinado de Elisabeth I, quase três séculos mais tarde, os ingleses bebiam mais de 40 milhões de garrafas de

vinho por ano, para uma população que, na época, contava 6,1 milhões de habitantes (LAROUSSE , 2004).

Em 1980, no sul da França, os vinhedos foram fortemente atacados pelas filoxera, um pulgão muito pequeno que devasta a plantação de uva, nutrindo-se do sumo de suas raízes. A praga veio de navio da América do Norte e foi se espalhando por toda a europa. Faltou pouco para que todos os vinhedos fossem dizimados. Após quarenta anos de devastações, foi encontrada uma solução: as uvas enxertadas com cepas americanas foram imunizadas. Nessa mesma época, outras duas pragas ajudaram a filoxera a destruir os vinhedos europeus: o oídio e o míldio (LAROUSSE , 2004).

Elemento de festa, cerimônia religiosa, medicamento, antiséptico, o vinho desempenhou e desempenha até os dias atuais vários papéis importantes. Porém, o domínio do envelhecimento foi relativamente recente. A possibilidade de guardar um vinho durante anos – e de se obter uma melhora em barril ou em garrafa – anuncia o nascimento do vinho de qualidade (LAROUSSE , 2004).

Estudos desenvolvidos no mundo inteiro comprovam que o vinho, em quantidade moderada, contribui para a saúde do organismo humano, aumentando a qualidade e o tempo de vida (Tomera, 1999). As pesquisas relacionam o consumo moderado de vinho aos benefícios à saúde humana, principalmente, com relação às doenças cardiovasculares, doenças hepáticas, prevenção do câncer e poder rejuvenecedor, já que é um potente antioxidante (FIG. 5).

FIGURA 5 – O vinho tinto é um grande amigo da saúde.

Na medicina oriental milenar *ayurveda*, o suco fermentado de uvas vermelhas é conhecido como um tônico cardíaco - "*darakchasava*" (Paul *et al*., 1999). O suco de uva ou o vinho tinto, são descritos como dádiva de Deus na Bíblia (Salmo: 104-13-15). Paulo, ao tomar conhecimento da doença de Timótio, recomenda-lhe o vinho para a cura do estomago e das frequentes enfermidades (I Timóteo 5:23).

As concentrações de resveratrol encontrados nos diferentes tipos de vinhos variam em função da infecção por fungos, o cultivo da uva, a origem geográfica, o tipo de vinho e as práticas enológicas (Lamuela-Raventos & De La Torre-Boronat, 1993).

Segundo Souto *et al*. (2000), foram analisados 36 tipos diferentes de vinhos brasileiros e as concentrações de resveratrol variaram de 0,82 a 5,75 mg/L, com valor médio de 2,57 mg/L. Esse trabalho mostrou que os vinhos gaúchos têm uma maior concentração de resveratrol, devido à alta umidade dos solos da Serra Gaúcha, o que favorece a proliferação de fungos. A alta concentração de resveratrol encontrada nos vinhos gaúchos ocorre porque esse composto é produzido pela planta como defesa contra a ação dos fungos, principalmente o *Botrytis cinerea* (Langcake & Pryce, 1979).

Em estudos que analisaram as concentrações de resveratrol em vinhos da Europa, América do Norte e Japão mostram que as concentrações variam de 0,1

a 14,5 mg/L, chegando a uma média de 7,25 mg/L (Mukherjee *et al*., 2010; Frémont, 2000).

3.7 Teste do cometa

Diversas metodologias vêm sendo desenvolvidas e aperfeiçoadas para detectar e quantificar danos induzidos ao DNA pela radiação ionizante, entre outros fatores que também induzem danos. Além das técnicas citogenéticas utilizadas para a detecção de dano radioinduzido, as metodologias bioquímicas também são muito bem empregadas para este objetivo. Dentre estas metodologias, a técnica bioquímica conhecida como teste do cometa, ou também chamado de eletroforese em microgel, foi pioneiramente descrito por Östling & Johanson (1984), utilizando condições neutras para lise e eletroforese das células, o que permitia apenas a observação de quebras nas duplas fitas de DNA.

Em 1988, Singh *et al*. descreveram a versão alcalina do teste do cometa, que possibilita detectar as quebras ocorridas tanto nas fitas simples e duplas e nos sítios álcali-lábeis. Logo a técnica alcalina é mais eficaz na detecção de lesões primárias radioinduzidas.

O teste do cometa se baseia no princípio da eletroforese. O material genético nuclear de mamíferos está organizado em unidades compactas, ligadas à membrana do núcleo. Quebras nas fitas do DNA ocasionam danos na estrutura da cromatina, causando um relaxamento. O filamento do DNA danificado (-) se apresenta menos compacto e migra do núcleo em direção ao ânodo (+) quando submetido a eletroforese, mostrando-se semelhante a um cometa, dando origem ao nome da técnica (Östling & Johanson, 1987).

Segundo Östling & Johanson (1987), os nucleóides das células que apresentam seu conteúdo mais concentrado e circular (“cabeça” do cometa) não sofreram danos no DNA; já os nucleóides que apresentam filamentos que migram durante a eletroforese formando a “cauda” do cometa sofreram danos no DNA. O tamanho da cauda do cometa é diretamente proporcional ao dano.

O teste do cometa é amplamente empregado, pois apresenta uma série de vantagens, como a avaliação de dano em células isoladas, utilização de uma pequena quantidade de amostras na ordem de microlitros (µl), utilização de qualquer tipo celular proliferativo ou não, avaliação da capacidade de reparo,

além de apresentar uma boa sensibilidade para detecção de danos ocorridos no DNA (Speit & Hartmann, 1999).

Este teste tem sido utilizado em diversas áreas de estudo, como em ensaios de genotoxicidade, monitoramento ambiental, biomonitoração humana, estudos envolvendo danos ao DNA e sua capacidade de reparo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A linhagem de células tumorais RD (rabdomiossarcoma humano), adquirida da American Type Culture Colletion – ATCC, fornecida pelo Departamento de Culturas Celulares, Instituto Adolfo Lutz, SP.

O meio de cultura utilizado neste trabalho foi o Eagle+L-15, suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico.

O resveratrol foi adquirido da empresa Sunrise Chemical Ltd. (China), importado e comercializado pela empresa PharmaNostra, Campinas-SP. A empresa PharmaNostra atesta o composto como sendo da forma isômera *trans*-resveratrol, com teor de 99,4% de pureza.

A radiação gama foi proveniente da fonte de ^{60}CO GammaCell 200 (Atomic Energy of Canada Limited – Ottawa, Canadá) – disponível no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN/SP). A taxa de dose de radiação gama da fonte GammaCell 200 variou durante os meses de novembro/2011 - maio/2012 de 1,57 kGy/h – 1,47 kGy/h, tendo como média 1,52 kGy/h.

Os reagentes químicos utilizados no trabalho: agarose “normal melting” e agarose “low melting” (Invitrogen); Tris, NaOH, etanol e DMSO (Synth); NaCl (Reagen); EDTA (Vetec); sarcosinato de sódio, corante brometo de etídio e corante vermelho neutro (Sigma - Aldrich) e Triton-X 100 (Nuclear).

Os equipamentos utilizados nos ensaios de determinação da dose letal 50% de radiação gama e citotoxicidade do resveratrol foram: estufa (Binder), fluxo laminar (Filtracom), espectrofotômetro leitor tipo ELISA (Tecan). Os equipamentos utilizados na cultura celular foram: centrifuga (Celm), banho maria (Fanem), estufa e fluxo laminar (ThermoScientific), microscópio (Carl Zeiss) e geladeira (Eletrolux). Os equipamentos utilizados para o preparo das soluções e o teste do cometa foram: phmetro (Orion), agitador magnético (Fanem), balança analítica (Mettler), banho maria (Ética), geladeira (Brastemp), microondas (GoldStar), fonte de eletroforese horizontal (Pharmacia Biotech) e microscópio de fluorescência (Nikon).

Os ensaios de determinação da dose letal 50% de radiação gama e citotoxicidade do resveratrol foram realizados no Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA – IPEN/CNEN, SP). Os ensaios do cometa, a preparação de soluções e a manutenção das células tumorais RD foram realizadas nos laboratórios gentilmente disponibilizados pelo Centro de Biotecnologia (CB – IPEN/CNEN, SP).

Os gráficos apresentados neste trabalho foram confeccionados nos programas “GraphPad Prism 5” e “Origin 7.5”.

A analise estatística foi feita pelo método 2way ANOVA e Bonferroni (GraphPad Prism 5.0). Os valores com $P > 0,05$ não são considerados estatiscamente significantes.

4.1 Preparo da cultura de células tumorais RD

O processo de preparo das células foi realizado na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz-SP como descrito abaixo.

As células da linhagem tumoral RD foram cultivadas em garrafa de cultura celular de 25 cm^3 utilizando meio de cultura Eagle+L-15, suplementado com 15% de SFB. As células foram mantidas em estufa a 37ºC, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2 até a formação da monocamada celular.

Para o teste do cometa, as garrafas de cultura com a monocamada de células da linhagem RD formada foram levadas ao laboratório de cultura celular do CB-IPEN/CNEN, onde foi adicionado antibiótico ao meio de cultura.

Para os ensaios realizados com as microplacas de 96 poços (DL_{50} e $IC_{50\%}$), depois da formação da monocamada celular, foram tratadas com uma solução de 0,20% de tripsina e 0,02% de EDTA, para destacar as células da garrafa de cultura. Após a tripsinização, as células foram contadas na câmara de Neubauer e a suspensão celular acertada de acordo com cada ensaio a ser realizado. Um volume de 0,2 mL da suspensão celular obtida foi distribuído em cada poço da microplaca.

A seguir, as microplacas foram incubadas a 37ºC em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 para a formação e adesão da monocamada celular em cada poço.

4.2 Determinação *in vitro* do índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$) do resveratrol

O ensaio, para determinação do índice de citotoxicidade do resveratrol em cultura de células tumorais RD, foi realizado pelo método de incorporação do corante vermelho neutro, em conformidade com as normas internacionais (ISO 10993-5, 2009) e as metodologias descritas na literatura (Rogero *et al*., 2003; Moreno *et al*., 2012; Magalhães *et al*., 2011).

O resveratrol foi diluído em etanol PA obtendo-se a solução estoque (50 mM). Posteriormente, a solução estoque foi diluída em meio de cultura Eagle+L-15, suplementado com 15% de SFB, resultando em cinco diferentes concentrações correspondentes a: 100% = 250 µM, 50% = 125 µM, 25% = 62,5 µM, 12,5% = 31,25 µM e 6,25% = 15,63 µM.

Para obter o extrato do controle positivo foi adicionado látex de borracha natural ao meio de cultura Eagle+L-15, suplementado com 15% SFB; e, como controle negativo, foi utilizado o extrato de polietileno de alta densidade também em meio de cultura, incubadas a 37ºC por 24 horas. Após esse período, os extratos foram submetidos ao mesmo procedimento de diluição seriada realizado com o resveratrol, em cinco diferentes concentrações (100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%).

Em uma microplaca de 96 poços contendo $5x10^4$ células RD/poço foi adicionado, em cada poço, um volume de 0,2 mL de cada solução (controle positivo, controle negativo e resveratrol) e, nos poços de controle de células, foi adicionado apenas 0,2 mL de meio de cultura (FIG. 6). A microplaca foi incubada a 37ºC em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2 por 24 horas.

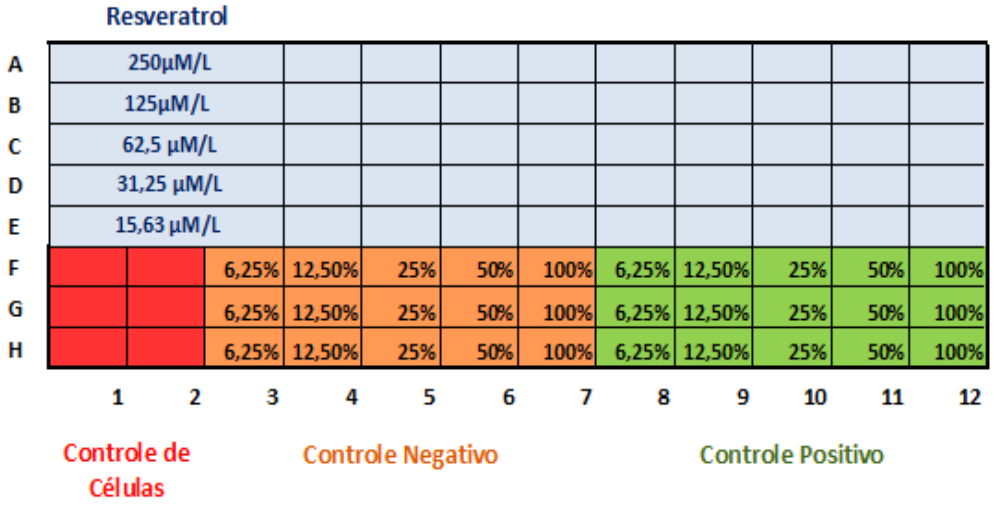

FIGURA 6 – Representação esquemática da distribuição das soluções de resveratrol, dos controles negativo e positivo e do meio Eagle+L-15 com 15% de SFB na microplca de 96 poços.

Passadas as 24 horas de incubação, a microplaca foi retirada da estufa e o meio com as soluções foi trocado por uma solução de corante vermelho neutro diluído em meio de cultura Eagle+L-15 sem SFB; e novamente a microplaca foi incubada por 3 horas a 37ºC, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2, para incorporação do corante vermelho neutro pelas células vivas.

Até esse momento, todos os procedimentos de manutenção e manipulação das células foram realizados em ambiente estéril, ou seja, em fluxo laminar previamente esterilizado com radiação UV, por 30 minutos, e álcool 70%. A obtenção dos extratos também foi realizada de forma estéril. A solução de resveratrol foi submetida a um processo de esterilização, sendo filtrada em membranas contendo poros de 0,22 µm de diâmetro, em ambiente estéril.

Após as 3 horas de incubação, a solução corante foi retirada e a microplaca foi lavada duas vezes com PBS pH 7,4 e uma vez com solução de lavagem ($CaCl_2$ 10% em formol 0,5%). A solução de extração (ácido acético 2% e etanol 1:1) foi adicionada, causando lise celular e evidenciando o corante.

A microplaca foi submetida a uma leitura de densidade ótica (DO), num espectrofotômetro leitor tipo ELISA, filtro de 540 nm. As porcentagens de viabilidade celular foram calculadas a partir das DO obtidas.

4.3 Determinação *in vitro* da dose letal 50% (DL_{50}) de radiação gama

Para o ensaio de determinação da dose letal 50% de radiação gama em cultura de células tumorais RD, foram usadas cinco microplacas de 96 poços contendo $5x10^4$ células por poço. Cada microplaca foi submetida a uma dose de radiação diferente: 1000 Gy, 750 Gy, 500 Gy, 250 Gy e 0 Gy (controle).

Após a irradiação, o meio de cultura foi trocado por meio de cultura fresco e as microplacas incubadas a 37ºC, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2, por 24 horas. Passado esse tempo, o meio de cultura das microplacas foi substituído pela solução corante vermelho neutro diluído em meio de cultura sem SFB, e novamente as microplacas foram incubadas a 37ºC, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2, por 3 horas, para incorporação do corante pelas células vivas.

A partir desse momento do ensaio, os procedimentos foram os mesmos descritos no item “4.2”.

4.4 Teste do cometa (eletroforese em microgel)

Foi adotada a versão alcalina do teste do cometa descrito por Singh *et al*. (1988), Nascimento *et al*. (2001) e Oliveira *et al*.(2001). As lâminas histológicas (em triplicata) foram previamente colocadas em etanol 100% para limpeza. Após a secagem, as lâminas foram embebidas em agarose normal (dissolvida em tampão PBS livre de Ca e Mg, a 65°C) e secas a temperatura ambiente, um dia antes do ensaio.

No teste primeiramente a cultura de células RD ficou em contato com o resveratrol em três diferentes diluições, incubadas durante 24 horas. Após esse período, as células foram destacadas e a suspensão celular foi submetida a duas diferentes doses de radiação gama. A suspensão celular assim tratada foi então submetida ao processo de eletroforese em microgel.

4.4.1 Incubação das células RD com resveratrol

Da solução estoque de resveratrol (50 mM) foram feitas três diluições (60 µM, 30 µM e 15 µM) em meio Eagle+L-15 suplementado com 15% SFB. Essas

três concentrações foram definidas a partir do ensaio de citotoxicidade descrito no item “4.2”.

Em cada ensaio foi analisada uma concentração por vez. Para cada concentração de resveratrol, foram utilizadas duas garrafas de cultura celular de 25 $cm^{3,}$ contendo a linhagem celular RD. Os meios de cultura foram desprezados e, em uma garrafa, foi adicionado o meio de cultura contendo uma concentração de resveratrol e, na outra, apenas o meio de cultura celular fresco (garrafa controle) (FIG. 7). As garrafas foram incubadas a 37ºC, em atmosfera úmida, contendo 5% de $CO_{2,}$ por 24 horas, para posterior irradiação e análise de dano e reparo celular, aplicando o teste do cometa.

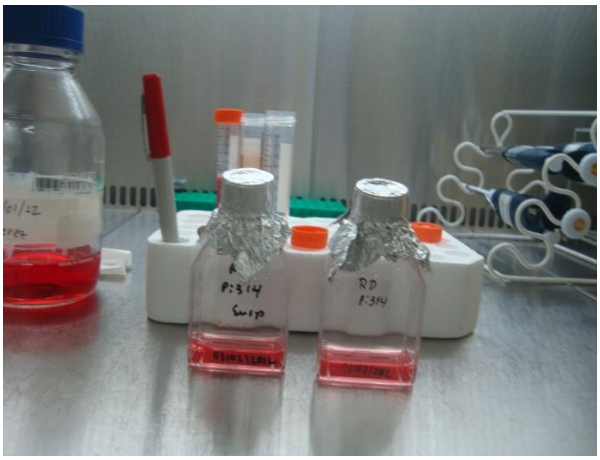

FIGURA 7 – As garrafas de cultura com células RD: uma apenas com meio de cultura Eagle+L-15 e a outra com resvratrol diluído no meio de cultura Eagle+L-15 com 15% de SFB.

A esterilização das soluções foi realizada com um sistema de membranas contendo poros de 0,22 µm de diâmetro (FIG. 8), em ambiente estéril, em fluxo laminar previamente esterilizado com radiação UV por 30 minutos e álcool 70%.

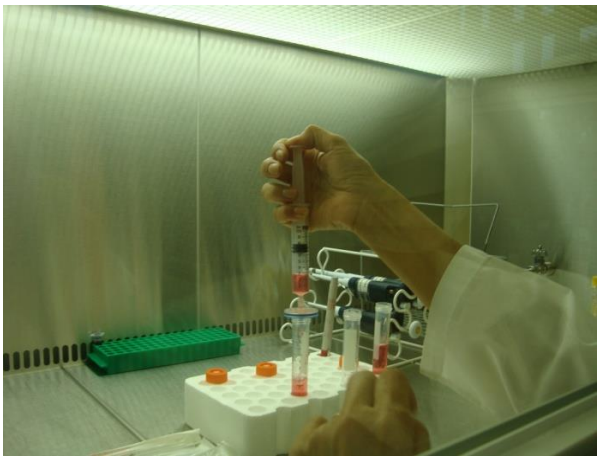

FIGURA 8 – Processo de esterilização das soluções com a membrana de 0,22 µm de diâmetro.

4.4.2 Irradiação das células RD

Após a incubação das células com resveratrol, as garrafas de cultura celular foram submetidas ao processo de tripsinização. A suspensão celular foi centrifugada e as células foram ressuspensas em PBS sem EDTA. A suspensão celular foi acertada para $1x10^6$ céls/mL, e 3 mL dessa solução de PBS, contendo células RD, foram colocadas em tubos de 15 mL. As células nos tubos de 15 mL foram irradiadas em diferentes doses: 100 Gy, 50 Gy e 0 Gy (controle) na fonte de radiação GammaCell (FIG. 9 e 10).

