

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
TESE DE DOUTORADO

**RESVERATROL E QUERCETINA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL  
E DOS MECANISMOS DE AÇÃO EM LINHAGENS DE GLIOMAS *IN VITRO* E EM  
UM MODELO DE IMPLANTE DE GLIOMAS *IN VIVO***

LAUREN LÚCIA ZAMIN

Orientador: Dr. Guido Lenz  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Christianne Salbego

Porto Alegre  
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
TESE DE DOUTORADO

**RESVERATROL E QUERCETINA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL  
E DOS MECANISMOS DE AÇÃO EM LINHAGENS DE GLIOMAS *IN VITRO* E EM  
UM MODELO DE IMPLANTE DE GLIOMAS *IN VIVO***

Tese de doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul como requisito parcial para obtenção  
do título de Doutor em Biologia Celular e  
Molecular.

LAUREN LÚCIA ZAMIN

Orientador: Dr. Guido Lenz

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Christianne Salbego

Porto Alegre

2010

Dedico esta tese aos meus pais, colegas de laboratório e em especial ao Evandro, pelo amor e confiança.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela minha bolsa, pela bolsa de iniciação científica dos alunos que me auxiliaram neste trabalho, e pelas verbas de pesquisa concedidas ao meu orientador.

À FAPERGS, FINEP, CAPES e ao FIPE do HCPA, pelo suporte financeiro.

Ao Guido, pelas brilhantes idéias que montaram esta tese; pela confiança e por acreditar que eu seria capaz; pela liberdade de me deixar criar e descobrir os caminhos, pela presença sempre que necessário; pelos puxões de orelha e ensinamentos; pelo exemplo de ciência de qualidade e ética.

A Christianne, por ter investido em mim desde a iniciação científica, pela liberdade e apoio de me deixar explorar novos caminhos científicos, pela sabedoria ensinada e pela ética.

A professora Fabiana e ao professor Rafael, minha comissão de acompanhamento, por acompanharem meu trabalho com idéias e críticas construtivas.

Ao Eduardo, que foi meu bolsista durante boa parte deste doutorado. Agradeço por ter sido um amigo e uma fonte de força e idéias. Agradeço a ajuda, a disponibilidade de tempo, a paciência e a prestatividade. Peço desculpa pelos momentos de impaciência.

Aos demais colegas do laboratório 107, Ale T, Ale P, Pati Lu, José, Emilly, Andrew, Pítia, Fran, Gabi, Lucas pelo companheirismo, ajuda e bons momentos de risada e descontração vividos nestes anos. Aos colegas do laboratório da professora Fabiana pela ajuda e pelos momentos de descontração. Às colegas de outros grupos colaboradores do nosso laboratório, pelo convívio e aprendizado.

Aos colegas do laboratório 23, do Departamento de Bioquímica, em especial ao Rudimar e a Andressa pelo auxílio com o modelo *in vivo* e com a amizade de longas datas.

Ao professor Jorge Quiefeldt, por ter aberto o laboratório e o biotério para os nossos experimentos com os animais. Agradeço a todo pessoal do seu laboratório pela ajuda e ensinamentos para os cuidados com os animais e pelo empréstimo do material. Agradeço em especial a Dona Zelma, sempre prestativa, solícita e atenciosa, e pela ajuda fundamental na aquisição e cuidado dos animais.

À Dra. Luise, pela disponibilidade de tempo, ensinamentos e ajuda na análise das lâminas e à Neiva, que apesar de atarefada, sempre achou um tempo pra fazer as lâminas

À Ana Paula Souza e a Cristina Bonorino, pela ajuda com a cultura de esplenócitos.

À Márcia Wink, pelas conversas, idéia e bom humor, que sempre levanta o astral daqueles que estão ao seu redor.

À Andréia Buffon, pela ajuda com as dosagens das enzimas hepáticas e pelos momentos de boas conversas.

A todos os colegas, coordenadores, professores e funcionários do PPGBCM, em especial a Silvia e ao Luciano.

Agradeço a todos os funcionários da UFRGS, em especial ao pessoal da segurança que nos vigiava nos finais de semana, e ao pessoal da limpeza.

Aos amigos e aos meus familiares, em especial ao Evandro pela presença, força, carinho, afeto e atenção em todos os momentos.

*“Sou um pouco de todos que conheci,  
um pouco dos lugares que fui,  
um pouco das saudades que deixei,  
sou muito das coisas que gostei.  
Entre umas e outras errei,  
entre muitas e outras conquistei”*

Ramon Hasma

## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas.....	10
Lista de Símbolos, Abreviaturas e Siglas .....	11
Resumo.....	16
Abstract .....	17
Apresentação .....	18
1 INTRODUÇÃO .....	19
1.1 Gliomas .....	19
1.1.1 Epidemiologia .....	19
1.1.2 Patologia e Etiologia .....	20
1.1.3 Tratamento .....	23
1.1.4 Principais Alterações Genéticas .....	23
1.1.4.1 Alterações na Via de Sinalização Mediada por RTK .....	24
1.1.4.2 A Via do Supressor Tumoral p53 .....	25
1.1.4.3 A Via da Proteína RB .....	26
1.1.5 Linhagens tumorais.....	27
1.2 Resveratrol ( <i>3,5,4'-trihidroxiestilbeno</i> ) .....	28
1.2.1 A Molécula .....	28
1.2.2 Resveratrol e a Saúde Humana .....	30
1.2.3 Farmacocinética e Toxicologia .....	31
1.2.4 Alvos Moleculares .....	32
1.2.5 Resveratrol e Gliomas .....	35
1.3 Quercetina ( <i>3,3',4,5,7-pentahidroxi flavona</i> ) .....	36
1.3.1 A Molécula .....	36
1.3.2 Quercetina e a Saúde Humana .....	38
1.3.3 Farmacocinética e Toxicologia .....	39
1.3.4 Alvos Moleculares .....	40
1.3.5 Quercetina e Gliomas .....	42
1.3.6 Quercetina e Resveratrol .....	42
1.4 Mecanismos de Morte Celular .....	43
1.4.1 Apoptose .....	45
1.4.2 Necrose.....	49

1.4.3	Autofagia .....	50
1.4.4	Catástrofe Mitótica .....	51
1.4.5	Senescência Celular .....	52
1.5	Dano ao DNA e Reparo.....	56
1.6	Hipótese do Trabalho.....	62
1.7	Objetivos Gerais .....	62
1.7.1	Objetivos Específicos .....	62
2.	DESENVOLVIMENTO.....	63
2.1	Capítulo 1- Resveratrol and Quercetin Cooperate to Induce Senescence-like Growth Arrest in C6 Rat Glioma Cells .....	63
2.2	Capítulo 2 – Resveratrol and Quercetin Induce Senescence-like Growth Arrest by Increasing DNA Damage and Phosphorylation of H2AX .....	72
2.3	Capítulo 3 –Resveratrol and Quercetin Effect in a Rat Glioma Model .....	91
3.	DISCUSSÃO.....	109
4.	CONCLUSÕES.....	121
4.1	Principais Resultados Encontrados .....	121
4.2	Mecanismos Investigados Envolvidos nos Efeitos Observados Anteriormente .....	121
4.3	Mecanismos Investigados Não Envolvidos na Indução de Senescência Mediada pelas Drogas.....	122
4.4	Mecanismos Investigados que Não Foram Alterados no Modelo de Gliomas <i>in vivo</i> .....	122
5.	PERSPECTIVAS.....	123
5.1	Modelo <i>In Vitro</i> .....	123
5.2	Modelo <i>In Vivo</i> .....	123
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
7.	ANEXO.....	142



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aberrações genéticas e cromossômicas envolvidas na gênese dos GBMs.....	22
<b>Figura 2.</b> Frequentes alterações em 3 vias de sinalização críticas em GBMs.....	24
<b>Figura 3.</b> Estrutura e fontes do resveratrol.....	29
<b>Figura 4.</b> Vias de absorção, transporte, metabolismo e excreção do resveratrol ....	32
<b>Figura 5.</b> Moléculas com as quais o resveratrol se liga diretamente.....	33
<b>Figura 6.</b> Produtos gênicos modulados pelo resveratrol.....	35
<b>Figura 7.</b> Fontes naturais e estrutura química da quercetina.....	37
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática da absorção, metabolismo e excreção da quercetina em mamíferos.....	40
<b>Figura 9.</b> Características morfológicas ultraestruturais da morte celular por microscopia eletrônica.....	44
<b>Figura 10.</b> As duas principais vias que levam a apoptose .....	48
<b>Figura 11.</b> Ilustração da apoptose e da necrose.....	50
<b>Figura 12.</b> Vias de sinalização envolvidas no processo de indução de senescência.....	53
<b>Figura 13 –</b> Sinalização mediada por ATM/ATR em resposta ao dano ao DNA, no controle do ciclo celular e na indução da apoptose .....	61

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Estado dos genes TP53, PTEN, p16/CDKN2A, p14 <sub>ARF</sub> ou p19 <sub>ARF</sub> em diferentes linhagens de GBMs.....	28
<b>Tabela 2.</b> Comparação das alterações morfológicas dos diferentes tipos de morte celular.....	45

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

- 53BP1** – Proteína Ligada a p53 (*p53 Binding Protein 1*);
- AIF**- Fator Indutor de Apoptose (*Apoptosis-inducing Factor*);
- AKT** - Homóloga Celular ao Oncogene Viral v-**AKT**. Também conhecida como PKB - Proteína cinase B;
- Amp** – Amplificado;
- AMPK** – Proteína Cinase Ativada por Adenosina Monofosfato (*Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase*);
- AP-1** - Proteína Ativadora 1 (*Activator Protein 1*);
- APAF-1** – *Apoptotic Protease Activating Factor 1*;
- ATM** - Proteína Mutada da Ataxia Telangiectasia (*Ataxia Telangiectasia Mutated*);
- ATR** - Proteína relacionada à ATM e Rad3 (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 related*);
- Bak** - Antagonista de Morte Bcl-2 (*Bcl2 Antagonist Killer*)
- Bax** - Proteína Bcl2 Associada ao X (*Bcl2-associated X Protein*);
- Bcl-2** - Proteína 2 de Linfoma de Células B (*B-cell Lymphoma Protein 2*);
- Bcl2L 12** – Bcl2 tipo 12 (*Bcl2 Like 12*);
- Bcl-xl** - Proteína de Isoforma Longa Relacionada a Bcl2 (*Bcl2 Related Protein, Long Isoform*);
- BER** – Reparo por Excisão de Bases (*Base Excision Repair*);
- bFGF** – Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico (*basic Fibroblast Growth Factor*);
- Bid** - Domínio Agonista de Morte de Interação com BH3 (*BH3 Interacting Domain Death Agonist*);
- BRCA1** - Câncer de Mama 1 (*Breast Cancer 1*);
- CAT** – Catalase;
- CCND2** – Ciclina D2;
- CDK** - Cinase Dependente de Ciclina (*Cyclin-dependent Kinase*);
- Chk1**- Cinase de Ponto de Checagem 1 (*Checkpoint Kinase 1*);
- Chk2** - Cinase de Ponto de Checagem 2 (*Checkpoint Kinase 2*);
- c-myc** - Oncogene **myc**;
- COMT** - Catecol-O-metiltransferase;
- COX-2** - Ciclooxigenase 2;
- CRP** - Protein C-reativa (*C-reactive Protein*);

**CYP 450** – Citocromo P450 (*Cytochrome P450*);

**DHFR** – Diidrofolato Redutase (*Dihydrofolate Reductase*);

**DISC** – Complexo Sinalizador Indutor de Morte (*Death-Inducing Signaling Complex*);

**DNA-PKcs** - Proteína Cinase Dependente de DNA (*DNA-dependent Protein Kinase*);

**EGFR** - Receptor de Fator de Crescimento Epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*);

**Egr-1** – Resposta Iniciadora de Crescimento (*Early growth response-1*);

**ELAM-1** – Molécula de Adesão Endotelial de Leucócitos (*Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1*);

**EndoG** - Endonuclease **G**;

**ER** - Receptor de Estrógeno (*Estrogen Receptor*);

**ERBB** - Homólogo 2 do Oncogene Viral da Leucemia Eritroblástica (*Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2*);

**ERK** - Cinase Regulada Extracelularmente (*Extracellularly Regulated Kinase*);

**FADD/ TRADD** - Domínio de Morte Associado a Fas/Domínio de Morte Associado a TNFR1 (*Fas-associated Death Domain/TNFR1-associated Death Domain*);

**Fas** - Ácido Graxo Sintetase (*Fatty Acid Synthetase*);

**FOXO** - *Forkhead Box-containing Protein O*;

**GBM** - Glioblastoma;

**GLCRES** - Resveratrol-3-O- $\beta$ -glicosídeo;

**GLURES** - Resveratrol-3-O- $\beta$ -glucuronídeo;

**GLUT4** – Transportador de Glicose Responsivo a Insulina 4 (*Insulin-responsive Glucose Transporter 4*);

**GM-CSF** – Fator Estimulador de Colônia de Granulócito-Macrófagos (*Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor*);

**GPx** - Glutaciona Peroxidase;

**GSK-3 $\beta$**  - Glicogênio Sintase Cinase-3 (*Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$* );

**$\gamma$ H2AX** – Fosfo-histona **H2AX**;

**HDAC** – Histona Desacetilase (*Histone Deacetylase*);

**HDAi** – Inibidor de Histona Desacetilase (*Histone Deacetylase inhibitor*);

**HIF** – Fator Indutor de Hypoxia (*Hypoxia Inducing Factor*);

**HR** - Recombinação Homóloga (*Homologous Recombination*);

**hTERT** - Telomerase Transcriptase Reversa Humana (*human Telomerase Reverse Transcriptase*);  
**IAP** - Proteína Inibidora da Apoptose (*Inhibitor of Apoptosis Protein*);  
**ICAM** - Molécula de adesão intracelular (*Intracellular Adhesion Molecule*);  
**IFN- $\gamma$**  – Interferon  $\gamma$ ;  
**IKB** - Fator de Inibição KB (*Inhibition Factor KB*);  
**IL**- Interleucina;  
**iNOS** - Óxido Nítrico Sintase Induzível (*inductible Nitric Oxide Synthase*);  
**I.v.** – Intravenoso;  
**JNK** - c-Jun N-terminal Cinase (*c-Jun N-terminal Kinase*);  
**LDL** - Lipoproteína de Baixa Densidade (*Low Density Lipoprotein*);  
**LMP**– Permeabilização da Membrana Lisossomal (*Lysosome Membrane Permeabilization*);  
**LOH** – Perda da Heterozigozidade (*Loss of Heterozygosity*);  
**5-LOX** - 5-Lipoxigenase;  
**LY** - LY294002;  
**MAPK** - Proteína Cinase Ativada por Mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinase*);  
**MDC1** - Proteína de Ponto de Checagem 1 Mediadora de Dano ao DNA (*Mediator of DNA Damage Checkpoint Protein - 1*);  
**MDM** - *Murine Double Minute*;  
**MEK** - Cinase Ativadora de ERK Ativada por Mitógenos (*Mitogen activated ERK activating Kinase*);  
**MET** - Fator de Transição Mesenquimal-epitelial (*Mesenchymal-epithelial Transition Factor*);  
**MMP** - Metaloproteinase de Matriz (*Matrix Metalloproteinase*);  
**MMR** - Reparo de Erros de Emparelhamento de Bases (*Mismatch Repair*);  
**MOMP** – Permeabilização da Membrana Mitocondrial Externa (*Mitochondrial Outer-Membrane Permeabilization*);  
**mTOR** – Proteína Alvo de Rapamicina de Mamíferos (*mammalian Target Of Rapamycin*);  
**Mut** – Mutado;  
**NAG1** - beta-(1,4)-**N**-acetylglucosaminidase ;  
**NER** – Reparo por Excisão de Nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair*);

**NHEJ**- Recombinação por Junção de Pontas Não Homólogas (*Non-homologous End Joining Recombination*);

**NF1** – Neurofibromatose 1 (*Neurofibromatosis 1*);

**NFκB**- Fator Nuclear kappa B (*Nuclear Factor kappa B*);

**NQO2**- *NAD(P)H:quinone Oxidoreductase 2*;

**NRF-2** – Fator Nuclear Respiratório 2 (*Nuclear Respiratory Factor 2*);

**OMS** – Organização Mundial de Saúde;

**PCNA** – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*;

**PDGF/R** – Receptor de Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (*Platelet-derived Growth Factor Receptor*);

**PI3K** – Fosfatidilinositol 3-cinase (*Phosphoinositide 3-kinase*);

**PIP3** - Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (*Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*);

**PKC** - Proteína Cinase C (*Protein Kinase C*);

**POG** - Privação de Oxigênio e Glicose;

**PPAR** – *Peroxisome Proliferator Activated Receptors*;

**PTEN** - Proteína Homóloga Fosfatase/tensina Deletada do Cromossomo 10 (*Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10*);

**RB** – Retinoblastoma;

**RIP1** – Proteína de Interação ao Receptor 1 (*Receptor-interacting Protein 1*);

**ROS** – Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*);

**RTK** - Receptores de Tirosina Cinase (*Receptors of Tyrosin Kinase*);

**SCF** - Skp1-Cul1-F-box-proteína Ubiquitina Ligase (*Skp1-Cul1-F-box-protein Ubiquitin Ligase*);

**SE** - Superexpresso;

**SIRT** – Sirtuína;

**SOD** - Superóxido Desmutase;

**SPARC** - Proteína Ácida Secretada Rica em Cisteína (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*);

**STAT** - Transdutor de Sinal Ativador de Transcrição (*Signal Transducer and Activator of Transcription*);

**suLRES**- Resveratrol-3-sulfato;

**tBid** - Bid truncada (*truncated Bid*);

**TGF** - Fator de Crescimento Tumoral (*Tumor Growth Factor*);

**TMZ** – Temozolamida;

**TNF** - Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor*);

**tPA** – Ativador de Plasminogênio Tecidual (*tissue Plasminogen Activator*);

**TRAF2** - Fator Associado ao Receptor TNF2 (*TNF Receptor-associated Factor 2*);

**TRAIL** – Ligante Indutor de Apoptose Relacionado a TNF (*TNF-related Apoptosis Inducing Ligand*);

**Trx1** - *Thioredoxin-1*;

**uPA** – Urocinase ativadora de plasminogênio (*urokinase Plasminogen Activator*);

**VCAM-1** – Molécula de Adesão Celular Vascular (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*);

**VEGF**- Fator de Crescimento Vascular Endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*);

**XIAP** - Proteína Inibidora de Apoptose Ligada ao X (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*);

## RESUMO

Dentre os tumores cerebrais primários, o glioblastoma (GBM) é o mais comum, apresentando alta taxa de mortalidade e morbidade. O tratamento convencional desses tumores tem surtido pouco efeito, com alta taxa de recorrência e progressão da doença. Neste trabalho, buscou-se aprimorar o conhecimento sobre a biologia destes tumores e, utilizando polifenóis amplamente distribuídos na natureza, procurar novas formas de terapia. Nesta tese demonstrou-se que o tratamento com resveratrol e quercetina diminuíram o número de células de maneira tempo e dose dependente em linhagens de GBM humano (U87 e U138), de camundongo (GL261) e de rato (C6), sendo a última a mais sensível e a utilizada neste trabalho. Esse efeito foi observado apenas em linhagens tumorais, não ocorrendo em cultura primária de astrócitos. Resveratrol em altas doses (50  $\mu\text{M}$ ) induziu apoptose, necrose e parada no ciclo celular. Agudamente, o tratamento com doses baixas de resveratrol (10  $\mu\text{M}$ ) mais quercetina (25  $\mu\text{M}$ ) – 24 a 72 h - induziu apoptose, enquanto cronicamente – 12 dias – induziu senescência celular. Esses efeitos não ocorreram quando esses compostos foram utilizados isoladamente. Até então, a indução de senescência pela combinação destes compostos não tinha sido demonstrada. Como provável mecanismo de ação demonstrou-se que o tratamento combinado destes polifenóis induziu senescência através da indução de quebra dupla de DNA e ativação da via da p53. O tratamento com as drogas isoladas não induziu dano ao DNA. A partir de então, investigou-se o efeito destes compostos em um modelo *in vivo* de implante de gliomas em ratos. Inesperadamente, a quercetina (50 mg/kg/dia intraperitoneal (i.p.)) induziu aumento do volume tumoral, o que não foi observado com o resveratrol (30 mg/kg/dia i.p.) e com a combinação de resveratrol mais quercetina. Para explicar este efeito prevalente do resveratrol nós elaboramos as seguintes hipóteses: 1. necrose/angiogênese: por diminuir a necrose o resveratrol pode ter diminuído a angiogênese, que pode ter sido aumentada pela quercetina; 2. Modulação do sistema imunológico: a quercetina foi capaz de imunossuprimir os animais (por diminuir a proliferação das células T-periféricas após estimulação por fitohemaglutinina e concanavalina A) e a combinação de resveratrol mais quercetina aumentou a estimulação das células T periféricas. Hipoteticamente, atribuiu-se a divergência entre o efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo* à ausência de senescência neste último, o que pode ser indicado pela ausência da diminuição do índice mitótico. Além disso, o estresse da cultura, um fator indutor de senescência celular, é perdido no modelo *in vivo*. Com base nos resultados aqui apresentados conclui-se que o resveratrol e a quercetina possuem um potencial antitumoral em gliomas *in vitro* que precisa de estudos mais aprofundados *in vivo* para melhorar o conhecimento dos efeitos exercidos por estes afim de se estabelecer uma dose segura para o tratamento dessa e de outras doenças para as quais essas moléculas possam vir a ser utilizadas.



## ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most common primary brain tumor, with high mortality and morbidity. The conventional treatment of these tumors has little effect, with high recurrence and progression of the disease. In this work, we set out to better understand the biology of these tumors, looking for new treatment approaches, and, by using polyphenols widely spread on nature, seek for new forms of therapy. In this thesis we demonstrated that the resveratrol and quercetin treatment decreased the cell number in a time and dose dependent manner in GBM cell lines from human (U87 and U138), mouse (GL261) and rat (C6) being the last the most sensitive and therefore the cell line used in this work. This effect was not observed in primary astrocyte cell culture. Higher doses of resveratrol (50  $\mu$ M) induced apoptosis, necrosis and cell cycle arrest. Acutely, the treatment of lower doses of resveratrol (10  $\mu$ M) plus quercetin (25  $\mu$ M) – 24 to 72 h - induced apoptosis while chronically – 12 days – this treatment induced cell senescence. These effects did not occur when the compounds were utilized alone. Until now, the induction of senescence by the combination of these compounds had not been demonstrated. As a probable mechanism of action it was showed that the cotreatment of these polyphenols induced senescence through inducing DNA damage by generating DNA double strand breaks and activating the p53 pathway. The treatment with the drugs alone did not induce DNA damage. These findings lead us to investigate the effect of these compounds in an *in vivo* rat glioma experimental model. Unexpectedly, quercetin (50 mg/kg/day) induced an increase in the tumor volume, which was not observed for resveratrol (30 mg/kg/dia) and the combination of the resveratrol plus quercetin. To explain this prevalent effect of resveratrol it was elaborated the following hypotheses: 1. necrosis/angiogenesis: by decreasing the necrosis, resveratrol can diminish the angiogenesis, that can be increased by quercetin; 2. modulation of immunological system: quercetin was able to immunosuppress the animals (by diminishing the peripheral T-cells proliferation upon phytohemmagglutinin and concanavalin A stimulation) and the combination of resveratrol plus quercetin increased the peripheral T-cell proliferation. Hypothetically, the divergence between the *in vitro* and *in vivo* antitumoral effect was attributed to the absence of senescence induction in the latter that can be indicated by the lack of mitotic index decrease. Besides, the culture stress, a senescence inductor factor, is lost in the *in vivo* model. Based in the results presented here, we concluded that resveratrol and quercetin have a potential antitumoral effect in GBM *in vitro* and this potential needs more *in vivo* studies to better harvest this potential and to establish a safe concentration to treat this and other diseases in which these compounds could be used.

## APRESENTAÇÃO

Esta tese está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: **Introdução**; **Desenvolvimento** - artigo científico publicado e artigos a serem submetidos; **Discussão**; **Conclusões**; **Perspectiva**; **Referências Bibliográficas** e **Anexos**.

A **Introdução** apresenta o embasamento teórico que nos levou a formular a proposta do trabalho e os objetivos gerais e específicos desta tese.

Os materiais, métodos, resultados e as referências específicas de cada artigo encontram-se no corpo de cada trabalho, os quais estão apresentados na forma de artigos científicos denominados capítulos 1, 2 e 3 da seção de **Desenvolvimento**.

A seção **Discussão** contém uma interpretação geral e uma análise global dos resultados obtidos nos diferentes trabalhos, bem como a formulação das novas hipóteses que surgiram com este trabalho.

A seção **Conclusões** aborda as principais conclusões obtidas neste trabalho.

A seção **Perspectivas** suscita as novas idéias propostas para testar as novas hipóteses que as conclusões geraram.

A seção **Referências Bibliográficas** cita as referências utilizadas na seção introdução e discussão.

Na seção **Anexo** encontra-se o *Curriculum Vitae* modelo padrão lattes/CNPq da autora deste trabalho.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Gliomas

### 1.1.1 Epidemiologia

Gliomas são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso central, correspondendo a 70 % de todos os tumores cerebrais primários. O mais comum e maligno de todos os gliomas é o glioblastoma (GBM - glioma de grau IV, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)). A incidência anual de gliomas malignos é aproximadamente 7 casos para cada 100 mil pessoas. A cada ano, mais de 20 mil novos casos são diagnosticados nos Estados Unidos (OHGAKI *et al.*, 2004; OHGAKI E KLEIHUES, 2005; LOUIS *et al.*, 2007). Embora relativamente incomuns, os gliomas malignos apresentam alta taxa de morbidade e mortalidade, apresentando uma sobrevida média de apenas 12 a 15 meses para pacientes com GBM e 2 a 5 anos para pacientes com glioma anaplásico (WEN E KESARI, 2008).

Em consonância com o observado em outros países do mundo, os registros de câncer no Brasil revelam um aumento das taxas dos tumores malignos de cérebro. As taxas de mortalidade por esta doença, ajustadas por idade pela população mundial, cresceram de 5,85/100 mil pessoas/ano em 1975 para 6,4/100mil pessoas/ano nos Estados Unidos (CBTRUS, 2009) e no Brasil, passou de 2,24/100 mil em 1970 para 3,35/100 mil em 1998, correspondendo a um aumento de 50 % (MONTEIRO E KOIFMAN, 2003). A incidência do tumor é maior em homens do que em mulheres (7,45 versus 5,17/100 mil pessoas/ano) e o risco de desenvolver este câncer durante a vida é de 0,65 % para homens e 0,5 % para mulheres (CBTRUS, 2009). A incidência de GBM em caucasóides é aproximadamente o dobro da de negróides (CBTRUS, 2009) e maior do que asiáticos (KURATSU *et al.*, 2001), dado válido também para crianças (STILLER E NECTOUX, 1994). Segundo estudo realizado por Monteiro e Koifman (2003), o óbito por câncer de cérebro corresponde a 4,4 % do total de mortes por câncer no Brasil, tendo maior prevalência em indivíduos acima dos 65 anos.

Alguns autores (PRESTON-MARTIN, 1996; LEGLER *et al.*, 1999), consideraram a tendência ascendente das taxas de incidência de tumores de cérebro um artefato relacionado à introdução de técnicas diagnósticas mais precisas e menos invasivas (tomografia computadorizada de crânio e ressonância

magnética), ao aumento dos registros, à ampliação do acesso à atenção médica para as várias camadas da população, à modificação na composição etária populacional levando a um aumento da população idosa. Outros autores sugerem uma forte participação de fatores genéticos, hormonais e ambientais (BOHNEN E KURLAND, 1995). Condições relacionadas com os antecedentes patológicos pessoais como traumatismo craniano, epilepsia, viroses e outras infecções, padrão de dieta, contato com animais, exposição domiciliar a pesticidas e exposição à radiação eletromagnética (ionizante e não ionizante), têm sido associadas ao aumento do risco para câncer de cérebro (PRESTON-MARTIN, 1996). A exposição ocupacional a derivados do petróleo, a produção de borracha e agroquímicos também tem sido relacionada a um maior risco de desenvolvimento da doença (BREM *et al.*, 1995; INSKIP *et al.*, 1995).

Outro problema relacionado aos gliomas são os gastos anuais diretos e indiretos com os pacientes, que nos Estados Unidos podem chegar a 104 bilhões de dólares (TURINI E RADAELLI, 2001). Apesar disso, este tumor permanece incurável, e, mesmo lançando mão dos tratamentos atualmente disponíveis, (cirurgia e/ou quimioterapia e/ou radioterapia) a sobrevida média ainda é baixa e a porcentagem de pacientes que sobrevivem mais de 5 anos é de apenas 3 a 10 % (STUPP *et al.*, 2009). Outro fator importante de mencionar é que a qualidade de vida destes pacientes desde o diagnóstico até o óbito é extremamente prejudicada. O paciente pode apresentar ataques epiléticos, perda da audição ou visão, fraqueza, comprometimento motor, dificuldades para falar ou caminhar e alterações de personalidade e raciocínio (TURINI E RADAELLI, 2001). Muitos pacientes com glioma vêm a óbito devido à progressão local da doença ou de outras complicações associadas, como trombose e embolia pulmonar (PYTEL E LUKAS, 2009). Metástases sistêmicas destes tumores são extremamente raras (TEMPLETON *et al.*, 2008).

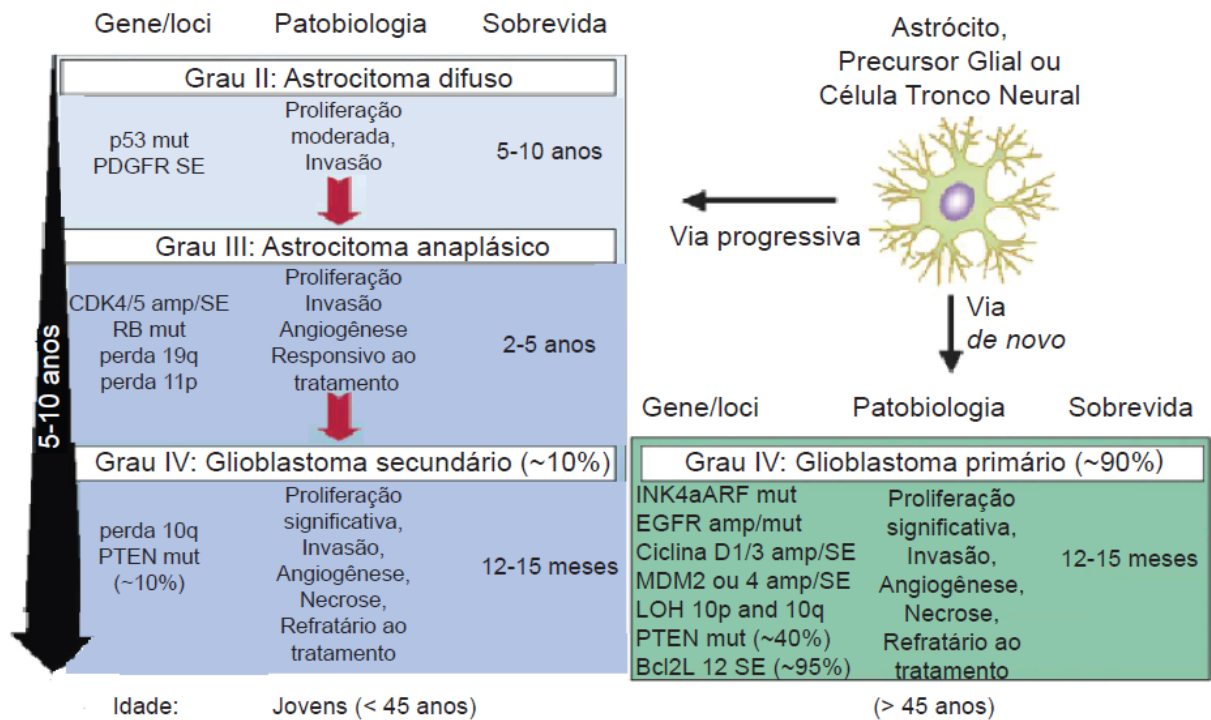
### **1.1.2 Patologia e Etiologia**

Gliomas são histologicamente heterogêneos e invasivos e são classificados de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS, que os dividem em 4 graus de malignidade baseado nas características histopatológicas e no prognóstico destes (KLEIHUES *et al.*, 2000; LOUIS, *et al.*, 2007). Gliomas de grau I, conhecidos como

astrocitoma pilocítico, são geralmente benignos, podendo ser curados por cirurgia; gliomas de grau II, ou astrocitoma difuso, possuem baixo grau de malignidade, mas dificilmente são curáveis por cirurgia, tendo uma sobrevida média de 10 a 15 anos; gliomas de grau III, astrocitoma anaplásico, são malignos e levam à morte em até 5 anos; glioma de grau IV, conhecido como GBM, possui alto grau de malignidade, sendo letal dentro de 12 a 15 meses. Setenta por cento dos tumores de grau II transformam-se em grau III ou IV em 5 a 10 anos (HOLLAND, 2001a).

Os astrocitomas anaplásicos são caracterizados por celularidade aumentada, atipia nuclear e alta atividade mitótica. Os GBMs contêm áreas proeminentes de proliferação microvascular, necrose ou ambos. Variantes pouco comuns de GBMs incluem gliosarcomas, que contêm elementos sarcomatosos; GBM de células gigantes, que possuem células gigantes multinucleadas; GBM de pequenas células, que são associados com amplificação do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor*) e GBM com aspecto oligodendroglial, que são associados ao melhor prognóstico dentro dos GBMs (LOUIS *et al.*, 2007).

GBMs primários e secundários são subtipos distintos de doenças, afetando pacientes de diferentes idades e se desenvolvendo através de diferentes mecanismos (KLEIHUES *et al.*, 2007). A maioria dos casos (aproximadamente 90 %) são GBMs primários, que se desenvolvem rapidamente *de novo*, sem evidências clínicas ou histológicas de lesões malignas precursoras e acometem principalmente indivíduos idosos. GBMs secundários desenvolvem-se através da progressão de um glioma de baixo grau, como astrocitoma difuso ou astrocitoma anaplásico e se manifestam em indivíduos mais jovens (KLEIHUES *et al.*, 2007). Detalhes gerais que caracterizam a maioria dos glioma estão ilustrados na figura 1.



**Figura 1- Aberrações genéticas e cromossômicas envolvidas na gênese dos GBMs.** SE – Superexpresso, amp – amplificado, mut – mutado. PTEN - Proteína homóloga fosfatase/tensina deletada do cromossomo 10 (*Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*); PDGFR – Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor receptor*); CDK- cinase dependente de ciclina (*Cyclin-dependent Kinase*); RB- Retinoblastoma; MDM - *Murine Double Minute*; LOH – perda da heterozigiosidade (*loss of heterozygosity*); Bcl2L 12 – *Bcl2 like 12*. Adaptado de FURNARI *et al.*, 2007.

A origem celular dos GBMs primários ainda é motivo de controvérsia. Estudos mais antigos propõem uma origem através de uma célula glial madura, já diferenciada, que adquiriria características de célula-tronco através de sucessivas mutações, transformando-se em um tumor. Esta hipótese advém do fato de que muitos gliomas possuem similaridades morfológicas e compartilham alguns marcadores específicos com astrócitos, como a proteína glial fibrilar ácida, S100B, etc. (VAN MEIER, 2009). Além disso, estas células seriam as únicas com capacidade proliferativa no cérebro adulto. Porém, com a descoberta das células-tronco cerebrais, no início da década de 90 (REYNOLDS E WEISS, 1992; LOIS E ALVAREZ-BUYLLA, 1993), e com a descoberta de que algumas células de leucemia se originavam de células-tronco (BONNET E DICK, 1997), surgiu a hipótese de que as células tumorais cerebrais se originariam de células-tronco indiferenciadas que, ao sofrerem alterações genéticas, derivariam células tumorais (PARDAL *et al.*, 2003). Essa hipótese foi reforçada após a observação de que células tumorais que expressam um marcador de células-tronco (CD133) possuem uma capacidade

aumentada de originar tumores quando implantadas em cérebro de camundongo (SINGH *et al.*, 2004b). Além disso, muitos gliomas possuem similaridades com outros tipos de células gliais, apresentando, muitas vezes dentro do mesmo tumor, características de astrócitos e oligodendrócitos (HOLLAND, 2001b). Ambas as hipóteses são aceitas, porém a da origem através de células tronco tumorais tem ganhando força conforme o surgimento de novas evidências (SINGH *et al.*, 2004a).

### 1.1.3 Tratamento

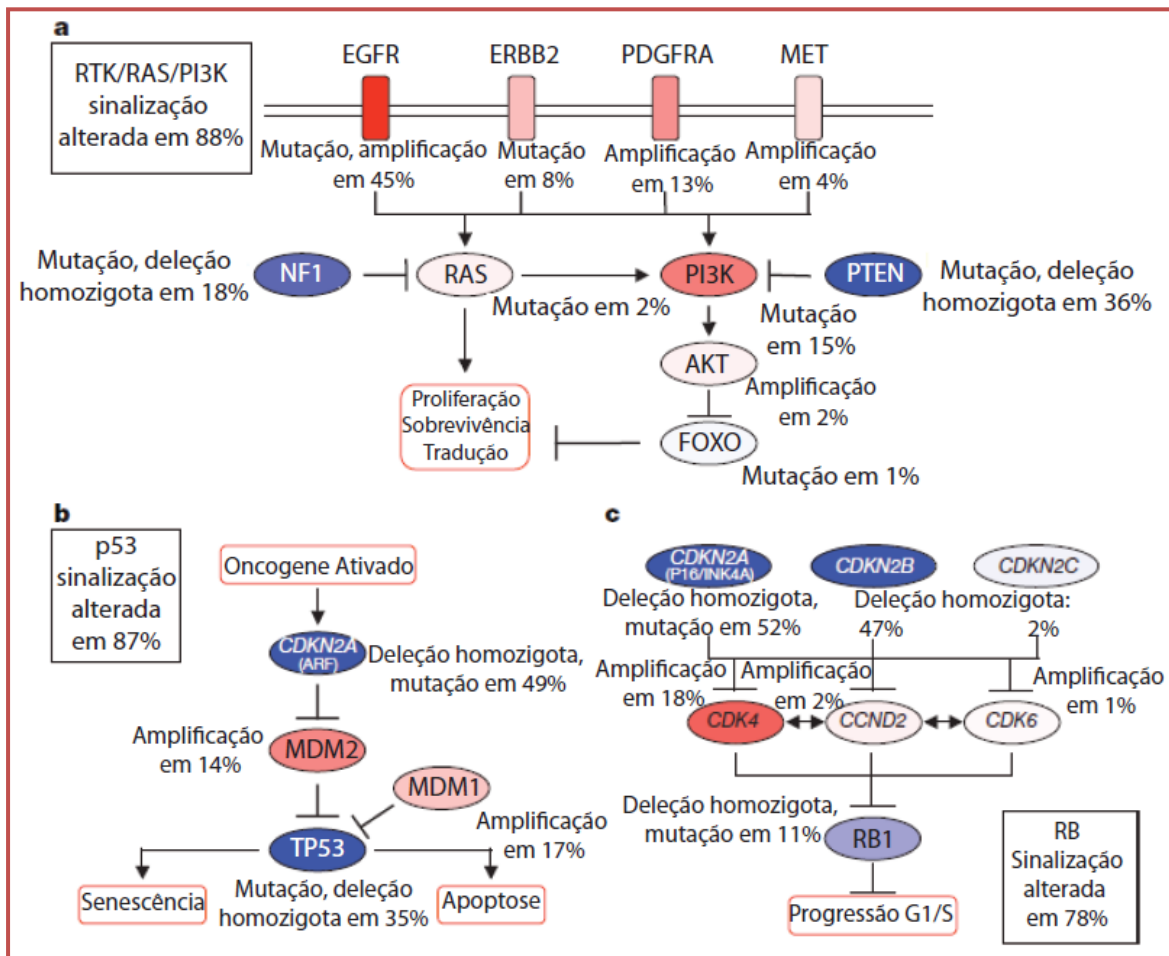
O tratamento para GBM recém diagnosticado consiste em ressecção cirúrgica máxima seguida de radioterapia e tratamento concomitante com o adjuvante temozolamida (TMZ). Outro adjuvante utilizado é a carmustina em cápsulas de biopolímeros implantadas diretamente na cavidade criada pela ressecção cirúrgica. Ao se dissolver lentamente, a cápsula vai liberando a carmustina diretamente no local onde havia a lesão (este medicamento é conhecido comercialmente como GLIADEL<sup>®</sup> Wafer, WESTPHAL *et al.*, 2003; GLIADEL, 2010). GBMs recorrentes são reoperados e tratados com carmustina (GLIADEL) ou outros quimioterápicos convencionais (iomustina, procarbazina, carboplatina, irinotecan, etoposídeo), bevacizumab mais irinotecan e/ou terapias experimentais (revisado em SATHORNSUMETEE *et al.*, 2007).

Com o avanço sobre o conhecimento da biologia dos gliomas, novos tratamentos têm sido propostos e testados, dentre eles terapia antiangiogênica (com anticorpos monoclonais anti-VEGF - fator de crescimento vascular endotelial - *vascular endothelial growth factor*), pequenas moléculas inibidoras de tirosina cinase, anticorpos, RNA interferente e terapia gênica. Porém, muito ainda precisa ser feito para compreender melhor as características moleculares desta doença, a fim de aumentar a sobrevida destes pacientes ou até mesmo curá-los (YAMANAKA E SAYA 2009).

### 1.1.4 Principais Alterações Genéticas

Um estudo recente realizado pelo *Cancer Genome Atlas Research Network* (2008) mapeou as alterações genéticas dos gliomas e as separou em 3 grupos principais: alterações nas vias de sinalização mediada por receptores de tirosina

cinase (RTK – *receptor of tyrosine kinase*), alterações na via da p53 e na via da proteína supressora de tumor RB, conforme ilustra a figura 2.



**Figura 2 – Frequentes alterações em 3 vias de sinalização críticas em GBMs.** a-c: Alterações nas sequências primárias e mudanças significantes no número de cópia dos componentes das vias de sinalização RTK, RAS/PI3K (fosfatidilinositol 3 cinase – *phosphoinositide 3 kinase*) (a), p53 (b) e RB (c). Vermelho indica alterações genéticas ativadoras, com genes frequentemente alterados em vermelho mais intenso. Azul indica alterações inativadoras, com azul escuro correspondendo a maior porcentagem de alteração. CCND2 – ciclina D2; NF1- neurofibromatose 1 (*neurofibromatosis 1*); FOXO - *forkhead box-containing protein O*; ERBB2 - homólogo 2 do oncogene viral da leucemia eritroblástica (*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*); MET - fator de transição mesenquimal-epitelial, (*mesenchymal-epithelial transition factor*); AKT - Homóloga Celular ao Oncogene Viral v-AKT (Também conhecida como PKB - Proteína cinase B). Adaptado de CANCER GENOME ATLAS, 2008.

#### 1.1.4.1 Alterações na Via de Sinalização Mediada por RTK

RTK são uma família de proteínas transmembrana que exibem grande diversidade nas regiões extracelulares, entretanto compartilham um domínio tirosina cinase intracelular bastante conservado (ROBINSON *et al.*, 2000). A sinalização intracelular é disparada pela oligomerização e ativação do domínio tirosina cinase e a subsequente fosforilação de múltiplos substratos que, por sua vez, recrutam



proteínas de associação, levando à ativação de Ras, PI3K, entre outros. Estas vias podem levar à diferenciação e ao crescimento celular (SCHLESSINGER, 2000). Estes receptores representam a maior classe de protooncogenes envolvidos na progressão e na metástase de células cancerosas (ULLRICH E SCHLESSINGER, 1990). Por esta razão, vários RTK são intensamente estudados na busca de alvos para intervenção terapêutica (ZWICK *et al.*, 2001).

Dentre os diferentes tipos de RTK, os EGFR, PDGFRA, MET, ERBB2, são encontrados alterados em gliomas. A amplificação do EGFR ocorre em aproximadamente 40 % dos GBMs primários (OHGAKI *et al.*, 2004; *CANCER GENOME ATLAS*, 2008) e raramente nos secundários (OHGAKI *et al.*, 2004), o ERBB2 (8 %), PDGFRA (13 %), e MET (4 %) estão alterados em GBMs (*CANCER GENOME ATLAS*, 2008).

Receptores de fatores de crescimento, tais como EGFR e outros citados acima, tornam-se ativados quando o ligante (exemplo EGF ou TGF – fator de crescimento tumoral - *tumor growth factor*) liga-se ao receptor e este recruta a PI3K para a membrana. PI3K fosforila e ativa alvos como a proteína AKT e a proteína alvo de rapamicina de mamífero (mTOR - *mammalian target of rapamycin*) que resultam em proliferação e sobrevivência. A PTEN que geralmente atua como supressor tumoral inibindo a sinalização mediada por PI3K por defosforilar o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3 - *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*), pode também estar associada a gliomagenese devido à perda de função originada por mutações (CANTLEY E NEEL, 1999). A PTEN está mutada em 15 a 40 % dos GBMs e quase exclusivamente em GBMs primários (DUERR *et al.*, 1998; OHGAKI *et al.*, 2004).

Mutações ou deleções homozigotas no supressor tumoral NF1 são encontradas em 23 % dos GBMs. O silenciamento do NF1 pode ativar a via da Ras, que causa proliferação celular descontrolada. Mutações do complexo da PI3K causando a expressão constitutiva desta são registradas em 15 % das amostras de GBMs (*CANCER GENOME ATLAS*, 2008).

#### **1.1.4.2 A Via do Supressor Tumoral p53**

O supressor tumoral p53 é um fator de transcrição com uma alta atividade antitumoral que é controlada por seu regulador negativo MDM2 através de um mecanismo de retroalimentação. O produto do oncogene MDM2 é uma ubiquitina

ligase que está superexpressa em muitos tumores. Ele liga em p53 e inibe sua função por modular sua atividade transcricional e promover sua degradação. O gene p14<sub>ARF</sub> codifica uma proteína que liga diretamente em MDM2 e inibe a degradação de p53 (KAMIJO *et al.*, 1998; POMERANTZ *et al.*, 1998).

Mutações no gene da p53 são as primeiras alterações genéticas detectáveis em dois terços dos astrocitomas difusos. Esta frequência é similar em astrocitoma anaplásico e em GBMs secundários, derivados dos antecessores. Mutação no gene da p53 também ocorre como um evento em GBMs primários (*CANCER GENOME ATLAS*, 2008). Mutações ou deleções homozigotas do gene da p53 foram encontradas em 35 % dos casos em um estudo de coorte consistindo predominantemente de GBMs primários. Amplificação de MDM2 está presente em 14 % dos GBMs (*CANCER GENOME ATLAS*, 2008) e exclusivamente em GBMs primários sem a mutação no gene de p53 (REIFENBERGER *et al.*, 1993). A perda da expressão de p14<sub>ARF</sub> é observada frequentemente em GBMs (76 %), e está correlacionada com deleção homozigota ou metilação do promotor do gene p14<sub>ARF</sub> (NAKAMURA *et al.*, 2001) sendo a última mais freqüente em GBM secundário do que em primário (NAKAMURA *et al.*, 2001).

#### 1.1.4.3 A Via da Proteína RB

RB controla a progressão no ciclo celular através da passagem da fase G1 para a fase S. O complexo CDK4/ciclina-D1 fosforila RB, induzindo a liberação do fator de transcrição E2F, que ativa genes envolvidos nesta transição (SHERR E ROBERTS, 1999). p16<sub>INK4a</sub> liga a CDK4, inibindo o complexo CDK4/ciclina D1, inibindo assim a progressão de G1 para S. Dessa forma, a perda da função normal de RB pode resultar da expressão alterada dos genes de p16<sub>INK4a</sub> e CDK4, bem como a perda da própria proteína através de alterações no seu próprio gene. A via da p16<sub>INK4a</sub>/RB parece ser uma via importante tanto em GBM primário quanto em secundário. Deleção homozigota de p16<sub>INK4a</sub> foi mais freqüente em GBM primário do que em secundário (NAKAMURA *et al.*, 2001), mas não houve diferença significativa na frequência total das alterações de p16<sub>INK4a</sub> (como deleção ou metilação do promotor) (NAKAMURA *et al.*, 2001). Amplificação do gene CDK4 foi visto em 18 % e deleção homozigota ou mutação no gene RB foi vista em 11 % (*CANCER GENOME ATLAS*, 2008).

### 1.1.5 Linhagens tumorais

Historicamente, uma das principais dificuldades para descobrir novas drogas para o tratamento de câncer e prever sua atividade clínica é a falta de um modelo em laboratório que recapitule a total complexidade da doença. No entanto, linhagens celulares derivadas de tumores têm sido amplamente utilizadas para estudo da biologia tumoral bem como para avaliação de potenciais agentes candidatos a quimioterápicos. Embora células cultivadas às vezes possuam propriedades distintas daquelas que as originaram, recentes tecnologias que facilitam a análise em paralelo de diversas linhagens juntamente com a análise genômica, que define as características genéticas de cada uma, tem tornado essa ferramenta de estudo bastante eficaz na investigação de novas drogas bem como na predição de biomarcadores moleculares (SHARMA *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de linhagens celulares comerciais tem como principal vantagem o fato de constituírem uma fonte quase inesgotável de amostras celulares com relativa uniformidade de características biológicas. Outra vantagem deste modelo é que estas linhagens são capazes de formar tumores quando implantadas em animais, permitindo um melhor entendimento acerca da patofisiologia do tumor *in vivo*, isto é, o estudo das interações com o microambiente tumoral, invasão ao tecido circundante, metástases, entre outros. Além disso, este modelo permite um melhor estudo a respeito de drogas com potenciais quimioterápicos (SHARMA *et al.*, 2010).

No estudo de gliomas, o desenvolvimento de linhagens celulares a partir de gliomas humanos ou de animais trouxe grandes avanços a respeito da compreensão destes tumores. Cada linhagem possui características moleculares distintas, permitindo um estudo mais detalhado de cada componente no processo tumoral. As diferentes linhagens utilizadas nesta tese bem como algumas de suas principais características moleculares estão ilustradas na tabela 1.

Tabela 1: Estado dos genes TP53, PTEN, p16/CDKN2A, p14<sub>ARF</sub> ou p19<sub>ARF</sub> em diferentes linhagens de GBMs.

Gene Linhagem	TP53	PTEN	p16/CDKN2A	p14 <sub>ARF</sub> (humanos)ou p19 <sub>ARF</sub> (roedores)
U87-MG <sup>h</sup>	Selvagem <sup>1</sup>	Mutada <sup>1</sup>	Deletada <sup>1</sup>	Deletada <sup>1</sup>
U138-MG <sup>h</sup>	Mutado <sup>1</sup>	Mutada <sup>1</sup>	Deletada <sup>1</sup>	Deletada <sup>1</sup>
U251-MG <sup>h</sup>	Mutado <sup>1</sup>	Mutada <sup>1</sup>	Deletada <sup>1</sup>	Deletada <sup>1</sup>
C6 <sup>r</sup>	Selvagem <sup>2</sup>	Selvagem <sup>3</sup>	Deletada <sup>4</sup>	Deletada <sup>4</sup>
GL261 <sup>c</sup>	Mutado <sup>5</sup>	Deletada <sup>3</sup>	ND	ND

ND – Não Disponível; h - proveniente de humanos; r - proveniente de rato; c - proveniente de camundongo. Fonte: 1 – ISHII *et al.*, 1999; 2 - STOCKMANN-JUVALA *et al.*, 2006; 3 - LEDUR, 2006; 4 - SCHLEGEL *et al.*, 1999; 5 – SZATMÁRI *et al.*, 2006.

## 1.2 Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno)

### 1.2.1 A Molécula

A palavra resveratrol tem origem latina, onde “Res” significa “que veio de”, “*veratrum*” designa a planta onde foi primeiramente descoberta e “ol” indica a presença do grupamento álcool na sua estrutura. O resveratrol foi detectado em mais de 70 espécies de plantas, compreendidas em 32 gêneros (revisado em AGGARWAL *et al.*, 2004). Alguns exemplos estão mostrados na figura 3, tais como uvas (50 - 100 mg/g), vinho tinto (8,7 - 30,7 µM), frutas vermelhas, amendoim, nozes, entre outras (CARERI *et al.*, 2003).



**Figura 3. Estrutura e fontes do resveratrol.** Fonte: HARIKUMAR E AGGARWAL, 2008.

O resveratrol, como o nome refere, foi primeiro isolado da raiz da planta *Veratrum grandiflorum* O.Loes, em 1940 (TAKAOKA) e, quase vinte anos mais tarde, da raiz de uma planta tradicional da cultura chinesa e japonesa Ko-jo-kon (*Polygonum cuspidatum*) por Nonomura e col. (1963). Esta planta era usada na medicina tradicional asiática para tratar dermatite supurativa, gonorréia e dislipidemia (SOLEAS *et al.*, 1997).

O resveratrol é sintetizado nas plantas em resposta a estresses ambientais, tais como radiação UV e ataque de fungos, sendo assim classificado como uma fitoalexina (LANGCAKE E PRYCE, 1976). Por definição, fitoalexina é um produto do metabolismo secundário da planta, ou seja, não é essencial para os processos metabólicos básicos, e é sintetizado *de novo*, no momento em que a planta necessita se defender das condições ambientais adversas (KUC, 1995). No caso das uvas, o resveratrol é produzido quando esta é infestada pelo fungo *Botrytis*

*cinera*. Esta produção ocorre na epiderme da folha e na casca do fruto, não sendo sintetizado na parte carnosa (CREASY E COFFEE, 1988).

O resveratrol pertence à classe dos estilbenos. A estrutura da molécula consiste em dois anéis fenólicos unidos por uma ligação dupla, que permite uma orientação *cis* e *trans* (figura 3), sendo a forma *trans* mais estável e biodisponível. O precursor do resveratrol é a fenilalanina e a enzima estilbeno sintase catalisa a conversão desta em resveratrol (JEANDET *et al.*, 2002). Muitos pesquisadores estão tentando transferir o gene da estilbeno sintase para outras plantas a fim de melhorar a tolerância a fitopatógenos e aprimorar a qualidade nutricional dos alimentos. A transferência deste gene e a detecção do produto resveratrol foram realizadas com sucesso em tabaco, arroz, maçã, trigo, entre outros (revisado em DELAUNOIS *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Resveratrol e a Saúde Humana

Embora a descoberta do resveratrol tenha ocorrido na década de 40, foi apenas nos anos 90 que se iniciaram os primeiros estudos mostrando os efeitos benéficos do resveratrol à saúde humana, quando foi atribuído a ele, ao menos em parte, alguns dos efeitos do “Paradoxo Francês” (KOPP, 1998). Este paradoxo resultou da observação de que a mortalidade por doenças cardiovasculares era relativamente baixa na França, apesar do alto consumo de gorduras saturadas. A única correlação encontrada foi o maior consumo moderado de vinho tinto (2-3 copos/dia). Como o resveratrol está presente no vinho tinto e o consumo desta bebida protege contra doenças cardiovasculares (RENAUD *et al.*, 1998) foi hipotetizado que o resveratrol seria o responsável por estes efeitos, mesmo considerando que o vinho contém diversos outros polifenóis (quercetina, catequinas), taninos e álcool, que também poderiam contribuir para este efeito.

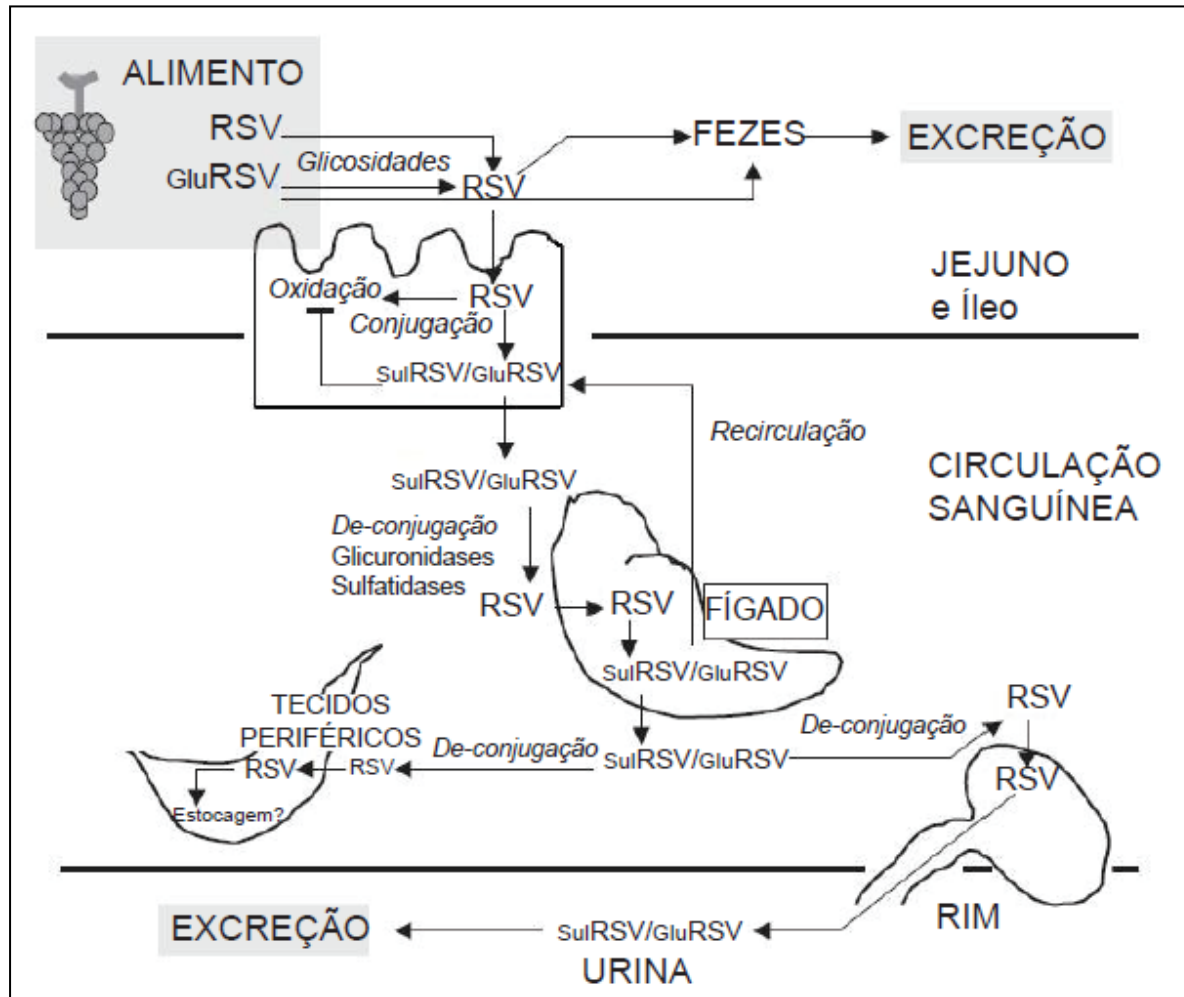
Desde então, dezenas de trabalhos são publicados anualmente mostrando que o resveratrol pode prevenir ou diminuir a progressão de diversas doenças, incluindo câncer (JANG *et al.*, 1997), doenças cardiovasculares (BRADAMANTE *et al.*, 2004) e neurodegenerativas (JANG E SURH, 2003; ZAMIN *et al.*, 2006). Foi demonstrado também que o resveratrol pode mimetizar os efeitos da restrição calórica e prevenir diversos processos do envelhecimento, aumentando a longevidade (BAUR *et al.*, 2006).

### 1.2.3 Farmacocinética e Toxicologia

Um estudo sobre biodisponibilidade do resveratrol em humanos foi realizado por Walle e col. (2004). Neste estudo, 5 e 6 indivíduos saudáveis receberam resveratrol marcado ( $^{14}\text{C}$ ) por via oral (25 mg) ou intravenosa (i.v. - 0,2 mg). A medida da radioatividade total nestes indivíduos demonstrou uma alta absorção (aproximadamente 70 %) após administração via oral, neste caso sem distinguir o resveratrol de seus metabólitos. Muita da radioatividade foi observada na urina (53,4 - 84,9 % e 42,3 - 83,2 % após administração oral e i.v., respectivamente) e nas fezes (0,3 - 38,1 % via oral e 0,6 - 22,7 % via i.v.). A máxima concentração observada no plasma após 1 h de administração via oral foi aproximadamente 22 nM, com um segundo pico após 6 h. Na via i.v. a concentração de resveratrol no plasma foi de 36 - 45 nM e não houve um segundo pico. Após administração i.v., o resveratrol foi distribuído por todo organismo, e provavelmente absorvido pelos tecidos antes de chegar à circulação enterohepática. A meia vida da radioatividade total encontrada no plasma foi de 10 h, para ambas as vias de administração.

Por ser lipossolúvel, o resveratrol consegue atravessar a barreira hematoencefálica e atingir o cérebro. Em um estudo realizado com ratos tratados via oral com 20 mg/kg de resveratrol, a concentração encontrada no cérebro após 10 minutos foi de 0,11 nmol/g (ASENSI *et al.*, 2002), ou seja, 0,46 nM (considerando a densidade do tecido cerebral de 1,04 g/mL (CARROLL *et al.*, 2002)).

O resveratrol é glicuronado no fígado e sulfatado tanto no fígado quanto no duodeno. Os principais derivados do resveratrol são trans-resveratrol-3-O-glicuronídeo, trans-resveratrol-4'-O-glicuronídeo, e trans-resveratrol-3-O-sulfato (YU *et al.*, 2002). Análise cinética da transformação do resveratrol sugere que, no fígado, a glicuronidação é favorecida sobre a sulfatação, com velocidades similares de reação. A absorção do resveratrol se dá basicamente no intestino (figura 4).



**Figura 4. Vias de absorção, transporte, metabolismo e excreção do resveratrol.** <sub>GLC</sub>RES, resveratrol-3-O-β-glicosídeo; <sub>SUL</sub>RES, resveratrol-3-sulfato; <sub>GLU</sub>RES, resveratrol-3-O-β-glicuronídeo. Adaptado de SIGNORELI, 2005.

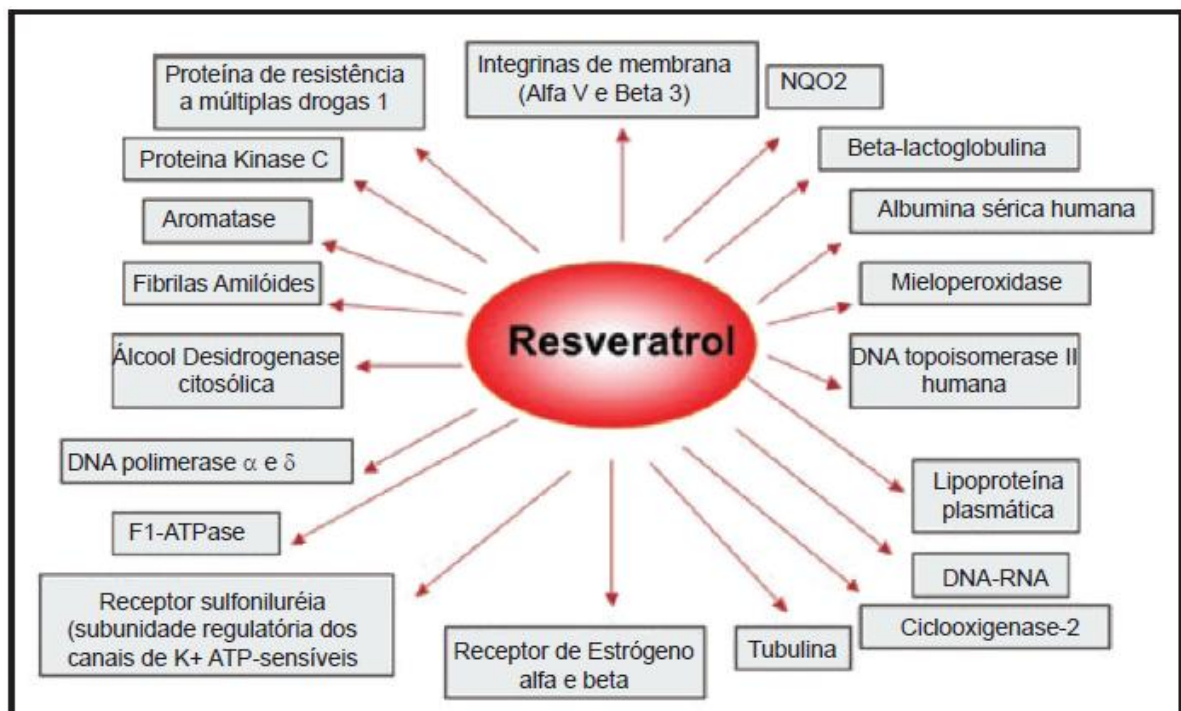
Crowell e col. (2004) realizaram um estudo toxicológico em ratos, administrando 0,3, 1 e 3 g/kg/dia de trans-resveratrol (doses equivalentes a 21, 70 e 210 g/dia em um humano de 70 kg) por gavagem durante 4 semanas. Apenas 2 dos 40 ratos que receberam a dose maior morreram. Muitos efeitos adversos associados a nefrotoxicidade foram encontrados com a dose maior. Nenhum efeito adverso em humanos foi encontrado após o consumo de 5 g/70 kg e uma única dose em 104 pacientes (BOOCOCK *et al.*, 2007).

#### 1.2.4 Alvos Moleculares

A diversidade dos efeitos biológicos observados para o resveratrol consiste na capacidade deste afetar diversos alvos moleculares. Estes alvos podem ser divididos em duas categorias: aqueles modulados por interação física direta com o



resveratrol (figura 5) e aqueles modulados indiretamente, através da mudança nos níveis de expressão de diversos genes (figura 6). Estudos demonstram que o resveratrol pode interagir diretamente com a proteína cinase C (PKC – *protein kinase C*), aromatase, integrinas, proteína de resistência a múltiplas drogas 1, albumina, DNA topoisomerase II, lipoproteínas plasmáticas, ácidos nucleicos, DNA polimerase  $\alpha$  e  $\delta$ , entre outras (revisado em HARIKUMAR E AGGARWAL, 2008). Em muitos casos a interação do resveratrol com estas proteínas leva à inativação da molécula.



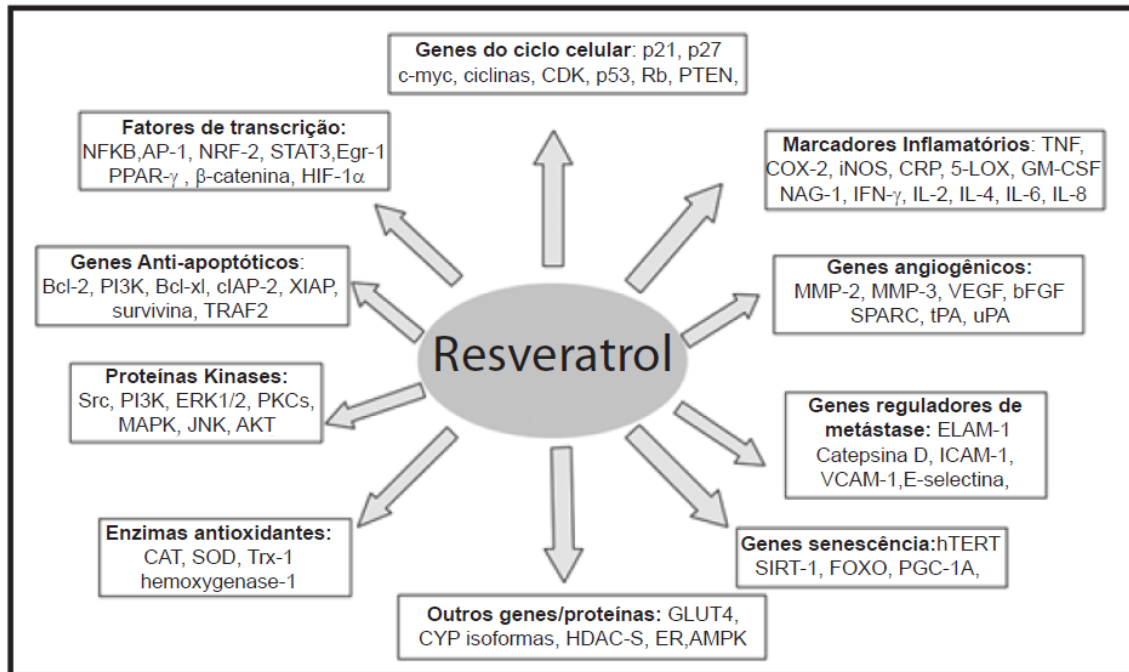
**Figura 5. Moléculas com as quais o resveratrol se liga diretamente.** NQO2 - *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 2*. Adaptado de HARIKUMAR E AGGARWAL, 2008.

Tem sido demonstrado também que o resveratrol inibe o crescimento de vários tipos celulares através da modulação de produtos de genes regulatórios do ciclo celular, como RB, CDKs, ciclinas e c-myc (oncogene myc) (figura 6). Este composto também é capaz de induzir apoptose através do aumento da atividade de p53 e da diminuição de produtos gênicos antiapoptóticos, como a Bcl-2 (proteína 2 de linfoma de células B - *B-cell lymphoma protein 2*), Bcl-xl (Proteína de isoforma longa relacionada a Bcl2 - *Bcl2 related protein, long isoform*), proteína inibidora de apoptose ligada ao X (XIAP - *X-linked inhibitor of apoptosis protein*), survivina e fator associado ao receptor TNF2 (TRAF2 - *TNF receptor-associated factor 2*). A modulação de proteínas cinases também está associada ao efeito regulatório do

crescimento celular mediado pelo resveratrol. Este também inibe a angiogênese e vias metastáticas, mediadas através da expressão de metaloproteinase de matriz (MMPs - *matrix metalloproteinase*), VEGF, catepsina D, molécula de adesão intracelular (ICAM - *intracellular adhesion molecule*) e E-selectinas (revisado em HARIKUMAR E AGGARWAL, 2008).

Os efeitos antioxidantes do resveratrol podem ser mediados através da capacidade deste induzir o aumento da expressão e a atividade de enzimas antioxidantes como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx). Os efeitos antiinflamatórios são mediados através da regulação negativa de vários marcadores como do fator de necrose tumoral (TNF - *tumor necrosis factor*), ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS - *inductible nitric oxide synthase*), proteína C-reativa (CRP - *C-reactive protein*), interferon- $\gamma$ , e várias interleucinas (IL). (Revisado em HARIKUMAR E AGGARWAL, 2008).

Estudos anteriores indicam que o resveratrol ativa sirtuína 1 (SIRT1), uma desacetilase dependente de NAD<sup>+</sup>, que atua sobre diversos substratos dentre eles histonas, p53, RB, Atg, entre outros, sendo um mediador essencial de longevidade em células normais sob restrição calórica (HOWITZ *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2008). Como inibidor de histona desacetilase (HDAC - *histone deacetylases*), SIRT1 diminui a expressão gênica, principalmente sob condições de deficiência energética (TAYLOR *et al.*, 2008). Após um dano causado ao DNA, SIRT1 desacetila p53 e diminui seu papel de fator de transcrição (CHEN *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado que SIRT1 desacetila Ku70, ativando o reparo do dano e evitando que a célula entre em apoptose (JEONG *et al.*, 2007). SIRT1 também induz autofagia, por ativar diversos componentes dos autofagossomos (Atgs) (LEE *et al.*, 2008a). Porém, um estudo recente, realizado por Pacholec e col. (2010) demonstrou que o resveratrol não ativa SIRT1 diretamente. Neste trabalho ele sugere que o resveratrol atua como uma molécula “promíscua” ativando diversos transportadores, receptores, enzimas, íons e que, dependendo da célula e do estado metabólico desta, o resveratrol terá diferentes efeitos.



**Figura 6. Produtos gênicos modulados pelo resveratrol.** A descrição das abreviações encontra-se na seção Lista de abreviações, no início desta tese. Adaptado de HARIKUMAR E AGGARWAL, 2008.

### 1.2.5 Resveratrol e Gliomas

Desde o primeiro trabalho demonstrando o efeito antitumoral do resveratrol, que reduziu em 98 % o crescimento de câncer de pele em camundongos após aplicação tópica (JANG *et al.*, 1997), diversos outros estudos vêm sendo realizados adicionando mais evidências e reforçando o efeito anticarcinogênico deste composto (revisado em KUNDU E SURH, 2008).

Jang e col. (1997) também sugeriram que o efeito antitumoral do resveratrol se daria nas três fases desta doença: iniciação, promoção e progressão. Atualmente, dados demonstram que o resveratrol também pode inibir metástases, angiogênese, induzir apoptose, parada no ciclo celular e senescência em diversos tumores (AGGARWAL *et al.*, 2004; HEISS *et al.*, 2007). Como exemplo, encontra-se tumor de cólon, mama, fígado, pâncreas, estômago, próstata, linfoma, mieloma, melanoma, pulmão, esôfago, etc. (revisado por SHAKIBAEI *et al.*, 2009)

Diversos efeitos contra doenças neurodegenerativas têm sido atribuídos ao resveratrol, tais como proteção contra isquemia, Alzheimer (MARAMBAUD *et al.*, 2005), Parkinson (JIN *et al.*, 2008), entre outros (ANEKONDA, 2006). Ao mesmo tempo, estudos *in vitro*, utilizando o resveratrol em linhagens de gliomas humanos U251 e U87 e de rato C6 (JIANG *et al.*, 2005; MICHELS *et al.*, 2006; JIANG *et al.*,

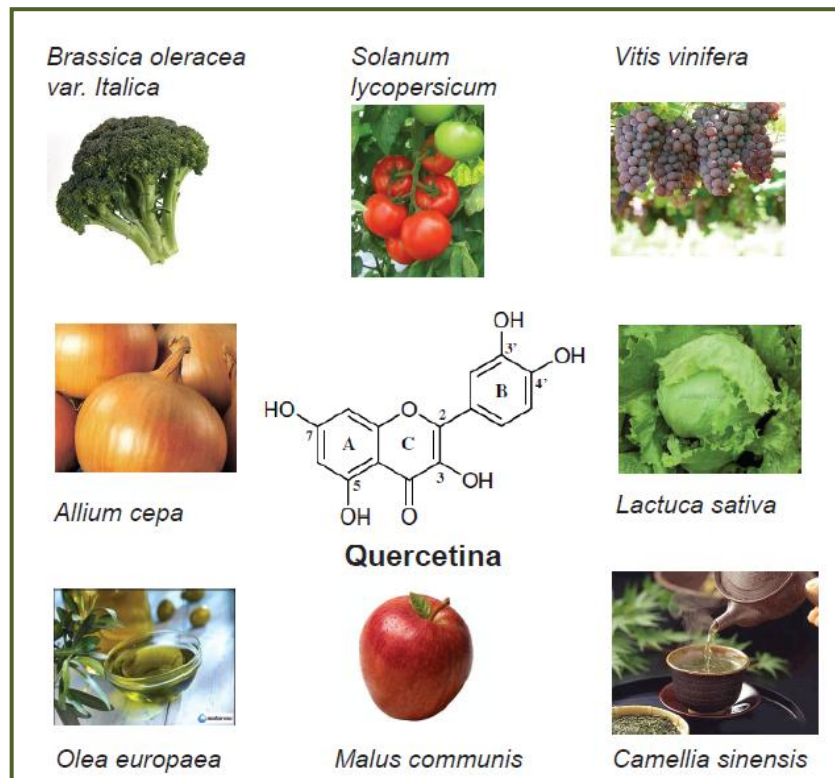
2009) demonstraram um forte efeito antitumoral. Um estudo realizado *in vivo*, onde uma linhagem de glioma de rato RT2 foi implantada subcutaneamente em ratos tratados intraperitonealmente com resveratrol, mostrou uma diminuição no crescimento do tumor (TSENG *et al.*, 2004). Outro estudo semelhante foi realizado utilizando implante subcutâneo de células de neuroblastoma em camundongos e posterior tratamento com resveratrol onde foi demonstrado que esse aumentou a apoptose e diminuiu o crescimento das células cancerosas (CHEN *et al.*, 2004).

Visto que o resveratrol tem um amplo espectro de ação, podendo atingir diversos alvos moleculares, mais estudos necessitam ser feitos a fim de compreender melhor os efeitos desta molécula. Cabe também ressaltar que o efeito do resveratrol varia de acordo com o tipo celular, com o estado metabólico da célula e com a concentração utilizada. Apesar disso, esta molécula permanece promissora com relação a terapias farmacológicas.

### **1.3 Quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona)**

#### **1.3.1 A Molécula**

A quercetina é uma das principais moléculas pertencente à família dos flavonóides, cuja característica principal é uma estrutura de três anéis (A, C e B) com um esqueleto difenilpropano (C-6-C-3-C-6), como ilustrado na figura 7. Os anéis são derivados do metabolismo da glicose, sendo o anel A biossintetizado pela condensação de 3 moles da coenzima malonil-CoA (FORMICA E REGELSON, 1995).



**Figura 7. Fontes naturais e estrutura química da quercetina.**

Os flavonóides fazem parte dos compostos do metabolismo secundário das plantas e tem um papel importante na fisiologia destas. Eles respondem a luz, protegendo contra os danos causados pela radiação UV, controlam os níveis de auxinas, que são os reguladores do crescimento e diferenciação da planta (HARBORNE, 1986). Outras funções descritas são atividade antibacteriana e antifúngica (TOMAS-BARBERAN *et al.*, 1988). São os flavonóides os responsáveis por muitas propriedades organolépticas da planta, deixando a planta com gosto desagradável, evitando a predação. Também são responsáveis pela cor, odor, afetando a polinização, ou estimulando ou evitando a alimentação dos insetos (HEDIN E WANGEA, 1986).

Cebola (284 - 486 mg/kg), brócolis (30 mg/kg), tomate (8 mg/kg), alface (14 mg/kg), chá verde (10 - 25 mg/L), maçã (21 - 72 mg/kg), vinho tinto (13 - 16  $\mu$ M), suco de uva (23 - 30  $\mu$ M), azeite de oliva, frutas vermelhas, alcaparras, entre outras, representam as principais fontes de quercetina na dieta humana, conforme ilustrado na figura 7 (HERTOG *et al.*, 1992; 1993). A quercetina é encontrada na natureza principalmente na forma de glicosídeo, onde ao menos um grupo hidroxila é substituído por vários tipos de açúcares. A solubilidade em água aumenta proporcionalmente à quantidade de grupos açúcares conjugados. Ela foi

primeiramente isolada e identificada em 1936, por Szent-Gyorgyi (HARBORNE, 1988).

As propriedades físicas da quercetina são atribuídas ao seu caráter hidrofóbico e estrutura co-planar. A atividade química da quercetina pode ser atribuída à propriedade de doar elétrons (atividade redutora), que se faz devido à presença do grupo fenólico (MURAKAMI *et al.*, 2008).

### 1.3.2 Quercetina e a Saúde Humana

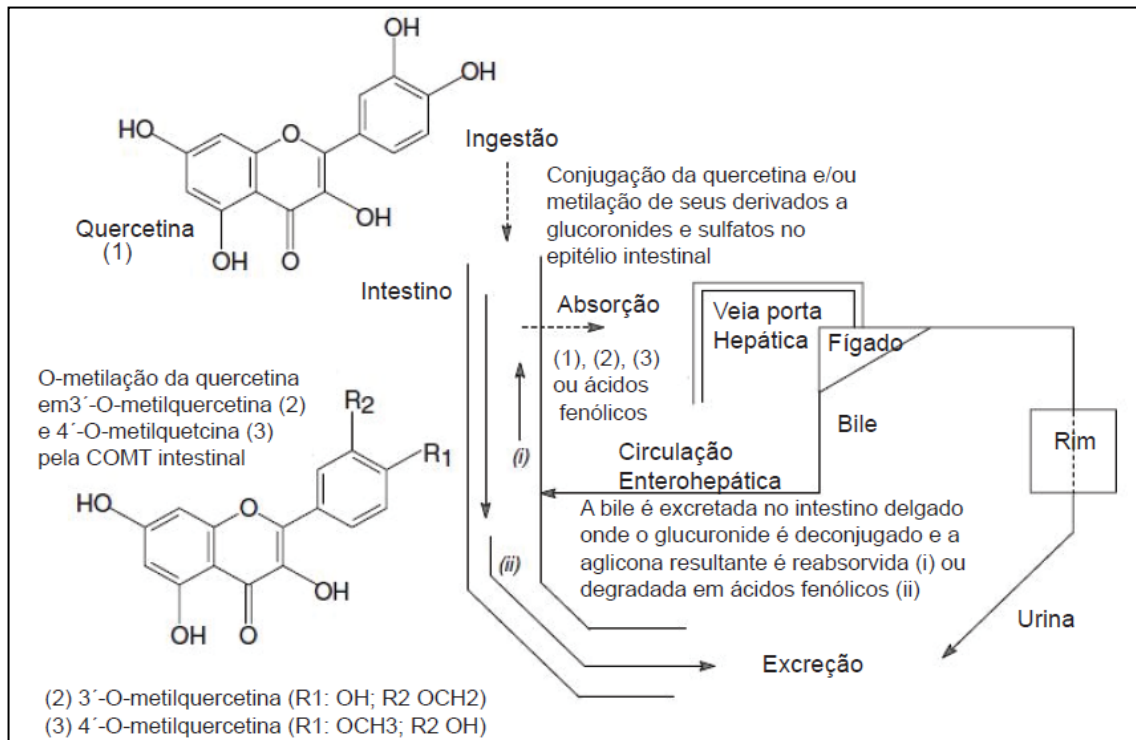
Diversos efeitos biológicos foram demonstrados para a quercetina. Um dos mais poderosos é o efeito antioxidante, demonstrado principalmente *in vitro*, protegendo contra espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) - incluindo superóxidos - e de nitrogênio, como óxido nítrico (BOOTS *et al.*, 2008). A quercetina também reduz os níveis da lipoproteína de baixa densidade (LDL - *low density lipoprotein*), reduzindo o risco de doenças cardíacas e aterosclerose (LOKE *et al.*, 2008), além de diminuir a pressão sanguínea e melhorar doenças relacionadas à hiperglicemia (EDWARDS *et al.*, 2007; RIVERA *et al.*, 2008; FANG *et al.*, 2008). A quercetina também possui propriedades neuroprotetoras, antialérgicas, antiinflamatória, antiagregante plaquetário, anticatarata e antitumoral (revisado em BISCHOFF, 2008).

Baseado nestes estudos, há uma enorme propaganda recomendando o consumo diário de quercetina, *in natura* ou como suplemento alimentar (THEOHARIDES E BIELORY, 2004), com doses diárias de 200 a 1200 mg (PDRNS, 2001). Além disso, a quercetina tem sido adicionada a diversos alimentos, entre eles cereais matinais, goma de mascar, gorduras e óleos, grãos e massas, doces, leite, bebidas gasosas, sucos de frutas, etc. (List of Existing Food Additives (MHLW, 1996)). Um cálculo estimado do consumo de quercetina, considerando as fontes naturais e os aditivos nos alimentos, estimou uma ingestão média de aproximadamente 4,7 mg de quercetina/kg de peso corporal/ dia (o que daria 226 mg/pessoa/dia), um valor próximo dos níveis mínimos recomendados (HARWOOD *et al.*, 2007). Em uma revisão realizada por Harwood e col. (2007) sobre os efeitos tóxicos do consumo de quercetina foi concluído que este composto é seguro, sem efeitos adversos a saúde, desde que em doses moderadas, ou seja, aquelas encontradas nos alimentos.

### 1.3.3 Farmacocinética e Toxicologia

Como ilustrado na figura 8, a quercetina pode ser metilada, sulfatada ou glicuronada (90 %) em um grupo hidroxila nas células absorptivas do epitélio intestinal, após ingestão de sua forma aglicona. Um estudo realizado *in vivo* em pacientes ileostomizados mostrou que quercetina glicosídeo é eficientemente hidrolizada no intestino delgado e a forma aglicona absorvida em média 65 - 81 % (WALLE *et al.*, 2000). Estudos em indivíduos humanos saudáveis onde a quercetina aglicona marcada ( $^{14}\text{C}$ ) foi administrada oralmente mostraram uma absorção de 36 - 53 %, com uma meia vida de 20 - 72 h (WALLE *et al.*, 2001). Uma pesquisa com 10 indivíduos saudáveis que receberam 500 mg de quercetina três vezes ao dia (junto com as refeições) durante 7 dias encontrou um pico de quercetina no plasma de 1,5  $\mu\text{M}$  após 3,5 h da última dose recebida (MOON *et al.*, 2008).

Em um trabalho realizado por de Boer e col. (2005), utilizando quercetina suplementada na dieta de ratos, foi encontrada uma ampla distribuição tecidual desta após 11 semanas. No cérebro, após administração de 500 mg/kg, a concentração de quercetina observada foi de 0,06 nmol/g e, quando a suplementação foi realizada por 3 dias observou-se uma concentração de 0,7 nM, sugerindo que este composto consegue atravessar a barreira hematoencefálica e alcançar concentrações detectáveis no cérebro. Os derivados ou a quercetina restante são metabolizados no fígado (3 %) e no rim (revisado em HARWOOD *et al.*, 2007). A excreção da quercetina se dá pela urina, bile e fezes (10 %) e em forma de  $\text{CO}_2$  (23 - 81 %) pela respiração (WALLE *et al.*, 2001).



**Figura 8. Representação esquemática da absorção, metabolismo e excreção da quercetina em mamíferos.** COMT - catecol-O-metiltransferase. Adaptado de HARWOOD *et al.*, 2007.

Embora pouco investigada, a toxicidade da administração da quercetina não tem sido relatada nos estudos clínicos randomizados duplos-cego, realizados em humanos (FERRY *et al.*, 1996; SHOSKES *et al.*, 1999; KIESEWITTER *et al.*, 2000; LOZOYA *et al.*, 2002). Nestes trabalhos, a quercetina foi administrada via oral, em cápsulas ou em forma de extrato de plantas, em doses de 3 a 1000 mg/dia por mais de 12 semanas. Nenhum destes estudos registrou efeitos tóxicos, seja em variações hematológicas, renais, hepáticas, bioquímicas, etc. Além disso, uma série de estudos epidemiológicos têm relacionado o alto consumo de frutas e verduras com alto teor de quercetina a efeitos benéficos à saúde humana, como já mencionado anteriormente (HARWOOD *et al.*, 2007).

### 1.3.4 Alvos Moleculares

Em nível molecular, a quercetina atua como agente anticâncer por reduzir a expressão de oncogenes tais como *H-ras*, *c-myc* e *K-ras* (RANELLETTI *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2008b), induzir a fosforilação de p53 e aumentar o conteúdo total desta proteína (TANIGAWA *et al.*, 2008) e estimular a expressão de proteínas que



controlam o ciclo celular, entre elas p21, p27, ciclina D1 (CASAGRANDE E DARBON, 2001; TANIGAWA *et al.*, 2008), favorecendo a parada no ciclo celular.

A quercetina inibe também diferentes proteínas tirosina, serina e treonina cinases, cuja atividade está ligada a vias que induzem a sobrevivência celular (proteína cinase ativada por mitógenos - MAPK - *mitogen activated protein kinase*, AKT) (SPENCER *et al.*, 2003). Este composto é conhecido como um potente inibidor da PI3K, que é essencial para ativação da AKT e sua estrutura foi usada como modelo para desenvolver o inibidor seletivo de PI3K LY294002 (LY) (VLAHOS *et al.*, 1994; AGULLO *et al.*, 1997 ; HAGIWARA *et al.*, 1988).

Em modelos animais, a quercetina induz apoptose (MOURIA *et al.*, 2002), aumentando a relação Bax (proteína Bcl2 associada ao X - *Bcl2 associated X protein*)/Bcl-2 (TANIGAWA *et al.*, 2008), aumentando a liberação de citocromo-c da mitocôndria, aumentando a ativação de caspase-3 e caspase-9 (WANG *et al.*, 1999).

A quercetina também modula vias de sinalização envolvida na produção de mediadores pró-inflamatórios, inibindo a expressão da iNOS, inibindo a degradação de IKB (inibidor do fator de transcrição nuclear kappa de células B ativadas – NF-κB) que se liga e estabiliza NF-KB, cuja dissociação do inibidor resulta na translocação para o núcleo e conseqüente ativação da expressão de proteínas pró-inflamatórias (CHO *et al.*, 2003). Quercetina também inibe COX-2 (CHEN *et al.*, 2001), PKC e MMP-9, (LIN *et al.*, 2008). Muitos desses efeitos são atribuídos ao seu forte caráter antioxidante (BOOTS *et al.*, 2008).

Quercetina tem se mostrado um inibidor de topoisomerase I e II (CONSTANTINO *et al.*, 1995). O primeiro estudo a sugerir uma interação direta da quercetina com o DNA foi realizado por Alvi e col. (1986). Neste estudo, os autores sugeriram que a quercetina inicialmente interage e estabiliza o DNA na sua estrutura secundária, porém, em tempos prolongados de exposição, a quercetina leva à ruptura da dupla hélice. Outros estudos surgiram desde então, indicando que a quercetina pode induzir dano ao DNA por diversos mecanismos (revisado por GATZ E WIESMULLE, 2008), inclusive inibição da DNA polimerase (ONO E NAKANE, 1990).

### 1.3.5 Quercetina e Gliomas

Estudos *in vitro* utilizando linhagens de glioma têm avaliado o efeito antitumoral da quercetina (CHEN *et al.*, 2006; BRAGANHOL *et al.*, 2006; KIM, *et al.*, 2008). No trabalho realizado por Braganhol e col. (2006) foi demonstrado que a quercetina induz morte por apoptose e necrose na linhagem de glioma humano U138, porém protege culturas organotípicas de hipocampo de rato da morte celular induzida por privação de oxigênio e glicose (POG). Isso indica que esta molécula pode ter um efeito protetor em tecido sadio e um efeito destruidor de células neoplásicas. Porém, os mecanismos pelo qual a quercetina estaria induzindo a morte destes gliomas estão pouco claros.

Até o presente momento, e para nosso conhecimento, nenhum estudo em modelos de glioma *in vivo* foi realizado com quercetina. Também não há estudos em humanos correlacionando consumo de quercetina com menor incidência desta doença ou com menor agressividade desse tumor.

### 1.3.6 Quercetina e Resveratrol

Diversos estudos epidemiológicos têm associado um alto consumo de frutas e verduras a um menor risco de desenvolver câncer, doenças cardíacas e neurodegenerativas ao longo da vida. Desde que estes estudos iniciaram, muitos pesquisadores começaram a isolar os compostos presentes nestes vegetais a fim de elucidar qual destes seria o principal responsável pelos efeitos benéficos. Muitos compostos foram isolados, porém a baixa concentração encontrada de cada um deles suscitou o fato de que os efeitos benéficos destes alimentos se dariam pela combinação de diversos compostos e pelo consumo diário, ao longo da vida (revisado em RUSSO, 2007).

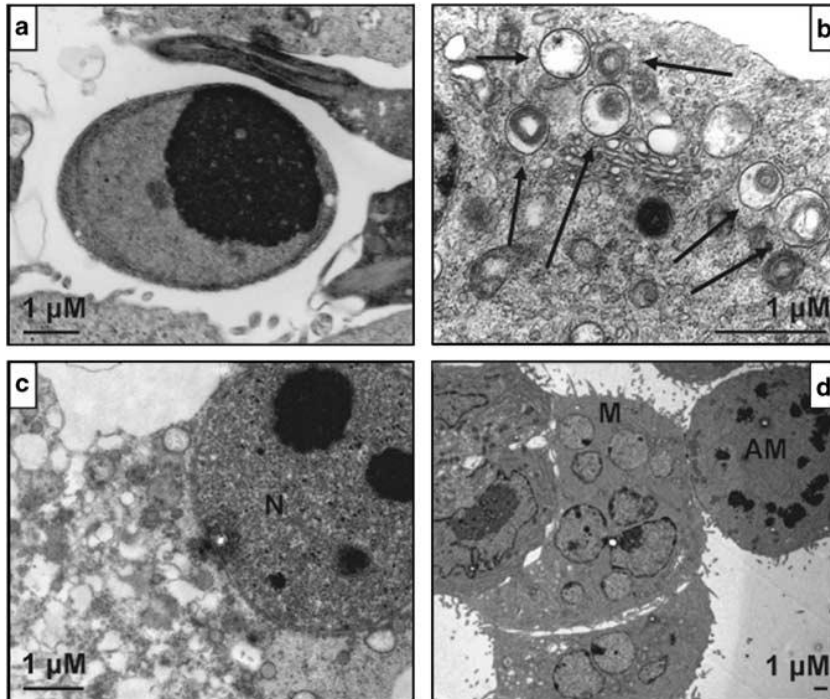
Assim, começaram a surgir trabalhos avaliando o efeito da combinação de dois ou três compostos (quercetina, resveratrol, genisteína, catequinas, etc), mostrando um efeito sinérgico ou aditivo destes (SOLEAS *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2008; SCHLACHTERMAN *et al.*, 2008) em modelos tumorais, corroborando a hipótese de que o efeito benéfico dos vegetais não reside em apenas um composto isolado, mas sim na combinação destes.

Nenhum trabalho foi até então realizado estudando o efeito da combinação do resveratrol e da quercetina em modelo de glioma, seja *in vitro* ou *in vivo*. Estudos epidemiológicos não encontraram uma associação entre hábitos de dieta e incidência de glioma na população, porém o alto consumo de polifenóis está associando à diminuição de diversas doenças neurodegenerativas, tais como isquemia, Parkinson, Alzheimer (PAN *et al.*, 2003; SIMONYI *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2008).

#### **1.4 Mecanismos de morte celular**

Diversos tipos de morte celular têm sido descritos. Dentre os mais estudados encontra-se a necrose, apoptose, morte celular autofágica, e processos que envolvem erros na mitose e parada irreversível no crescimento, como catástrofe mitótica e senescência celular (FORMIGLI *et al.*, 2000; SPERANDIO *et al.*, 2000; DEBNATH *et al.*, 2005; CAMPISI E DI FAGAGNA, 2007; GALLUZZI *et al.*, 2007).

A morte celular pode ser classificada de acordo com a aparência morfológica do processo letal - conforme ilustrado na figura 9 - critérios enzimáticos (envolvendo caspases, nucleases, catepsinas), aspectos funcionais (programada ou acidental, fisiológica ou patológica) ou características imunológicas (imunogênicas ou não imunogênicas). A tabela 2 ilustra algumas destas características que distinguem os diferentes tipos de morte.



**Figura 9. Características morfológicas ultraestruturais da morte celular por microscopia eletrônica.** (a) Apoptose – Linhagem de câncer de pulmão de não-pequenas células (H1975) sofrendo apoptose induzida por inibidor de EGFR. Nota-se a diminuição do tamanho celular e a condensação nuclear. (b) Autofagia – Células de tumor epitelial (HeLa) tratada com taspigargina. Nota-se o acúmulo de vacúolos citoplasmáticos com membrana dupla (setas) contendo organelas e parte do citosol. (c) Necrose. Carcinoma humano de cólon (HCT116) respondendo a estímulo necrótico. Nota-se o núcleo (N) ainda intacto com nucléolos, porém a membrana plasmática e o citoplasma já em degradação. (d) Catástrofe mitótica. Células HCT116 tratadas com inibidores de microtúbulos (taxanos), exibindo mitoses multipolares aberrantes (AM) e multinucleação (M). Adaptado de GALLUZZI *et al.*, 2007.

Tabela 2. Comparação das alterações morfológicas dos diferentes tipos de morte celular.

Característica	Apoptose	Necrose	Autofagia	Catástrofe Mitótica	Senescência
<b>Quantidade de células afetadas</b>	Uma célula ou um pequeno grupo	Em geral muitas células contíguas	Pode-se encontrar em muitas células, contíguas ou não (pela liberação de produtos da autodigestão)	Uma célula ou um pequeno grupo	Pode-se encontrar em muitas células, contíguas ou não.
<b>Morfologia geral da célula</b>	Encolhimento celular e convulsão	Turgescência celular	Aumento da granulosidade celular, sem padrão de alteração no tamanho	Células gigantes com diversos núcleos	Aumento de tamanho celular
<b>Alterações nucleares</b>	Picnose e cariorexis	Cariólise, picnose e cariorexis	Sem condensação da cromatina	Micronucleação e multinucleação; arranjos cromossômicos aberrantes	Focos associados a heterocromatina
<b>Alterações da membrana</b>	Membrana celular intacta	Ruptura da membrana celular	Ruptura e fragmentação da membrana no final do processo	Membrana celular intacta inicialmente, podendo ou não haver fragmentação no final do processo	Membrana celular intacta
<b>Alterações no citoplasma</b>	Retenção do citoplasma em corpos apoptóticos	Vacuolização e degeneração organelar, seguido de liberação do citoplasma no meio extracelular	Maior vacuolização do citoplasma (vesículas autofágicas com membrana dupla)	Sem alterações significativas no citoplasma e seus componentes	Achatamento celular, aumento da granulosidade e acidificação do citoplasma;
<b>Resposta imune</b>	Sem resposta inflamatória	Resposta inflamatória	Sem resposta inflamatória	Sem resposta inflamatória	Sem resposta inflamatória
<b>Gasto energético</b>	Com gasto de energia	Sem gasto de energia	Com gasto de energia	Sem gasto de energia	Sem gasto de energia

#### 1.4.1 Apoptose

O termo apoptose foi primeiro usado por Kerr e col. (1972) para descrever uma forma de morte celular morfológicamente distinta da forma clássica observada na necrose. Atualmente, a apoptose é reconhecida e aceita como um importante mecanismo de morte celular programada, que envolve a eliminação de determinada célula.

A apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento e o envelhecimento, além de atuar como um mecanismo de manutenção da população celular tecidual. Também ocorre como mecanismo de defesa em reações imunológicas ou quando células danificadas por alguma doença ou toxina precisam ser eliminadas (ELMORE, 2007). Neste caso, danos extensivos ao DNA levam à ativação de uma cascata de sinalização culminando em apoptose.

Algumas células expressam o receptor Fas (Ácido graxo sintetase - *Fatty acid synthetase receptor*) ou TNF que podem levar à apoptose através da interação com um ligante. Além disso, apoptose é um processo coordenado e dependente de energia que envolve a ativação de proteases chamadas caspases e uma complexa cascata de eventos iniciada por um estímulo específico que acaba por levar à morte celular (ELMORE, 2007).

Várias mudanças morfológicas detectáveis em microscópio ópticos são características do processo apoptótico (HACKER, 2000). Durante as fases iniciais, encolhimento celular e picnose são visíveis (KERR *et al.*, 1972), onde também se observa um citoplasma denso e organelas empacotadas em pedaços ainda menores. Picnose é a condensação da cromatina e é a forma mais característica da apoptose. Estas mudanças subcelulares que ocorrem durante este processo podem ser melhor visualizadas através do microscópio eletrônico (figura 9) (HACKER, 2000).

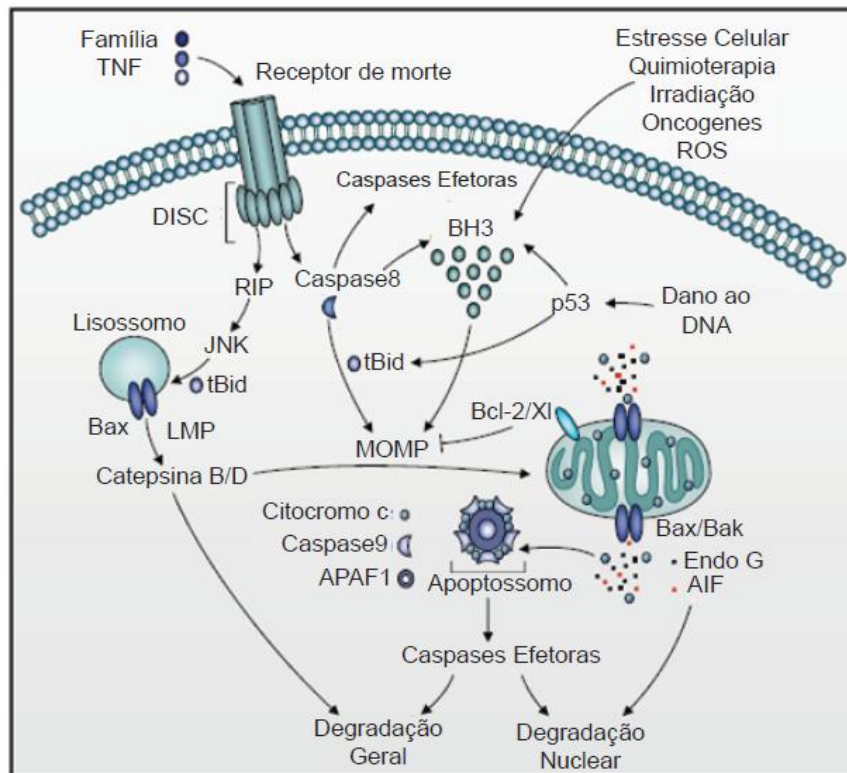
Extensivas “bolhas” de membrana (*blebbing*) são observadas e seguidas por cariorexis (fragmentação nuclear) e separação da célula em fragmentos ou corpos apoptóticos durante um processo chamado “brotamento” (*budding*). Corpos apoptóticos consistem de citoplasma com organelas empacotadas com ou sem fragmentos nucleares (HACKER, 2000). Estes corpos são fagocitados por macrófagos, células parenquimais ou células neoplásicas, e degradadas em fagolisossomos. Todo este processo se dá sem desencadear resposta inflamatória, sendo considerada uma morte “limpa” (KUROSAKA *et al.*, 2003).

Duas vias de inicialização da apoptose podem ser observadas: a via intrínseca e a via extrínseca (figura 10).

Na via intrínseca (KROEMER, 2003) múltiplos sensores, incluindo proteínas com domínio BH3 e a proteína p53, reagem em resposta a diferentes condições estressantes ou dano ao DNA e ativam uma cascata de sinais que culminam na permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP – *mitochondrial outer-*

*membrane permeabilization*) (MARTINOU E GREEN, 2001). A liberação de proteínas do espaço intermembranas para o citosol permite a formação do apoptossoma, um complexo ativador de caspases formado por APAF-1 (fator ativador de protease apoptótico - *apoptotic protease activating factor 1*), caspase-9 e citocromo-c, resultando na ativação das caspases efetoras que são responsáveis pela degradação das estruturas celulares (FERRI E KROEMER, 2001).

A via extrínseca é iniciada na membrana plasmática pela ativação de receptores de morte como os da família TNFR que incluem Fas/CD95 e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF - *TNF-related apoptosis inducing ligand*) (CHOI E BENVENISTE, 2004). A trimerização do receptor induzida pela ligação ligante-receptor resulta no recrutamento e ativação de proteínas adaptadoras como FADD/TRADD (*Domínio de morte associado a Fas/domínio de morte associado a TNFR1 - Fas-associated death domain/TNFR1-associated associated death domain*) que levam à ativação da caspase 8, que propaga o sinal de morte de 3 maneiras: 1 - pela proteólise direta e ativação das caspases efetoras; 2 - pela proteólise da proteína de domínio BH-3 Bid (Domínio agonista de morte de interação com BH3 – *BH3 interacting domain death agonist*), translocação da tBid (Bid truncada - *truncated Bid*) para a mitocôndria e conseqüente MOMP; 3 - pela ativação de cinases RIP1 (proteína de interação ao receptor 1 - *receptor-interacting protein 1*) e JNK (cinase c-Jun N-terminal - *c-Jun N-terminal kinase*), que levam ao translocamento da tBid para o lisossomo e causam a permeabilização da membrana lisossomal dependente de Bax, resultando na liberação de catepsina B/D, mediando proteólise geral e MOMP (BOYA *et al.*, 2003; DIETRICH *et al.*, 2004).



**Figura 10. As duas principais vias que levam à apoptose.** AIF – fator indutor de apoptose (*Apoptosis-inducing factor*); Bak – antagonista de morte Bcl-2 (*Bcl-2 antagonist killer*); DISC – complexo sinalizador indutor de morte (*death-inducing signaling complex*); EndoG - endonuclease G; LMP – Permeabilização da membrana lisossomal (*lysosome membrane permeabilization*); Adaptado de VICENCIO *et al.*; 2008.

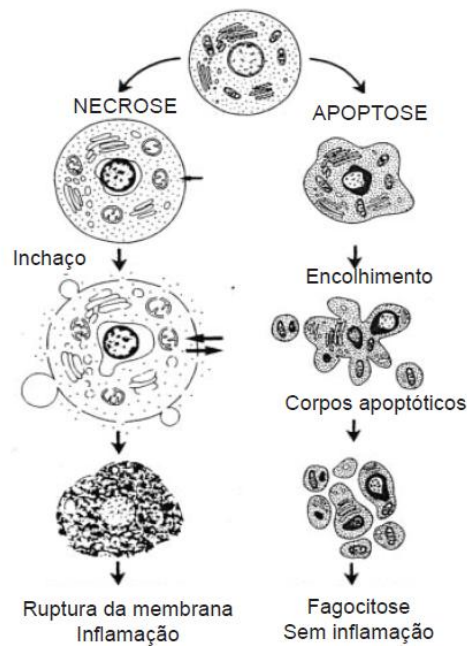
Como citado na seção 1.1.4 desta tese, muitas vias que induzem apoptose em glioma estão inibidas e muitas vias que inibem a apoptose estão ativadas. Diversos trabalhos têm buscado formas de alterar estes genes, através do uso de ferramentas de biologia molecular como transfecção viral para silenciar genes superexpressos (com RNA de interferência) ou recolocar genes deletados ou superexpressar genes pró-sobrevivência que estão pouco expressos. Outra forma de utilizar esta via como forma de terapia é empregar fármacos ou compostos que modulem estas vias, inibindo genes ou proteínas pró-sobrevivência e estimulando genes ou proteínas indutoras da apoptose. Muitos trabalhos têm mostrado que o resveratrol e a quercetina modulam proteínas que estão na rota apoptótica, como já descrito acima, indicando a possibilidade destas drogas exercerem efeito antitumoral, inclusive em gliomas.



### 1.4.2 Necrose

Outro tipo de morte celular descrito é a necrose, que é considerada um processo tóxico onde a célula é vítima passiva e sofre uma morte independente de energia. Necrose é um processo degradativo em que ocorre cariólise e aumento do volume celular, com formação de vacúolos citoplasmáticos, ruptura e desagregação das organelas e da membrana celular (KERR *et al.*, 1972; MAJNO E JORIS, 1995; TRUMP *et al.*, 1997). A perda da integridade da membrana celular e a liberação do conteúdo citoplasmático para o tecido circundante liberam sinais quimiotáticos, causando o recrutamento da resposta inflamatória (SAVILL E FADOK, 2000; KUROSAKA *et al.*, 2003). A necrose é um processo descontrolado e passivo que afeta diversas células dentro de um tecido, enquanto a apoptose é um processo controlado que afeta uma única célula ou alguns grupos pequenos. A necrose em geral é desencadeada por dois mecanismos distintos: falta de suplemento energético ou dano direto à membrana celular (ZEISS, 2003).

Algumas vezes é difícil distinguir a necrose da apoptose por técnicas histológicas convencionais. Além disso, esses dois processos podem ocorrer simultaneamente. Muitas vezes a célula inicia um processo apoptótico, mas acaba por morrer por necrose devido à falta de energia ou indisponibilidade de caspases (LEIST *et al.*, 1997; DENECKER *et al.*, 2001). O que vai determinar o tipo de morte celular são os sinais de morte, o tipo celular, o estágio do desenvolvimento do tecido e estado fisiológico da célula (FIERS *et al.*, 1999; ZEISS, 2003). A figura 11 traz uma ilustração sobre as diferenças morfológicas entre apoptose e necrose.



**Figura 11. Ilustração da apoptose e da necrose.** Adaptado de VAN CRUCHTEN E VAN DEN BROECK, 2002.

### 1.4.3 Autofagia

A autofagia é outro processo que pode levar à morte celular. A autofagia é coordenada pelos genes Atgs que levam à degradação de organelas e proteínas e, como a apoptose, é geneticamente programada e conservada. Este processo envolve a formação de vesículas formadas por uma membrana dupla, contendo componentes celulares que se ligam aos lisossomos, formando os autofagolisossomos. Neste local ocorre a degradação dos componentes intravesiculares, resultando em diversos produtos que podem ser reutilizados pelas células (SHINTANI E KLIONSKY, 2004; BAEHRECKE, 2005). Desta maneira, a autofagia atua como um mecanismo pró-sobrevivência, principalmente em condições adversas, como depleção de nutrientes e oxigênio. Entretanto, este processo tem um caráter autolimitante e pode acabar resultando em morte celular autofágica (ou morte celular programada do tipo II) quando altos níveis de intensidade ou duração deste processo ocorrerem (LEVINE E YUAN, 2005).

Apesar deste papel ambíguo, em células cancerosas, vários trabalhos têm demonstrado que a autofagia pode ser um importante mecanismo anticâncer visto que a expressão de beclina-1, um gene fundamental para autofagia, está diretamente correlacionada à sobrevivência (CHENG *et al.*, 2009). Além disso, a

autofagia é induzida por tratamentos físicos e químicos, como com TMZ, rapamicina, radiação gama, ceramida e resveratrol, sendo uma alternativa promissora para o tratamento de gliomas (ESHLEMAN *et al.*, 2002; KANZAWA *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2005; MICHELS *et al.*, 2006; LEFRANC E KISS, 2006;).

Gliomas são mais sensíveis a agentes que induzem autofagia do que apoptose, como a TMZ (LEFRANC E KISS, 2006). Além disso, estruturas características do processo autofágico são encontradas em gliomas de pacientes (ALVA *et al.*, 2004). Como em outros tipos de câncer, a expressão de beclina 1, um gene fundamental ao processo autofágico, é inversamente relacionada a malignidade dos tumores cerebrais (MIRACCO *et al.*, 2007). No nosso grupo de pesquisa, Filippi-Chiela e col., 2010 (manuscrito submetido) encontraram que o resveratrol induz autofagia em três linhagens de GBM humana, levando à parada na progressão do ciclo celular e à indução de apoptose.

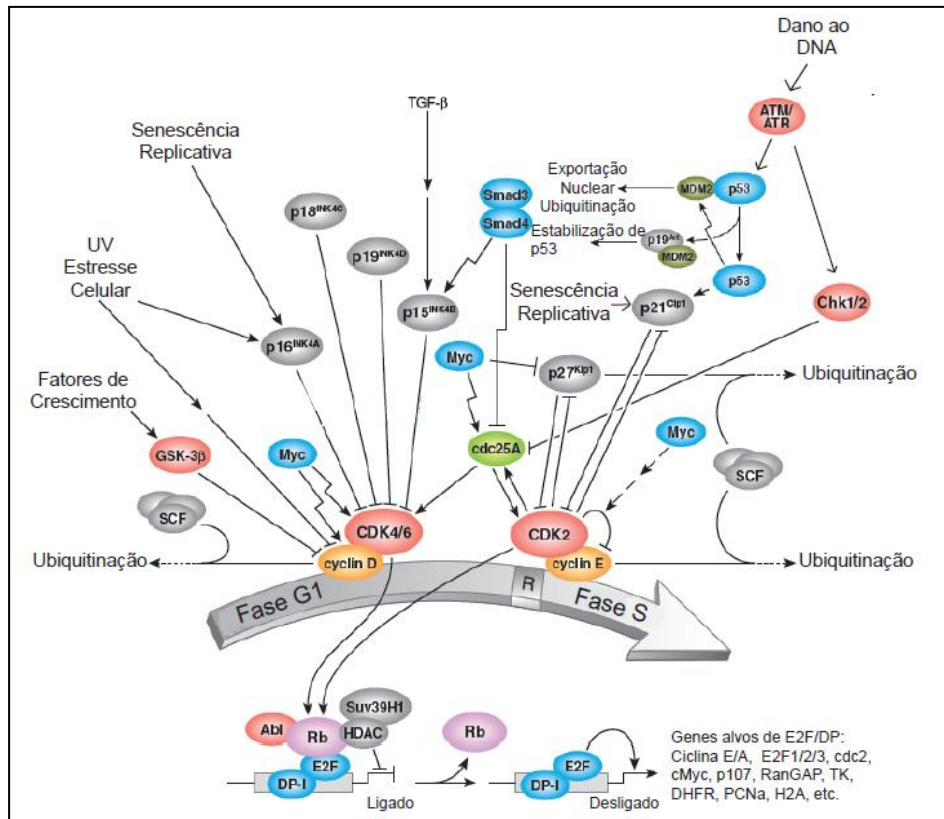
#### **1.4.4 Catástrofe mitótica**

A catástrofe mitótica tem sido considerada um tipo de morte celular que resulta da entrada prematura e inapropriada da célula em mitose e pode ser causada por estresse químico ou físico, como radiação ionizante, drogas estabilizadoras de microtúbulos, e drogas anticâncer que causam defeito nos pontos de checagem do ciclo celular (VAKIFAHMETOGLU *et al.*, 2008). A principal característica morfológica deste processo é a formação de envelope nuclear ao redor dos grupos de cromossomos mal-agregados. Outras características são a incompleta síntese de DNA, a condensação prematura dos cromossomos e o aumento do tamanho celular (MACKEY *et al.*, 1988; IANZINI E MACKEY, 1997). Na apoptose também observa-se a condensação cromossômica, porém há um encolhimento do citoplasma e fragmentação nuclear, o que não se observa na catástrofe mitótica. Se a catástrofe mitótica pode ser considerada um tipo de morte celular *per se* ou apenas um evento inicial que acabará por resultar em morte celular necrótica ou apoptótica ainda é controverso e muitos estudos precisam ser realizados a fim de elucidar melhor estes eventos (GALLUZZI *et al.*, 2007; VAKIFAHMETOGLU *et al.*, 2008).

### 1.4.5 Senescência Celular

A senescência celular foi primeiramente descrita há mais de 4 décadas quando Hayflick e col. (1965) mostraram que células normais têm uma capacidade proliferativa limitada quando estão em cultura. Estas células permanecem viáveis por semanas, mas não conseguem crescer nem se dividir, apesar da presença de nutrientes, espaço e fatores de crescimento no meio. Em geral estas células param irreversivelmente no ciclo celular na fase G1 (CAMPISI E DI FAGAGNA, 2007).

Após a descoberta deste fenômeno, duas hipóteses aparentemente contraditórias foram levantadas. A primeira delas veio do fato de que muitas células cancerosas proliferam indefinidamente em cultura. A senescência foi proposta como um mecanismo anticâncer ou supressor tumoral. Neste contexto, a senescência celular foi considerada benéfica porque protegeria os organismos do câncer, uma das principais doenças “encurtadoras” da longevidade. A segunda hipótese surgiu do fato de que a regeneração e o reparo tecidual diminuem com a idade, portanto a senescência celular seria um mecanismo pró-envelhecimento. Assim, surgiu o nome senescência, que é derivado do latim “*senex*”, que significa homem velho ou idoso. Em biologia celular, senescência celular às vezes é chamada de envelhecimento celular ou senescência replicativa (CAMPISI E DI FAGAGNA, 2007). Atualmente, drogas que induzem senescência celular têm sido amplamente estudadas como terapia anticâncer (COLLADO E SERRANO, 2010).



**Figura 12. Vias de sinalização envolvidas no processo de indução de senescência.** Círculos azuis representam fatores de transcrição, círculos verdes claro representam proteínas fosfatases, círculos verdes escuro representam enzimas diversas, círculos vermelhos representam proteínas cinases inibidoras de CDKs, círculos cinza representam setas com ponta em flecha representam sinais estimulatórios diretos, setas com ponta reta representam sinais inibitórios diretos. Abreviaturas descritas na seção Lista de Abreviaturas, no início desta tese. Adaptado de CELL SIGNALING TECHNOLOGY, 2010. ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com))

Células senescentes possuem uma morfologia característica, que inclui um tamanho muito maior e um formato achatado em cultura. Existem poucos marcadores de senescência, sendo os mais usados a medida da atividade de  $\beta$ -galactosidase ácida, focus de heterocromatina e acúmulo de grânulos de lipofuscina (ITAHANA *et al.*, 2007; KURZ *et al.*, 2007). Há diversos estímulos que conduzem à senescência, entre eles encurtamento dos telômeros, dano ao DNA, perturbação da cromatina, estresse oxidativo e indução por oncogenes em células transformadas (CAMPISI E DI FAGAGNA, 2007, VAN HEEMST *et al.*, 2007).

Tanto telômeros disfuncionais quanto dano ao DNA genômico disparam uma cascata de sinalização que levam à parada na progressão no ciclo celular para que a célula possa tentar reparar o dano (DI LEONARDO *et al.*, 1994; D'ADDA DI FAGAGNA *et al.*, 2004). Dano ao DNA causado por ROS também tem sido relacionado à indução de senescência celular (TOUSSAINT *et al.*, 2000; BENPORATH E WEINBERG, 2005; SUZUKI E BOOTHMAN, 2008). Muitas proteínas

participam deste processo, entre elas a proteína mutada da ataxia telangiectasia (ATM - *ataxia telangiectasia mutated*), cinase de ponto de checagem 2 (ChK2 - *Checkpoint Kinase 2*), proteínas adaptadoras (53BP1 - proteína ligada a p53, *p53 Binding Protein 1*, e MDC1 - proteína de ponto de checagem 1 mediadora de dano ao DNA, *mediator of DNA damage checkpoint protein-1*) e modificadores da cromatina como a histona H2AX fosforilada ( $\gamma$ H2AX) (CAMPISI E DI FAGAGNA, 2007). Quebra de fita dupla de DNA também pode induzir senescência através de ativação de p53 e p16. Muitos quimioterápicos utilizados na clínica induzem um severo dano ao DNA e tumores que possuem a p53 selvagem mostram-se muito mais sensíveis à senescência (RONINSON, 2003).

O estado da cromatina determina quais genes serão ativados (eucromatina) ou silenciados (heterocromatina), e isto depende principalmente das modificações das histonas (por exemplo, acetilação e metilação). Interessantemente, moléculas que inibem a HDAC (HDAi – inibidor de HDCA), que promovem a formação da eucromatina, induzem senescência (MUNRO *et al.*, 2004). HDAi pode induzir a expressão de p16 e p21 e, por induzir a atividade de ATM, pode causar senescência mediada por p53 (BAKKENIST E KASTAN, 2003; MUNRO *et al.*, 2004).

Oncogenes são versões mutadas de genes normais que têm potencial de transformar células. Células normais respondem à ativação de muitos oncogenes entrando no estado de senescência. Este fenômeno foi primeiro observado quando a Ras foi superexpressa em células de fibroblasto (SERRANO *et al.*, 1997). Subsequentemente, outros membros da via da Ras e proteínas nucleares pro-proliferativas (E2F1) mostraram induzir senescência quando superexpressas em células não transformadas (LIN *et al.*, 1998; ZHU *et al.*, 1998; DIMRI *et al.*, 2000; MICHALOGLOU *et al.*, 2005). Importante enfatizar que a super-expressão destes genes geralmente não induz senescência em linhagens de câncer (COLLADO E SERRANO, 2010).

Apesar de diferentes, em geral estes sinais estimulatórios acabam convergindo em duas vias efetoras principais, a via da p53 e da p16/RB (figura 12). Em condições normais, a proteína supressora tumoral p53 é continuamente poliubiquitinada pela proteína MDM2, o que leva à sua degradação mediada por proteassomo. Após estímulos estressores ou dano ao DNA, a atividade de MDM2 é suprimida, levando ao acúmulo de p53 e expressão dos alvos transcricionais dessa

como, por exemplo, o inibidor de CDK, p21, levando conseqüentemente a uma parada no ciclo celular (VICENCIO *et al.*, 2008).

Na segunda via, quando a proteína p16 tem sua expressão aumentada após estresse celular ou dano ao DNA, ela acaba por inibir CDK. Com a CDK inibida, a proteína RB se mantém hipofosforilada e ligada ao fator de transcrição E2F, que desta forma fica inibido. Assim, a célula para a sua progressão no ciclo celular (VAZIRI E BENCHIMOL, 1999; HELMBOLD *et al.*, 2006). Outras proteínas envolvidas com o processo senescente podem ser encontradas na figura 12.

Como descrito anteriormente, a apoptose é um resposta extrema ao estresse celular e representa um importante mecanismo supressor tumoral. Não está claro o que determina se uma célula sofrerá apoptose ou senescência. Um fator que parece determinar o tipo de morte é o tipo celular: células epiteliais e fibroblastos danificados tendem a senescer, já linfócitos tendem a entrar em apoptose. Porém, apesar destes processos parecerem mutuamente exclusivos, muitas vezes a célula pode sofrer um ou outro, dependendo da natureza e da intensidade do dano ou do fator estressor (revisado em CAMPISI E DI FAGAGNA, 2007).

Alguns estudos realizados com linhagens de gliomas tratadas com o quimioterápico TMZ encontraram que esta droga pode induzir senescência celular (HIROSE *et al.*, 2001; PAPAIT *et al.*, 2009). Outro trabalho também mostrou a indução da senescência nestes tumores irradiados com feixes de íons de carbono (JINNO-OUE *et al.*, 2010). Gliomas que tiveram o gene da p16 superexpresso também mostraram uma diminuição do crescimento celular e fenótipo senescente (UHRBOM *et al.*, 1997; FUEYO *et al.*, 1996), sugerindo que a indução de senescência nestes tumores seria uma maneira de eliminar estas células.

O resveratrol vem sendo amplamente divulgado como uma molécula pró-longevidade, inibindo o envelhecimento e mimetizando os efeitos da restrição calórica. Porém, recentemente, Heiss e col. (2007) demonstraram que o tratamento crônico com resveratrol (30  $\mu$ M) induz parada no crescimento celular por induzir senescência em linhagem de câncer de cólon HCT116. Neste trabalho, foi observado também que o resveratrol estaria aumentando a produção de radicais livres e ativando a via da p38 e causando estresse replicativo, ativando a via da ATM, aumentando a fosforilação da p53 e induzindo aumento na expressão de p21.

Em outro trabalho, utilizando linhagem de osteosarcoma (U2OS) e adenocarcinoma de pulmão (A549), resveratrol (20 e 50  $\mu$ M) induziu senescência

por mediar instabilidade genômica e telomérica e aumentar a expressão de BRCA1 (câncer de mama 1 - *breast cancer 1*), ciclina B1, p21 e induzir a fosforilação de RB e H2AX (RUSIN *et al.*, 2009).

Até o presente momento, nenhum estudo mostrou a indução de senescência por quercetina ou pela combinação de resveratrol e quercetina em modelos tumorais. Kuo e col. (2004) mostraram que a quercetina pode modular p53 e p21, moléculas de sinalização envolvidas na indução da senescência, em linhagem de carcinoma de pulmão, mas neste trabalho foi observada indução de apoptose. Em outro trabalho, utilizando linhagem de células linfoblastóides humanas, a quercetina induziu a fosforilação da ATM, da H2AX e da p53, indicando que esta estaria induzindo dano ao DNA. Contudo, neste estudo, não houve avaliação de indução de morte celular ou indução de senescência (YE *et al.*, 2004).

## 1.5 Dano ao DNA e Reparo

A manutenção da estabilidade genômica que um organismo necessita para sobreviver requer não apenas um mecanismo extremamente acurado para replicar o DNA, mas também um mecanismo para reparar lesões acidentais que ocorrem continuamente. Estas lesões, causadas por agentes exógenos químicos (ex. metilmetanosulfonato), físicos (ex. radiação ultravioleta), agentes endógenos (ex. ROS) e lesões espontâneas devido à instabilidade das ligações químicas dos nucleotídeos, são geralmente corrigidas por um eficiente mecanismo de reparo de DNA. Estas modificações do DNA são as principais fontes de variabilidade genética, contudo muitas vezes estas resultam em doenças, como o câncer. (ALBERTS *et al.*, 2008).

Os principais danos à molécula de DNA compreendem modificações químicas que ocorrem nas bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas), na desoxirribose e na ponte fosfodiéster. De todas as alterações químicas que podem ocorrer no DNA, as bases modificadas são as mais comuns (SLUPPHAUG *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2004).

Algumas lesões espontâneas ao DNA são originadas por desaminação hidrolítica da citosina, gerando uma base aberrante como a uracila, ou por depurinação, ou seja, a perda de bases púricas (adenina e guanina) (BARNES E LINDAHL, 2004). Lesões causadas por oxidação direta as purinas e as pirimidinas



dos ácidos nucleicos podem levar à formação de quebras em uma das cadeias do DNA (quebra simples) ou quebras simples em posições aproximadamente simétricas nas duas cadeias do DNA (quebras duplas). Além disso, quebras simples podem gerar quebras duplas durante a replicação (BERRA *et al.*, 2006).

O sistema de reparo de dano ao DNA foi descrito em todos os seres vivos, e possui um alto grau de conservação em espécies filogeneticamente distantes (HOEIJMAKERS, 1993a, b). A importância que a manutenção da integridade do genoma possui é evidente também devido ao grande investimento que a célula faz em enzimas de reparo (ALBERTS *et al.*, 2008). Basicamente, o sistema de reparo pode ser reunido em 3 grupos principais: reparo direto, reparo por excisão-ressíntese e reparo recombinacional (EISEN E HANAWALT, 1999; FRIEDBERG, 2003).

O reparo direto se diferencia das outras vias de reparo de DNA por duas características principais: uma única enzima é suficiente para a retirada da lesão, e não há necessidade de substituição da base lesada: a estrutura original da molécula de DNA é recuperada com a reversão da lesão. São três os mecanismos conhecidos de reparo direto: fotorreativação, alquiltransferência e o reparo direto oxidativo (AGNEZ-LIMA *et al.*, 2003).

O mecanismo de fotorreativação utiliza a luz visível para reverter os danos causados por irradiação UV no DNA, como a formação de dímeros de pirimidinas. A enzima responsável por este reparo é a fotoliase. A fotoliase tem dois cromóforos que captam um fóton, cuja energia é utilizada para reverter o dímero, ou seja, quebrar as ligações covalentes entre as pirimidinas, resultando na estrutura molecular original do DNA (THOMPSON E SANCAR, 2002; AGNEZ-LIMA *et al.*, 2003; FRIEDBERG, 2008).

Alquiltransferência é um dos três mecanismos conhecidos para remoção de adutos alquil (metil, etil, etc.) das bases do DNA. Grupos alquil são incorporados ao DNA em consequência de reação com agentes químicos alquilantes (como TMZ) ou enzimáticos (metilases). As proteínas que exercem a atividade de alquiltransferases (por exemplo as metiltransferases) captam os grupos alquil do DNA para seus resíduos de cisteína. Este é um mecanismo altamente específico, mas dispendioso, já que a proteína não é regenerada após sua atividade de transferência destes grupos alquil (KAINA E CHRISTMANN, 2002; AGNEZ-LIMA *et al.*, 2003; CHRISTMANN *et al.*, 2003).

O reparo oxidativo direto representa outra forma de remoção de danos de alquilação. Esse sistema foi descrito apenas recentemente, após anos de estudos com a proteína AlkB, pela verificação de similaridade estrutural dessa proteína com enzimas dependentes de alfa-cetoglutarato, oxigênio e ferro (II). Assim, conseguiu-se demonstrar que essa enzima cataliza a eliminação do grupo metil das bases lesadas 1-metil-adenina e 3-metil-citosina, que são revertidas para adenina e citosina, respectivamente, numa reação dependente de alfa-cetoglutarato, oxigênio e ferro (II). Essa é uma reação oxidativa, havendo liberação do grupo metila na forma de formaldeído, revertendo a lesão para base não modificada (FALNES *et al.*, 2002; TREWICK *et al.*, 2002; AGNEZ-LIMA *et al.*, 2003).

O reparo por excisão-ressíntese requer a ação coordenada e sequencial de várias enzimas no DNA lesado. Pode-se resumir as vias de reparo por excisão-ressíntese em três etapas: a) a porção alterada da fita de DNA danificada é reconhecida e retirada por nucleases e helicases, que hidrolisam as ligações fosfodiésteres adjacentes à lesão, resultando em uma região de DNA simples fita; b) essa região simples fita é corrigida por processo de polimerização, pela DNA polimerase, que utiliza a fita intacta como molde; c) o processo é finalizado pela DNA ligase, que une as extremidades da fita recém sintetizada ao restante da molécula de DNA (AGNEZ-LIMA *et al.*, 2003). Os sistemas de reparo por excisão-ressíntese de DNA podem ser classificados de acordo com o tipo de alteração que ocorre nesta molécula e como ela é removida e são classificados em três grupos principais: (i) a excisão de bases (BER – *base excision repair*) (BOITEUX E GUILLET, 2004); (ii) a excisão de nucleotídeos (NER – *nucleotide excision repair*) (PRAKASH E PRAKASH, 2000; CHRISTMANN *et al.*, 2003) e (iii) o reparo de erros de emparelhamento de bases (MMR - *mismatch repair*) (CHRISTMANN *et al.*, 2003). Tanto as vias de reparo direto, quanto as de excisão são essenciais para a remoção de bases modificadas e adutos, de forma que respondem por grande parte da atividade de reparo de DNA na célula (MEMISOGLU E SAMSON, 2000).

O BER é responsável pelo reparo das bases nitrogenadas e dos açúcares modificados dos nucleotídeos trifosfatados, como oxidações, desaminações espontâneas e alquilações (DIZDAROGLU, 2005; DIZDAROGLU *et al.*, 2008). O mecanismo de BER envolve a formação de uma série de complexos enzimáticos, consistindo basicamente em 4 etapas, sendo a primeira o reconhecimento da lesão e clivagem da ligação glicosídica por uma glicosilase, seguida pela clivagem da

ligação fosfodiéster por uma endonuclease. Isso gera um sítio apurínico ou apirimidínico que é então preenchido através da polimerização e ligação de um nucleotídeo pela DNA polimerase e DNA ligase, respectivamente (DIZDAROGLU, 2005).

O reparo via NER (via RAD3) é um mecanismo mais genérico e flexível, que repara lesões que causam distorções na dupla hélice de DNA. NER envolve a formação de um complexo enzimático que se inicia pelo reconhecimento da lesão e abertura da dupla hélice de DNA, seguida da clivagem das extremidades da lesão por endonucleases e liberação do fragmento de DNA e posterior polimerização e ligação da região removida (SCHARER, 2008).

O reparo MMR corrige pares errôneos de bases e alças desemparelhadas no DNA, eventualmente introduzidos por erros de replicação, ou lesões que interfiram com a atividade replicativa das DNA polimerases. Nesse mecanismo, a metilação é utilizada como sinal para discriminação da fita a ser reparada, uma vez que esta só ocorre algum tempo após a replicação do DNA. A fita filha, não metilada temporariamente (recém-sintetizada), é atacada por enzimas de reparo, e o trecho contendo a base incorreta é excisado. O reconhecimento das bases mal emparelhadas é realizado por um dímero da proteína MutS, que se liga nas lesões e se associa a proteína MutL, ativando a endonuclease MutH. A fita a ser eliminada é discriminada por MutH ao identificar o sítio GATC hemimetilado próximo a lesão. Após a incisão na fita recém-sintetizada, ocorre a excisão do trecho danificado a partir deste ponto onde a MutH cortou a fita de DNA e a molécula original é restaurada pela ação da DNA polimerase replicativa e ligase (AGNEZ-LIMA *et al.*, 2003; CHRISTMANN *et al.*, 2003; SCHOFIELD E HSIEH, 2003).

O reparo recombinacional (via RAD52) ocorre para reparar lesões do tipo quebra de DNA gerada por agentes endógenos e físico-químicos, sendo do tipo recombinação homóloga (HR – *homologous recombination*), bastante precisa, ou junção de pontas não homóloga (NHEJ – *non-homologous end joining recombination*), sujeita a erros (VIAU, 2009).

Na HR ocorre a ressecção nucleotídica da fita 5'-3', promovida pelo complexo MRX (Mre11, Rad50 e Xrs2p) (GILL E FAST, 2007). Essa ressecção possui, como objetivo, a geração de extremidades invasivas do tipo 3' fita simples, que possibilitam o processo recombinacional. Uma vez que as extremidades 3' fita simples estejam disponíveis, a proteína Rad51 liga-se a estas e inicia o evento de

invasão a uma fita homóloga não danificada, que é usada como molde pela DNA polimerase. Desta maneira, a região 3' terminal da fita danificada é restaurada e, terminada a extensão, as extremidades livres são novamente reunidas pela DNA ligase I (JACKSON, 2002).

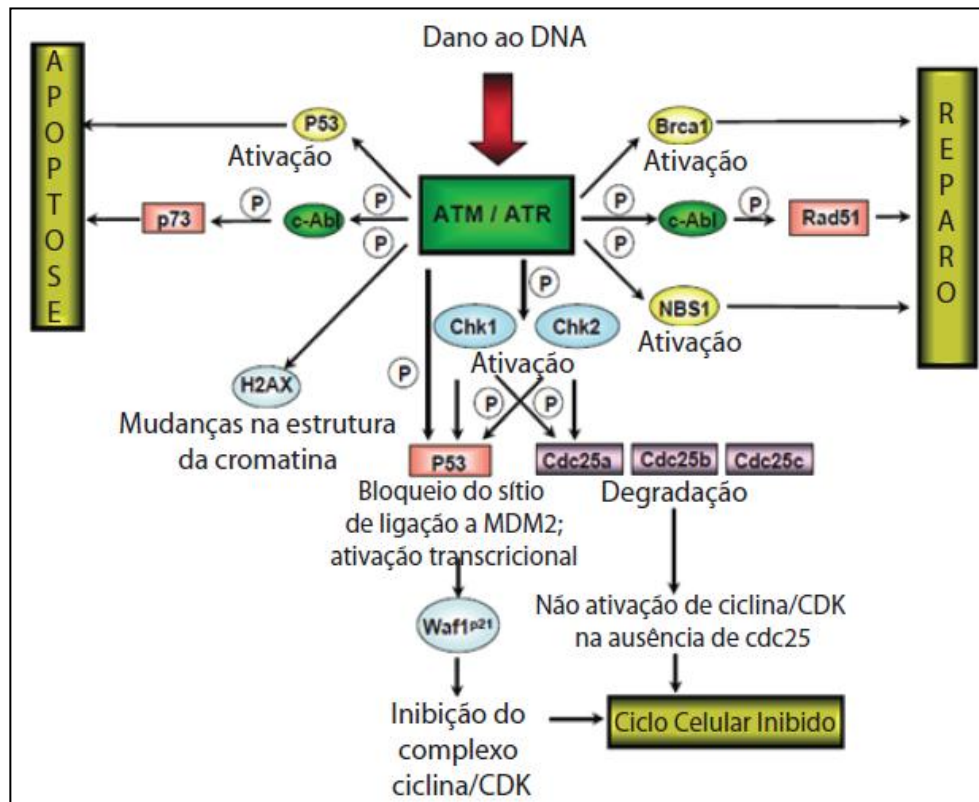
A NHEJ está presente quando há necessidade de religar duas extremidades de DNA, resultantes de uma quebra, que não possuam homologia entre si. Além disso, pequenas regiões de homologia existentes entre duas fitas não homólogas de DNA podem ser utilizadas para reparação (SHRIVASTAV *et al.*, 2008). Embora os mecanismos moleculares da via NEHJ não sejam totalmente conhecidos, a maquinaria básica consiste nas proteínas Xrcc4, na DNA ligase IV, no heterodímero Ku70/Ku80, bem como na subunidade catalítica da proteína cinase dependente de DNA (DNA-PKcs - *DNA-dependent protein kinase*) (DUDASOVA *et al.*, 2004; WETERINGS *et al.*, 2009).

O reconhecimento e a sinalização de dano ao DNA é um pré-requisito para a subsequente resposta celular, como reparo da lesão, parada no ciclo celular e apoptose. A parada no ciclo celular evita que a célula se divida e propague o erro às células filhas. No momento em que a reparação é concluída, a célula retorna a crescer e a proliferar normalmente. Porém, se o erro tiver sido muito grande e a célula não conseguir realizar um reparo eficiente do DNA, a célula entra em apoptose (HARRISON E HABER, 2006).

O reconhecimento da quebra do DNA é realizado por um grupo de proteínas, entre as quais se encontram ATM (SMITH *et al.*, 1999), proteína relacionada a ATM e Rad3 (ATR - *ataxia telangiectasia and Rad3 related*) e DNA-PK (HARTLEY *et al.*, 1995). Ativação de ATM se dá preferencialmente em resposta à radiação ionizante e quebra de fita dupla de DNA. Sabe-se que o complexo MRE11-RAD50-Nbs1 (MRN) atua como um sensor para a ATM e a recruta para o local da quebra na molécula de DNA (LEE E PAULL, 2005). ATM é uma proteína homóloga a integrantes da família da PI3K (SAVITSKY *et al.*, 1995) e, após sua ativação, ATM fosforila a histona H2AX, que parece recrutar fatores de reparo, como RAD51 e BRCA1 (CELESTE *et al.*, 2002; REDON *et al.*, 2002). ATM também causa a estabilização de p53, permitindo então sua fosforilação, resultando, através da ativação de múltiplas etapas, na parada da progressão do ciclo celular. ATM também induz a ativação da Chk2, uma proteína cinase relacionada aos pontos de checagem na transição G1/S

e da fase S e que, por sua vez, também fosforila p53 (revisado em CHRISTMANN *et al.*, 2003).

A proteína ATR é ativada principalmente durante a quebra de fita simples de DNA. Esta proteína ativada fosforila e ativa a cinase de ponto de checagem 1 (Chk1 – *checkpoint kinase1*) que fosforila e induz a degradação de cdc25A, levando a parada na progressão do ciclo celular. ATR também fosforila e ativa diversas proteínas de reparo de DNA, como RAD17 (POST *et al.*, 2001) e BRCA1 (TIBBETTS *et al.*, 2000). Assim, a fosforilação de diversas proteínas por ATM/ATR, principalmente Chk1, Chk2 e p53 é crucial para levar à parada no ciclo celular, apoptose e reparo de DNA (figura 13).



**Figura 13 – Sinalização mediada por ATM/ATR em resposta ao dano ao DNA, no controle do ciclo celular e na indução da apoptose.** Adaptado de CHRISTMANN *et al.*, 2003.

## 1.6 Hipótese do trabalho

Devido ao fato de o resveratrol e a quercetina se mostrarem potenciais drogas antitumorais, nós hipotetizamos que estes compostos seriam eficazes em induzir a morte celular em gliomas.

## 1.7 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito antitumoral do resveratrol e da quercetina em um modelo de glioma *in vitro* e *in vivo* e investigar potenciais mecanismos de ação.

### 1.7.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito antitumoral do resveratrol e da quercetina em diversas linhagens de GBM humano, em uma linhagem de rato e em uma de camundongo (Capítulo 1).
- Verificar os efeitos das drogas sobre a progressão do ciclo celular e indução de morte celular apoptótica, necrótica e senescência celular (Capítulo 1).
- Avaliar o efeito destas drogas sobre a via de sinalização PI3K, envolvida na sobrevivência e crescimento celular (Capítulo 1).
- Investigar a indução de senescência celular e suas possíveis causas, como estresse oxidativo, dano ao DNA ou outras vias de sinalização clássicas (Capítulo 2).
- Verificar o efeito antitumoral destes polifenóis *in vivo*, num modelo de implante de gliomas em cérebro de rato (Capítulo 3).

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Capítulo 1

#### **Resveratrol and Quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells**

Lauren L. Zamin, Eduardo C. Filippi-Chiela, Patricia Dillenburger-Pilla, Fabiana  
Horn, Christianne Salbego, Guido Lenz

Periódico: **Cancer Science**

Estado: **Publicado**

# Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells

Lauren L. Zamin,<sup>1</sup> Eduardo C. Filippi-Chiela,<sup>1</sup> Patricia Dillenburg-Pilla,<sup>3</sup> Fabiana Horn,<sup>1</sup> Christianne Salbego<sup>2</sup> and Guido Lenz<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Biophysics Department, <sup>2</sup>Biochemistry Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre; <sup>3</sup>Biochemistry Department, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil

(Received March 26, 2009/Revised April 30, 2009/Accepted May 7, 2009/Online publication June 2, 2009)

**Glioma is the most frequent and malignant primary human brain tumor with dismal prognosis despite multimodal therapy. Resveratrol and quercetin, two structurally related and naturally occurring polyphenols, are proposed to have anticancer effects. We report here that resveratrol and quercetin decreased the cell number in four glioma cell lines but not in rat astrocytes. Low doses of resveratrol (10  $\mu$ M) or quercetin (25  $\mu$ M) separately had no effect on apoptosis induction, but had a strong effect on caspase 3/7 activation when administered together. Western blot analyses showed that resveratrol (10  $\mu$ M) and quercetin (25  $\mu$ M) caused a reduction in phosphorylation of Akt, but this reduction was not sufficient by itself to mediate the effects of these polyphenols. Most important, resveratrol and quercetin chronically administered presented a strong synergism in inducing senescence-like growth arrest. These results suggest that the combination of polyphenols can potentialize their antitumoral activity, thereby reducing the therapeutic concentration needed for glioma treatment. (*Cancer Sci* 2009; 100: 1655–1662)**

**M**alignant gliomas comprise the most common and devastating types of primary central nervous system (CNS) tumors and have an incidence of 5–8/100 000 population. The median survival of patients with malignant gliomas is only 12 months after diagnosis.<sup>(1)</sup> Gliomas are characterized by diffuse infiltrations of the surrounding CNS tissue,<sup>(2)</sup> and this characteristic is one of the main reasons for the lack of successful treatment of this type of cancer.<sup>(3)</sup> Nevertheless, the therapeutic strategy for gliomas has remained essentially unchanged for decades due to a limited understanding of the biology of the disease. There is an urgent need to develop mechanism-based approaches for the management of glioma, i.e. to develop strategies which can eliminate only the damaged (pre-malignant) or malignant cells without harming normal CNS tissue.<sup>(4)</sup>

Resveratrol (Rsv; 3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) is found in many plant species such as grapes, berries, and peanuts, and exhibits pleiotropic health beneficial effects, including anti-oxidant, anti-inflammatory, cardioprotective, neuroprotective, and antitumor activities.<sup>(5–7)</sup> The cancer chemopreventive properties of Rsv were first appreciated when Jang *et al.* (1997)<sup>(5)</sup> demonstrated that Rsv inhibited cellular events associated with tumor initiation, promotion, and progression. It has been shown that Rsv can induce apoptotic cell death in a number of cancer cell lines, including U251 human glioma cells,<sup>(8)</sup> RT-2 rat glioma cells,<sup>(9)</sup> and the C6 rat glioma cell line.<sup>(10)</sup> It is thought that Rsv affects whole pathways and sets of intracellular events rather than a single enzyme and is, therefore, less prone to induce resistance in cancer cells.<sup>(11)</sup>

Quercetin (Quer; 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) is a flavonoid ubiquitous in nature that has recently been described as a potential anticancer agent<sup>(12)</sup> because of its ability to modulate cell proliferation,<sup>(13)</sup> survival, and differentiation, targeting key

molecules responsible for tumor cell growth such as p53, p21, and Ras in several cancer cell types.<sup>(14,15)</sup> Quer induces little or no toxicity when administered orally or intravenously, and preliminary animal and human data indicate that Quer inhibits tumor growth.<sup>(16)</sup> We have previously demonstrated that Quer induced necrotic and apoptotic cell death in the U138-MG human glioma cell line,<sup>(17)</sup> and Kim *et al.* (2007) demonstrated that Quer treatment resulted in loss of cell viability in the A172 glioma cell line.<sup>(18)</sup>

Fresh grape skin contains about 50–100  $\mu$ g/g of Rsv and 40  $\mu$ g/g of Quer.<sup>(19,20)</sup> In red wine, the concentration of Rsv is in the range of 7–13  $\mu$ M<sup>(21)</sup> and Quer is in the range of 7.4  $\mu$ M,<sup>(22)</sup> while commercial grape juice contains about 20  $\mu$ M of *trans*-resveratrol.<sup>(23)</sup> In rats, injection of Rsv or Quer lead to levels of these drugs in the low micromolar range in the CNS, suggesting that they could potentially be used as therapeutic agents against gliomas.<sup>(24,25)</sup>

The mechanisms of chemopreventive effects of Rsv and Quer are not well understood. Moreover, studies suggest that targeting regulatory molecules of the cell cycle, apoptosis, and senescence in cancer cells can be an effective strategy for the management of cancer<sup>(26–28)</sup> and, at present, many works have shown that Rsv and Quer can modulate some of these processes.<sup>(17,29–31)</sup> Both Rsv and Quer have been suggested to extend lifespan of model organisms<sup>(32–35)</sup> and to reduce cell senescence in normal cells.<sup>(36,37)</sup> There is only one report showing that Rsv can induce senescence in cancer cells<sup>(31)</sup> and no such report was found for Quer. Besides, no study considering the interactions of these agents on cell senescence was found in the literature. Here we show that Rsv and Quer cooperate in triggering apoptosis, inhibiting cell proliferation and, most strikingly, in inducing senescence-like growth arrest in gliomas cell lines.

## Materials and Methods

**Cell culture.** Rat C6 glioma cells, human U87-MG, and U138-MG glioma cells were obtained from ATCC (Rockville, MD, USA). Mouse GL261 glioma cell line was gently provided by Dr Ilker Eytüpoğlu, University of Zurich. All culture materials were purchased from Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA). Cells were cultured in DMEM low glucose supplemented with 10% FBS (5% for C6 cells), 1% penicillin/streptomycin, and 0.1% anphoterecin B at 37°C/5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator.

**Cell treatments.** Rsv and Quer were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) and administered for 24–72 h. Rsv (10  $\mu$ M) and Quer (25  $\mu$ M) were also added together and are referred in the text as cotreatment. The PI3K (Phosphoinositide-3-kinase) inhibitor LY294002 (LY; Cell Signaling, Beverly, MA,

<sup>4</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: lenz@ufrgs.br



USA), was administered (10  $\mu$ M) for 72 h. The vehicle carrier DMSO (Acros Organics, NJ, USA) was present in the control wells at a maximum concentration of 0.5%.

**Astrocyte cultures.** Primary astrocyte cultures were prepared as previously described.<sup>(38)</sup> Briefly, hippocampi of new-born Wistar rats (1–2 days old) were removed and mechanically dissociated by sequential passage through a Pasteur pipette. Cell suspension was centrifuged at 1000 *g* for 5 min. The supernatant was discarded, and the pellet resuspended in culture medium containing DMEM with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin and 0.1% anphoterecin B. Cells were plated at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> onto 24-well plates pretreated with polylysine in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C, and allowed to grow to confluence (14 days). All animal use procedures were approved by the local Animal Care Committee and were in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

**Cell number determination and propidium iodide (PI) staining.** The number of cells was counted in a hemocytometer and the value of the treated cells was calculated as a percentage of the control. For PI staining, cells were treated with the drugs in the presence of 6  $\mu$ M PI (Sigma) for 72 h and images were obtained using a Carl Zeiss Fluorescence Inverted Microscope with a rhodamine filter (Carl Zeiss, Jena, Germany). Results are presented as ratio of cells marked with PI to total cells of at least three fields of three experiments analyzed by Image J software (NIH Image, Rockville, MD, USA).

**Mitotic index (MI) determination.** Cells were fixed with 70% ethanol for 15 min and stained with 6  $\mu$ M PI. MI was evaluated by counting at least 300 cells per sample using Image J software and the percentage of cells with condensed chromatin was determined.

**Long-term culture of C6 cells in the presence of Rsv and Quer and determination of population doublings.** Cells were plated at each passage in 24-well plates at a density of 50 000 cells/well and exposed to DMSO or different concentrations of Rsv and Quer with renewal every 48 h of medium and treatments. Confluent cells were passaged, and population doublings (PD) were determined according to the formula  $PD = [\log N(t) - \log N(t_0)] / \log 2$ , where  $N(t)$  is the number of cells per well at time of passage, and  $N(t_0)$  is the number of cells seeded at the previous passage.<sup>(31)</sup> The sum of PDs was then plotted against time of culture.

**Colony formation assay.** After 6 or 12 days of treatments, cells were trypsinized, counted, and plated at concentration of 1000 cells/well into six-well plates. After 7 days without treatments, senescence induction was analyzed as described below and cells were stained with Giemsa solution to determinate colony number formation.<sup>(39)</sup> The percentage of colony forming efficiency was calculated in relation to values of untreated control cells.

**Senescence-associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) staining.** After 12 days in culture, cells were washed in PBS, fixed in 3% formaldehyde for 15 min at room temperature, washed, and incubated with fresh SA- $\beta$ -gal staining solution containing 1 mg/mL X-gal (Sigma), 40 mM citric acid/sodium phosphate (pH 6.0), 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM NaCl, and 2 mM MgCl for 12–16 h at 37°C.<sup>(40)</sup> Results are presented as ratio of SA- $\beta$ -gal-positive cells to total cells of at least three fields of three experiments.

**Caspase 3/7 activity.** Measurement of caspase 3/7 activity was done as previously described.<sup>(41)</sup> After treatments, C6 cells were lysed and 40  $\mu$ g of protein were incubated with a reaction buffer. The caspase 3/7 substrate Ac-DEVD-MCA (Peptide Institute, Osaka, Japan) was present at a final concentration of 20  $\mu$ M. The cleavage of the fluorogenic synthetic substrate was quantified by fluorimetry in a Spectramax Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The fluorescence intensity was calibrated with standard concentrations of MCA, and the caspase 3/7 activity was calculated using the slope of the accumulated fluorogenic product and expressed in picomols per

min per mg of protein. Cells treated with 50  $\mu$ M etoposide (Sigma) for 24 h were used as positive control.

**Annexin V staining.** Phosphatidylserine externalization was determined by annexin fluorescent signal of Annexin-V-FLUOS Staining Kit assay (Roche, Germany) according to the manufacturer's protocol. C6 cells were treated and incubated with PI and annexin for 10 min at room temperature and photographed. Necrotic cells were identified by double PI and annexin fluorescent staining, while apoptotic cells were positive only for annexin.

**Immunoblotting.** Preparation of protein samples and western blot were performed as described previously with minor modifications.<sup>(7)</sup> Whole-cell lysate (40  $\mu$ g) was electrophoresed and electroblotted onto a PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). The membrane was blocked in 5% skimmed milk/TBST for an hour and probed with Ab to phosphatase and tensin homolog (PTEN) (1:2000 dilution; Cell Signaling), phospho-Akt (pAkt Ser473) (1:1000; Cell Signaling), and Akt (1:1000; Cell Signaling) for 1 h at room temperature. Bound Ab was detected with appropriate HRP secondary Ab (1:2000; Cell Signaling) using ECL and X-ray films (Kodak X-Omat, Rochester, NY, USA). The optical density of the bands was obtained in with Bio-Rad software (Quantity One; Hercules, CA).

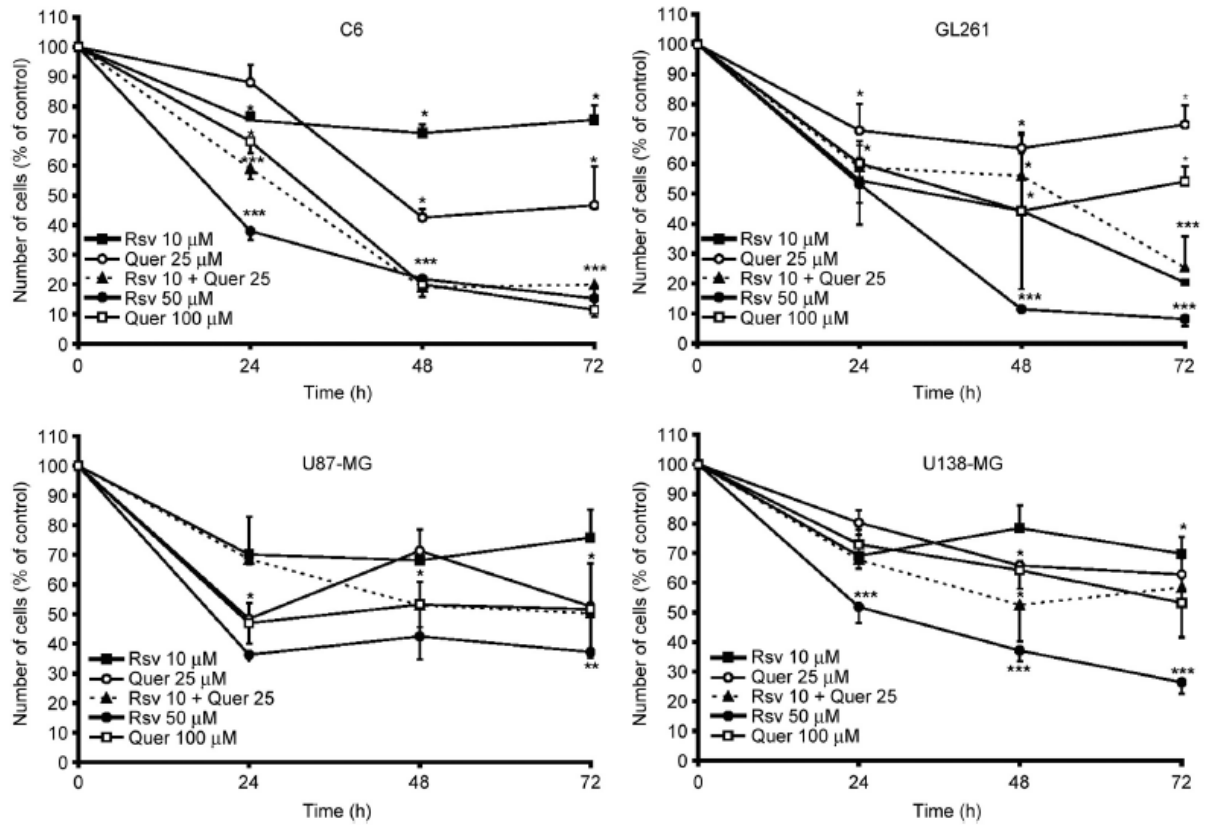
**Statistical analysis.** All data were expressed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed using ANOVA, followed by SNK post-hoc test for multiple comparisons. Differences with  $P < 0.05$  were considered significant. Analyses of the data were performed using the software GraphPad INSTAT, (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## Results

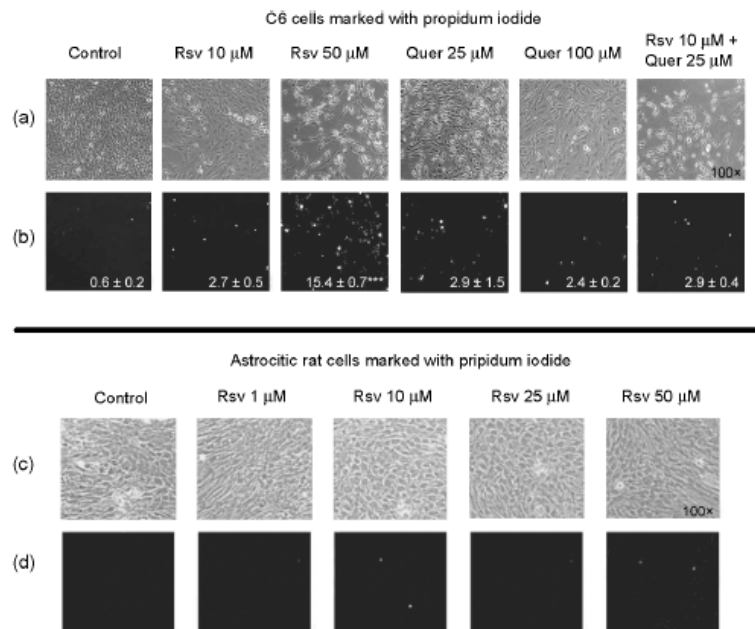
**Rsv and Quer decreased cell numbers.** In search of novel strategies to induce cell death, we investigated the antitumor effect of the natural compounds Rsv and Quer on glioma cell lines. As shown in Figure 1, Rsv and Quer decreased the number of glioma cells in a time- and dose-dependent manner. In C6 cells, after 72 h of 10  $\mu$ M Rsv and 25  $\mu$ M Quer treatment, the number of cells was reduced 25% and 54%, respectively. When cells were treated with both compounds at the same concentration and exposure time, the number of cells was reduced 80%, indicating an additive effect of the cotreatment. This reduction was similar to the result observed with higher concentrations of Rsv and Quer. These results were confirmed by MTT assay (data not shown). In other glioma cell lines, the additive effect was not observed, with 50  $\mu$ M Rsv being the dose that induced the biggest cell number reduction after 72 h of treatment. The difference of response could be explained by the genetic characteristics of each cell line, since U87-MG and U138-MG are deleted for PTEN, and U138-MG is mutant for TP53, whereas C6 has both proteins functional.<sup>(42,43)</sup>

To evaluate whether the cytotoxic effect of Rsv is selective to glioma cell cultures, primary astrocyte cultures and glioma C6 cells were treated for 72 h with Rsv and stained with PI. As shown in Figure 2(a,b), PI incorporation was highest in glioma cells treated with 50  $\mu$ M Rsv. This effect was not observed in rat astrocyte cultures (Fig. 2c,d). C6 cells treated with 25–100  $\mu$ M Quer (Fig. 2a,b) presented no significant PI incorporation.

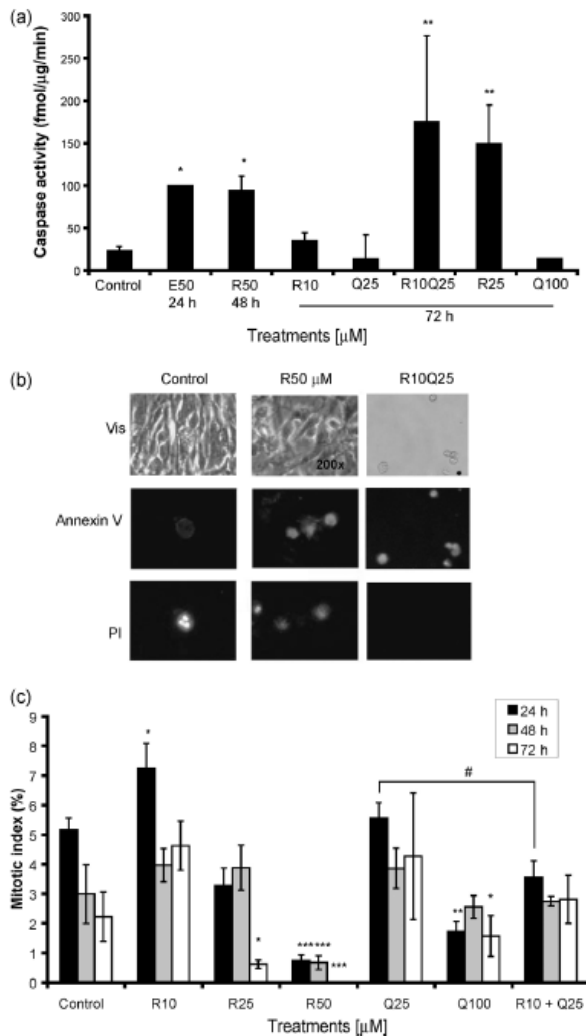
**Rsv activated caspase 3/7.** To assess whether cytotoxicity of Rsv and Quer was due to apoptosis induction, we measured the activity of the executioner caspase 3/7<sup>(44)</sup> after treating C6 cells with these compounds. Rsv (50  $\mu$ M) increased caspase 3/7 activity after 48 h of treatment at an intensity similar to 50  $\mu$ M etoposide, used as a positive control (Fig. 3a).<sup>(41)</sup> This activation was slow, since there was no detectable caspase 3/7 activation before this time (data not shown). Quer (100  $\mu$ M) was unable to induce caspase 3/7 even at 72 h of treatment. Neither 10  $\mu$ M Res nor 25  $\mu$ M Quer alone were able to induce caspase 3/7 activation;



**Fig. 1.** Resveratrol (Rsv) and quercetin (Quer) reduced the number of human, mouse, and rat gliomas. Glioma cell lines from rat (C6), mouse (GL261), and humans (U87-MG and U138-MG) were treated with 10 or 50 μM Rsv, 25 or 100 μM Quer, and 10 μM Rsv plus 25 μM Quer for 24, 48, and 72 h; cells were then counted in a hemocytometer. Each time point represents the mean ± SEM of three independent experiments. ANOVA was followed by SNK post test. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.



**Fig. 2.** Resveratrol (Rsv) increased propidium iodide (PI) incorporation in C6 cells but not in astrocyte cell cultures. C6 cells were treated with 10 or 50 μM Rsv, 25 or 100 μM quercetin (Quer), and 10 μM Rsv plus 25 μM Quer. Astrocyte cultures were treated with 1, 10, 25, or 50 μM Rsv. At the end of the treatments (72 h), the images were obtained using a Carl Zeiss inverted microscope. Representative light micrographs of C6 (a), astrocyte cell cultures (c), fluorescence micrographs of C6 (b), and astrocyte cell cultures (d) stained with PI (×100) are shown. The numbers below the pictures depict values of PI staining (ratio of PI labeled cells/total number cells, normalized to control) as mean ± SEM of three independent experiments. ANOVA was followed by SNK post test \*\*\**P* < 0.001.



**Fig. 3.** Resveratrol (R) induces caspase 3/7 activation, annexin V staining, and reduces mitotic index. C6 cells were treated with Rsv (10, 25, or 50 μM) and quercetin (Q) (25 or 100 μM) and 10 μM Rsv plus 25 μM Quer for 48 or 72 h. Caspase 3/7 activity was estimated by fluorogenic assay for the effector caspase 3/7 (a). Cells were stained with annexin V-FLUOS and propidium iodide (PI) and positive cells were observed using an inverted fluorescence microscope ( $\times 200$ ). The same fields are shown. Control cells (left panels), 50 μM Rsv (middle panels), and 10 μM Rsv plus 25 μM Quer (right panels) observed under light microscopic image (upper panel), with annexin V staining (middle panel) and PI staining (lower panel) after 72 h of treatments (b). Cells were treated as indicated above for 24, 48, and 72 h and cells in mitosis were visualized by PI staining. The results represent mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. ANOVA was followed by SNK post test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

however, a strong activation was observed with the cotreatment, suggesting a synergistic effect of these compounds in caspase 3/7 activation (Fig. 3a).

To verify if the caspase 3/7 activation was leading to apoptosis, we analyzed annexin V (an apoptosis marker) and PI (necrosis or late apoptosis marker) staining. After 72 h of 50 μM Rsv and cotreatment of Rsv and Quer, there was an increase in annexin V and PI staining, suggesting that the observed caspase 3/7 activation was leading to apoptosis (Fig. 3b).

In order to investigate the effect of Rsv and Quer on cell cycle progression we determined the MI. The MI decreased with 50 μM Rsv and 100 μM Quer treatments but did not decrease with lower doses of Rsv and Quer. Surprisingly, 10 μM Rsv increased the MI in the first 24 h of treatment, but had no effect at later time-points. Rsv and Quer cotreatment induced a small reduction in MI, which was not observed by these treatments alone (Fig. 3c). Cell cycle distribution indicated that Rsv (50 μM) caused a modest G1 arrest ( $60 \pm 3\%$  compared to  $48 \pm 5\%$  control cells) while Quer (100 μM) induced an S-phase accumulation ( $20 \pm 3\%$  compared to  $16 \pm 2$  control cells) at 24 h. These effects were no longer observed at 72 h of treatment (data not shown).

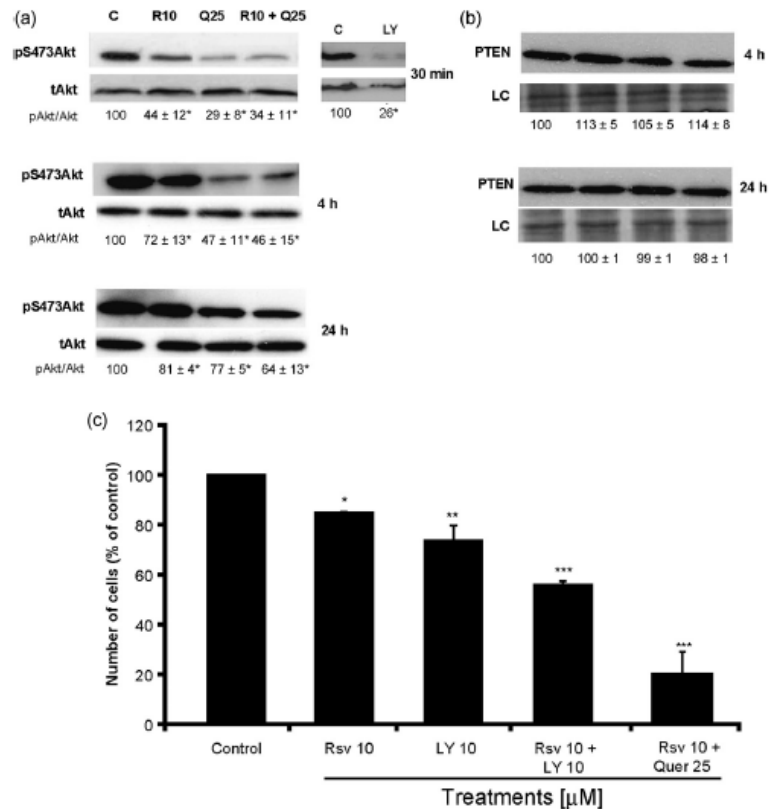
**Reduction in pAkt by Rsv and Quer is not essential for their cytostatic effects.** Given the evidence that PI3K/Akt is overactivated in a wide range of tumor types and triggers a cascade of responses that include cell growth, proliferation, and survival,<sup>(45)</sup> we wondered whether this pathway could be involved in Rsv and Quer apoptosis induction and growth arrest. Rsv (10 μM) and Quer (25 μM) reduced the phosphorylation of Akt to a level comparable to the PI3K inhibitor LY without changing the intracellular Akt levels (Fig. 4a). This effect was more intense within 30 min of treatment, but was also observed at 4 h and even at 24 h (Fig. 4a). This reduction in the phosphorylation of Akt was not due to alteration in expression of PTEN, which was not affected by the treatments (Fig. 4b).

To verify if the reduction in the phosphorylation of Akt was responsible for the cell number decrease, we counted cells after LY treatment. While Rsv plus Quer reduced pAkt to 34% of the control and the cell number to 20% of the control, LY reduced the same parameter to 26% and 70% respectively (Fig. 4c). Taken together, these results indicated that there was not a relationship between pAkt reduction and cell number decrease since LY was more potent in reducing pAkt and less effective in decreasing cell number.

**Rsv and Quer cooperated in inducing senescence-like growth arrest in C6 cells.** In order to assess a potential pro-senescence activity of chronically administered Rsv and Quer, we cultivated C6 cells in the presence of Rsv and Quer and determined population doublings during 12 days. Rsv (10 μM) or Quer (25 μM) had only a small effect on the proliferation rate of C6 cells, but Rsv plus Quer lead to a striking reduction in long-term glioma growth (Fig. 5a). Senescence induction by Rsv plus Quer, measured by the activity of acidic β-galactosidase, a biochemical marker for lysosome acidification,<sup>(40)</sup> was cooperative, since each treatment alone produced around 20% of SA-β-gal positive cells, whereas combination of Rsv and Quer induced staining in almost all cells (Fig. 5b,c).

Despite a lack of relationship between pAkt reduction and cell number decrease in the acute treatments, we analyzed whether Akt played a role in chronic treatments. For this reason, we treated cells for 12 days with 10 μM LY and determined population doublings. LY, despite blocking Akt (Fig. 4a), did not affect the proliferation rate of C6 cells and these cells did not present SA-β-gal staining (Fig. 5a-c), corroborating the results found by acute treatments.

In order to assess the recovery ability of cells that survived the long-term Rsv and Quer treatments, we performed colony formation assay. For this, after 12 days of treatments we allowed cells to grow for 7 days without treatment and then we analyzed their ability to form colonies. The colony formation was reduced after treatment with 25 μM Rsv, suggesting that in these cases, a sub-population of cells that survived the 12-day treatment were committed to arrest or death, but another sub-population survived and formed SA-β-gal-negative colonies. (Fig. 5d,e). At the end of 12 days of Rsv and Quer cotreatments, no cells survived to form colonies. Therefore, we performed a test after 6 days of cotreatment followed by 7 days without treatment and



**Fig. 4.** Resveratrol (Rsv) and quercetin (Quer) decreased the phosphorylation of Akt. C6 cells were treated with 10 μM Rsv, 25 μM Quer, or 10 μM Rsv plus 25 μM Quer, for 30 min, 4 h, and 24 h, and with 10 μM LY294002 for 30 min. Lysates were subjected to western blot analysis for pS473Akt and total Akt antibodies (a) and PTEN antibody (b). Representative blots of three independent experiments are shown and the numbers below the blots depict values of densitometric evaluation as mean ± SEM. Number of C6 cells treated as indicated for 72 h (c). The results represent mean ± SEM from three independent experiments. ANOVA was followed by SNK post test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

observed that the colony formation was reduced by 40%; and as observed with the other treatments, cells that survived were not SA-β-gal-positive (Fig. 5d,e).

#### Discussion

In the present work we found that Rsv and Quer elicited cytostatic and cytotoxic effects on C6 glioma cell lines by reducing cell growth when administered acutely and chronically. The type of effect elicited was dependent on drug concentration and exposure time. The concentrations at/or above 50 μM Rsv induced necrosis, apoptosis, and cell cycle arrest in early time-points, whereas lower concentrations of Rsv required the presence of Quer for the induction of long-term growth arrest and senescence. Others have observed additive effects with acute treatments with Rsv plus Quer in leukemia, breast cancer, and melanomas,<sup>(46–48)</sup> but these studies did not evaluate long-term effects of this combination.

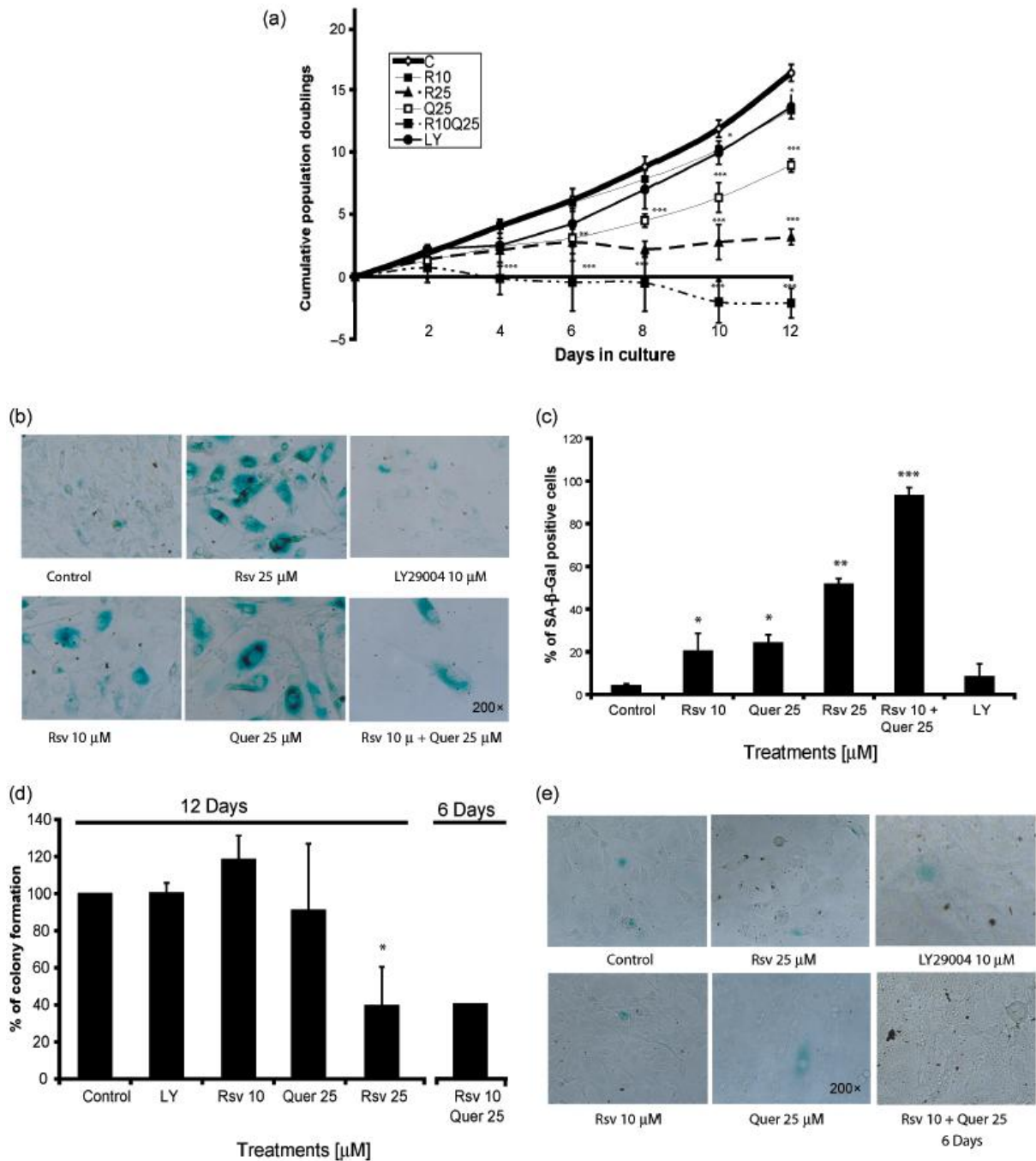
Inhibition of apoptosis and cell cycle deregulation are two mechanisms of tumor formation, and many chemopreventive agents act through the induction of apoptosis and cell cycle arrest to block the carcinogenic process.<sup>(49–52)</sup> Our data showed that C6 cells treated with 50 μM Rsv for 72 h and Rsv plus Quer induced an increase in caspase 3/7 activity and an augmented annexin V staining. As soon as 24 h after 50 μM Rsv treatment, a strong decrease in MI accompanied by a small reduction in the G1 population was observed. These results support our notion that the cancer preventive effect of Rsv plus Quer may occur through the induction of apoptosis.<sup>(8,53)</sup> Previous works showed that the upregulation of p53-responsive genes such as p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, p300/CBP, and Apaf1 by Rsv predisposed human prostate cancer (LNCaP) cells to undergo apoptosis.<sup>(54)</sup> Similarly, Rsv- and

Quer-induced apoptosis in HepG2 cells was accompanied by a p53-dependent increase in Bax and p21.<sup>(55,56)</sup>

Cell cycle deregulation and apoptosis are closely related events. The PI3K/Akt pathway has a key role in regulating both processes and, as recently described, is involved in senescence induction.<sup>(57,58)</sup> Besides this, it has been reported that increased PI3K activity due to loss of PTEN, gene amplification, and mutation of catalytic and regulatory subunits of PI3K is common in high grade glioma,<sup>(59)</sup> and that inhibition of PI3K is cytotoxic in several human glioma cell lines *in vitro*.<sup>(60)</sup> Both Rsv and Quer reduced the phosphorylation of Akt at early time-points and despite reducing pAkt to a similar level to Rsv or Quer, LY produced only a small reduction in cell numbers with acute and chronic treatments. These results indicate that inhibition of the PI3K/Akt pathway does not play an essential role in Rsv- or Quer-induced cell death. Other studies have found an inhibitory effect of Rsv on the PI3K/Akt pathway, but in this case the effect was mimicked by a PI3K inhibitor.<sup>(61)</sup>

The induction of senescence, irreversible growth arrest, is regarded in cancer cells as a means to halt tumor initiation and progression.<sup>(62)</sup> Recent studies have revealed some molecular basis for cellular senescence, which may involve the p38 MAPK cascade, and Rb and p53 tumor suppression pathways.<sup>(63)</sup> Rsv and Quer are known for their antisenescent effects induced by a variety of stresses, with only one report that shows Rsv-induced senescence in the HCT116 colon cancer cell line<sup>(31)</sup> and no report of Quer-induced senescence. The striking synergy observed with low concentrations of Rsv and Quer point to the regulation of converging pathways to the senescence machinery.

Long-term exposure to low concentrations of Rsv (10–25 μM) or Quer (25 μM) induced senescence-like growth arrest. More important, the clear additive – even synergistic – effect between



**Fig. 5.** Resveratrol (Rsv) and quercetin (Quer) induce senescence in C6 cells. C6 cells were cultivated in the continuous presence of 10 or 25  $\mu\text{M}$  Rsv, 25  $\mu\text{M}$  Quer, 10  $\mu\text{M}$  Rsv plus 25  $\mu\text{M}$  Quer, or 10  $\mu\text{M}$  LY294002 for 12 days and cumulative population doublings were plotted against time (a). After this time cells were stained for senescence-associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) and photographed (b). The bar graph represents the ratio of SA- $\beta$ -gal-positive cells to total cells of at least three fields of three independent experiments (c). Colony formation efficiency of C6 cells 7 days after 12 days Rsv or Quer treatment or 6 days of cotreatment (d), and SA- $\beta$ -gal staining at the end of the colony formation assay (e). ANOVA was followed by SNK post test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Rsv and Quer was observed on cell number decrease, caspase 3/7 activation, long-term proliferation inhibition, and senescence induction. This indicates that different targets may be involved in the regulation of these features and supports the notion that the combination of Rsv and Quer is an interesting strategy for glioma treatment.

Inhibition of Akt<sup>(57)</sup> as well as activation of Akt<sup>(58)</sup> have been linked to increase in senescence. Since we found that Rsv and Quer reduced pAkt, we investigated whether these effects could be involved with long-term growth arrest and senescence induction. LY, despite dramatically reducing Akt phosphorylation, did not have any effect on cell growth and senescence, indicating that pAkt reduction is not solely responsible for this process.

In this work we observed two types of effects, with high doses of Rsv inducing apoptosis, low doses inducing senescence, and cotreatment with low doses of Rsv and Quer inducing both. It is still not clear what determines if a cell will undergo senescence or apoptosis. Although most cells are capable of both, these processes seem to be mutually exclusive.<sup>(28)</sup> Cell type, gene expression, and level of tumour suppressor protein p53<sup>(64,65)</sup> appear to be determinant for the cell to undergo apoptosis or senescence. Some studies clearly point to a crosstalk between the processes of apoptosis and cellular senescence;<sup>(66)</sup> however, the cross-regulation between these processes is far from understood and further studies are needed to clarify their relationship.

The synergistic induction of senescence and long-term growth inhibition by Rsv and Quer suggests that the combination of these agents is a good candidate treatment for preclinical studies on glioma tumors. Studies in rodents indicate that both Rsv and Quer cross the intact blood-brain barrier and reach concentrations

in the range of 0.1 and 0.3  $\mu\text{mol/kg}$ , respectively.<sup>(24,25)</sup> Glioma growth may break the blood-brain barrier, probably increasing the concentration reachable inside the glioma. It is worthwhile noting that Rsv is not toxic to primary astrocyte cultures and both Rsv and Quer are protective against oxygen and glucose deprivation in hippocampal organotypic cultures,<sup>(7,17)</sup> making these agents ideal for therapeutic intervention in CNS tumors.

Taken together, our studies add a novel facet to the cancer chemopreventive action of Rsv and Quer. Acutely administered high doses of Rsv can induce apoptosis and chronically administered Rsv and Quer in subapoptotic doses can induce senescence-like growth arrest.

Several reports have investigated the effect of individual polyphenols. Because the majority of dietary compounds contain a mixture of polyphenols, it is important to understand their combinatorial effect at dietary concentrations. For a further potential application of Rsv and Quer, isolated or combined, as cancer chemopreventive agents or adjuvants in chemotherapy, more studies focusing on bioavailability, the half-life of Rsv and Quer, the interaction of both compounds and their metabolites are needed. This is even more necessary when taken into account that senescence induction normally requires the continuous presence of the inducing agents at the tumor site.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian funding agencies CNPq, FAPERGS, and PROPESQ/UFGRS. We thank Nicolle Barbieri for help with caspase assay and Pítia Ledur for help with preparation of the manuscript.

#### References

- 1 Avgeropoulos NG, Batchelor TT. New treatment strategies for malignant gliomas. *Oncologist* 1999; **4**: 209–24.
- 2 Russell DS, Rubinstein LJ. *Pathology of Tumours of the Nervous System*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989.
- 3 Tonn JC, Goldbrunner R. Mechanisms of glioma cell invasion. *Acta Neurochir Suppl* 2003; **88**: 163–7.
- 4 Mukhtar H, Ahmad N. Cancer chemoprevention: future holds in multiple agents: contemporary issues in toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; **158**: 207–10.
- 5 Jang M, Cai L, Udeani GO *et al*. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; **275**: 218–20.
- 6 Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli AAE, Bertelli A, Das DK. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1999; **27**: 160–9.
- 7 Zamin LL, Dillenburg-Pilla P, Argenta-Comiran R *et al*. Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: involvement of PI3-K pathway. *Neurobiol Dis* 2006; **24**: 170–82.
- 8 Jiang H, Zhang L, Kuo J *et al*. Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Mol Cancer Ther* 2005; **4**: 554–60.
- 9 Tseng SH, Lin SM, Chen JC *et al*. Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 2190–202.
- 10 Zhang W, Fei Z, Zhen H, Zhang J, Zhang X. Resveratrol inhibits cell growth and induces apoptosis of rat C6 glioma cells. *J Neuro-Oncol* 2007; **81**: 231–40.
- 11 Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res* 2008; **658**: 68–94.
- 12 Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* 2008; **269**: 315–25.
- 13 Hosokawa N, Hosokawa Y, Sakai T *et al*. Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possibly cell-cycle-related 17-kDa protein, in human colon cancer cells. *Int J Cancer* 1990; **45**: 1119–24.
- 14 Avila MA, Velasco JA, Cansado J, Notario V. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res* 1994; **54**: 2424–8.
- 15 Ranelletti FO, Maggiano N, Serra FG *et al*. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. *Int J Cancer* 2000; **85**: 438–45.
- 16 Ferry DR, Smith A, Malkhandi J *et al*. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 1996; **2**: 659–68.
- 17 Braganhol E, Zamin LL, Canedo AD *et al*. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs* 2006; **17**: 663–71.
- 18 Kim EJ, Choi CH, Park JY, Kang SK, Kim YK. Underlying mechanism of quercetin-induced cell death in human glioma cells. *Neurochem Res* 2008; **33**: 971–9.
- 19 Jeandet P, Bessis R, Gautheron B. The production of resveratrol (3,5,4-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am J Enol Viti* 1991; **42**: 41–6.
- 20 Talcott ST, Lee JH. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *J Agric Food Chem* 2002; **50**: 3186–92.
- 21 Goldberg DM, Yan J, Ng E *et al*. A global survey of trans-resveratrol concentrations in commercial wines. *Am J Enol Viti* 1995; **46**: 159–65.
- 22 Dragoni S, Gee J, Bennett R, Valoti M, Sgaragli G. Red wine alcohol promotes quercetin absorption and directs its metabolism towards isorhamnetin and tamarixetin in rat intestine *in vitro*. *Br J Pharmacol* 2006; **147**: 765–71.
- 23 Pace-Asciak CR, Rounova O, Hahn SE, Daimandis EP, Goldberg DM. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin Chim Acta* 1996; **246**: 163–82.
- 24 Asensi M, Medina I, Ortega A *et al*. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**: 387–98.
- 25 de Boer VCJ, Dihal AA, van der Woude H *et al*. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr* 2005; **135**: 1617–8.
- 26 Collins K, Jacks T, Pavletich NP. The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 2776–8.
- 27 Steinbach JP, Weller M. Apoptosis in gliomas: molecular mechanisms and therapeutic implications. *J Neuro-Oncol* 2004; **70**: 245–54.
- 28 Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 729–40.
- 29 Park JW, Choi YJ, Jang MA *et al*. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells. *Cancer Lett* 2001; **163**: 43–9.
- 30 Ahmad N, Adhami VM, Afaq F, Feyes DK, Mukhtar H. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G1-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 1466–73.

- 31 Heiss EH, Schilder YDC, Dirsch VM. Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells. *J Biol Chem* 2007; **282**: 26759–66.
- 32 Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY *et al*. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003; **425**: 191–6.
- 33 Bauer HB, Goulpil S, Garber GB, Helfand SL. An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 12980–5.
- 34 Barger JL, Kayo T, Pugh TD, Prolla TA, Weindruch R. Short-term consumption of a resveratrol-containing nutraceutical mixture mimics gene expression of long-term caloric restriction in mouse heart. *Exp Gerontol* 2008; **43**: 859–66.
- 35 Saul N, Pietsch K, Menzel R, Steinberg CEW. Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: Is DAF-16 involved? *Mech Ageing Dev* 2008; **129**: 611–3.
- 36 Xia L, Wang XX, Hu XS *et al*. Resveratrol reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity by Akt-dependent mechanisms. *Br J Pharmacol* 2008; **15**: 5387–94.
- 37 Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, Galbati F. Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts stress-induced premature senescence upregulates the expression of endogenous caveolin-1. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 2502–17.
- 38 Lenz G, Gonçalves D, Luo Z, Avruch J, Rodnight R, Neary J. Extracellular ATP stimulates an inhibitory pathway towards growth factor-induced cRaf-1 and MEKK activation in astrocyte cultures. *J Neurochem* 2001; **77**: 1001–9.
- 39 Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2001; **61**: 1957–63.
- 40 Dimri GP, Lee X, Basile G *et al*. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9363–7.
- 41 Horn AP, Gerhardt D, Geyer AB *et al*. Cellular death in hippocampus in response to PI3K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. *Neurochem Res* 2005; **30**: 355–61.
- 42 Ishii N, Maier D, Merlo A *et al*. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN Tumor suppressor Genes in Human Glioma Cell lines. *Brain Pathol* 1999; **9**: 469–79.
- 43 Yang L, Wang S, Sung B, Lim G, Mao J. Morphine induces ubiquitin-proteasome activity and glutamate transporter degradation. *J Biol Chem* 2008; **283**: 21703–13.
- 44 Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; **326**: 1–16.
- 45 Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 489–501.
- 46 Ferrer P, Asensi M, Segarra R *et al*. Association between pterostilbene and quercetin inhibits metastatic activity of B16 melanoma. *Neoplasia* 2005; **7**: 37–47.
- 47 Mertens-Talcott SU, Percival SS. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett* 2005; **218**: 141–51.
- 48 Schlachterman A, Valle F, Wall KM *et al*. Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model. *Transl Oncol* 2008; **1**: 19–27.
- 49 Bursch W, Oberhammerand F, Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 1992; **13**: 245–51.
- 50 Wright SC, Zhong J, Larrick JW. Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion. *FASEB J* 1994; **8**: 654–60.
- 51 Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994; **78**: 539–42.
- 52 Collins K, Jacks T, Pavlitch NP. The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 2776–8.
- 53 Nam TW, Yoo CI, Kwon HTKCH, Park JY, Kim YK. The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits migration through a MAPK-dependent mechanism in osteoblasts. *J Bone Miner Metab* 2008; **26**: 551–60.
- 54 Narayanan BA, Narayanan NK, Re GG, Nixon DW. Differential expression of genes induced by resveratrol in LNCaP cells: P53-mediated molecular targets. *Int J Cancer* 2003; **104**: 204–12.
- 55 Kuo PL, Chiang LC, Lin CC. Resveratrol-induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells. *Life Sci* 2002; **72**: 23–34.
- 56 Tanigawa S, Fuji M, Hou DX. Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; **72**: 797–804.
- 57 Thaler S, Hähnel PS, Schaad A, Dammann R, Schuler M. RASSF1A mediates p21Cip1/Waf1-dependent cell cycle arrest and senescence through modulation of the Raf-MEK-ERK pathway and inhibition of Akt. *Cancer Res* 2009; **69**: 1748–57.
- 58 Nogueira V, Park Y, Chen CC *et al*. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* 2009; **14**: 458–70.
- 59 Mizoguchi M, Nutt CL, Mohapatra G, Louis DN. Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain Pathol* 2004; **14**: 372–7.
- 60 Guillard S, Clarke PA, Te Poele R *et al*. Molecular pharmacology of phosphatidylinositol 3-kinase inhibition in human glioma. *Cell Cycle* 2009; **8**: 443–53.
- 61 Poolman TM, Ng LL, Farmer PB, Manson MM. Inhibition of the respiratory burst by resveratrol in human monocytes: correlation with inhibition of PI3K signaling. *Free Radic Biol Med* 2005; **39**: 118–32.
- 62 Braig M, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res* 2006; **66**: 2881–4.
- 63 Katakura Y. Molecular basis for the cellular senescence program and its application of anticancer therapy. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; **70**: 1076–81.
- 64 Nelyudova A, Aksenov N, Pospelov V, Pospelova T. By blocking apoptosis, Bcl-2 in p38-dependent manner promotes cell cycle arrest and accelerated senescence after DNA damage and serum withdrawal. *Cell Cycle* 2007; **6**: 2171–7.
- 65 Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene* 2003; **22**: 2805–11.
- 66 Seluanov A, Gorbunova V, Falcovitz A *et al*. Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 1552–64.

## 2.2 Capítulo 2 – Artigo a ser submetido a Mutation Research

### **Resveratrol and Quercetin induce senescence-like growth arrest by increasing DNA damage and phosphorylation of H2AX**

Lauren L. Zamin<sup>a</sup>, Eduardo C. Filippi-Chiela<sup>a</sup>, Alessandra Pelegrini<sup>a</sup>, Christianne Salbego<sup>b</sup>, Guido Lenz<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Av. Ramiro Barcelos, 2600, UFRGS, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

\* Corresponding author: Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: +555133087620; Fax: +555133307003 Email: [lenz@ufrgs.br](mailto:lenz@ufrgs.br)



### Abstract

We previously showed that the combination of resveratrol (Rsv) and quercetin (Quer) induced senescence-like growth arrest in C6 glioma cell line. Here, we investigated the mechanisms by which this process can occur in this cell line. We first investigated the minimum time and dose needed for senescence induction. We found that the minimum dose necessary to observe this effect was the combination of Rsv (10  $\mu$ M) plus Quer (25  $\mu$ M), after 7 days of treatment. After that, we investigated some classic pathways involved with senescence induction such as p53 and retinoblastoma (RB) using a glioma cell line mutated for p53 (U251) and analyzing the phosphorylation status of RB and the immunoccontent of p27 and p15. When we treated U251 cell line, no senescence was observed and the cell growth was bigger than C6. There were no differences in the phosphorylation of RB or immunoccontent of p15 and p27. Furthermore, we analyzed other pathways involved with senescence by using inhibitors of p38 (SB203580), ERK (PD98059) and mTOR (rapamycin). We did not find any difference in the senescence induction or cell growth when cells were treated with the inhibitors plus polyphenols. We tested if this effect was mediated by DNA damage and/or oxidative stress. DNA damage induction was shown by comet assay after 24 h of Rsv(10  $\mu$ M) plus Quer(25  $\mu$ M) treatments, but not for the same concentrations alone.  $\gamma$ H2AX also increased with 10  $\mu$ M Rsv plus 25  $\mu$ M Quer, indicating that the drugs combination induced DNA double strand break. There were no alterations in oxidative stress status. We concluded that Rsv and Quer are inducing DNA damage and consequently inducing senescence-like growth arrest. The damage seems to be a DNA-double strand break, since  $\gamma$ H2AX is considered a marker for the formation of this process, and this should be dependent of p53.

**Keywords:** Resveratrol, Quercetin, glioma, senescence, DNA damage, p53.

**Abbreviation:** ATM - ataxia telangiectasia mutated; ATR - ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related; C – control; CPD - cumulative population doublings; DMSO-dimethylsulphoxide; DSB - DNA double strand breaks; ERK1/2 - Extracellularly Regulated Kinase 1/2; GBM - Glioblastoma; H2DCF-DA - 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; MAPK - Mitogen Activated Protein Kinase; MEK - Mitogen-activated ERK-activating kinase; mTOR -mammalian Target of Rapamycin; PD - PD98059; PRAK- p38-regulated/activated protein kinase; pRB -phospho-Retinoblastoma; Quer - Quercetin; RAP – rapamycin; ROS - Reactive Oxygen Species; Rsv – Resveratrol; SA- $\beta$ -gal - Senescence-associated- $\beta$ -galactosidase; SB - SB203580; X-gal - 5-bromo-4chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactoside;  $\gamma$ -H2AX - phosphorylated histone H2AX;

## 1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most common and lethal primary malignant brain tumor. Although considerable progress has been made using multimodal treatment approaches, such as surgery, radiotherapy and chemotherapy, the impact of these advances on clinical outcomes has been disappointing. GBM is defined by the features of uncontrolled cellular proliferation, diffuse infiltration, necrosis, robust angiogenesis, intense resistance to apoptosis, and genomic instability [1].

Resveratrol (*trans-3,4,5-trihydroxystilbene*) (Rsv) and quercetin (*3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone*) (Quer) are natural polyphenols found in fruits and vegetables such as onions, apples, peanuts, grapes and, consequently in grape products and red wine [2, 3]. A voluminous number of evidences suggest that an increased consumption of fruit and vegetables reduce the incidence of chronic disease, such as cancer, cardiovascular disease and other aging-related pathologies. For this reason, several studies have been done seeking for a specific compound responsible for these human's health beneficial effect. The results found pointed out to a combination of plants compounds as responsible for these effects because of the little concentration and the molecular multitargets for each one [reviewed in 4, 5, 6].

Cellular senescence is a potent anti-cancer mechanism controlled by tumor suppressor genes, particularly p53 and phospho-Retinoblastoma (pRB), which is characterized by the irreversible loss of proliferation. Senescence induced by DNA damage, oncogenic stimulation, oxidative stress or excessive mitogenic input, serves as a barrier that counteracts cancer progression [7]. DNA damage, in humans, particularly if it entails formation of DNA double-strand breaks (DSBs), provides a signal for phosphorylation of histone H2AX on Ser 139 ( $\gamma$ H2AX) [8]. The phosphorylation is mediated by ataxia telangiectasia mutated (ATM) [9], ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) [10] and/or DNA-dependent protein kinase [11], and occurs in nucleosomes along a megabase domain of DNA on each flank of the DSB. Numerous signalling and repair proteins including the M/R/N complex (Mre11/Rad50/Nbs1), BRCA1 and the p53 binding protein 1 colocalize with  $\gamma$ H2AX in the DNA damage foci [12-15] that are detected in senescent cells [16].

We have previously demonstrated that chronic treatment of C6 glioma cell line with the combination of Rsv and Quer reduced the cell growth and induced

senescence like-growth arrest [17]. In the present work we investigate some mechanisms by which these drugs could induce this senescent phenotype.

## **2. Material and methods**

### *2.1 Cell culture*

Rat C6 and human U251 glioma cells were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD). All culture materials were obtained from GIBCO Laboratories (Grand Island, NY). Cells were cultured in DMEM low glucose supplemented with 5 % fetal bovine serum (10 % for U251 cells), 0.1 % amphoterecin B and 1 % penicillin/streptomycin at 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> in a humidified incubator.

### *2.2 Cell treatments*

Rsv and Quer were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO) and administered for indicated time in the following concentrations: Rsv (5 or 10 µM), Quer (10 or 25 µM), the combination of Rsv (5 µM) plus Quer (10 µM), and the combination of 10 µM Rsv plus 25 µM Quer. The p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) inhibitor SB203580 10 µM (SB) and mitogen-activated ERK-activating kinase/extracelullarly regulated kinase (MEK/ERK 1/2) MAPK inhibitor PD98059 20 µM (PD) were obtained from Calbiochem (San Diego, CA). Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor rapamycin 10 nM (RAP) was obtained from Sigma. All drugs were dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO, Acros Organics, NJ). DMSO was present in the control (C) wells at a maximum concentration of 0.5 %.

### *2.3 Long term culture of cells and determination of population doublings*

Cells were plated at each passage in 24-well plates at a density of 50,000 cells/well and exposed to DMSO or different concentrations of Rsv and Quer or inhibitor SB, PD and RAP with medium and treatments renewal every 48 h. Confluent cells were passaged, and population doublings (PD) were determined according to

the formula  $PD = \frac{\log N(t) \times \log(N(t_0))}{\log 2}$ , where  $N(t)$  is the number of cells per well at time of passage, and  $N(t_0)$  is the number of cells seeded at the previous passage [18]. The sum of cumulative PDs (CPDs) was plotted against time of culture.

#### 2.4 Senescence-associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) staining

After indicated days in culture, cells were washed in PBS, fixed in 3 % formaldehyde for 15 min at room temperature, washed, and incubated with fresh SA- $\beta$ -gal staining solution containing 1 mg/mL 5-bromo-4chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactoside (X-gal, Sigma), 40 mM citric acid/sodium phosphate, pH 6,0, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl for 12-16 h at 37 °C [19]. Results are present as ratio of SA- $\beta$ -gal-positive cells to total cells of at least three fields of three experiments.

#### 2.5 Alkaline comet assay.

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al., 1988 with minor modifications [20-23]. After treatments, cells were embedded in 0.75 % low melting point agarose, and immediately spread onto a glass microscope slide precoated with a layer of 1 % normal melting point agarose. The slides were then incubated in lysis solution (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1 % Triton X-100 and 10 % DMSO, pH10.0) at 4 °C for at least 1 h. After the lysis procedure, the slides were placed on a horizontal electrophoresis unit with fresh alkaline buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13.0) for 20 min at 4 °C. Slides were stained using a silver staining protocol as described in Nadin et al., 2001 [24] and gels were analyzed using an optical microscope. One hundred cells of two replicate slides were selected and analyzed for DNA migration. Methyl methanesulphonate (MMS) (0.4 mM for 2 h) was used as a positive control.

One hundred cells were scored visually according to the tail length and the amount of DNA present in the tail. Each comet was given an arbitrary value ranging from 0 (undamaged) to 4 (maximally damaged) [25]. Damage index was thus assigned to each sample and can range from 0 (completely undamaged: 100 cells  $\times$  0) to 400 (with maximum damage: 100 cells  $\times$  4).

## 2.6 *Flow-cytometric Determination of Total Reactive Oxygen Species (ROS)*

For determination of total ROS levels, cells were treated as indicated and then incubated with 10  $\mu$ M 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA) (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA), which is cleaved by intracellular esterases and transformed to a fluorescent dye when oxidized at 37 °C for 30 min prior to immediate analysis by flow cytometry Guava EasyCyte (Guava Technologies, Hayward, CA). The mean fluorescence of 5,000 analyzed cells (corrected for autofluorescence) of each treatment group was taken as a measure for the total ROS load. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.2 mM for 2 h) was used as a positive control.

## 2.7 *Immunoblotting*

Preparation of protein samples and western blot were performed as described previously with minor modifications [26]. Whole-cell lysate (80  $\mu$ g) was electrophoresed and electroblotted onto a PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). The membrane was blocked in 5 % skimmed milk/TBST for an hour and probed overnight with antibodies to  $\gamma$ H2AX (1:1,000 dilution; Cell Signaling, Beverly, MA), pRB, (1:1,000; Cell Signaling), p15 (1:1,000; Cell Signaling) and p27 (1:1,000; Cell Signaling), phospho-p38 (pp38) (1:1,000; Cell Signaling), p38 (1:1,000; Cell Signaling), phospho-ERK1/2 (pERK1/2)(1:1,000; Cell Signaling). Bound antibody was detected with appropriate horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies (1:2,000; Cell Signaling) using enhanced chemiluminescence and X-ray films (Kodak X-Omat, Rochester, NY). The optical density of the bands was obtained with Bio-Rad software (Quantity One; Hercules, CA).

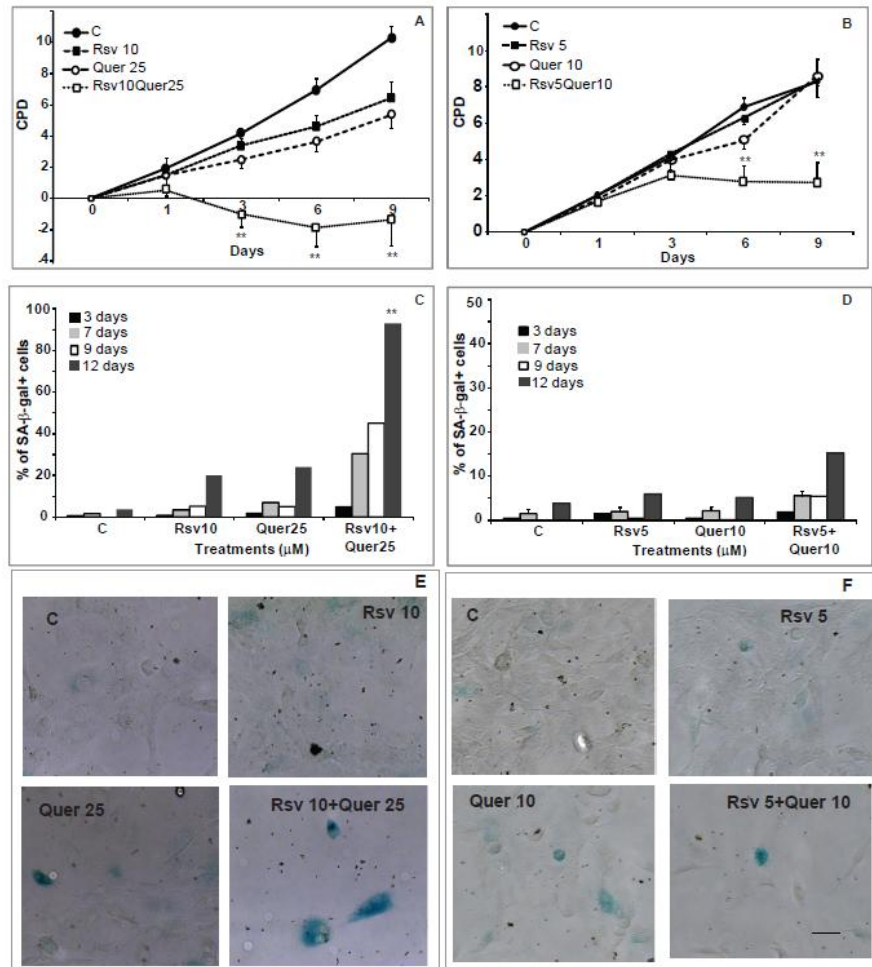
## 2.8 *Statistical analysis*

All data were expressed as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean) and were analyzed using a one way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey post hoc test for multiple comparisons. Differences with  $p < 0.05$  were considered significant.

Analyses of the data were performed using the software Biostat 5.0 (Belém, PA, Brazil).

### 3. Results

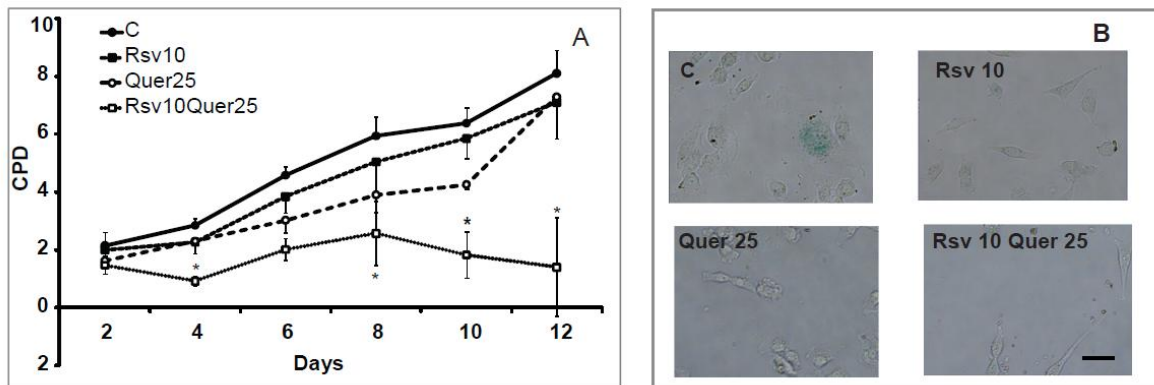
We have previously demonstrated that 12 days of 10  $\mu\text{M}$  Rsv plus 25  $\mu\text{M}$  Quer treatment induced senescence-like growth arrest in C6 cells [17]. In this work, we first analyzed if lower doses of Rsv and Quer could induce the same effect. We treated C6 cells with 5  $\mu\text{M}$  Rsv, 10  $\mu\text{M}$  Quer and 5  $\mu\text{M}$  Rsv plus 10  $\mu\text{M}$  Quer and found a decrease in the cell growth with 5  $\mu\text{M}$  Rsv plus 10  $\mu\text{M}$  Quer (Fig. 1B). However, this effect was less pronounced than 10  $\mu\text{M}$  Rsv plus 25  $\mu\text{M}$  Quer treatment (Fig. 1A). Also, the previously obtained senescence induction by higher doses (Fig. 1C and E) was not observed with lower doses (Fig. 1D). A clear senescent phenotype was detected between 5 and 7 days of 10  $\mu\text{M}$  Rsv plus 25  $\mu\text{M}$  Quer treatment (Fig. 1C and E).



**Fig. 1** – Lower dose limit for induction of senescence with the combination of Rsv and Quer: Time and dosage effect of Rsv and Quer on cumulative population doubling (A and B) and senescence-like growth arrest (C and D) in C6 cells. C6 cells were cultivated in the continuous presence of treatments as described in the methods section and cumulative population doublings (CPD) were plotted against time (A and B). After this time, cells were stained for SA-β-gal and photographed (E and F). The bar graph represents the ratio of SA-β-gal-positive(+) cells to total cells of at least three fields of three independent experiments (C and D). Each time point or bar represents the mean  $\pm$  SEM. ANOVA followed by Tukey's post test. Scale bar 10 $\mu$ M. \*\* $p < 0.01$  from C.

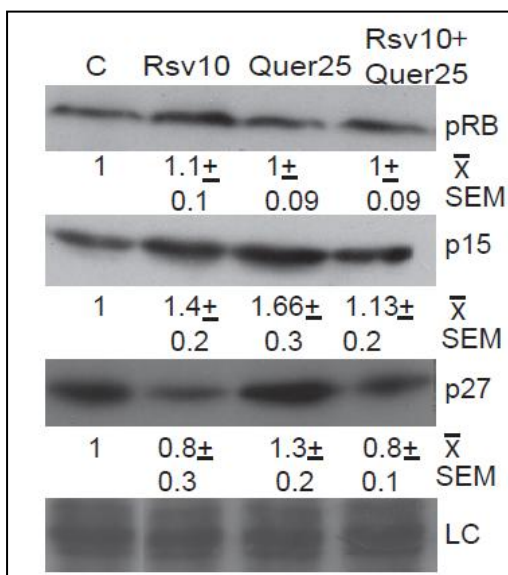
There are many stimuli able to induce cellular senescence. In spite of the diversity of these stimulatory signals, they only converge onto two major effector pathways: the p53 and the pRB pathways [27]. On this base, we first tested the involvement of p53 by measuring the senescence induction by Rsv and Quer in a cell line deficient in this protein, U251 [28]. Fig. 2A shows that combined 10  $\mu$ M Rsv plus 25  $\mu$ M Quer induced cell growth arrest, however did not induced senescence (Fig. 2B). We also found that the ability of Rsv and Quer to induce cell growth arrest was far greater in C6 than in U251 (Fig. 1A), suggesting that senescence-like growth

arrest is important to the antiproliferative effect observed upon Rsv plus Quer cotreatment, corroborating that this phenotype needs a functional p53 protein.



**Fig. 2** - Rsv and Quer effect on cumulative population doubling (A) and senescence-like growth arrest (B) in U251 cells. U251 cells were cultivated in the continuous presence of treatments as indicated in the methods section and cumulative population doublings (CPD) were plotted against time (A). Each time point represents the mean  $\pm$  SEM. After this time cells were stained for SA- $\beta$ -gal and photographed (B). ANOVA followed by Tukey's post test. Scale bar 10 $\mu$ M. \*p < 0.05 from C.

We therefore assessed if Rsv and Quer could modulate the pRB pathway. To this end we treated C6 cells with 10  $\mu$ M Rsv, 25  $\mu$ M Quer and cotreatment for 24 h and analyzed the phosphorylation status of RB by western blot. No clear change was observed in the levels of pRB in cells treated with Rsv and Quer (Fig. 3). Moreover, levels of p15 and p27, inhibitors of CDK4/6 and CDK2 respectively [29, 30], which have RB as a target, was only slightly increased. Altogether, these data suggest that RB pathway is probably not involved in the senescence response induced by Rsv and Quer (Fig. 3).

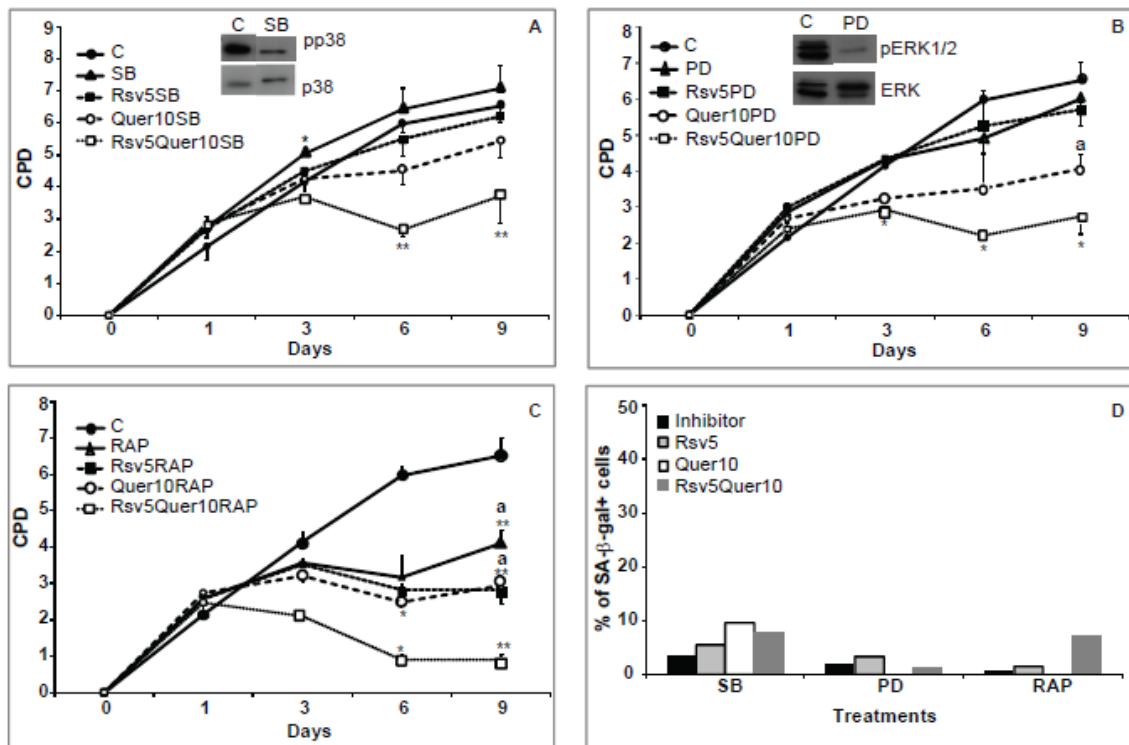


**Fig. 3** - Effect of Rsv and Quer on the phosphorylation status of RB and immunoccontent of p15 and p27. C6 cells were treated with 10 $\mu$ M Rsv, 25 $\mu$ M Quer or 10 $\mu$ M Rsv plus 25 $\mu$ M Quer for 24 h. Lysates were subjected to western blot analysis. Representative blots of three independent experiments are shown and the numbers below the blots depict values of densitometric evaluation as mean ( $\bar{x}$ )  $\pm$  SEM. ANOVA was followed by Tukeys post test. LC - Loading control.



p38 MAPK was shown as a positive regulator of senescence [31-33]. Therefore, we tested the involvement of this pathway in Rsv and Quer senescence-like growth arrest induction. For this we analyzed the CPD and SA- $\beta$ -gal staining of C6 cells after incubating cells with the p38 inhibitor SB. As indicated by figure 4A and D, we did not find any difference between Rsv and Quer treatments plus cotreatment with SB, indicating that the decreased cell growth observed does not require an increase in p38 activity. When cells were treated only with SB, there was a tendency to increase cell growth, suggesting that when p38 is activated, it can decrease cell growth, at least in part. The phosphorylation status of p38 was efficiently decreased by SB as showed by the western blot image (Fig. 4A insert).

Studies have indicated that the ability of Ras to induce senescence depends on the Raf-MEK-ERK MAPK pathway [34, 35]. Next, we assessed whether this way was involved in Rsv and Quer triggering cellular senescence. Thus we incubated C6 cells with MEK inhibitor PD plus Rsv and Quer. We found an unexpected additive effect of 10 $\mu$ M Quer and PD in decreasing CPD (Fig. 4B), but this effect was not observed with the senescent phenotype (Fig. 4D). Other treatments have shown a similar result to Rsv and Quer alone (Fig. 1B). The pMEK was efficiently inhibited by PD as shown by the western blot image of a downstream protein ERK1/2 (Fig. 4B insert).

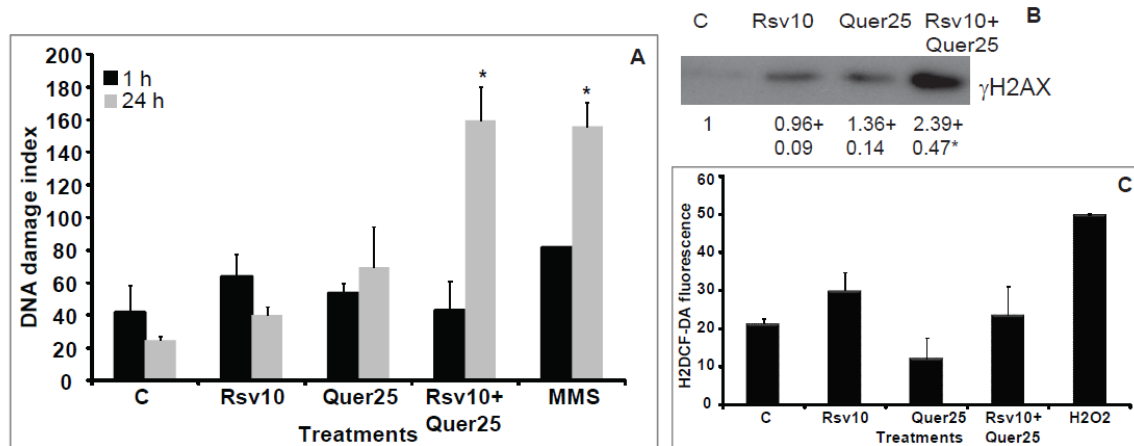


**Fig. 4** – Effect of p38, MEK/ERK1/2 and mTOR inhibitor cotreatment with Rsv and Quer on cumulative population doubling (A to C) and senescence-like growth arrest (D) in C6 cells. Western blot images are shown to confirm the inhibition of the phosphorylation of p38 and ERK1/2 by SB and PD respectively after 30 min of treatment (inserted on figures A and B - top). C6 cells were cultivated in the continuous presence of treatments as indicated in the methods section and cumulative population doublings (CPD) were plotted against time (A, B, C). Each time point represents the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. After this time cells were stained for SA- $\beta$ -gal and photographed. The bar graph represents the ratio of SA- $\beta$ -gal-positive (+) cells to total cells of at least three fields of three independent experiments (D). ANOVA followed by Tukey's post test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  from C, a – different from Rsv or Quer alone.

mTOR has emerged as a major effector of cell growth and proliferation by regulating protein synthesis [36]. mTOR inhibitors have been used in clinical trials as a chemotherapeutic drug [37, 38], with positive results for refractory renal cell carcinoma. We found a decrease in cell growth when we used RAP, 5 $\mu$ M Rsv plus RAP and 10  $\mu$ M Quer plus RAP comparing to control, 5 $\mu$ M Rsv and 10  $\mu$ M Quer alone, respectively (Fig. 4C). No cellular senescence was observed (Fig. 4D), indicating that another way of growth inhibition is occurring.

As aforementioned, there are many stimuli conducive to cellular senescence. Among them, DNA damage and oxidative stress are the most common [16, 39]. To establish whether Rsv and Quer were inducing DNA damage that could lead to senescence, we analyzed the DNA damage by single-cell electrophoresis under alkaline conditions (alkaline comet assay). The results (Fig. 5A) showed that 24 h of

cotreatment of Rsv plus Quer induced DNA damage similar to the positive control, MMS. This finding prompted us to investigate if this damage was a DNA DSB. Indeed, this damage also lead to an increase in the  $\gamma$ H2AX (Fig. 5B), an early event in the recognition of DNA DSB [8], corroborating that DNA damage induced by Rsv plus Quer may be DSB.



**Fig. 5** – Rsv and Quer effect on DNA damage,  $\gamma$ H2AX and ROS production. (A) C6 cells were treated with 10  $\mu$ M Rsv, 25  $\mu$ M Quer or 10  $\mu$ M Rsv plus 25  $\mu$ M Quer and comet assay was performed 1 or 24 h latter. Methyl methanesulphonate (MMS) (0.4 mM for 2 h) was used as a positive control. (B) Effect of Rsv and Quer on  $\gamma$ H2AX. C6 cells were treated with 10  $\mu$ M Rsv, 25  $\mu$ M Quer or 10  $\mu$ M Rsv plus 25  $\mu$ M Quer for 24 h. Lysates were subjected to western blot analysis. Representative blots of four independent experiments are shown and the numbers below the blots depict values of densitometric evaluation. (C) C6 cells were treated as indicated for 24 h and total ROS levels were determined by H2DCF-DA staining and flow cytometric analysis. The graph depicts the fluorescence intensity. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.2 mM for 2 h) was used as a positive control.

Induction of DNA damage by ROS has been described extensively [40, 41]. Next, we evaluate if DNA damage induced by Rsv plus Quer treatment were accompanied by an increase in ROS production. DNA damage observed here was not mediated by ROS, since employing the redox-sensitive fluorescent dye H2DCF-DA (detecting all intracellular ROS, namely H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide, and peroxynitrite) and subsequent analysis by flow cytometry did not show an obvious increase in this parameter (Fig. 5C).

#### 4. Discussion

Understanding the molecular mechanisms of Rsv and Quer-induced senescence may facilitate the development of additional therapeutic interventions for the prevention and treatment of glioma. In this report, we have focused on the

mechanism of action purported to Rsv and Quer in senescence induction. Our results demonstrated that cotreatment of Rsv and Quer induce DNA DSB resulting in senescence like-growth arrest probably by activating p53.

We initially investigated the lowest doses needed to induce the senescent phenotype. We found that the minimum concentration necessary to induce senescence is combined 10  $\mu\text{M}$  Rsv plus 25  $\mu\text{M}$  Quer, and this phenotype is apparent after 5 to 7 days of treatment. It is important to establish the *in vitro* dosage necessary to induce senescence-like growth arrest due to the fact that just lower concentrations are attainable *in vivo* [42-45]. For instance, Moon et al. [42] in a clinical study, found that the average peak plasma concentration of total Quer for 10 subjects was 1.5  $\mu\text{M}$  at 3.5 h when dosing 500 mg Quer three times daily with meals. In other work, animals treated with Quer for 3 days with 500 mg/kg, the concentration obtained in the brain was 0.7 nM [43]. Asensi et al. [44] showed that 11 min after oral administration to rats of 20 mg of Rsv/kg the brain concentration found was 0.46 nM.

Cellular senescence is a stress response that is characterized by a robust inhibition of cell proliferation; this often becomes irreversible and independent of the initial stress trigger [45]. Signalling by oncogenic proteins, oxidative damage and persistent DNA damage are among the best-studied triggers of senescence [45]. In spite of the diversity of these stimulatory signals, they converge onto two major effector pathways: the p53 pathway and the pRB pathway [27]. Rsv and Quer are inducing senescent phenotype by activating p53 since a cell line deficient in this protein (U251) did not show senescence induction after Rsv plus Quer cotreatment, although a reduction in cell growth was observed. Moreover, there was no difference in phosphorylation of RB among treatments and we only found a slight increase in p15 and p27 upon polyphenols treatments suggesting that the expression levels of these proteins are not major player in the senescence induction by Rsv and Quer.

The signals that induce a DNA damage response, such as chemotherapeutic drugs (such as etoposide or cyclophosphamide) or telomere dysfunction appear to drive senescence primarily via p53 pathway. Interestingly, many of these senescent phenotypes can be rescued by p53 inactivation, indicating a pivotal role for p53 in DNA damage-induced senescence [46, 47]. Moreover, cancer cells that retain intact p53 are much more susceptible to senescence in response to chemotherapy [48-50]. These results corroborate with our findings, that showed that a p53 deficient cell line, U251, was less sensible to the drugs that C6 which has a functional p53.

Furthermore, other groups have found that 100  $\mu\text{M}$  Rsv induced apoptosis and 150  $\mu\text{M}$  induced autophagy in U251 glioma cell line [51, 52]. Since we observed a reduction in U251 cell growth after cotreatment with 10  $\mu\text{M}$  Rsv and 25  $\mu\text{M}$  Quer we suggest that these compounds may be inducing apoptosis and/or autophagy instead of senescence in this cell line.

Studies have indicated that the ability of Ras to induce senescence depends on the Raf-MEK/ERK MAPK pathway [34, 35] and is accompanied by upregulation of p16<sup>INK4A</sup>, p53, p14/p19<sup>ARF</sup>, and/or p21<sup>WAF1</sup> [53, 54] and silencing of E2F target genes [55]. Recently, studies have shown that Ras-induced senescence also requires activation of p38 [56-58] following by activation of PRAK (p38-regulated/activated protein kinase) that mediates senescence by phosphorylation of p53 [59]. Since we proposed that Rsv plus Quer were inducing senescence by activating p53, we also investigated the potential involvement of the MAPKs pathways in this effect. We did not find any difference in the cell growth after incubating cells with combined Rsv plus Quer plus p38 and MEK1/2 inhibitors, reinforcing the theory that p53 are being activated by DSB DNA damage.

Elevated ROS, such as hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ) and hydroxyl radical (OH) have been widely accepted as a causative trigger for senescence-like growth arrest [60], moreover, increased levels of ROS lead to DNA oxidative damage. The resulting DNA lesions include base modifications, base loss, single-strand DNA breaks and through single-strand DNA breaks clustering even DSBs [61, 40]. We tested whether Rsv and Quer were increasing ROS. As expected, these compounds did not increase the ROS, suggesting that DNA DSB is being mediated by another way, probably p53 pathway.

Data presented herein demonstrated that combined 10  $\mu\text{M}$  Rsv plus 25  $\mu\text{M}$  induced DNA DSB assessed by comet assay and increased  $\gamma\text{H2AX}$ . In a recent review, Gatz e Wiesmuller [62] discuss the existing data on Rsv direct and indirect effects on genome integrity, as well as related compounds such as Quer. The impact of Rsv on genome stability is highlighted by findings indicating that Rsv affects all aspects of DNA metabolism, i.e. DNA replication, recombination, repair, relaxation and telomere maintenance, but the exact mechanism of interaction between Rsv and Quer on the induction of DNA damage remains unclear.

New clues to the underlying mechanisms have come from a number of reports suggesting physical and biochemical interactions between Rsv and DNA [62]. *In vitro* studies revealed that Rsv directly binds DNA and RNA [63, 64], and comparable results were obtained with Quer [65]. It should be noted that in contrast with Quer, Rsv itself is not a DNA intercalator [66, 67]. Topoisomerases function to maintain normal DNA topology, a critical requirement for each cellular activity that involves DNA strand separation, including DNA replication, recombination and RNA transcription [68]. In two studies, Rsv was characterized as a class II (catalytic) inhibitor of topoisomerases II with an IC<sub>50</sub> of 66–79  $\mu$ M [69, 70]. Activities of Rsv toward topoisomerases I or topoisomerases II as a poison were not detected up to doses of >400  $\mu$ M [74]. For comparison, Quer was demonstrated to be a catalytic inhibitor of both, topoisomerases I and topoisomerases II [69].

Significantly, recent studies have revealed that activation of ATM and ATR could be a central effect of Rsv that underlies cell cycle regulation and the newly described activation of fidelity control mechanisms in DNA DSB repair involving p53 [71]. Taken together, straightforward conclusions on the mechanistic basis for the observed effects on genome stability cannot be drawn, as they very much depend on the chemopreventive agent chosen and the treatment conditions applied.

### **Conflict of Interest statement**

"The authors declare that there are no conflicts of interest"

### **Acknowledgements**

This study was supported by the Brazilian agencies: CNPq/MCT, FINEP, CAPES, The authors thank to João Antônio Pêgas Henriques for discussion of the results.

### **References**

- [1] R. Yamanaka, H. Saya, Molecularly Targeted Therapies for Glioma, *Ann. Neurol.* 66 (2009) 717–729.
- [2] M. Shakibaei, K.B. Harikumar, B.B. Aggarwal, Resveratrol addiction: to die or not to die, *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (2009) 115–128.

- [3] J.V. Formica, W. Regelson, Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 1061–1080.
- [4] P. Saiko, A. Szakmary, W. Jaeger, T. Szekeres, Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat. Res.* 658 (2008) 68–94.
- [5] A.W. Boots, G.R.M.M. Haenen, A. Bast, Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical, *Eur. J. Pharmacol.* 585 (2008) 325–337.
- [6] G.L. Russo, Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention, *Biochem. Pharmacol.* 74 (2007) 533–544.
- [7] M.C. Caino, J. Meshki, M.G. Kazanietz, Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players, *Apoptosis* 14 (2009) 392–408.
- [8] E.P. Rogakou, D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, W.M. Bonner, DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5858–5868.
- [9] S. Burma, B.P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, D.J. Chen, ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 42462–42467.
- [10] L. Anderson, C. Henderson, Y. Adachi, Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 1719–1729.
- [11] E.J. Park, D.W. Chan, J.H. Park, M.A. Oettinger, J. Kwon, DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylated H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner, *Nucl. Acids Res.* 31 (2003) 6819–6827.
- [12] T.T. Paull, E.P. Rogakou, V. Yamazaki, C.U. Kirchgesser, M. Gellert, W.M. Bonner, A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage, *Curr. Biol.* 10 (2000) 886–895.
- [13] J.A. Downs, J. Cote, Dynamics of chromatin during the repair of DNA double-strand breaks, *Cell Cycle* 4 (2005) 1373–1376.
- [14] E.R. Foster, J.A. Downs, Histone H2AX phosphorylation in DNA double-strand break repair, *FEBS J.* 272 (2005) 3231–3240.
- [15] T.T. Paull, J.H. Lee, The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as DNA double-strand break sensor for ATM, *Cell Cycle* 4 (2005) 737–740.
- [16] J. Campisi, F. D. di Fagagna, Cellular senescence: when bad things happen to good cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 729–740.
- [17] L.L. Zamin, E.C. Filippi-Chiela, P. Dillenburg-Pilla, F. Horn, C. Salbego, G. Lenz, Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells, *Cancer Sci.* 100 (2009) 1655–1662.
- [18] E.H. Heiss, Y.D.C. Schilder, V.M. Dirsch, Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 26759–26766.
- [19] G.P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scortt, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubeljii, O. Pereira-Smithii, M. Peacocket, J. Campisi, A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 9363–9367.
- [20] P.L. Olive, J.P. Banath, The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells, *Nat. Protocols* 1 (2006) 23–29.
- [21] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.

- [22] A.R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 249-261.
- [23] A.L. Pelegrini, D.J. Moura, B.L. Brenner, P.F. Ledur, J.A.P. Henriques, J. Saffi, G. Lenz, Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA Damage induced cell cycle arrest. Unpublished results.
- [24] S.B. Nadin, L.M. Vargas-Roig, D.R. Ciocca, A silver staining method for single-cell gel assay, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 1183-1186.
- [25] G.M. Ross, T.J. McMillan, P.Wilcox, A.R. Collins, The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications, *Mutat. Res.* 337(1995) 57-60.
- [26] L.L. Zamin, P. Dillenburg-Pilla, R. Argenta-Comiran, A.P. Horn, F. Simão, M. Nassif, D. Gerhardt, R. L. Frozza, C. Salbego, Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: involvement of PI3-K pathway, *Neurobiol. Dis.* 24 (2006) 170–182.
- [27] J.M. Vicencio, L.Galluzzi, N.Tajeddine, C.Ortiz, A.Criollo, E.Tasdemir, E. Morselli, A.B. Younes, M.C. Maiuri, S. Lavandro, G. Kroemer, Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path – a mini-review. *Gerontology* 54 (2008) 92-99.
- [28] N. Ishii, D. Maier, A. Merlo, M. Tada, Y. Sawamura, A.C. Diserens, E.G. Van Meir, Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14<sup>ARF</sup>, PTEN Tumor suppressor Genes in Human Glioma Cell lines, *Brain Pathol.* 9 (1999) 469-479.
- [29] G. J. Hannon, D. Beach, p15INK4B is a potential effector of TGF b-induced cell cycle arrest, *Nature* 371 (1994) 257–261.
- [30] A.A. Russo, P.D. Jeffrey, A.K. Patten, J. Massague, N.P. Pavletich, Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A–Cdk2 complex, *Nature* 382 (1996) 325–331.
- [31] K. Ito, A.Hirao, F. Arai, K. Takubo, S. Matsuoka, K. Miyamoto, M. Ohmura, K. Naka, K. Hosokawa, Y. Ikeda, T. Suda, Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells, *Nat. Med.* 12 (2006) 446–451.
- [32] S. Kuki, T. Imanishi, K. Kobayashi, Y.Matsuo, M. Obana, T. Akasaka, Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase, *Circ. J.* 70 (2006) 1076–1081.
- [33] V. Probin, Y. Wang, A. Bai, D. Zhou, Busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a p53-independent but extracellular signal-regulated kinase-p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319 (2006) 551–560.
- [34] A.W. Lin, M.Barradas, J.C. Stone, L. Van Aelst, M. Serrano, S.W. Lowe, Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling, *Genes Dev.* 12 (1998) 3008–3019.
- [35] J. Zhu, D. Woods, M. McMahon, J.M. Bishop, Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf, *Genes Dev.* 12 (1998) 2997–3007.
- [36] N. Hay, N. Sonenberg, Upstream and downstream of mTOR, *Genes Dev.* 18 (2004) 1926-1945.
- [37] S.M. Chang, P. Wen, T. Cloughesy, H. Greenberg, D. Schiff, C. Conrad, K. Fink, H.I. Robins, L. De Angelis, J. Raizer, K. Hess, K. Aldape, K.R. Lamborn, J. Kuhn, J. Dancey, Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme, *Invest. New Drugs* 23 (2005) 357–361.



- [38] M.B. Atkins, M. Hidalgo, W.M. Stadler, T.F. Logan, J.P. Dutcher, G.R. Hudes, Y. Park, S.H. Liou, B. Marshall, J.P. Boni, G. Dukart, M.L. Sherman, Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma, *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 909–918.
- [30] D. van Heemst, P.M. den Reijer, R.G. Westendorp, Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers, *Eur. J. Cancer* 43 (2007) 2144–2152.
- [40] G. Slupphaug, B. Kavli, H.E. Krokan, The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage, *Mutat. Res.* 531(2003) 231-251.
- [41] Q. Chen, A. Fischer, J.D. Reagan, L.J. Yan, B.N. Ames, Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 4337-4341.
- [42] Y.J. Moon, L. Wang, R. DiCenzo, M.E. Morris, Quercetin pharmacokinetics in humans, *Biopharm. Drug Dispos.* 29 (2008) 205-217.
- [43] V.C.J. de Boer, A.A. Dihal, H. van der Woude, I.C.W. Arts, S. Wolfram, G.M. Alink, I.M.C.M. Rietjens, J. Keijer, P.C.H. Hollman, Tissue distribution of quercetin in rats and pigs, *J. Nutr.* 135 (2005) 1718–1725.
- [44] M. Asensi, I. Medina, A. Ortega, J. Carretero, M.C. Bano, E. Obrador, J.M. Estrela, Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 387-398.
- [45] M. Collado, M. A. Blasco, M. Serrano, Cellular senescence in cancer and aging, *Cell* 130 (2007) 223–233.
- [46] K.M. Frank, N.E. Sharpless, Y. Gao, J.M. Sekiguchi, D.O. Ferguson, C. Zhu, J.P. Manis, J. Horner, R.A. DePinho, F.W. Alt, DNA ligase IV deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway, *Mol. Cell* 5 (2000) 993–1002.
- [47] P.P. Ongusaha, T. Ouchi, K.T. Kim, E. Nytko, J.C. Kwak, R.B. Duda, C.X. Deng, S.W. Lee, BRCA1 shifts p53-mediated cellular outcomes towards irreversible growth arrest, *Oncogene* 22 (2003) 3749–3758.
- [48] R.S. Roberson, S.J. Kussick, E. Vallieres, S.Y. Chen, D.Y. Wu, Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers, *Cancer Res.* 65 (2005) 2795–2803.
- [49] I.B. Roninson, Tumor cell senescence in cancer treatment, *Cancer Res.* 63 (2003) 2705–2715.
- [50] J.W. Shay, I.B. Roninson, Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy, *Oncogene* 23 (2004) 2919–2933.
- [51] H. Jiang, L. Zhang, J. Kuo, K. Kuo, S.C. Gautam, L. Groc, A.I. Rodriguez, D. Koubi, T.J. Hunter, G.B. Corcoran, M.D. Seidman, R.A. Levine, Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells, *Mol. Cancer Ther.* 4 (2005) 554-561.
- [52] J. Li, Z. Qin, Z. Liang, The prosurvival role of autophagy in Resveratrol-induced cytotoxicity in human U251 glioma cells, *BMC Cancer* 9 (2009) 215.
- [53] M. Serrano, A.W. Lin, M.E. McCurrach, D. Beach, S.W. Lowe, Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a, *Cell* 88 (1997) 593–602.
- [54] G. Ferbeyre, E.de Stanchina, A.W. Lin, E. Querido, M.E. McCurrach, G.J. Hannon, S.W. Lowe, Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 3497–3508.

- [55] M. Narita, S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A.W. