

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA E DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
BACHARELADO COM ÊNFASE EM BIOLOGIA MOLECULAR, CELULAR E
FUNCIONAL**

**Influência do Resveratrol,
Quercetina e Temozolomida na
Formação de Tumor-Esferas em
Glioma Humano *in vitro***

**Emilly Schlee Villodre
Professor Orientador: Dr. Guido Lenz**

Porto Alegre, 2009

TRABALHO DE CONCLUSÃO

Influência do Resveratrol, Quercetina e Temozolomida na Formação de Tumor-Esferas em Glioma Humano *in vitro*

Trabalho desenvolvido no Departamento de Biofísica e no Centro de Biotecnologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título em Bacharelado com Ênfase em Biologia Molecular, Celular e Funcional dentro do Programa de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Emilly Schlee Villodre
Professor Orientador: Dr. Guido Lenz

Porto Alegre, 2009

*Pensa como pensam os sábios,
mas falam como fala as pessoas simples.*

Aristóteles

Aos meus pais, Jorge e
Rosemary Villodre.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de primeiramente agradecer ao meu orientador Guido Lenz por ter me aceito logo no início da graduação. Obrigada por esses 3 anos e meio de orientação e ensinamento.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular pela ajuda, pela amizade e pelo conhecimento que adquiri ao lado de vocês. A Alessandra Pelegrini que me proporcionou muitos momentos de felicidade; a Alessandra Tamajusuku que sempre esteve disposta a ajudar; ao Andrew pela ajuda e amizade, ao Eduardo por sempre estar ao meu lado quando precisei de ajuda, pela amizade e pelas risadas; a Lauren por tantos momentos de ensinamento e amizade que tu me proporcionaste; a Patrícia por suas muitas ajudas e a Franciele, a Gabriela, ao Lucas e ao Jose pela amizade e momentos de alegria.

Agradeço também à Pítia Ledur, por ter me dado orientação durante o seu mestrado, mas acima de tudo pela grande amizade que surgiu entre nós. Obrigada pelos ensinamentos, pelas risadas, pelos conselhos e principalmente pela companhia.

Agradeço à banca, Ana Paula Horn e Rafael Roesler.

Agradeço ao CNPq, FAPERGS e PIBIC-UFRGS pelo apoio financeiro.

Agradeço principalmente aos meus pais, que sem eles nada disso seria possível. Se não fosse pelo esforço deles em me prover a melhor chance de estudo, eu não estaria aqui. Obrigada por tudo, amo vocês!! E também ao meu irmão.

Agradeço ao meu noivo Camillo que nesses quatro anos de graduação esteve sempre ao meu lado, me dando incentivo para buscar meus sonhos. Te amo muito e sempre vou te amar!

E também para as minhas famílias: os Villodre, os Schlee e os Cardoso-Borges.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 GLIOMAS.....	10
1.2 CÉLULAS TRONCO TUMORAIS.....	12
1.3 RESVERATROL.....	13
1.4 QUERCETINA.....	15
1.5 TEMOZOLOMIDA	15
1.6 SENESCÊNCIA.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 CULTURA DE CÉLULAS	19
3.2 EXTRAÇÃO DE RNA	19
3.3 QUANTIFICAÇÃO DO RNA	20
3.4 SÍNTESE DE cDNA.....	20
3.5 RT-PCR.....	21
3.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	22
3.7 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE ESFERAS.....	22
3.8 CITOMETRIA DE FLUXO.....	23
3.9 MTT	23
3.10 β -GALACTOSIDASE ASSOCIADA À SENESCÊNCIA	24
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 TRATAMENTO COM Rsv E Tmz.....	26
4.2 TRATAMENTO COM Rsv E Quer.....	29
5 PERPECTIVAS	34
6 CONCLUSÕES	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Vias moleculares da gliomagenese.....	11
Figura 2 Fontes vegetais de resveratrol	14
Figura 3 Estrutura molecular da Quercetina.....	15
Figura 4 Sinais fisiológicos que ativam a senescência.....	17
Figura 5 Cultura de U87	23
Figura 6 Cultura de U87 contendo células senescentes	25
Figura 7 Citometria de fluxo para CD133 com tratamento com Rsv e Tmz.....	27
Figura 8 Histograma referente à citometria de fluxo.....	27
Figura 9 Ensaio de MTT realizado após tratamento com Rsv e Tmz.....	28
Figura 10 Ensaio de formação de esfera tratado com Rsv e Tmz.....	29
Figura 11 Ensaio de MTT realizado após tratamento com Rsv e Quer.....	30
Figura 12 Ensaio de formação de esfera tratado com Rsv e Quer.....	30
Figura 13 Tratamento com Rsv + Tmz e Rsv + Quer reduziram a presença de mRNA de Oct4.....	31
Figura 14 Porcentagem de células SA-βgalactosidase positivas	32
Figura 15 Células senescentes após 7 dias de plaqueamento.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequências do par de primers.....	21
Tabela 2 Número de esferas formadas nos tratamentos com Rsv e Tmz.....	28
Tabela 3 Número de esferas formadas no tratamento Rsv + Quer	30

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina Bovina Sérica (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
°C	graus Celsius
cDNA	DNA complementar
CSC	<i>Cancer Stem Cells</i> (Células Tronco Tumorais)
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio padrão
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> , ou ácido etilenodiamino tetraacético
EP	erro padrão
GBM	glioblastoma multiforme
µg	unidade de medida: micrograma
µl	unidade de medida: microlitro
µM	unidade de medida: micromolar
ml	unidade de medida: mililitro
mg	unidade de medida: miligrama
mm	unidade de medida: milímetro
mM	unidade de medida: milimolar
nm	unidade de medida: nanometro
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Oct4	Octamer 4
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – reação da polimerase em cadeia
Quer	Quercetina
RNA	ácido ribonucléico
Rsv	Resveratrol
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
Tmz	Temozolomida
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)

RESUMO

Gliomas são tumores do Sistema Nervoso Central, originados de células gliais. Caracterizam-se por sua alta invasibilidade e proliferação, além de quimio e radiorresistência e altos índices de recorrência e morte. Evidências recentes sugerem que esses gliomas apresentam uma população de células tronco tumorais que estariam envolvidas na sua resistência a terapias. A linhagem celular de glioma humano U87 caracteriza-se por formar esferas quando em cultura e essas esferas são enriquecidas em células tronco tumorais. Temozolomida (Tmz) é um anti-tumoral utilizado na terapia de diversos tumores, inclusive gliomas. Resveratrol (Rsv) e Quercetina (Quer) são polifenóis encontrados em diversas plantas, como a uva, também estando presentes no vinho tinto. Esses polifenóis possuem diversos efeitos como: neuroproteção, anti-inflamatório, anti-oxidante, proteção cardíaca, entre outros. Nosso objetivo foi avaliar a influência da Tmz, do Rsv e da Quer na formação de esferas em cultura de células U87. Células foram cultivadas em condição padrão com 5% de SFB. Ensaio de formação de esferas foi realizado semeando 750 e 1000 células em uma placa de 96 poços, com diferentes tratamentos (Rsv 10 μ M, Tmz 5 μ M e Rsv 10 μ M + Tmz 5 μ M) ou então 750, 1125, 1700 e 2500 células foram semeadas e tratadas com Rsv 10 μ M + Quer 25 μ M. Citometria foi realizada utilizando anti-CD133. RNA de células tratadas com Rsv + Tmz e Rsv + Quer foi extraído e cDNA foi sintetizado, após foi realizado RT-PCR para o marcador de células indiferenciadas Oct4. O ensaio de β -galactosidase foi realizado após 7 dias de tratamento com Rsv + Quer. Resultados mostraram que a média do número de esferas formadas foi menor com Tmz (10) e Rsv + Tmz (12) comparado com o controle (18), para 1000 células plaqueadas e, somente com Rsv o número de esferas foi semelhante ao controle (26). Mas, o número de células CD133⁺ foi menor nos tratamentos (10,9 com Rsv; 5,8 com Tmz e 7,7% com Rvs + Tmz) do que no controle (12,1%). Para o tratamento com Rsv + Quer o número de esferas foi de 20, 32, 39 e 36 para 750, 1125, 1700 e 2500 células respectivamente, enquanto que para o controle os valores encontrados foram de 18, 32, 43 e 48. Além disso, através de RT-PCR foi possível ver que além de reduzir o número de células CD133, a combinação de Rsv e Tmz reduziu a expressão de Oct4, assim como

Rsv + Quer. Também vimos um aumento da senescência nas células tratadas com Rsv + Quer quando comparadas com o controle. O efeito citotóxico da Tmz somente ocorre em concentrações acima de 100 μM e efeitos observados com concentrações tão baixas reforçam a importância do efeito específico sobre as células tronco do câncer. A procura de combinações de drogas que causem um efeito sinérgico nestas células pode representar uma boa estratégia terapêutica no combate às células tumorais.

Influência do Resveratrol, Quercetina e Temozolomida na Formação de Tumor-Esferas em Glioma Humano *in vitro*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLIOMAS

Gliomas são tumores originados de células gliais do sistema nervoso central (SNC) e são do tipo mais comum de tumor cerebral primário. Caracterizam-se por apresentar alta invasibilidade e proliferação, altos índices de recorrência e encontram-se entre os cânceres humanos mais mortais (Maher, 2001). Além disso, possuem resistência a quimio e radioterapias (Bredel, 2002).

Gliomas podem ser classificados – segundo a organização mundial da saúde (*World Health Organization* - WHO) – em quatro graus de acordo com sua malignidade, utilizando com base a sua histologia e prognóstico. O grau I, conhecido como astrocitoma pilocítico, é o menos maligno e apenas com a cirurgia é possível se curar; o de grau II, astrocitoma, possui características histológicas semelhantes a astrócitos e uma sobrevida de 10 a 15 anos; no de grau III, ou astrocitoma anaplásico, a sobrevida cai para 2 a 3 anos; e o grau IV, o glioblastoma multiforme, é o mais maligno de todos com uma média de sobrevida de 1 ano (Holland, 2001; Louis, 2006; Louis, 2007).

Glioblastoma multiforme (GBM) apresenta uma incidência de 5-8/100.000 pessoas e a média de sobrevida dos pacientes quando tratados somente com métodos convencionais é de 14 semanas, somente com cirurgia é de 20 semanas, com cirurgia e radiação aumenta a sobrevida para 36 semanas e com a adição de quimioterapia se eleva para 40-50 semanas (Avgeropoulos, 1999).

Os gliomas, assim como os diferentes tumores, possuem características cruciais para o seu estabelecimento e desenvolvimento, como: capacidade de proliferação independente de estímulos externos, evasão da apoptose e sem limites de replicação, capacidade de se desenvolver e crescer apesar da existência de forças externas supressivas e do sistema imunológico, estimular

a angiogênese e também apresentar a habilidade de invadir tecidos saudáveis (Hanahan, 2000; Rich, 2004).

O GBM pode originar-se, basicamente, de duas formas: através da progressão de tumores de menor grau até o de grau IV, considerado glioblastoma secundário; ou então o paciente pode apresentar diretamente o de grau IV, glioblastoma primário (Holland, 2001; Maher, 2001; Rich, 2004) (Figura 1). O primário geralmente está presente em pacientes mais velhos, caracterizado por ser um tumor de alta invasibilidade e, normalmente, sem precedentes clínicos de outro tumor. O secundário é, na maioria das vezes, observado em jovens que inicialmente apresentaram astrocitoma de menor grau que, entre 5-10 anos, se transformaram em GBM (Maher, 2001).

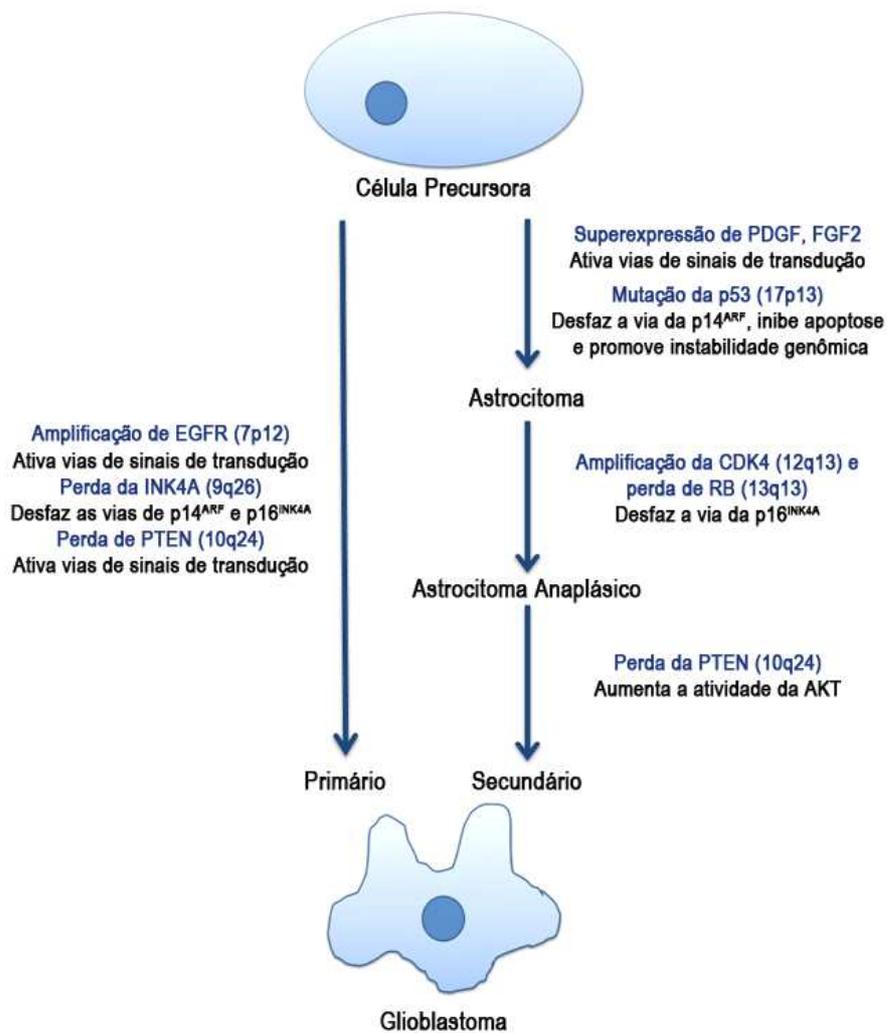


Figura 1| Vias moleculares da gliomagenese. Glioblastomas multiformes (GBM) podem ser formados diretamente (GBM primário), ou a partir da progressão de tumores de menor grau (GBM secundário). As mutações presentes na figura são as normalmente encontradas nos tumores e que possuem correlação com o grau e tipo de glioma, além disso, possíveis efeitos causados a partir dessas mutações também são listados. EGFR, receptor do fator de

crescimento epidermal; PTEN, homólogo a fosfatase e angiotensina deletada no cromossomo 10; PDGF, fator de crescimento derivado de plaqueta; FGF2, fator de crescimento fibroblástico; CDK4, cinase dependente de ciclina 4; RB, proteína de suscetibilidade a retinoblastoma. Adaptado de Holland, 2000 e Rich, 2004.

1.2 CÉLULAS TRONCO TUMORAIS

Glioblastomas apresentam uma população mista de células que diferem morfológicamente e podem ser definidas tanto em níveis fenotípicos quanto genéticos (Yuan, 2004; Beier, 2007; Fan, 2007). Essa heterogeneidade pode ser devido à perda da estabilidade genômica ou devido a uma desregulação dos processos de proliferação e de diferenciação (Fan, 2007).

Na literatura é possível encontrar diversos estudos mostrando que dentro dessa população heterogênea presente na massa tumoral existem células com características similares às células tronco com a capacidade de auto-renovação (ou seja, são capazes de sofrer mitose assimétrica, em que uma das células filhas se mantém com características de célula tronco e a outra se diferencia em célula madura). Essas células foram denominadas células tronco tumorais (CSC – *Cancer Stem Cells*) e possuem características semelhantes às células tronco do tecido de origem sendo importantes para o estabelecimento e manutenção de diversos tumores, como leucemia, mama, gliomas, entre outros (Al-Hajj, 2004; Singh, 2004). Além de ser capaz de gerar células diferenciadas, uma característica importante das CSCs é a capacidade de formação de tumor a partir de uma célula de câncer indiferenciada (Flores, 2009).

Em gliomas, essa população de células tronco tumorais foi identificada expressando uma glicoproteína transmembrana, CD133 (ou Prominina 1). Esse marcador de superfície é expresso, normalmente, em células tronco neurais. Em seu artigo de 2004, Singh mostrou que ao se injetar 100 células CD133⁺, em camundongo imunodeprimido NOD-SCID (*non-obese diabetic, severe combined immunodeficient*), houve a formação de um tumor, enquanto que ao se injetar 100.000 células CD133⁻, não houve crescimento tumoral. Indicando, assim, que as células tronco são importantes para o desenvolvimento do câncer. Além disso, quando se analisa a expressão de CD133 em pacientes

com glioblastoma, vemos que existe uma correlação inversa entre a expressão do gene e a sobrevivência do paciente (<http://cancergenome.nih.gov>).

Bao, no seu estudo em 2006, mostrou que CSC (CD133⁺ - proporção de aproximadamente 5 – 30 % da população celular) de gliomas promovem a radiorresistência devido à ativação preferencial da resposta a danos no DNA maior que nas demais células e, após radiação, essa população foi enriquecida tanto *in vivo* quanto *in vitro*, aumentando a tumorigenicidade das células restantes.

Em câncer de mama e de cérebro, foi visto que a população de CSC tem a capacidade de se auto-renovar, enquanto que a maioria das células cancerosas tem a proliferação limitada ou ausente, sugerindo que as células tronco tumorais impulsionariam o crescimento e a propagação do tumor (Clarke, 2006).

Além disso, estudos mostraram que as células tronco de diversos tumores super-expressam proteínas resistentes a multidrogas, protegendo a célula contra drogas citotóxicas que matam as progenitoras e diferenciadas. Então, essa propriedade biológica de CSC pode explicar a falha dos quimioterápicos a longo prazo para o tratamento de gliomas (Kondo, 2004; Salmaggi, 2006; Beier, 2008).

Com a descoberta dessa população de células tronco tumorais é importante que a busca de melhores tratamentos seja focada no estudo molecular e das vias que sinalizam para que estas células auto-renovem-se e tornem-se radiorresistentes, colaborando, assim, com o desenvolvimento do tumor.

1.3 RESVERATROL

Resveratrol (Rsv; 3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um polifenol que ocorre naturalmente em diversas plantas, como uvas, amendoim, amoras, mirtilo, entre outras (Figura 2). É classificado como um fitoalexina – antibiótico com origem nas plantas, e é sintetizado em resposta a condições adversas como estresse ambiental ou ataques patogênicos (Aggarwal, 2004).

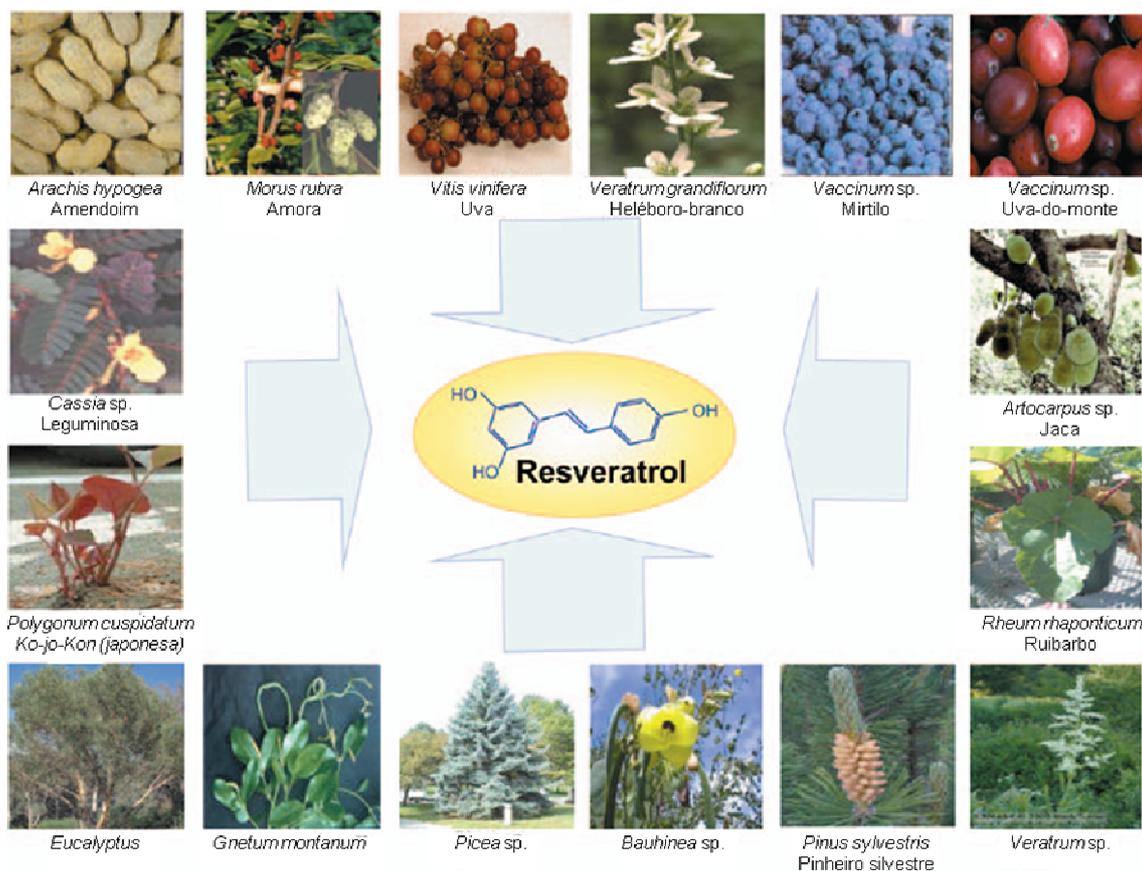


Figura 2| Fontes vegetais de resveratrol (Adaptado de Aggarwal, 2004).

Estudos já mostraram que Rsv é importante como neuroprotetor (Huang, 2001; Inoue, 2003), cardioprotetor (Huang, 2001), possui efeito anti-inflamatório (de la Lastra, 2005; Das, 2007), anti-oxidante (Villano, 2005), além da capacidade de induzir a diferenciação celular (Wang, 2003; Wang, 2008; Yu, 2008), entre outros.

Em estudos sobre Rsv e câncer, foi visto que ele age como um agente antitumoral, afetando a proliferação celular através da sua ação na iniciação e na progressão do tumor (Jang, 1997; Tseng, 2004).

Lu, em 2009, demonstrou que Rsv pode inibir a proliferação e a tumorigenicidade de células tronco tumorais em meduloblastomas e é capaz de aumentar, sinergicamente, a radiosensibilidade dessas células após o tratamento. Outro estudo também mostrou a sua capacidade de aumentar a radiosensibilidade de células CD133⁺ derivadas de tumor teratóide/rabdóide atípico, além de ser anti-apoptótico e anti-proliferativo (Kao, 2009).

1.4 QUERCETINA

Quercetina (Quer; 3,3',4',5,7-Pentahidroxi flavona) (Figura 3) pertence a classe de polifenóis flavonóides e está quase onipresente nas plantas e fontes de alimento vegetal, com uva, vinho e chás; e muitas vezes ocorre como glicosídeos – derivados açúcar (Lamson, 2000; Russo, 2007; Murakami, 2008).

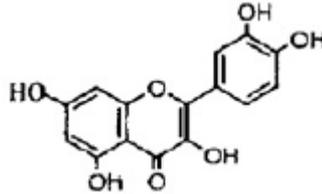


Figura 3| Estrutura molecular da Quercetina (Adaptado de Russo, 2007).

Quer é um dos bioflavonóides mais importante na dieta humana, com um consumo médio diário individual em países ocidentais de 25-30 mg (Lamson, 2000; Russo, 2007).

Já foi demonstrado que essa molécula é um importante anti-oxidante, anti-inflamatório, anti-proliferativo e tem efeito apoptótico em modelos de cultura celular (Lamson, 2000; Russo, 2007). Também pode atuar como anticancerígeno, reduzindo a expressão de oncogenes – como H-ras, c-myc e K-ras; de genes supressores de tumor – como a p53 (Ranelletti, 2000; Russo, 2007) e aumentando a expressão de proteínas que controlam o ciclo celular – como p21WAF1 e p27KIP1 (Casagrande, 2001; Russo, 2007).

Quer é capaz de inibir diferentes cinases (tirosina e serina-treonina), cuja atividade está conectada com as vias de sobrevivência da MAPK, AKT/PKB (Spencer, 2003; Russo, 2007). Mouria, em 2002, mostrou que Quer inibiu o crescimento de câncer pancreático através da liberação de citocromo C e indução de apoptose.

1.5 TEMOZOLOMIDA

Temozolomida (Tmz) é um agente alquilante que tem seu efeito citotóxico através da metilação da posição O⁶ da guanina. Essa metilação pode ser removida pela proteína de reparo de DNA, MGMT (O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase), conferindo, portanto, resistência dos gliomas que expressam

esta enzima à Tmz. A metilação do promotor do gene da MGMT e sua consequente expressão reduzida em alguns gliomas tornam a Tmz mais eficiente nestes casos (Stupp, 2005; Beier, 2008).

Tmz foi o primeiro agente quimioterápico a ser aprovado para o tratamento de GBM (Fu, 2009), é o mais utilizado e geralmente é bem tolerado pelos pacientes (Stupp, 2005; Beier, 2008).

Stupp, em 2005, viu um aumento na sobrevida de pacientes com glioblastoma quando tratados com esse agente. Apresentando um acompanhamento médio de 28 meses, a sobrevida mediana foi de 14,6 meses, com radioterapia e temozolomida e de 12,1 meses com radioterapia isolada.

Estudos relacionando Tmz e CSC mostram resultados diversos. Beier, em 2008, mostrou que Tmz reduz preferencialmente CSC em cinco linhagens de tumores CD133⁺ enquanto que Fu, em 2009, viu que CSC de glioblastomas colaboram com a capacidade de resistência do tumor a TMZ, e que as células CD133⁺ contribuem com essa resistência, reduzindo a expressão de proteínas relacionadas à autofagia, demonstrando somente em uma amostra de tumor primário.

1.6 SENESCÊNCIA

Células normais humanas são submetidas a um número finito de divisões celulares e, após, elas entram em um estado de não-divisão celular denominado senescência replicativa. Propõe-se que o encurtamento dos telômeros seria o relógio molecular que provoca essa senescência (Bodnar, 1998). A expressão ectópica de hTERT, a subunidade catalítica da telomerase, é capaz de restaurar o comprimento dos telômeros em fibroblastos e em vários outros tipos de células e permite que culturas de células com poucas passagens contornem a senescência e tornem-se imortais (Bodnar, 1998; Lundberg, 2000). Uma variedade de outros estímulos fisiológicos celulares pode provocar a entrada da célula em senescência, como mostrado na Figura 4.

As células senescentes caracterizam-se por: (I) entrar em parada de crescimento irreversível; (II) apresentar uma morfologia diferente das outras células em cultura, sendo maiores e planas; (III) aumentar a expressão de

diversas proteínas inibitórias do ciclo celular; (IV) aumentar a atividade da enzima β -galactosidase ácida (Dimri, 1995; Dumont, 2000; Lundberg, 2000; Volonte, 2002).

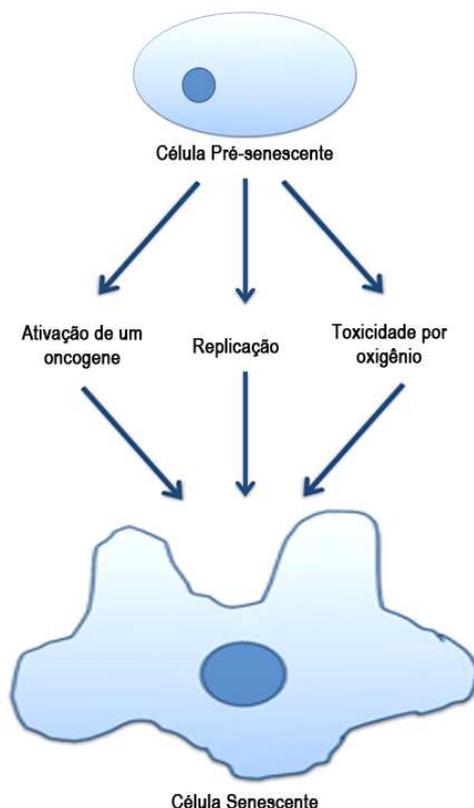


Figura 4| Sinais fisiológicos que ativam a senescência. Cultura primária de células de mamíferos entra em parada de crescimento irreversível e exibe a marca de células senescentes quando segue extensas passagens (replicação) em cultura, com a ativação de oncogenes ou então a exposição com agentes oxidativos. Adaptado de Ludenberg, 2000.

Muitas células tumorais perdem a capacidade de entrar em senescência e este aspecto parece ser muito importante para o desenvolvimento tumoral (Dimri, 1995; Wynford-Thomas, 1999; Lundberg, 2000; Volonte, 2002). Em 2008, Xia viu que Rsv foi capaz de reduzir a senescência em células progenitoras endoteliais através do aumento da atividade da telomerase.

Heiss, em 2007, é um dos únicos estudos que mostra que Rsv pode induzir senescência em células de câncer $p53^+$. Recentemente mostramos em nosso grupo que a combinação de Rsv e Quer foi capaz de induzir senescência na linhagem de glioma de rato C6 (Zamin, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do Resveratrol, da Quercetina e da Temozolomida na formação de tumor-esferas em glioma humano *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar quantitativamente o número de esferas formadas a partir dos tratamentos com Rsv, Tmz e Quer.

Analisar a presença de células CD133⁺ após os tratamentos com Rsv e Tmz.

Avaliar se o tratamento com Rsv e Quer induzem senescência em células da linhagem de glioma humano U87.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE CÉLULAS

Os frascos de cultura de tecidos utilizados foram adquiridos da marca TPP. Os reagentes utilizados para fazer as soluções da cultura seguem-se listados: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/DMEM* (Gibco BRL), Soro Fetal Bovino (Gibco BRL), NaHCO_3 (Merck), Penicilina/Streptomicina (Gibco BRL), Tripsina (Gibco BRL).

O meio de cultura DMEM foi preparado com DMEM *Low Glucose*, NaHCO_3 44 mM, 1 % de Penicilina e Streptomicina, 0,1% de fungizona (Gibco BRL) e suplementado com 5% de soro fetal bovino, com pH ajustado para 7,4. A solução de CMF, pH 7,4, utilizada no preparo da tripsina e para lavar as células antes da tripsinização, continha NaH_2PO_4 8,0 mM, NaCl 138 mM, KCl 2,68 mM. Todas as soluções utilizadas na cultura de células foram preparadas em água destilada autoclavada e esterilizadas por filtração em membrana com poro de 0,2 mm da Millipore.

A linhagem celular de glioma humano U87 foi obtida da ATCC (*American Type Culture Collection* - Rockville, Maryland, USA). Foi cultivada em condição padrão em meio DMEM *Low Glucose* suplementado com 5 % de soro fetal bovino, contendo antibióticos e fungicida.

As células foram mantidas em frascos de cultura de tecidos em estufa a 37°C com atmosfera umidificada e 5 % de CO_2 . O meio de cultivo era trocado a cada 2 / 3 dias.

3.2 EXTRAÇÃO DE RNA

A placa de 6 poços foi semeada contendo 31.000 células (referente a 1.000 células no poço de 96), após 7 dias com o tratamento foi retirada da estufa, e depois de retirar todo o meio de cultura, lavou-se as células com CMF. Ao final da lavagem, no gelo, adicionou-se 1 ml de TRIZOL LS (Invitrogen), responsável por promover a lise celular.

O homogeneizado foi raspado com um raspador de células e todo o conteúdo do poço foi recolhido para um tubo (tipo eppendorf) livre de RNAses,

adicionando-se 400 µl de clorofórmio (Quimex). Agitou-se o tubo à temperatura ambiente para misturar as fases e incubou-se no gelo. Depois de 5 minutos, foi feita a centrifugação dos tubos por 15 minutos a 13200 RPM. Após, visualizou-se duas fases, uma aquosa, e outra turva. Transferiu-se a fase aquosa para outro tubo, no qual foi adicionado isopropanol (Quimex) na quantidade de 1:1, os tubos foram agitados para homogeneização e realizou-se uma nova centrifugação por 40 minutos a 13200 RPM.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70 % (Quimex), mais uma centrifugação foi feita, por 5 minutos a 8000 RPM, no final o sobrenadante foi novamente descartado.

O precipitado formado secou a temperatura ambiente por 20 minutos para a retirada de qualquer resquício de etanol, e depois foi solubilizado em água livre de RNAses (DEPC).

3.3 QUANTIFICAÇÃO DO RNA

O RNA foi diluído 100 vezes para realizar a sua quantificação em volume final de 300 µl (3µl de RNA para 297 µl de água DEPC).

A leitura foi feita no espectrofotômetro em cubeta de quartzo. Para calibrar o aparelho, utilizou-se água pura (transmitância 100% e absorbância 0,000). Realizaram-se leituras nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A absorbância em 260 nm serve para calcular a concentração de RNA, e a absorbância em 280 nm indica a concentração de proteína. A razão 260 nm / 280 nm indica se o RNA está puro (razão deve estar entre 1,6 e 2,0, caso contrário pode indicar a presença de restos de TRIZOL e de proteínas na amostra).

Após a leitura, utilizou-se a fórmula absorbância 260 nm X fator de diluição / 25 (valor constante para RNA) = µg / µl). Calculou-se a concentração de cada amostra e o RNA foi armazenado em freezer a -80°C.

3.4 SÍNTESE DE cDNA

A síntese de cDNA foi realizada conforme protocolo do fabricante (Promega), utilizando a concentração sugerida de RNA de 5 µg.

Primeiramente foi realizada a etapa de anelamento do *primer* poliT (Promega). A reação foi calculada para um volume final de 14 µl. Para isso, adicionou-se *primer* poliT (0,5µg PoliT / µg RNA) e água DEPC ao RNA. Levou-se a mistura ao termociclador por 5 minutos a 70°C.

Na etapa seguinte, que é a de alongação do cDNA, juntou-se aos 14 µl da reação da primeira reação, 1 µl de transcriptase reversa (Promega), 5 µl de tampão da enzima, e 5 µl de dNTPs 10 mM (Cenbiot – UFRGS). A reação retorna ao termociclador por 60 minutos a 42°C.

3.5 RT-PCR - Reação em cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa

Após a padronização do *primer* (Invitrogen) (tabela 1), foi determinada a temperatura ideal para o par de *primer* da Oct4 como sendo 61°C. Foram utilizadas as seguintes quantidades de reagentes (relativos a uma reação):

0,25 µl de taq polimerase (0,5 U – CenBiot - UFRGS)

2,0 µl de dNTPs

0,5 µl de cada *primer* (F+R=1µl)

0,75 µl de MgCl₂ 50mM

2,5 µl de tampão 10X concentrado

1,0 µl de cDNA

H₂O para completar o volume final de 25 µl (neste caso, 17,5 µl)

Tabela 1| Sequências do par de primers utilizados e tamanho de seu respectivo fragmento em pares de bases (pb).

<i>Primer</i>	Sequência	Tamanho do produto (pb)
pOct4F	5'-AAC ATG TGT AAG CTG CGG C-3'	
pOct4R	5'-TTG AAT GCA TGG GAG AGC C-3'	496
β-actina F	5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA G-3'	
β-actina R	5'-GTG GTG GTG AAG CTG TAG C-3'	236

Como controle utilizou-se *primer* de β-actina, e na reação de controle negativo não se adicionou cDNA.

Os passos do programa utilizado no termociclador foram os seguintes:

95°C, 1 minuto
94°C, 30 segundos }
61 °C, 30 segundos } 35 ciclos
72°C por 1 minuto }
72°C por 10 minutos

3.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Um gel de agarose (Promega) 1,5 % foi utilizado para realizar a eletroforese. O tampão utilizado foi TAE 1X concentrado (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM). À mistura homogênea de agarose e tampão adicionou-se Sybr Green (diluído 100X em DMSO - Invitrogen), um intercalante de DNA que permite a visualização dos fragmentos na presença de luz ultra-violeta.

Após a polimerização do gel, os produtos do PCR foram carregados, misturados ao tampão de amostra (azul de bromofenol, 6X concentrado), aplicou-se 10 µl da mistura por poço do gel e 7 µl do padrão (100 pares de bases - Promega). O gel foi visualizado no transluminador com luz UV, e fotos foram capturadas.

3.7 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE ESFERAS

Utilizou-se placa de 96 poços e meio DMEM suplementado com 5 % de SFB. Os tratamentos foram feitos contendo diferentes concentrações de Resveratrol (Sigma), Temozolomida (Sigma) e Quercetina (Sigma).

As células cultivadas foram tripsinizadas e contadas com o auxílio de Câmara de Neubauer. Após, diferentes concentrações foram semeadas (750 e 1000 células para Rsv e Tmz; 750, 1125, 1700 e 2500 para a combinação de Rsv e Quer) em uma placa de 96 poços.

Rsv 10 µM, Tmz 5 µM e Quer 25 µM foram adicionados e o controle continha além do meio de cultura o veículo utilizado para diluir as drogas (DMSO) na mesma quantidade usada no momento da diluição das drogas.

A placa foi analisada utilizando um microscópio óptico dos dias 4-7, nos quais o número de esferas foi contado. Considerou-se esferas as células que

formavam um grupo, que não estavam completamente aderidas e que tinham um volume maior que 60 μm (Figura 5) quando observadas em contraste fase.

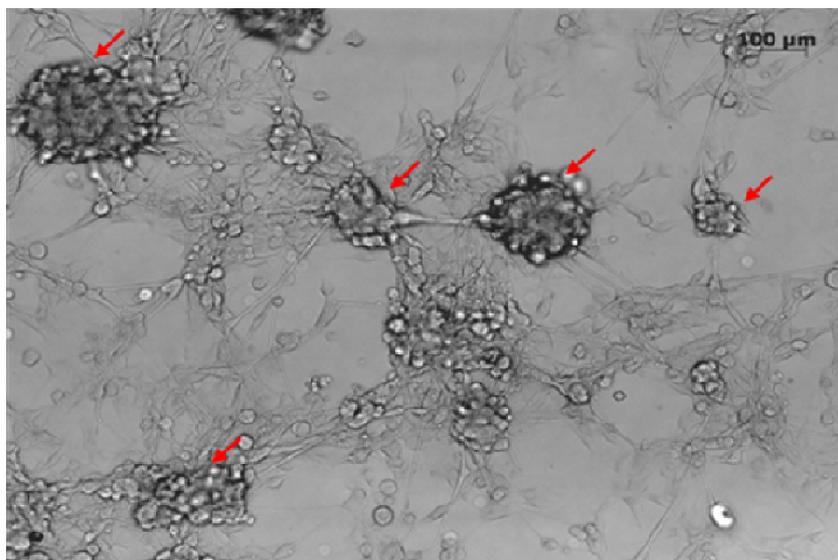


Figura 5| Cultura de U87. Esferas indicadas pelas setas. Esferas são grupos de células que não se encontram totalmente aderidas na placa e apresentam mais de 60 μm de diâmetro (observado no microscópio óptico).

3.8 CITOMETRIA DE FLUXO

Uso-se uma solução de EDTA 2 mM em PBS contendo 0,5 % de BSA (Albumina Bovina Sérica). O anticorpo utilizado foi anti- CD133/1 (AC133)-PE (Miltenyi Biotec, Alemanha).

As células foram dissociadas mecanicamente, lavadas duas vezes com solução EDTA 2 mM / PBS / 0.5 % BSA. Após elas foram incubadas com anticorpo anti-CD133/1 (AC133)-PE 1:10 durante 10 minutos a 4 °C no escuro. As células foram analisadas por citometria de fluxo (Aparelho PCA-96), através da detecção da fluorescência vermelha emitida pelo anticorpo.

Os resultados foram avaliados utilizando o software CytosoftPCA96 (Guava Technologies, Hayward, CA, USA) e WinMDI2.9.

3.9 MTT

O ensaio de redução do MTT foi realizado de acordo com Mosmann, T. 1983. Utilizou-se a solução de MTT 5mg / ml (Sigma) dissolvida em PBS, e após as 3 horas de incubação os cristais foram dissolvidos em DMSO.

Após os sete dias de tratamento, o meio de cultura presente na placa de 96 poços utilizada para o ensaio de formação de esferas foi retirado, as células foram lavadas com CMF 1x estéril e 100 µl da solução de MTT dissolvido em PBS foi adicionado por poço. A placa foi incubada a 37 °C por 3 horas.

A solução de MTT (amarelo), após as 3 horas, foi reduzida a cristais de formazan (púrpura). Então, retirou-se o sobrenadante e 100 µl de DMSO foi adicionado para solubilizar os cristais.

Foi utilizado o espectrofotômetro SpectraMax (MolecularDevices, CA, USA) nos comprimentos de onda de 560 e 630 nm. A inibição do crescimento das células foi expressa como porcentagem das células não tratadas.

3.10 β -GALACTOSIDASE ASSOCIADA À SENESCÊNCIA (SA- β -GAL)

Utilizou-se PBS para a lavagem das células, formaldeído 3% para a fixação e uma solução contendo: 1 mg/mL 5-bromo-4cloro-3-indolil β -D-galactoside (X-gal, Sigma), 40 mM ácido cítrico / fosfato de sódio com pH 6.0, 5 mM ferrocianeto de potássio, 5 mM ferricianeto de potássio, 150 mM cloreto de sódio, 2 mM cloreto de magnésio.

Para corar o núcleo, utilizou-se uma solução contendo Triton X-100 0,1 %, DAPI 300 µM e PBS 1 X.

Após sete dias de tratamento as células foram lavadas com PBS, e formaldeído 3% foi adicionado por 1 h para a fixação das células. Em seguida, as células foram novamente lavadas e adicionou-se 50 µl da solução contendo o substrato da enzima X-Gal por 16 – 18 h.

Após esse período, as células foram então, lavadas com PBS e acrescentou-se 50 µl de uma solução de marcação de núcleo (contendo Triton X-100, PBS e DAPI) por 15 min.

Após as fotos foram obtidas usando microscópio de fluorescência invertida Carl Zeiss e as imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ 1.42q.

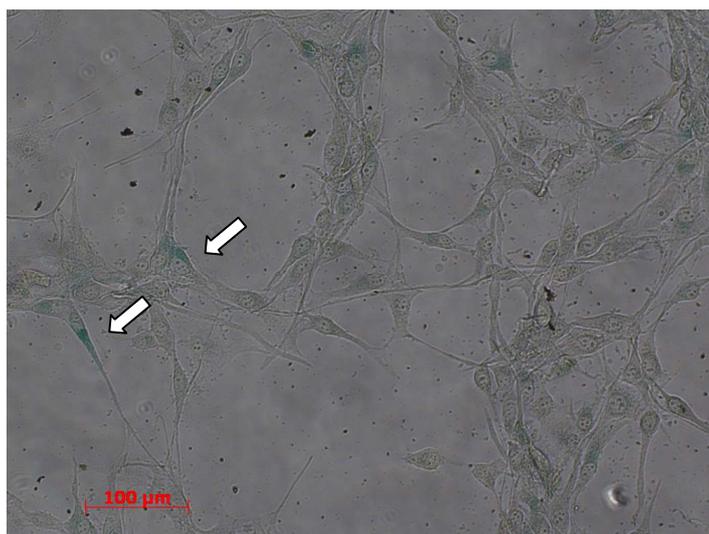


Figura 6| Cultura de U87 contendo células senescentes. Células senescentes indicadas pelas setas (observado no microscópio óptico).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das tabelas são expressos com média \pm DV, enquanto que nos gráficos são expressos por média \pm EP. Os valores obtidos foram analisados usando ANOVA seguida de SNK para múltiplas comparações.

A análise dos dados foi realizada com o auxílio do programa GraphPad INSTAT (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TRATAMENTO COM Rsv E Tmz

O tratamento com Rsv é capaz de reduzir a proliferação de células tronco tumorais (Lu, 2009) e que, segundo (Beier, 2008), Tmz seria capaz de reduzir preferencialmente essa população. Na citometria de fluxo (figuras 6 e 7) podemos observar que o número de células positivas para CD133 é reduzido em todos os tratamentos (12.1 no controle para 10.9, 5.8 e 7.7 % para Rsv, Tmz e Rsv + Tmz, respectivamente – Figura 7). Além disso, uma subpopulação positiva para CD133, mas com tamanho menor foi encontrada, e nela também houve redução de células positivas (11 no controle para 4.1, 2.5 e 2.8 % para Rsv, Tmz e Rsv + Tmz, respectivamente – Figura 7). Na figura 8 é possível visualizar melhor essa subpopulação (delimitada pelo círculo). A outra população vista no histograma se refere à população presente no quadrante inferior à esquerda da figura 6.

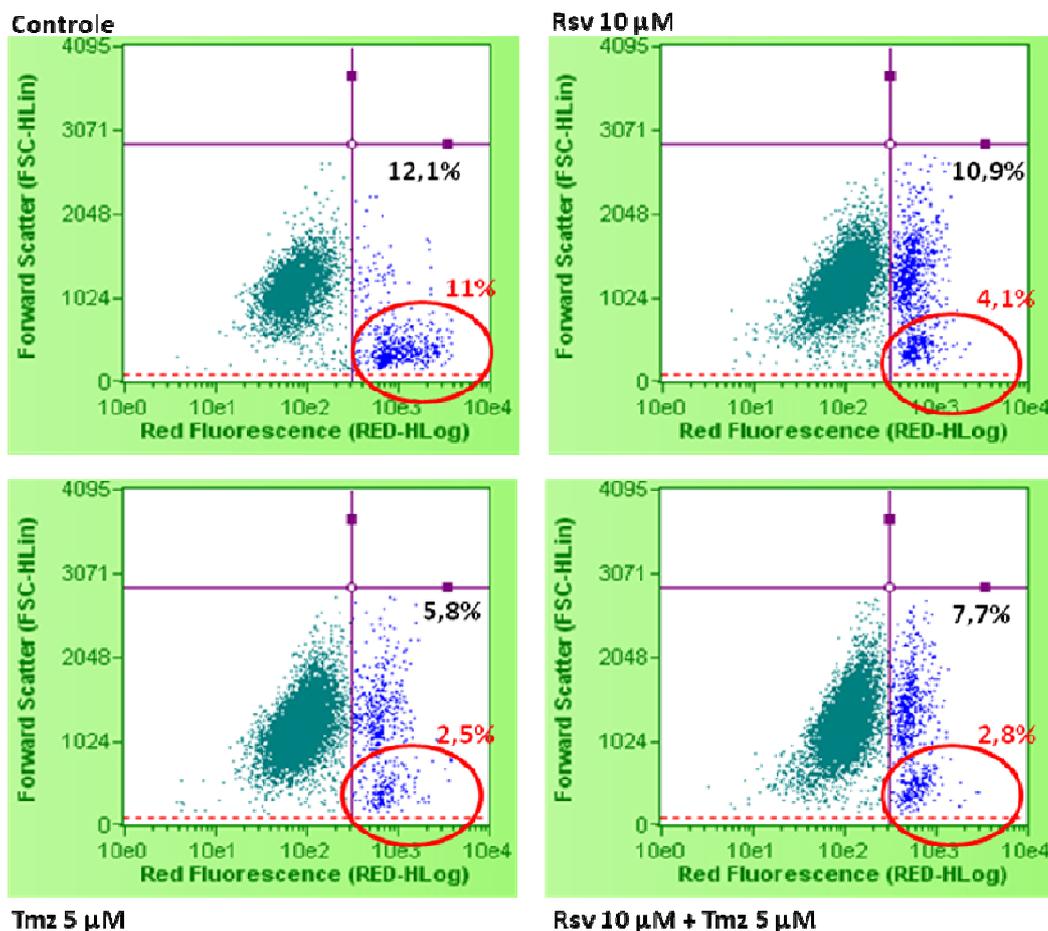


Figura 7| Citometria de fluxo para CD133. Eixo Y referente ao tamanho da célula e eixo X a fluorescência do anti-CD133. Números em preto referem-se à porcentagem do quadrante e os próximos ao círculo refere-se à subpopulação positiva delimitada. Valores representativos de dois experimentos.

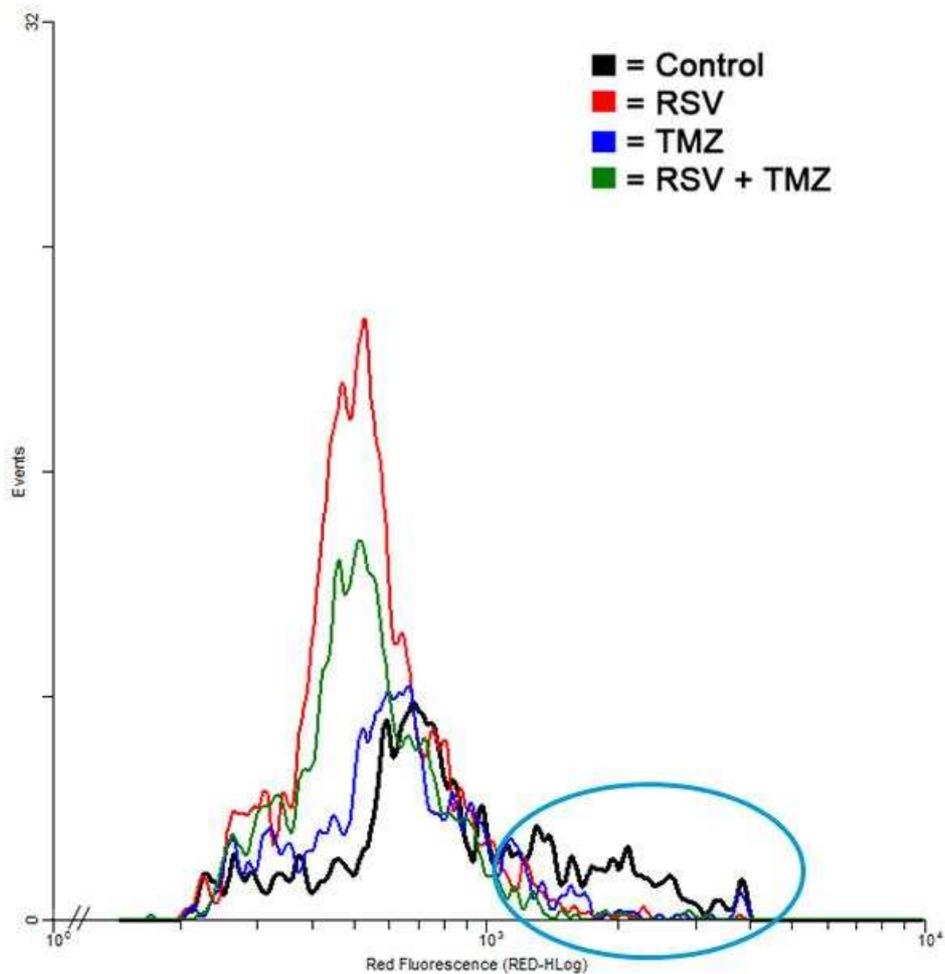


Figura 8| Histograma referente à citometria de fluxo. No círculo está destacada a subpopulação positiva encontrada e que foi reduzida com os tratamentos.

Através do ensaio de MTT, foi possível visualizar uma redução na proliferação celular nos tratamentos, principalmente com 1000 células (Figura 9). O efeito citotóxico do TMZ ocorre somente acima de 100 μM (Fillipi-Chiela, dados não publicados) o que explica a ausência de efeito citotóxico da concentração usada no presente trabalho, que é de 5 μM .

Além disso, no ensaio de formação de esferas observamos que Rsv não alterou o número de esferas formadas, apesar de ter reduzido o número de células CD133 (Figura 6); já os tratamentos com Tmz e Rsv + Tmz potencialmente reduzem o número de esferas comparadas com o controle (Tabela 2; Figura 10). Como foram obtidos valores diferentes no MTT para o

controle e os tratamentos, realizou-se a correção do número de esferas pelo valor obtido no MTT, uma vez que o número de esferas obtidas poderia ter sofrido alteração no seu valor e, mesmo após a correção do valor, vimos que houve uma possível redução no número de esferas formadas para Tmz e para a combinação.

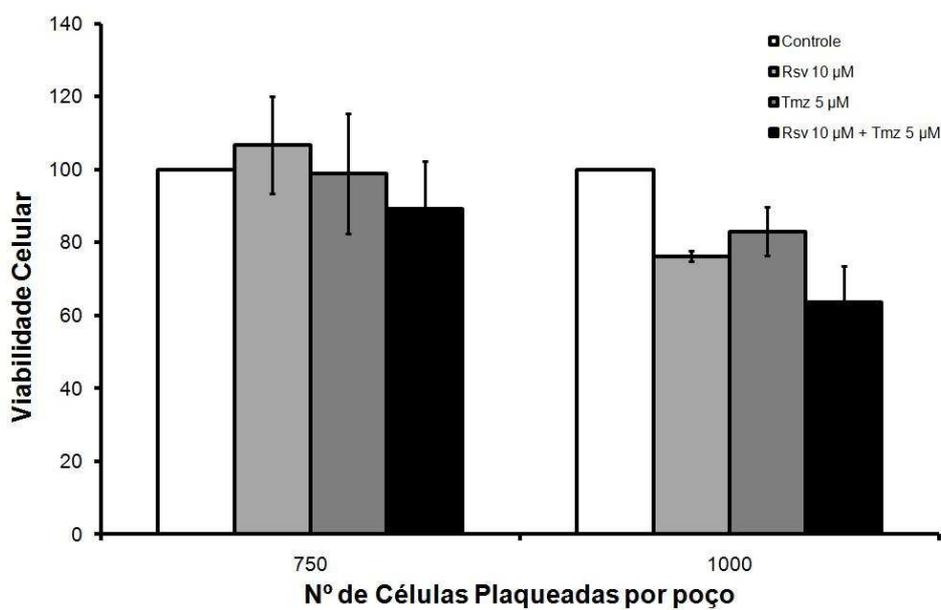


Figura 9| Ensaio de MTT realizado após 7 dias de tratamento. Os resultados são expressos como média \pm EP em relação ao controle (n=3).

Tabela 2| Número de esferas formadas no dia 7 no controle e nos tratamentos Rsv, Tmz e Rsv + Tmz, corrigido pelo MTT, com 750 e 1000 células semeadas. Valor expresso como média \pm DP (n=3).

Nº Esferas / MTT	750	1000
Controle	12 \pm 7	18 \pm 8
Rsv 10 µM	10 \pm 7	26 \pm 10
Tmz 5 µM	5 \pm 2	10 \pm 6
Rsv 10 µM + Tmz 5 µM	4 \pm 1	12 \pm 6

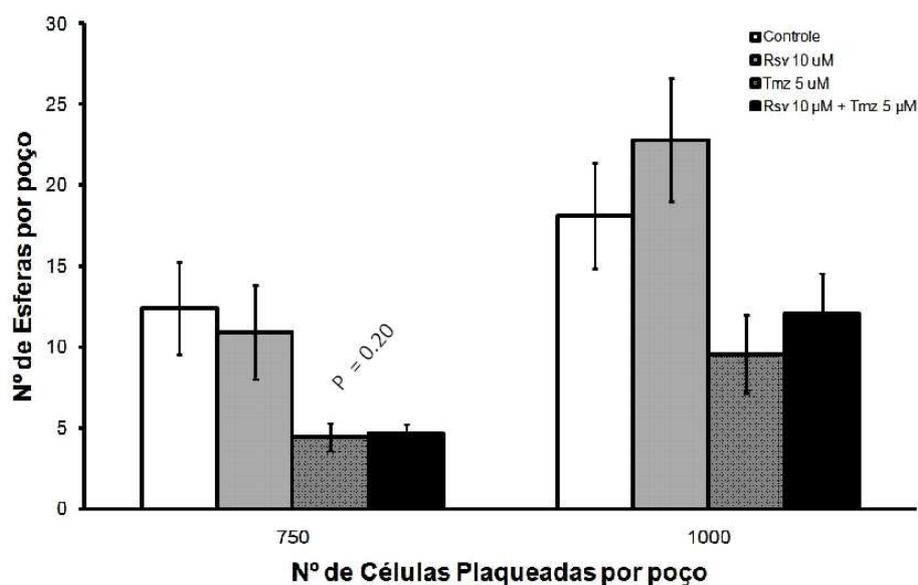


Figura 10| Ensaio de formação de esfera tratado com Rsv e Tmz. Número de esferas formadas após 7 dias de tratamento, corrigido pelo MTT. Os resultados são expressos como média \pm EP, (n=3).

4.2 TRATAMENTO COM Rsv E Quer

A combinação de Rsv e Quer reduz o número de células tanto da linhagem de rato C6, como de camundongo GL261, e nas de humano U87 e U138. Além de induzir a atividade das caspases 3/7 (Zamin, 2009). Entretanto, vimos que a combinação de Rsv e Quer aumentou a proliferação conforme o número de células plaqueadas (Figura 11), enquanto que potencialmente reduz o número de esferas formadas, tendo a maior diferença de formação com 2500 células plaqueadas (Tabela 3; Figura 12).

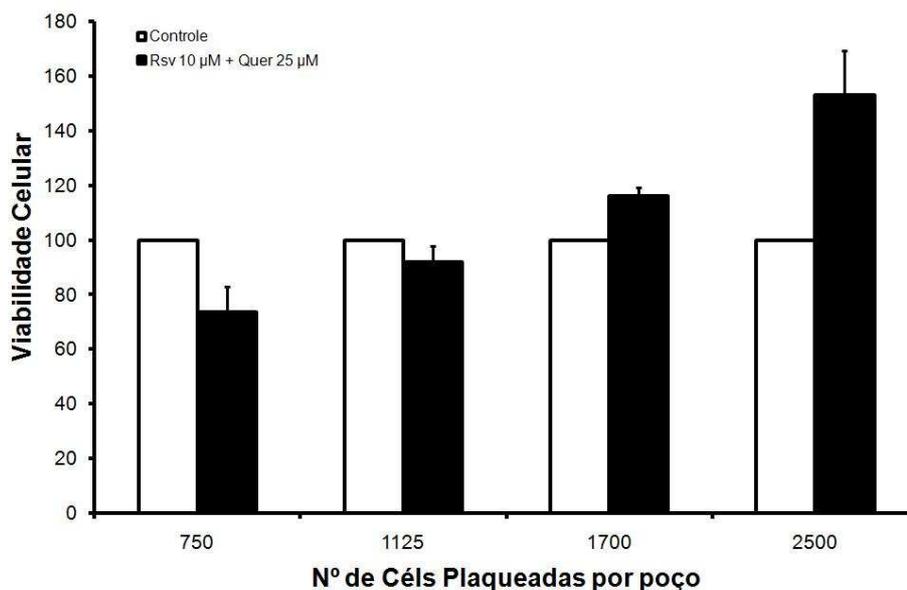


Figura 11| Ensaio de MTT realizado após 7 dias de tratamento. Os resultados são expressos como média \pm EP em relação ao controle (n=3).

Tabela 3| Número de esferas formadas no dia 7 no controle e no tratamento Rsv + Quer, corrigido pelo MTT. Valor expresso como média \pm DP (n=3).

Nº Esferas / MTT	750	1125	1700	2500
Controle	18 \pm 6	32 \pm 6	43 \pm 8	48 \pm 11
Rsv 10 µM + Quer 25 µM	20 \pm 2	32 \pm 5	39 \pm 7	36 \pm 13

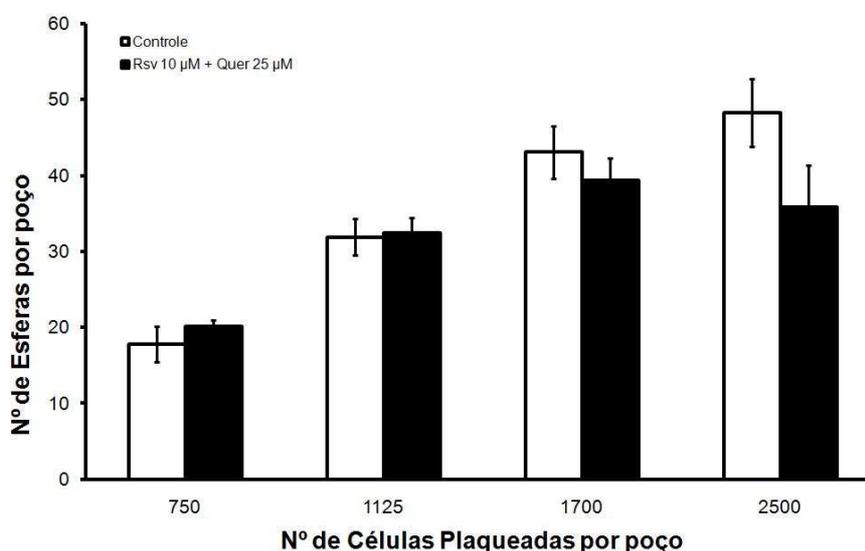


Figura 12| Figura 10| Ensaio de formação de esfera tratado com Rsv e Quer, valor corrigido pelo MTT. Os resultados são expressos como média \pm EP (n=3).

Além da redução vista de CD133 para a combinação de Rsv com Tmz (Figura 7), visualizamos a ausência de outro marcador de células

indiferenciadas, Oct4, presente no controle (Figura 13), também não foi detectado na combinação de Rsv com Quer.

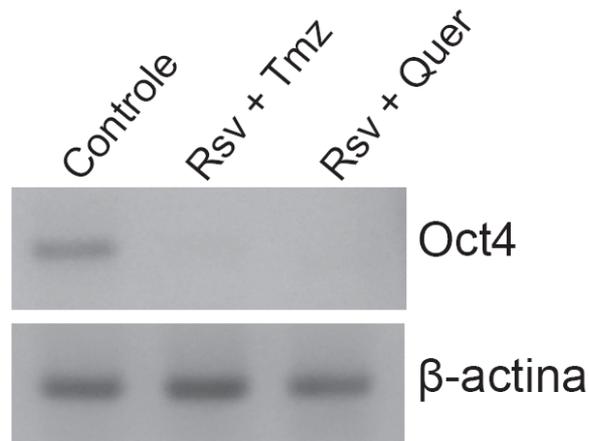


Figura 13| Tratamento com Rsv + Tmz e Rsv + Quer reduziram a presença de mRNA de Oct4, um marcador de células indiferenciadas, através da técnica de RT-PCR (n=1).

Zamin, em 2009, mostrou que, em células de rato C6, o tratamento com Rsv 10 μM + Quer 25 μM aumentou a senescência nessas células. E, o ensaio de β -galactosidase mostrou um aumento na senescência nas células U87 tratadas quando comparadas com o controle, exceto em 2500 células que os valores foram o mesmo (Figura 14), indicando que esses compostos possuem um potencial de induzir senescência não somente em linhagem de ratos, mas também de humanos.

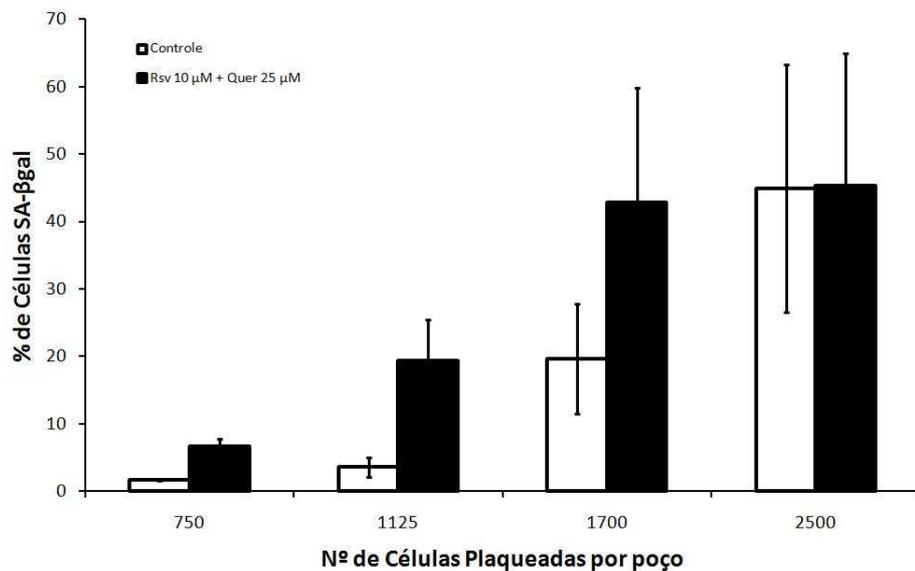


Figura 14| Porcentagem de células SA- β galactosidase positivas por poço em placa de 96, após 7 dias de tratamento. Os resultados são expressos como média \pm EP (n=2).

Ao compararmos os gráficos de viabilidade celular e senescência com o tratamento de Rsv + Quer (Figura 11 e 14, respectivamente) vemos uma relação inversa entre eles. Conforme aumenta o número de células plaqueadas a relação de células β -galactosidase positivas reduz em relação ao controle, enquanto que no MTT a viabilidade aumenta. O fato de que quanto menos células semeadas apresentar maior senescência poderia ser devido ao menor contato das células no poço. Ao semearmos, por exemplo, 750 células em um poço de uma placa de 96, as células aderem-se afastadas umas das outras, e a ausência de contato poderia interferir no crescimento dessas células.

Na figura 15B, vemos que com 2500 células semeadas, o número de células senescentes aumentou comparado com 1125 células (Figura 15A), além disso a senescência também aumentou nas esferas. Em 2009, Kuilman escreveu uma revisão mostrando que células sintetizam fatores que são capazes de induzir a senescência nas células vizinhas e a maior senescência basal encontrada em poços com mais células plaqueadas sugere que isso possa estar ocorrendo. Por isso, o estudo do efeito de drogas sobre a senescência precisa ser feita em condições de cultivo bem estabelecidas para que não seja afetado pelo excesso de células.

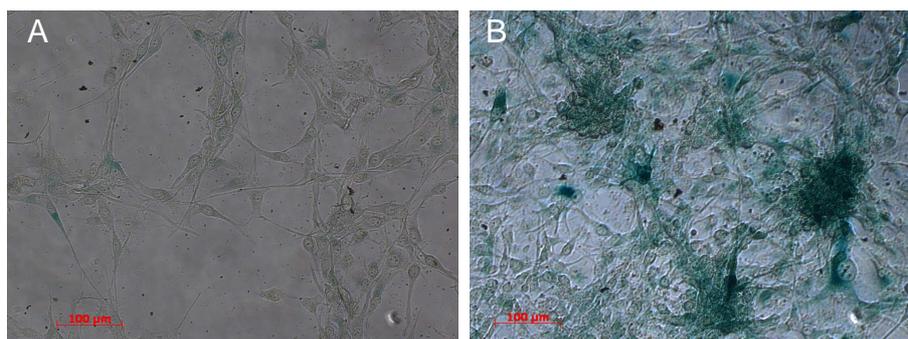


Figura 15| Células senescentes após 7 dias de plaqueamento. A. com 1125 células semeadas, poucas esferas formadas e poucas células senescentes. B. 2500 células semeadas mostra grande número de células da monocamada e das esferas com grande incidência de senescência.

Beier, em 2008, mostrou que Tmz reduz preferencialmente células tronco tumorais, e nossos resultados corroboram essa observação, visto que reduziu o número de células CD133. Entretanto, a combinação com Rsv não apresentou nenhum efeito aditivo, uma vez que o número de células CD133

positivas e nem o número de esferas foram reduzidas mais do que com a Tmz sozinha (Figura 7 e Figura 10).

Mostramos que a combinação de Rsv com Tmz ou com Quer reduz a transcrição de Oct4, utilizado como marcador de células indiferenciadas. Oct4 é o fator de transcrição que, isoladamente, pode gerar células pluripotentes induzidas (iPS - *induced pluripotent stem*) de células diferenciadas como por exemplo fibroblastos (Kim, 2009; Yan, 2009), sugerindo que os tratamentos estariam levando as células a uma diferenciação.

Vimos que o tratamento com Rsv, Tmz e combinado tem um potencial para reduzir o número de células CD133⁺. Entretanto, acreditamos que nem todas as células presentes nas esferas sejam CSCs, visto que estudos descrevem que o número de células tronco dentro de uma população de células estaria entre 5 a 30 % (Bao, 2006). Além disso, o tratamento conjunto de Rsv com Tmz reduziu a expressão de outro marcador de células indiferenciadas, Oct4. Em conjunto, nossos dados indicam a presença de células indiferenciadas no controle, mas que com o tratamento essa população foi reduzida.

O tratamento com Rsv e Quer, no ensaio de formação de esferas, não foi conclusivo, visto que houve variação no resultado conforme se aumentava o número de células semeadas por poço. Entretanto demonstramos que esse tratamento tem potencial para induzir senescência em células de glioma humano. Só não sabemos se as células que entraram em senescência são CSCs.

A sobrevida de pacientes com GBM após cirurgia, radio e quimioterapia aumenta para 40-50 semanas (Avgeropoulos, 1999). Por isso, mais estudos com Rsv e Quer e com outros compostos devem ser feitos para que possamos aumentar o efeito da Tmz a fim de aumentarmos não só a expectativa de vida dos pacientes com glioblastoma, mas também de encontrarmos uma combinação de drogas que exibam mínimos efeitos colaterais e que possam evitar a recorrência desse tumor.

5 PERPECTIVAS

Para atingirmos o nosso objetivo de verificar a influência de Rsv, Quer e Tmz na formação de tumor-esferas será necessário realizarmos ainda:

- Realizar ensaio de formação de esferas para Tmz, Rsv + Tmz e Rsv + Quer, para fecharmos o n de 4;
- Realizar ensaio de formação de esferas para Tmz + Quer;
- Realizar RT-PCR e qRT-PCR para Rsv, Tmz, Quer, Rsv + Tmz e Rsv + Quer para os genes Oct4, CD133, para verificar se o tratamento gera diferença de expressão de genes de células indiferenciadas;
- Realizar β -galactosidase associado à senescência Tmz, Rsv + Tmz e Rsv + Quer para fecharmos o n de 3 e com as drogas isoladas.

6 CONCLUSÕES

- Rsv, Tmz e Rsv + Tmz reduzem o número de células CD133⁺;
- Tmz e Rsv + Tmz potencialmente diminuem o número de esferas formadas;
- Efeito citotóxico da Tmz somente ocorre em concentrações acima de 100 µM e efeitos observados com concentração tão baixa reforçam a importância do efeito específico sobre as células tronco do câncer;
- Rsv + Quer potencialmente diminui a formação de esferas;
- Houve um aumento na senescência tratadas com Rsv + Quer quando comparadas com o controle, exceto em 2500 células que os valores foram o mesmo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., & Takada, Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. ***Anticancer Res.***, 24(5A): 2783-2840, set, 2004.

Al-Hajj, M. & Clarke, M. F. Self-renewal and solid tumor stem cells. ***Oncogene***, 23(43): 7274-7282, set, 2004.

Avgeropoulos, N. G. & Batchelor, T. T. New treatment strategies for malignant gliomas. ***Oncologist.***, 4(3): 209-224, set, 1999.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., & Rich, J. N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. ***Nature***, 444(7120): 756-760, dez, 2006.

Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., & Beier, C. P. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. ***Cancer Res.***, 67(9): 4010-4015, maio, 2007.

Beier, D., Rohrl, S., Pillai, D. R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L. A., Leukel, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., Trampe-Kieslich, A., Giebel, B., Wischhusen, J., Reifenberger, G., Hau, P., & Beier, C. P. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. ***Cancer Res.***, 68(14): 5706-5715, jul, 2008.

Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., & Wright, W. E. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. ***Science***, 279(5349): 349-352, jan, 1998.

Bredel, M. & Zentner, J. Brain-tumour drug resistance: the bare essentials. ***Lancet Oncol.***, 3(7): 397-406, jul, 2002.

Casagrande, F. & Darbon, J. M. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. ***Biochem.Pharmacol.***, 61(10): 1205-1215, maio, 2001.

Clarke, M. F. & Fuller, M. Stem cells and cancer: two faces of eve. ***Cell***, 124(6): 1111-1115, mar, 2006.

Das, S. & Das, D. K. Anti-inflammatory responses of resveratrol. ***Inflamm.Allergy Drug Targets.***, 6(3): 168-173, set, 2007.

de la Lastra, C. A. & Villegas, I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. ***Mol.Nutr.Food Res.***, 49(5): 405-430, maio, 2005.

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., & . A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, 92(20): 9363-9367, set, 1995.

Dumont, P., Burton, M., Chen, Q. M., Gonos, E. S., Frippiat, C., Mazarati, J. B., Eliaers, F., Remacle, J., & Toussaint, O. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. **Free Radic.Biol.Med.**, 28(3): 361-373, fev, 2000.

Fan, X., Salford, L. G., & Widegren, B. Glioma stem cells: evidence and limitation. **Semin.Cancer Biol.**, 17(3): 214-218, jun, 2007.

Flores, D. G., Ledur, P. F., Abujamra, A. L., Brunetto, A. L., Schwartzmann, G., Lenz, G., & Roesler, R. Cancer Stem Cells and the Biology of Brain Tumors. **Curr.Stem Cell Res.Ther.**, 4(4): 306-313, dez, 2009.

Fu, J., Liu, Z. G., Liu, X. M., Chen, F. R., Shi, H. L., Pangjese, C. S., Ng, H. K., & Chen, Z. P. Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced autophagy. **Chin Med.J.(Engl.)**, 122(11): 1255-1259, jun, 2009.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100(1): 57-70, jan, 2000.

Heiss, E. H., Schilder, Y. D., & Dirsch, V. M. Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells. **J.Biol.Chem.**, 282(37): 26759-26766, set, 2007.

Holland, E. C. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. **Nat.Rev.Genet.**, 2(2): 120-129, fev, 2001.

Huang, S. S., Tsai, M. C., Chih, C. L., Hung, L. M., & Tsai, S. K. Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. **Life Sci.**, 69(9): 1057-1065, jul, 2001.

Inoue, H., Jiang, X. F., Katayama, T., Osada, S., Umesono, K., & Namura, S. Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice. **Neurosci.Lett.**, 352(3): 203-206, dez, 2003.

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

Kao, C. L., Huang, P. I., Tsai, P. H., Tsai, M. L., Lo, J. F., Lee, Y. Y., Chen, Y. J., Chen, Y. W., & Chiou, S. H. Resveratrol-induced apoptosis and increased radiosensitivity in CD133-positive cells derived from atypical teratoid/rhabdoid tumor. **Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.**, 74(1): 219-228, maio, 2009.

Kim, J. B., Zaehres, H., Arauzo-Bravo, M. J., & Scholer, H. R. Generation of induced pluripotent stem cells from neural stem cells. **Nat.Protoc.**, 4(10): 1464-1470, set, 2009. Kondo, T., Setoguchi, T., & Taga, T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, 101(3): 781-786, jan, 2004.

Kuilman, T. & Peeper, D.S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. **Nature Reviews Cancer**, 9: 81-94, jan, 2009.

Lamson, D. W. & Brignall, M. S. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. **Altern.Med.Rev.**, 5(3): 196-208, jun, 2000.

Louis, D. N. Molecular pathology of malignant gliomas. **Annu.Rev.Pathol.**, 1: 97-117, fev, 2006.

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol.**, 114(2): 97-109, ago, 2007.

Lu, K. H., Chen, Y. W., Tsai, P. H., Tsai, M. L., Lee, Y. Y., Chiang, C. Y., Kao, C. L., Chiou, S. H., Ku, H. H., Lin, C. H., & Chen, Y. J. Evaluation of radiotherapy effect in resveratrol-treated medulloblastoma cancer stem-like cells. **Childs Nerv.Syst.**, 25(5): 543-550, maio, 2009.

Lundberg, A. S., Hahn, W. C., Gupta, P., & Weinberg, R. A. Genes involved in senescence and immortalization. **Curr.Opin.Cell Biol.**, 12(6): 705-709, dez, 2000.

Maher, E. A., Furnari, F. B., Bachoo, R. M., Rowitch, D. H., Louis, D. N., Cavenee, W. K., & DePinho, R. A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes Dev.**, 15(11): 1311-1333, jun, 2001.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J.Immunol.Methods**, 65(1-2): 55-63, dez, 1983.

Mouria, M., Gukovskaya, A. S., Jung, Y., Buechler, P., Hines, O. J., Reber, H. A., & Pandol, S. J. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. **Int.J.Cancer**, 98(5): 761-769, abril, 2002.

Murakami, A., Ashida, H., & Terao, J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. **Cancer Lett.**, 269(2): 315-325, out, 2008.

Ranelletti, F. O., Maggiano, N., Serra, F. G., Ricci, R., Larocca, L. M., Lanza, P., Scambia, G., Fattorossi, A., Capelli, A., & Piantelli, M. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. **Int.J.Cancer**, 85(3): 438-445, fev, 2000.

Rich, J. N. & Bigner, D. D. Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. **Nat.Rev.Drug Discov.**, 3(5): 430-446, maio, 2004.

Russo, G. L. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. **Biochem.Pharmacol.**, 74(4): 533-544, ago, 2007.

Salmaggi, A., Boiardi, A., Gelati, M., Russo, A., Calatozzolo, C., Ciusani, E., Sciacca, F. L., Ottolina, A., Parati, E. A., La, P. C., Alessandri, G., Marras, C., Croci, D., & De, R. M. Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype. **Glia**, 54(8): 850-860, dez, 2006.

Singh, S. K., Clarke, I. D., Hide, T., & Dirks, P. B. Cancer stem cells in nervous system tumors. **Oncogene**, 23(43): 7267-7273, set, 2004.

Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., & Dirks, P. B. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, 432(7015): 396-401, nov, 2004.

Spencer, J. P., Rice-Evans, C., & Williams, R. J. Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. **J.Biol.Chem.**, 278(37): 34783-34793, set, 2003.

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N.Engl.J.Med.**, 352(10): 987-996, mar, 2005.

Tseng, S. H., Lin, S. M., Chen, J. C., Su, Y. H., Huang, H. Y., Chen, C. K., Lin, P. Y., & Chen, Y. Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. **Clin.Cancer Res.**, 10(6): 2190-2202, mar, 2004.

Villano, D., Fernandez-Pachon, M. S., Troncoso, A. M., & Garcya-Parrilla, M. C. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. **Analytica Chimica Acta**, 538: 391-398, mar, 2005.

Volonte, D., Zhang, K., Lisanti, M. P., & Galbiati, F. Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. **Mol.Biol.Cell**, 13(7): 2502-2517, jul, 2002.

Wang, Q., Li, H., Wang, X. W., Wu, D. C., Chen, X. Y., & Liu, J. Resveratrol promotes differentiation and induces Fas-independent apoptosis of human medulloblastoma cells. **Neurosci.Lett.**, 351(2): 83-86, nov, 2003.

Wang, Q., Li, H., Liu, N., Chen, X. Y., Wu, M. L., Zhang, K. L., Kong, Q. Y., & Liu, J. Correlative analyses of notch signaling with resveratrol-induced differentiation and apoptosis of human medulloblastoma cells. **Neurosci.Lett.**, 438(2): 168, jun, 2008.

Wynford-Thomas, D. Cellular senescence and cancer. **J.Pathol.**, 187(1): 100-111, jan, 1999.

Xia, L., Wang, X. X., Hu, X. S., Guo, X. G., Shang, Y. P., Chen, H. J., Zeng, C. L., Zhang, F. R., & Chen, J. Z. Resveratrol reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity by Akt-dependent mechanisms. *Br.J.Pharmacol.*, 155(3): 387-394, out, 2008.

Yan, X., Qin, H., Qu, C., Tuan, R. S., Shi, S., & Huang, G. T. iPS cells reprogrammed from mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev.*, out, 2009.

Yu, L. J., Wu, M. L., Li, H., Chen, X. Y., Wang, Q., Sun, Y., Kong, Q. Y., & Liu, J. Inhibition of STAT3 expression and signaling in resveratrol-differentiated medulloblastoma cells. *Neoplasia*, 10(7): 736-744, jul, 2008.

Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D. L., Black, K. L., & Yu, J. S. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 23(58): 9392-9400, dez, 2004.

Zamin, L. L., Filippi-Chiela, E. C., Dillenburg-Pilla, P., Horn, F., Salbego, C., & Lenz, G. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Sci.*, 100(9): 1655-1662, set, 2009.