FIGURA 9 – Fonte de ^{60}CO GammaCell 200, localizada no CTR.

Em cada ensaio com concentrações diferentes de resveratrol foi mantida uma amostra não irradiada de cada tubo de 15 mL como controle.

FIGURA 10 – Fonte de ^{60}CO GammaCell 200: local onde se colocam as amostras a serem irradiadas.

4.4.3 Eletroforese em microgel

Para cada concentração de resveratrol foram realizados os ensaios do cometa em três tempos de avaliação (“corridas do cometa”): 0, 24 e 48 horas após irradiação. Mesmo as amostras não irradiadas (0 Gy) foram avaliadas nesses três tempos, sendo utilizadas como controle de viabilidade celular.

Logo após a irradiação, as células foram colocadas no gelo para paralisar toda e qualquer atividade celular (FIG. 11).

FIGURA 11 – Amostras das células RD no gelo após a irradiação, para evitar qualquer tipo de atividade celular.

A primeira corrida de eletroforese foi logo após a irradiação. As amostras para as outras duas corridas (24 horas e 48 horas após a irradiação) foram novamente processadas, plaqueadas e incubadas a 37ºC em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 por 24 horas e 48 horas para ser analisada a capacidade de reparo celular. Decorrido o tempo de reparo, as células foram mais uma vez submetidas ao processo de tripsinização e a suspensão celular foi ajustada e diluída em PBS sem EDTA para a corrida de eletroforese correspondente.

Com as células devidamente processadas em seus respectivos tempos de analise (0 hora, 24 horas e 48 horas após a irradiação), alíquotas de 10 µl desta suspensão celular foram misturadas em 90 µl de agarose “low melting” (dissolvida em tampão PBS livre de Ca e Mg, a 37°C). A mistura foi colocada em lâmina contendo uma camada de agarose normal, previamente preparada, e sobre a mistura foi colocada uma lamínula (FIG. 12). Após a solidificação da agarose (5 minutos a 4ºC), as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em uma solução de lise celular (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de TRIS, 1% de sarcosinato de sódio, 1% de TRITON X-100 e 10% de DMSO) por 2 horas a 4°C para remoção das proteínas (FIG. 13).

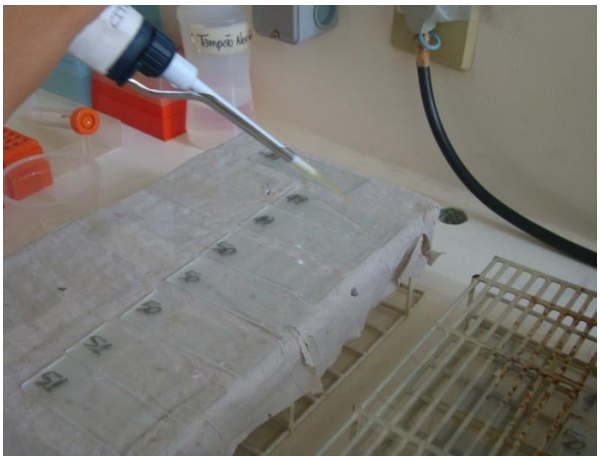

FIGURA 12 – Suspensão celular misturada com agarose “low melting” sendo colocada sobre de uma primeira camada de agarose normal.

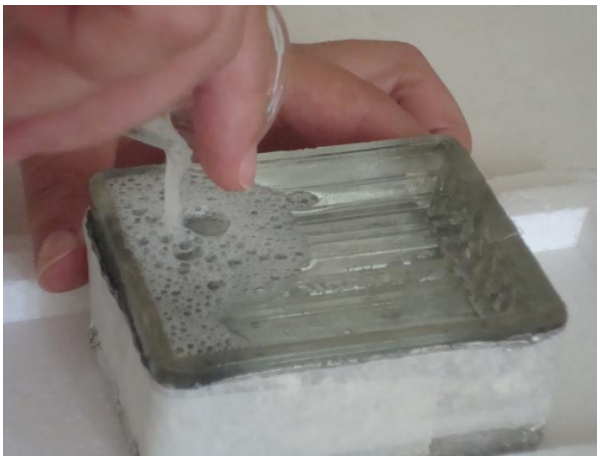

FIGURA 13 – Solução de lise sendo colocada no recipiente contendo as lâminas com células RD, preparadas para eletroforese.

Após a lise das células e extração das proteínas, o que resta nas lâminas são os núcleos das células, chamados de nucleóides. A partir deste momento deve-se tomar todo cuidado, principalmente com a luz, pois os nucleóides são extremamente sensíveis a qualquer tipo de dano, por menor que seja. Por este motivo, passado o momento de lise celular, os procedimentos posteriores do teste do cometa são feitos com a luz do laboratório desligada e a iluminação da janela bloqueada pelas cortinas.

Após este procedimento, as lâminas foram retiradas da solução de lise e colocadas lado a lado em uma cuba de eletroforese horizontal (17 cm x 20 cm)

contendo tampão alcalino de eletroforese (1 mM de EDTA e 300 mM de NaOH, pH 12) por 30 minutos, para que ocorresse a expressão de quebras nas fitas (simples e duplas) e sítios álcali-lábeis do DNA (FIG 14).

FIGURA 14 – Adição do tampão de eletroforese na cuba de eletroforese horizontal.

As amostras, quando colocadas na cuba de eletroforese, são protegidas da radiação UV com papel alumínio (FIG. 15).

FIGURA 15 – Papel alumínio sendo colocado por cima da cuba de eletroforese, para evitar danos aos nucleóides das células RD.

Em seguida as lâminas foram submetidas à corrida de eletroforese (25 V e 300 mA) por 30 minutos a 4°C (FIG. 16). Após a corrida eletroforética, as lâminas foram neutralizadas três vezes durante 5 minutos com tampão TRIS (pH 7,5) e fixadas em etanol 100% por 10 minutos para armazenamento e posterior análise.

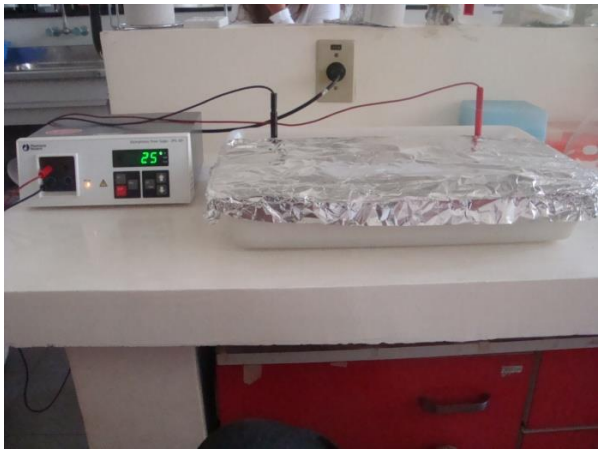

FIGURA 16 – Corrida de eletroforese: 25 V e 300 mA por 30 minutos à 4ºC (gelo em volta da cuba de eletroforese).

A coloração foi feita com 50 µL de corante brometo de etídio (20 µg/mL) para analise no microscópio de fluorescência no aumento de 200 vezes. Cerca de 100 cometas escolhidos aleatoriamente foram analisados em cada lâmina.

Os cometas foram classificados de acordo com o critério estabelecido por Jaloszynski *et al*. (1997) e por Mozdarami *et al.* (2007) em cinco categorias (0 - IV) de acordo com a intensidade do dano ao DNA, no total de 100 cometas por lâmina. Foram classificados como classe 0 (sem migração do DNA) os cometas com uma cabeça brilhante e sem cauda, os cometas com uma pequena cabeça e cauda longa e/ou difusa, como classe IV (DNA extremamente danificado) e os cometas com aspectos intermediários foram classificados como classes I, II e III.

A estimativa quantitativa do dano ao DNA foi determinada pela equação **(1)**, descrita por Jaloszynski *et a*l. (1997), variando de 0 a 400 unidades arbitrárias:

$$DD = (n1 + 2\ n2 + 3\ n3 + 4\ n4) / (\Sigma / 100) \qquad (1)$$

Onde:

DD = dano ao DNA em unidade arbitrária
n1 – n4 = número de cometas das classes I – IV
Σ = número total de cometas analisados, incluindo os de classe 0

Os valores de DD podem abranger diversas situações, desde todas as células sem dano (classe 0) até todas as células extremamente danificadas (classe IV).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação *in vitro* do índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$) do resveratrol

O ensaio biológico para determinação da citotoxicidade ($IC_{50\%}$) do resveratrol em cultura de células tumorais RD foi realizado para determinar as concentrações a serem analisadas no trabalho, aplicando o teste do cometa.

Nesse ensaio, com os valores de DO obtidos, foram calculadas as porcentagens de viabilidade celular em relação ao controle de células consideradas 100%, e apresentado na TAB.1.

TABELA 1 - Valores de viabilidade celular (%) obtidas no ensaio de citotoxicidade do resveratrol

Concentração Extrato (%)	Controle negativo	Controle positivo	Resveratrol
100	124±5	14±0	13±5
50	121±8	15±1	53±8
25	115±5	72±14	70±7
12,50	115±4	73±3	80±6
6,25	106±3	70±3	113±4

Lançando no gráfico a porcentagem de viabilidade celular em função da concentração do extrato, teremos as curvas de viabilidade celular do controle negativo, controle positivo e das soluções em diferentes concentrações do resveratrol, apresentadas na FIG. 17.

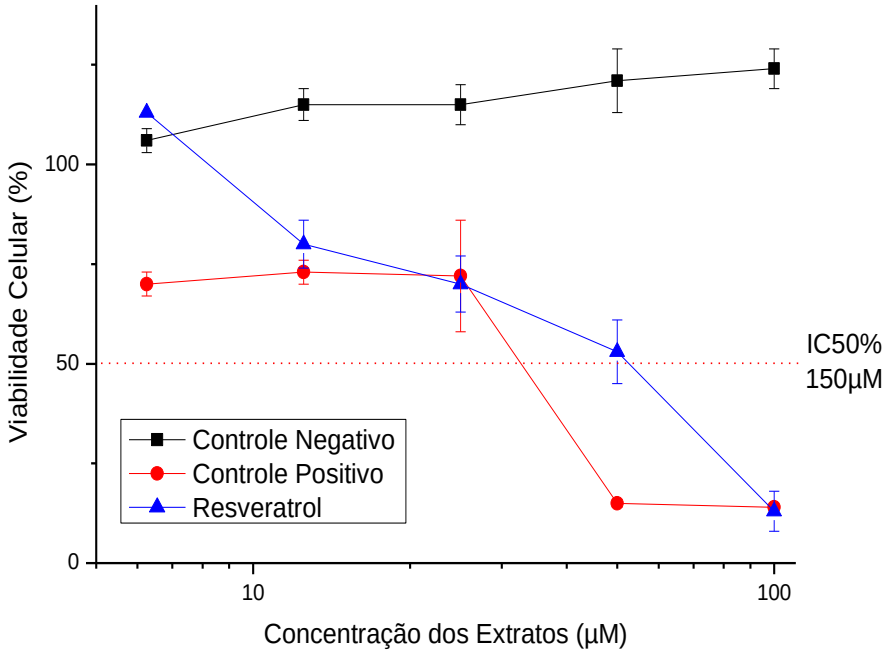

FIGURA 17 – Curva de viabilidade celular do resveratrol obtida no ensaio *in vitro* de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.

A análise gráfica da citotoxicidade dos compostos é verificada a partir da posição das curvas de viabilidade celular. As curvas que se encontram acima da linha 50% de viabilidade celular são consideradas não citotóxicas, como a curva do controle negativo. As curvas que se encontrarem abaixo ou cruzarem a linha de 50% de viabilidade celular são consideradas citotóxicas. O $IC_{50\%}$ é obtido na intersecção da curva de viabilidade celular com a linha de 50% de viabilidade celular. O índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$) indica qual a concentração de um composto que reduz em 50% a população celular.

O gráfico ajustado pelo modelo sigmoidal/curva dose-resposta do índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$) do resveratrol nas células tumorais de rabdomiossarcoma humano está representado na FIG. 18.

$$Y = 100 / (1+10^{((\log IC50 - x)*\text{hill slope})}) \qquad (2)$$

A equação **(2)** é o algoritmo de cálculo utilizado para determinação dos valores de IC50 para as concentrações de resveratrol analisadas. Onde:

Y= viabilidade celular

X= concentrações de resveratrol

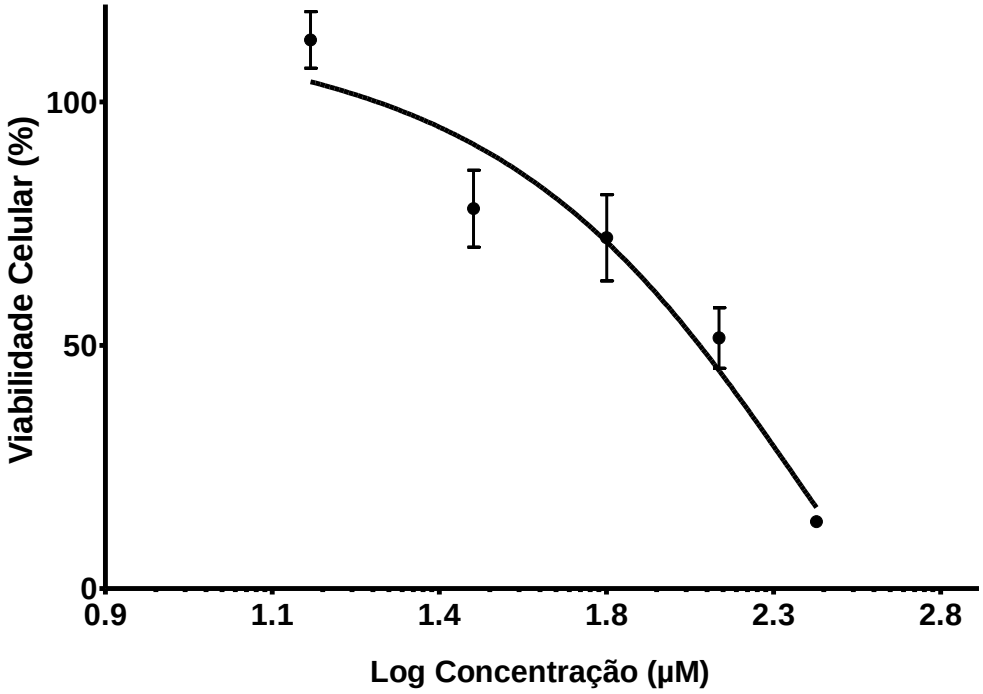

FIGURA 18 – Curva dose-resposta de viabilidade celular do resveratrol ajustada (R^2=0,909).

Para a linhagem tumoral de rabdomiossarcoma humano foi obtido o $IC_{50\%}$ do resveratrol em 150µM.

Em um estudo com a mesma linhagem celular utilizada no trabalho (RD), Chow *et al*. (2005) obteviram $IC_{50\%}$ de 48µM. A diferença dos resultados deve-se à diferença na densidade celular dos dois trabalhos. Apesar do número de células utilizadas em ambos os trabalhos ser o mesmo ($5x10^4$ céls/poço), a densidade celular foi maior neste trabalho, pois utilizamos uma microplaca de 96 poços, enquanto Chow *et al*. (2005) usaram microplacas de 24 poços.

Além disso, no trabalho de Chow *et al*. (2005), o tratamento com resveratrol foi feito durante 7 dias, sendo que durante esse período, o meio de cultura contendo resveratrol foi trocado a cada 3 dias. Já, neste trabalho, a incubação com resveratrol durou 24 horas.

Em trabalhos anteriores, o $IC_{50\%}$ do resveratrol obtido em células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano (NCI-H292) foi de 192µM (Magalhães *et al*., 2011), e Moreno *et al* obteveram $IC_{50\%}$ de 50µM em cultura de células normais de tecido conectivo de camundongos, NCTC clone 9, utilizando a mesma técnica de incorporação do corante vermelho neutro.

5.2 Determinação *in vitro* da dose letal 50% (DL_{50}) de radiação gama

O ensaio biológico de determinação da dose letal 50% de radiação gama nas células RD foi realizado para definir os níveis de doses de radiação a serem utilizadas no teste do cometa.

Com a média de DO de cada microplaca foi calculada a porcentagem de viabilidade celular para cada dose de radiação em relação à microplaca controle, e os dados estão apresentados na TAB. 2. O controle de células consiste em uma microplaca, que não foi submetida à radiação gama, representando então 100% de viabilidade celular.

TABELA 2 - Valores de viabilidade celular (%) obtidas no ensaio de DL_{50} da radiação gama em células RD

DOSE (Gy)	VIABILIDADE CELULAR (%)
0	100±9
250	74±6
500	42±8
750	11±2
1000	10±1

A DL_{50} é a dose de radiação gama que provoca 50% de morte celular no ensaio. Para estimar a DL_{50}, foram projetados, no gráfico apresentado na FIG. 19,

os valores das porcentagens de viabilidade celular em função das doses de radiação gama. É possível observar que quanto maior a dose de radiação gama a que as células foram submetidas, menor é a viabilidade celular.

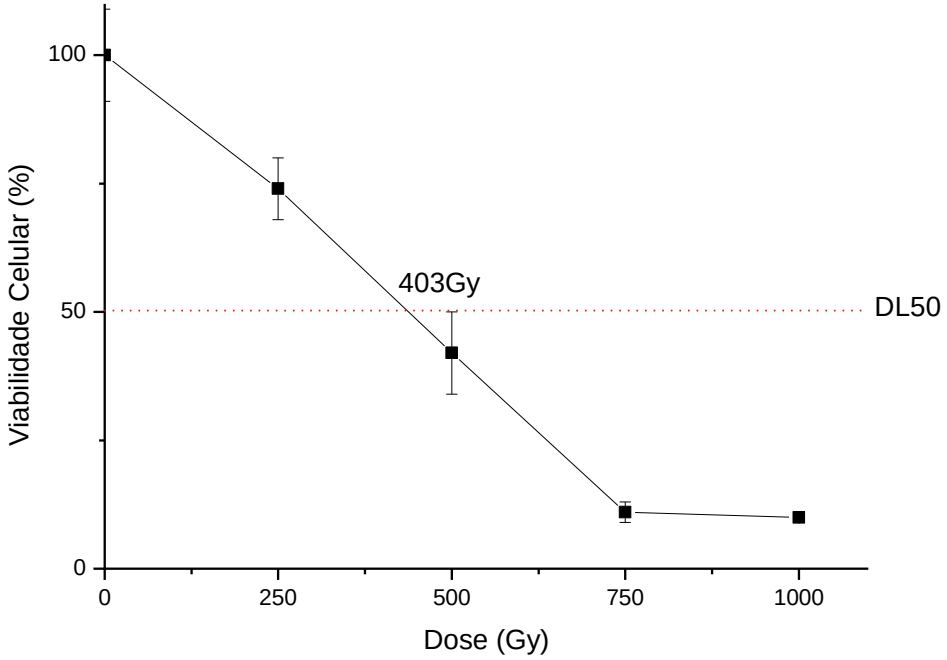

FIGURA 19 - Curva de viabilidade celular obtida no ensaio da DL_{50} da radiação gama em cultura de células tumorais RD.

A dose de radiação gama que representa a DL_{50} nas células tumorais RD é obtida graficamente na intersecção da curva de viabilidade celular com a linha de 50% de viabilidade. O gráfico, ajustado pelo modelo sigmoidal/curva dose-resposta da dose letal 50% (DL_{50}) e radiação gama nas células tumorais de rabdomiossarcoma humano, está representado na FIG. 20.

$$Y = 100 / (1+10^{((\log DL50 - x)*hill\ slope)}) \quad (3)$$

A equação **(3)** é o algoritmo de cálculo utilizado para determinação do valor de DL_{50} para as doses de radiação gama analisadas. Onde:

Y= viabilidade celular
X= doses de radiação gama

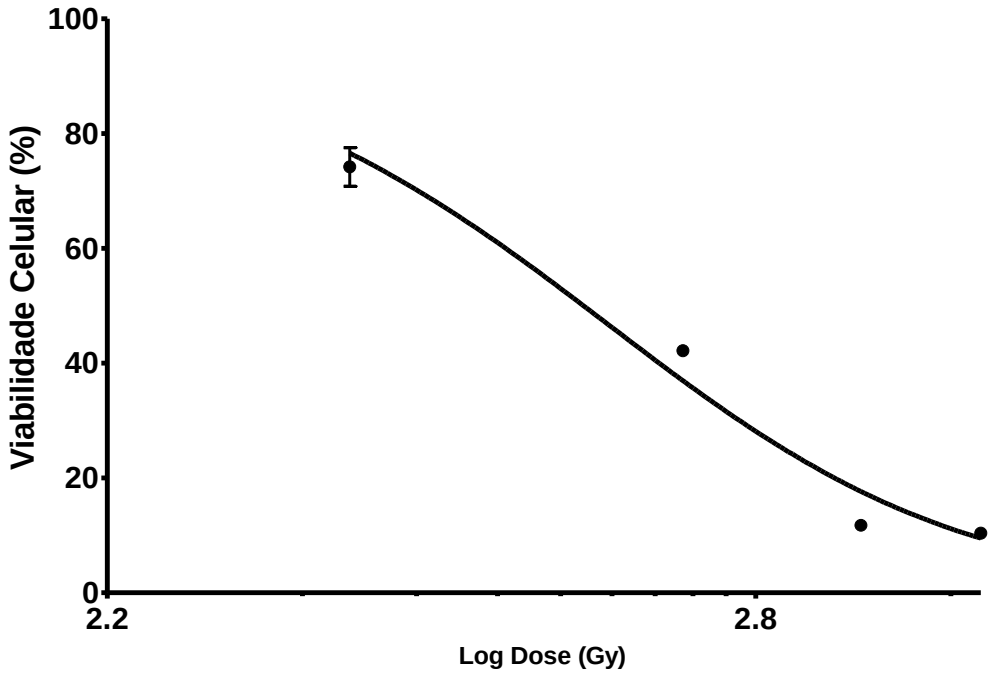

FIGURA 20 – Curva dose-resposta da DL_{50} de radiação gama ajustada (R^2=0,975).

Neste trabalho foi obtida a DL_{50} de radiação gama para a linhagem tumoral RD o valor DL_{50}/24hr de 403 Gy. Não foi encontrado na literatura dado de DL_{50} da radiação gama para essa linhagem celular. Moreno *et al*. obteveram a DL_{50} da

radiação gama em células normais de tecido conectivo de camundongos, NCTC, o valor de 304 Gy.

Segundo Murad & Katz (1996), os rabdomiossarcomas necessitam na radioterapia de altas doses para morte celular, por serem radiorresistentes. Porém, a primeira linhagem tumoral utilizada neste trabalho foram as células NCI-H292 e, por serem extremamente radioressistentes, não foi obtido valor de DL_{50}, pois, mesmo na dose máxima de radiação gama (1000 Gy) utilizada no ensaio, as células NCI-H292 ainda apresentavam 77% de viabilidade (Magalhães *et al*., 2011) e, por esse motivo, foi substituída a linhagem tumoral NCI-H292 para a linhagem tumoral RD, que mesmo sendo resistente mostrou resultados adequados para alcançar os objetivos deste trabalho.

A TAB. 3 compara os valores de viabilidade celular (%) em relação às doses de radiação gama obtidas nos ensaios de DL_{50}.

TABELA 3 – Valores de viabilidade celular (%) das linhagens tumorais RD e NCI-H292 submetidas a diferentes doses de radiação gama

	Viabilidade celular (%)	
DOSE (Gy)	RD	NCI-H292
0	100±9	100±5
250	74±6	97±4
500	42±8	100±4
750	11±2	103±7
1000	10±1	77±9

O gráfico apresentado na FIG. 21 mostra a diferença entre os resultados obtidos no ensaio de DL_{50} nas duas linhagens tumorais, evidenciando a alta resistência à radiação gama da linhagem tumoral NCI-H292, que teria sua DL_{50} acima de 1 kGy.

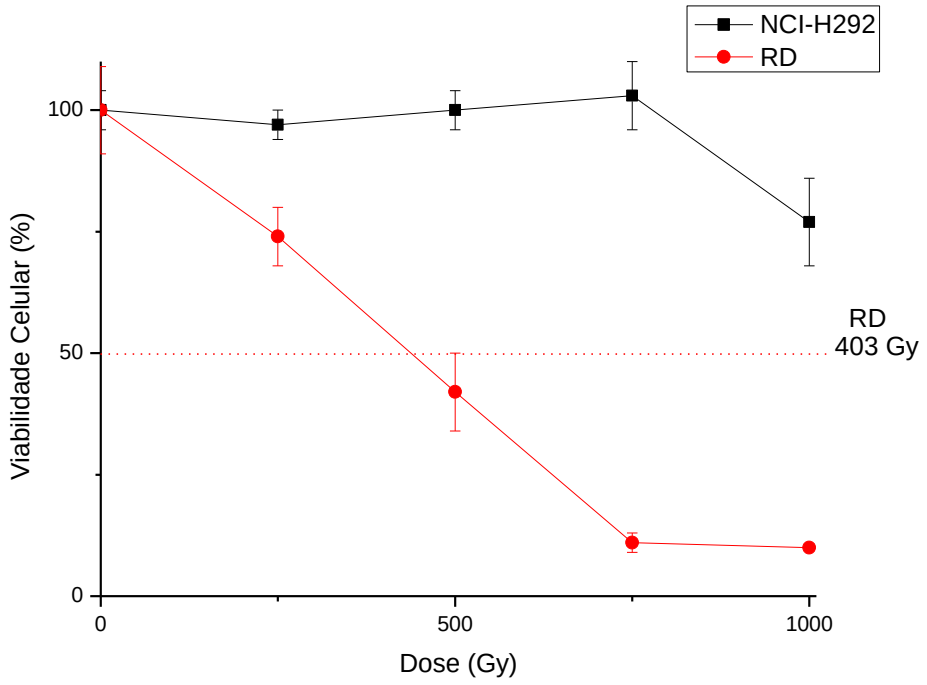

FIGURA 21 – Comparação das curvas de viabilidade celular das linhagens tumorais RD e NCI-H292.

5.3 Teste do cometa (eletroforese de microgel)

O teste do cometa foi realizado para determinação *in vitro* dos efeitos radiomodificadores do resveratrol. Nesse teste pode ser analisado tanto o dano produzido pela ação da radiação gama nas células tumorais como o reparo celular, na presença ou não do resveratrol. Para análise do dano ao material genético (DD), foram realizadas “corridas” de cometa (eletroforese em microgel) logo após a irradiação das células. Já para análise do reparo celular, foram realizadas “corridas” de cometa 24 e 48 horas após a irradiação.

A partir dos resultados dos ensaios de determinação de DL_{50} de radiação gama e $IC_{50\%}$ do resveratrol na linhagem celular em estudo, foram utilizadas duas doses de radiação (50 Gy e 100 Gy) e três diferentes concentrações de resveratrol (15 µM, 30 µM e 60 µM) para estudar *in vitro*, em cultura de células RD, os efeitos radiomodificadores desse composto. Os resultados foram analisados em relação ao controle denominado “NT” (não tratadas com resveratrol).

A concentração de 15 µM é considerada na literatura como uma concentração que exerce *in vitro* um efeito protetor (Das *et al.*, 2006; Kaga *et al.*, 2005; Penumathsa & Maulik, 2009*;* Stocco, 2012; Xi *et al.*, 2009), e, segundo Jang *et al*.(1997), concentrações de resveratrol acima de 15 µM induzem apoptose em células tumorais. A terceira concentração foi escolhida abaixo do nível de citotoxicidade do resveratrol ($IC_{50\%}$) nessa linhagem celular. Porém, de acordo com a literatura, 60 µM está dentro da faixa de concentração de resveratrol conhecido como inibidor da atividade metabólica e proliferativa das células (Caddeo *et al.*, 2008; Chow *et al.*, 2005; Hope *et al.*, 2008; Stocco, 2012).

A segunda concentração (30 µM) foi escolhida como intermediária entre as concentrações que induzem efeitos radioprotetores (15 µM) e radiossensibilizadores (60 µM).

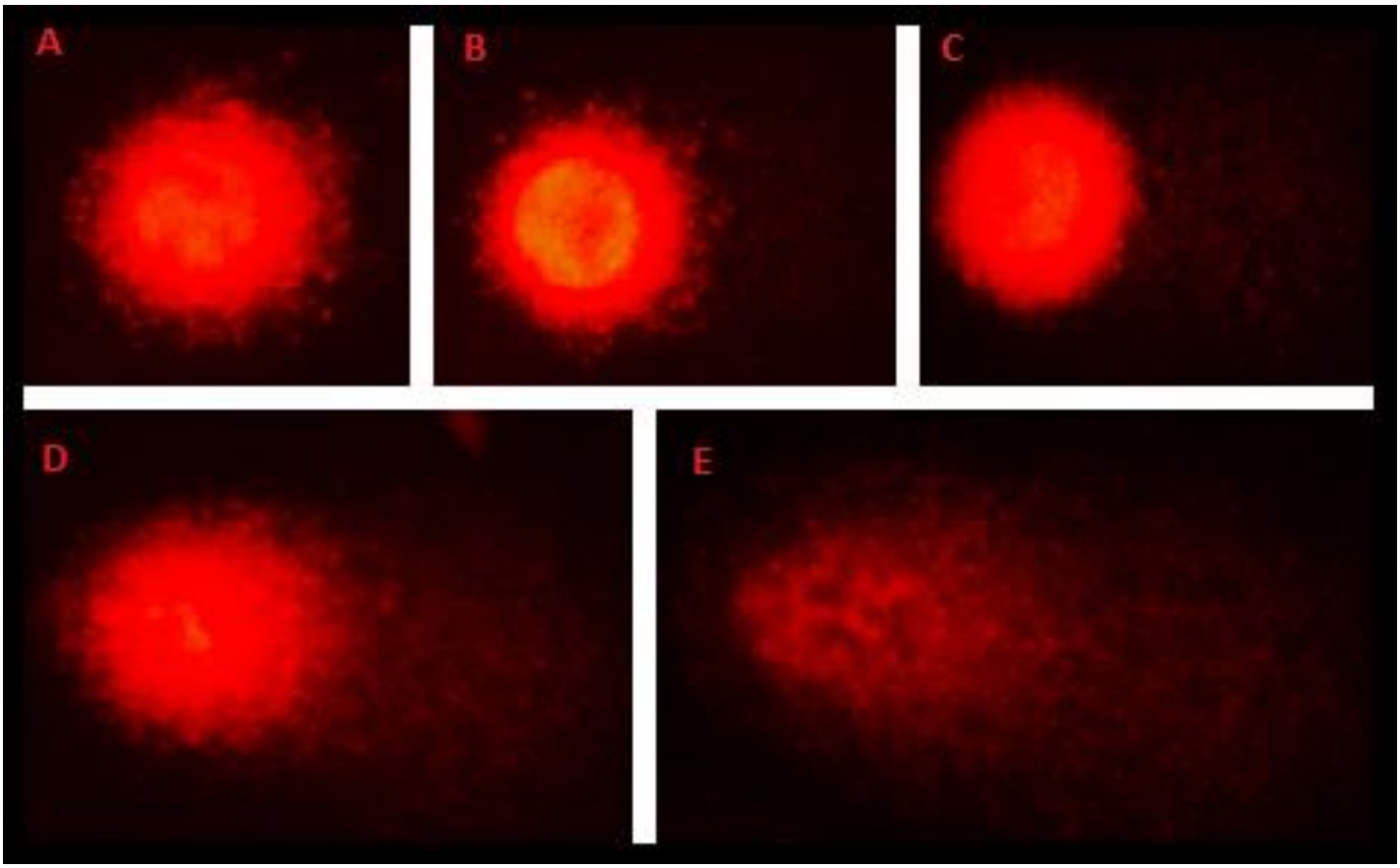

FIGURA 22 – Micrografia células RD, classificação visual dos cometas: (A) cometa classe 0; (B) cometa classe I; (C) cometa classe II; (D) cometa classe III e (E) cometa classe IV.

Os resultados obtidos na contagem e classificação visual dos cometas (TAB. 4, 5 e 6) foram aplicados na equação **(1)**, previamente descrita no item “4.4.3”, para o cálculo do dano ao DNA (DD), e esses resultados foram analisados no programa “GraphPad Prism 5”. Sendo n=9 para amostras incubadas com resveratrol; n=27 para amostras dos controles, onde:

n = número de réplicas dos ensaios

TABELA 4 – Distribuição do dano ao DNA pela classificação visual (classes 0, I, II, III e IV) das células tumorais RD não irradiadas (0 Gy) e analisadas em 0, 24 e 48 h

Tempo	0h				24h				48h			
Classificação Tipo Dano	Concentração Resveratrol (µM)											
	0	**15**	**30**	**60**	**0**	**15**	**30**	**60**	**0**	**15**	**30**	**60**
0	1.913	724	733	523	1.973	782	732	527	2.028	797	787	556
I	679	113	165	199	640	118	169	271	649	103	116	265
II	93	0	2	134	91	0	0	85	32	0	2	89
III	21	0	0	57	0	0	0	22	0	0	0	0
IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABELA 5 – Distribuição do dano ao DNA pela classificação visual (classes 0, I, II, III e IV) das células tumorais RD irradiadas com 50 Gy e analisadas em 0h, 24h e 48h

Tempo	0h				24h				48h			
Classificação Tipo Dano	Concentração Resveratrol (µM)											
	0	**15**	**30**	**60**	**0**	**15**	**30**	**60**	**0**	**15**	**30**	**60**
0	0	3	0	0	31	35	24	0	227	138	102	36
I	155	85	84	52	276	145	153	43	486	245	150	120
II	611	234	239	228	843	303	283	261	526	162	205	188
III	976	302	325	282	818	206	259	290	691	194	253	252
IV	979	284	255	344	737	221	185	322	781	179	215	310

TABELA 6 – Distribuição do dano ao DNA pela classificação visual (classes 0, I, II, III e IV) das células tumorais RD irradiadas a 100 Gy e analisadas em 0h, 24h e 48 h

Tempo	0h				24h				48h			
Classificação Tipo Dano	Concentração Resveratrol (µM)											
	0	**15**	**30**	**60**	**0**	**15**	**30**	**60**	**0**	**15**	**30**	**60**
0	0	0	0	0	4	0	13	0	50	71	35	9
I	8	0	12	20	54	81	55	0	271	162	138	71
II	456	164	246	170	560	297	294	143	573	196	191	178
III	806	325	239	246	886	244	269	306	765	194	224	222
IV	1.444	413	403	464	1.206	288	269	455	1.051	277	320	417

A TAB. 7 apresenta os valores de dano ao DNA (DD) das células RD não irradiadas, obtidos nos tempos de avaliação: 0, 24 e 48 h, em diferentes concentrações de resveratrol, correspondendo aos controles das amostras irradiadas.

TABELA 7 – Valores de DD das células RD não irradiadas (0 Gy), obtidos em 0, 24 e 48 h como controle das células irradiadas, em diferentes concentrações de resveratrol

Concentração de Resveratrol	DD (ua)	DD (ua)	DD (ua)
	Tempo de avaliação		
	0 h	24 h	48 h
0 µM	35±11	30±12	26±7
15 µM	20±2	13±6	11±5
30 µM	19±5	19±7	13±4
60 µM	45±33	56±29	48±30

A FIG. 23 apresenta o gráfico com os valores de DD das células RD que foram incubadas por 24 horas com resveratrol e não foram submetidas à radiação gama.

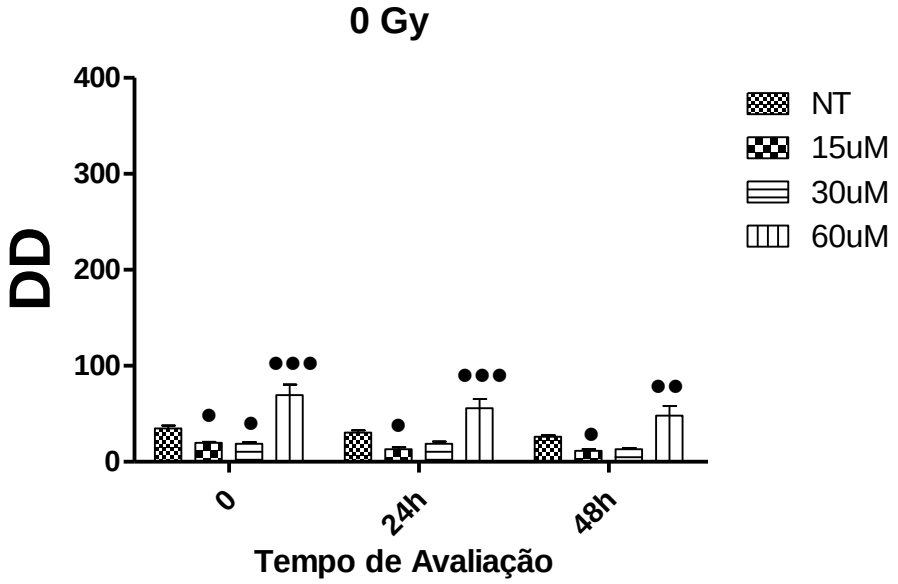

FIGURA 23 - Ensaio do cometa (controle): dano ao DNA das células RD após 24 horas de incubação com resveratrol em diferentes concentrações e não irradiadas: • P <0,05; •• P <0,01; ••• P < 0,001.

Observa-se que o resveratrol, na concentração de 60 µM, induz um aumento estatiscamente significativo na quantidade de dano no DNA (DD), levando a um aumento do DD celular mesmo sem a ação da radiação gama, evidenciando a citotoxicidade intrínseca do resveratrol. As outras duas concentrações (15 µM e 30 µM) diminuem significantemente o índice de dano ao DNA, evidenciando o efeito protetor exercido pelo resveratrol nas células.

Em 24 e 48 horas notam-se o reparo em todas as concentrações e também no controle de células RD, mostrando a capacidade de reparo das mesmas. Sendo que na concentração de 60 µM, comparando com o controle e com as demais concentrações, o reparo celular não foi significativo.

A TAB. 8 apresenta os valores de dano ao DNA (DD) das células RD irradiadas a 50 Gy de radiação gama, obtidos 0, 24 e 48 horas após a irradiação, em diferentes concentrações de resveratrol.

TABELA 8 – Valores de DD das células RD irradiadas com 50 Gy, obtidos 0, 24 e 48 horas após a irradiação das células, em diferentes concentrações de resveratrol

Concentração de Resveratrol	DD (ua)	DD (ua)	DD (ua)
	Tempo de avaliação		
	0 h	24 h	48 h
0 µM	302±19	272±17	248±40
15 µM	286±32	253±28	204±63
30 µM	283±16	247±20	236±15
60 µM	301±21	299±17	274±23

Na FIG. 24, as células RD irradiadas na dose de 50 Gy, na presença de concentrações diferentes de resveratrol, no ensaio do cometa, mostraram que a concentração de 15 µM reduziu significativamente os danos no DNA em 48 horas após a irradiação das células, evidenciando seu poder radioprotetor. As demais concentrações de resveratrol não tiveram efeitos estatisticamente relevantes pelo método estatístico utilizado.

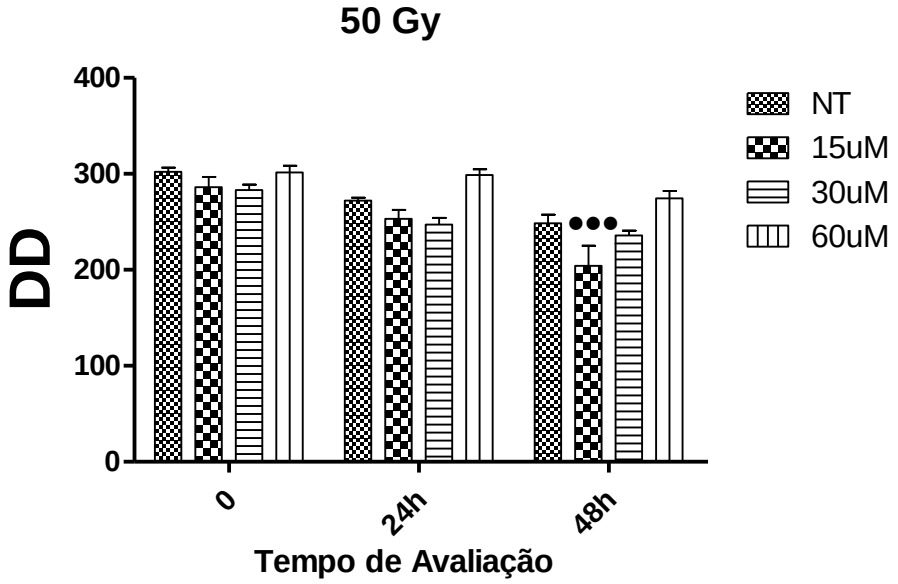

FIGURA 24 - Ensaio do cometa: dano ao DNA das células RD após contato com resveratrol em diferentes concentrações e irradiadas na dose de 50 Gy: ••• P < 0,001.

A TAB. 9 apresenta os valores de dano ao DNA (DD) das células RD irradiadas com 100 Gy de radiação gama, obtidos 0, 24 e 48 horas após a irradiação, em diferentes concentrações de resveratrol.

TABELA 9 – Valores de DD das células RD irradiadas com 100 Gy, obtidos 0, 24 e 48 horas após a irradiação das células, em diferetes concentrações de resveratrol

Concentração de Resveratrol	DD (ua)	DD (ua)	DD (ua)
	Tempo de avaliação		
	0 h	24 h	48 h
0 µM	336±17	319±14	292±18
15 µM	328±17	281±13	249±29
30 µM	315±13	281±19	269±18
60 µM	329±33	334±8	308±8

Na FIG. 25 está apresentado o gráfico do ensaio do cometa utilizando a dose de 100 Gy de radiação gama. Observa-se uma pequena diminuição do dano

induzido ao DNA das células na presença de resveratrol, na concentração de 30 µM, no tempo 0 hora. Em 24 horas após a irradiação, observa-se uma diminuição bastante significativa do dano induzido ao DNA nas concentrações de resveratrol de 15 µM e 30 µM, provavelmente devido ao processo de reparo atenuando o seu efeito radioprotetor. Esse processo continuou 48 horas após a irradiação, principalmente na concentração de 15 µM.

Na concentração de 60 µM, não houve resultado estatisticamente significante, porém, visualmente nota-se um aumento do DD em 24 horas e um retardo no reparo celular em 24 e 48 horas, isso pode ocorrer pelo fato do resveratrol em 60 µM impedir o reparo das células.

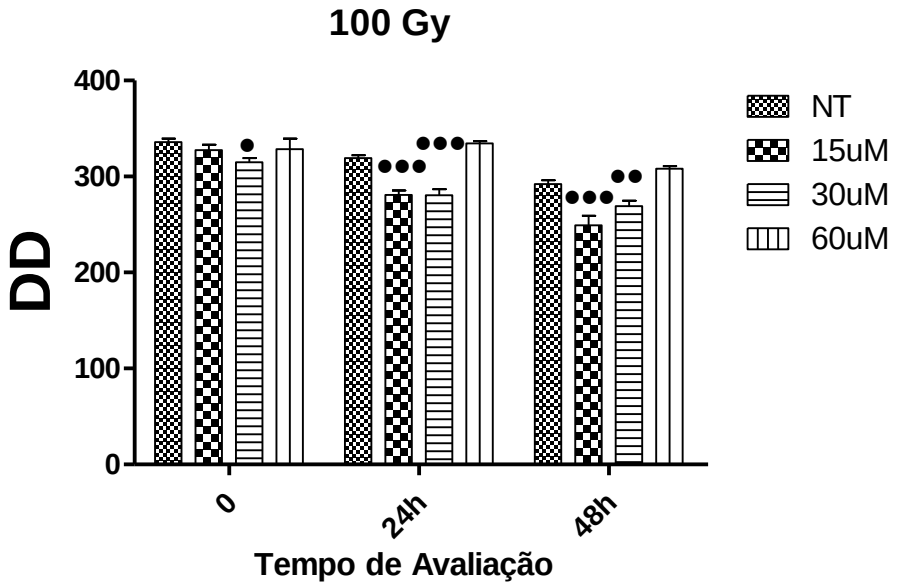

FIGURA 25 - Ensaio do cometa: dano ao DNA das células RD após contato com resveratrol em diferentes concentrações e irradiadas na dose de 100 Gy: • P < 0,05; •• P < 0,01; ••• P < 0,001.

Analisando os dados obtidos, verifica-se um efeito radioprotetor do resveratrol nas concentrações de 15 µM e 30 µM, sendo estatisticamente significativo na concentração de 15 µM, em conformidade com a literatura (Das *et al.*, 2006; Kaga *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2012; Penumathsa & Maulik, 2009; Stocco, 2012; Xi *et al.*, 2009). O resveratrol na concentração de 60 µM apresentou um efeito citotóxico nas células tumorais e parece exercer um efeito

radiosensibilizador, porém sem significância estatística. Ferry-Dumazet *et al*. (2002) mostram que altas concentrações de resveratrol (60 µM) podem inibir o crescimento celular e induzir apoptoses, tanto em células normais quanto em células tumorais. Segundo Chow *et al.* (2005), a partir de 50 µM de resveratrol, a proliferação das células RD foi diminuida em cerca de 50%. No trabalho de Chow *et al.* (2005) também foram avaliadas concentrações de 70 e 100 µM e a diminuição da proliferação das células RD aumentou conforme o aumento da concentração de resveratrol.

Os resultados deste trabalho reafirmam que o resveratrol atua como um composto radiomodificador; atuando nas células da linhagem tumoral RD como um radioprotetor celular, em baixas concentrações de resveratrol; e como um radiossensibilizador celular, em altas concentrações de resveratrol (Chow *et al.*, 2005; Mukherjee *et al*., 2010).

6. CONCLUSÕES

O índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$) do resveratrol obtido nesse trabalho foi de 150 µM, ou seja, esta é a concentração necessária para o resveratrol reduzir em 50% a população das células tumorais RD.

A dose letal 50% (DL_{50}) de radiação gama necessária para reduzir em 50% a população de células tumorais RD foi determinada em 403 Gy.

Pode-se concluir que conforme aumenta o tempo de avaliação, diminui a fragmentação ao DNA, comprovando o reparo exercido pelas células RD e que o teste do cometa pode avaliar tanto o dano quanto o reparo exercido pelas células.

O resveratrol na concentração de 15 µM mostrou claramente o efeito protetor e radioprotetor celular. A concentração de 30 µM também mostra seu efeito protetor e radioprotetor celular, porém não tão significante quanto a concentração de 15 µM.

O resveratrol na concentração de 60 µM mostrou um efeito citotóxico na cultura celular, aumentando significativamente o dano no DNA (DD) das células RD. O seu efeito radiossensibilizador não teve significância estatística, porém, visualmente nota-se um aumento no DD nas células RD, com a incidência de radiação ionizante. Nessa concentração de resveratrol também ficou pode ser notada certa dificuldade das células em realizar o reparo, principalmente quando submetidas a dose de 100 Gy de radiação gama.

Foram evidenciados os efeitos do resveratrol como protetor celular na concentração de 15 µM e efeito sensibilizador em 60 µM. Convertendo esses valores de concentrações teremos 3,4 mg/L e 13,7 mg/L respectivamente. Em média em um vinho tinto é encontrado 7 mg/L de resveratrol, portanto para obtermos um efeito protetor celular devemos consumir diariamente cerca de 2 taças de vinho (490 mL) e a quantidade que pode produzir efeito citotóxico equivale a cerca de 2 L de vinho tinto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A BÍBLIA SAGRADA O Novo e o Velho Testamento. Traduzida em português por João Ferreira de Almeida. 29ª ed. Imprensa Bíblica Brasileira. Rio de Janeiro, 1974.

BAUR, J. A. & SINCLAIR, D.A. Therapeutic pontential of resveratrol: the *in vivo* evidence. **Nat. Rev. Drug Disc**. v.5, p.493-495, 2006.

BRENEMAN, J.; MEZA, J.; DONALDSON, S.S.; RANEY, R.B.; WOLDEN, S.; MICHALSKI, J.; LAURIE, F.; RODEBERG, D.A.; MEYER, W.; WALTERHOUSE, D.; HAWKINS, D.S. Local control with reduced-dose radiotherapy for low-risk rhabdomyosarcoma: A report from the children´s oncology group D9602 study. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys**. 2012.

CADDEO, C.; TESKAC, K.; SINICO, C.; KRISTL, J. Effect of resveratrolincorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. **Int. J. Pharm.**, v. 363, p. 183-191, 2008.

CHOW, A.W.; MURILLO, G.; YU, C.; BREEMEN, R. B VAN; BODDIE, A.W.; PEZZUTO, J.M.; GUPTA, T. K. DAS; MEHTA, R.G. Resveratrol inhibits rhabdomyosarcoma cell proliferation. **European Journal of Cancer Prevention**, v.14, p. 351-356, 2005.

DAS, D.K. & MAULIK, N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promiseof alternative medicine. **Mol. Interv.**, v. 6, p. 36-47, 2006.

DAVID, A.R. & ZIMMERMAN, M.R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? **Nat. Rev. Cancer**, v. 10, p. 728-733, 2010.

DOWD, S.B.; TILSON, E.R. **Practical radiation protection and applied radiobiology**. 2 ed. Philadelphia, P.A. Saunders Company, 1999.

DUNN, B. Solving an age-old problem. **Nature**, v. 483, S2-6, 2012.

FERRY-DUMAZET, H.; GARNIER, O.; MAMANI-MATSUDA, M.; VERCAUTEREN, J.; BELLOC, F.; BILLIARD, C.; DUPOUY, M.; THIOLAT, D.; KOLB, J.P.; MARIT, G.; REIFFERS, J.; MOSSALAYI, M. D. Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells. **Carcinogenes.**, v. 23, p. 1327-1333, 2002.

FRANKEL, E.N.; WATERHOUSE, A.L.; KINSELLA, J.E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **Lancet**. v. 341, p. 1103-1104, 1993.

FRÉMONT, L. Minireview: Biological effects of resveratrol. **Life Sci**., v. 66, p. 663-673, 2000.

GARRETT, M.A. Cell cycle control and cancer. **Cur. Sci.**, v. 81, p.515-522, 2001.

GETOFF, N. Radiation-induced degradation of water pollutants-state of the art. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 47, p. 581-593, 1996.

GIGLIA, R.C.; BINNS, C.W.; ALFONSO, H.S.; SCOTT, J.A.; ODDY, W.H. The effect of alcohol intake on breastfeeding duration in Australian women. **Acta. Paediatr**., v. 97, p. 624-629, 2008.

GOLDBERG, D.M.; HAHN, S.E.; PARKES, J.G. Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. **Clin. Chim. Acta**, v. 237, p. 155-187, 1995a.

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 its concentration in commercial wines. **J. Agric. Food Chem.**, v.43, p.1245-1250, 1995b.

GORINSTEIN, S. Comments on “potential explanation for the French paradox”. **Nut. Resv**., v. 19, p. 1599-1602, 1999.

HARTWEEL, L.H. & WEINERT, T.A. Checkpoints – Controls that ensure the order of cell-cycle events. **Scien**., v. 246, p. 629-634, 1999.

HOMERE. **Hymnes**. Texte Établhgi et Traduit: Jean Humbert. d´Edition “Les Belles Letters”. Paris, 1976.

HOPE, C.; PLANUTIS, K.; PLANUTIENE, M.; MOYER, M.P.; JOHAL, K. S.; WOO, J.; SANTOSO, C.; HANSON, J.A.; HOLCOMBE, R.F. Low concentration of resveratrol inhibit Wnt signal throughput in colon-derived cells: implications for colon cancer prevention. **Mol. Nutr. Food Res.**, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA/PRO-ONCO) - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, Brasil, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO document 10993-5). **Biological evaluation of medical devices, Part. 5, Tests for cytotoxicity: in vitro method**, 2009.

JALOSZYNSKI, P.; KUJAWSKI, M.; CZUB-SWIERCZEK, M.; MARKOWSKA, J. & SZYFTER, K. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studies by comet assay. **Mutant. Research**, v. 385, n.3, p.223-33, 1997.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G.O.; SLOWING, K.V.; THOMAS, C.F.; BEECHER, C.W.;FONG, H.H.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN A.D.; MEHTA, R.G.;

MOON, R.C. & PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Scie.,** v. 275, p. 218-220, 1997.

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. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, p. 1113-1118, 2004.

JEANDET, P.; DOUILLET-BREUIL, A.C.; BESSIS, R.; DEBORD, S.; SBAGHI, M.; ADRIAN, M. Phytoalexin from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 2731-2741, 2002.

JOHNSON, H. **Vintage: the story of wine.** Simon and Schuster, 1989.

KAGA, S.; ZHAN, L.; MATSUMOTO, M.; MAULIK, N. Resveratrol enhances neovascularization in the infarcted rat myocardium through the induction of thioredoxin-1, heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 39, p. 813-822, 2005.

KINSELLA,J.E.; FRANKEL,E.; GERMAN, B.; KANNER, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. **Food Techn.**, p.85-89, 1993.

KONDO, S. Mutation and cancer inrelation to the atomic-bomb radiation effects. **Japanese Journal Cancer Research**, v. 79, n. 7, p. 785, 1988.

LAMUELA-RAVENTOS, R.M.; DE LA TORRE-BORONAT, M.C. Beneficial effects of white wines. **Drugs Exp. Clin. Res**., v.25, p. 121-124, 1999.

LANGCAKE, P.; CORNFORD, C.A.; PRYCE, R.J. Identification of pterostilbene as a phytoalexin of Vitis vinifera leaves. **Phytochem**., v.18, p. 1025-1028, 1979.

LAROUSSE do vinho. Consultoria Charlotte Marc e Ricardo Castilho. São Paulo: Larousse do Brasil, 2004. p. 18-20 (enciclopédia).

LEAONARD, 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. **Biochem. Biophys. Res. Commun**., v. 309, p. 1017-1026, 2003.

LEDERMAN, M. The early history of radiotherapy – 1895-1939. **Int. Jour. Rad. Onc. Biol. Phys.**, v.7, p. 639-648, 1981.

MAGALHÃES, V.D.; ROGERO, S.O.; CRUZ, A.S.; ROGERO, J.R. Determination of gamma radiation lethal dose (LD_{50}) and resveratrol cytotoxicity level in tumor cells line. 2011 **International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2011**, Belo Horizonte, MG. p. 24-28, 2011.

METTLER JUNIOR, F.A.; UPTON, A.C. **Medical effects of ionizing radiation**. 2 ed. Philadelphia, P.A.: Saunders Company, 1995.

MEYER, A.S.; OCK-SOOK, Y.I.; PEARSON, D.A.; WATERHOUSE, A.L.; FRANKEL, E.N. Inhibiton of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). **J. Agric. Food Chem.,** v. 45, p. 638-1643, 1997.

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, n.1, p.28-33, 2012.

MOZDARANI, H.; NASIRIAN, B. & HAERI, S.A. *In vivo* gamma-rays induced initial DNA damage and the effect of famotidine in mouse leukocytes as assayed by the alkaline comet assay. **Journal Radiation Research (Tokyo)**, v. 48, n.2, p. 129-34, 2007.

MUKHERJEE, S.; DUDLEY, J.I.; DAS, D.K. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. **Dose-response**, v.8, p. 478-500, 2010.

MURAD, A. M. & KATZ, A. **Oncologia Bases Clínicas do Tratamento**. 1ª ed. Guanabara-Koogan, p. 355-358. Rio de Janeiro, 1996.

NASCIMENTO, P.A.; DA SILVA, M.A.; OLIVEIRA, E.M.; SUZUKI, M.F. & OKAZAKI, K. Evaluation of radioinduced damage and repair capcity in blood lymphocytes of breast cancer patients. **Braz. Jour. Med. and Biol. Res.**, v. 34, n. 2, p. 165-76, 2001.

OLIVEIRA, E.M., SUZUKI, P.A., DO NASCIMENTO, M.A., DA SILVA, M.A & OKAZAKI, K. Evaluation of the effect of 90Sr beta-radiation on human blood cells by chromossome aberration and single cell gel electrophoresis (comet assay) analusis. **Mutation Research**, v. 476, n. 1-2, p. 109-21, 2001.

OSTLING, O. & JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-8, 1984.

PAUL, B.; MASIH, I.; DEOPUJARI, J. & CHARPENTIER, C. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, na ayurvedic medicine from Índia. **J. Ethnopharmacol**, v. 68, p. 71-76.

PAN, Q.H.; WANG, L.; LI, J.M. Amounts and subcellular localization of stilbene synthase in response of grape berries to UV irradiation. **Plant Sci**., v. 176, p. 360-366, 2009.

PENNA, N.G. & HECKTHEUER, L.H.R. Vinho e Saúde: uma revisão. **Inf**., v. 16, p. 64-69.

PENUMATHASA, S.V. & MAULIK, N. Resveratrol: a promising agent in promoting cardioprotection against coronary heart disease. **Can. J. Phisiol. Pharmacol.**, v. 87, p. 275-286, 2009.

RAMOS, G.R.; ALVES, A.L.H.; HERMES-LIMA, M. Radicais livres, antioxidantes e a adaptabilidade animal. **O que é vida? Para entender a biologia do século XXI**. Relume Dumará, p.209-231. Rio de Janeiro, 2000.

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. 317-320, 2003.

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. **Ciênc. Tecnol. Aliment**., v. 25, p. 437-442, 2005.

STOCCO, B.; TOLEDO, K.; SALVADOR, M.; PAULO, M.; KOYAMA, N. &

TORQUETI TOLOI, M.R. Dose-dependent effect of resveratrol on bladder cancer cells: chemoprevention and oxidative stress. **Maturitas.** 2012.

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. **Mutat. Res.**, v. 496, p. 171-180, 2001.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R. & SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exper. Cell Res.**, v. 175, n. 1, p. 184-91, 1988.

TOMERA, J.F. Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption. **Trends Food Sci. Technol**., v. 10, p. 129-138, 1999.

TRELA, B.C.; WATERHOUSE, A.L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 1253-1257, 1996.

VAN ETTEN, H.D.; MANSFIELD, J.W.; BAILEY, J.A.; FARMER, E.E. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipins”. **Plan. Cell**, v. 6, p. 1191-1192, 1994.

VASANTHI, H.R.; PARAMESWARI, R.P.; DELEIRIS, J.; DAS, D.K. Health benefits of wine and alcohol from neuroprotection to heart health. **Front. Biosc**., 2012.

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

VINGTDEUX, V.; DRESES-WERRINGLOER, U.; ZHAO, H.; DAVIES, P.; MARAMBAUD, P. Review: Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer´s disease. **BMC Neurosci**., v. 9, suppl. 2-S6, 2008.

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 Metab. Dispos**., v. 32, p.1377-1382, 2004.

WATERHOUSE, A.L. Consumer labels can convey polyphenolic content: implications for public health. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 53, p. 5664-5669, 2005.

XI, J.; WANG, H.; MUELLER, R.A., NORFLEET, E. A.; XU, Z. Mechanism for resveratrol-inducedcardioprotecction against reperfusion injury involves glycogen synthase kinase 3beta and mitochondrial permeability transition pore. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 604, p. 111-116, 2009.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of rumex crispus L. extracts. **J. Agric. Food Chem**., v. 49, p. 4083-4089, 2001.

ZAKHARI, S.; LI, T.K. Determinants of alcohol use and abuse: impact of quantity and frequency patterns on liver disease. **Hepatol.**, v. 46, p. 2032-2039, 2007.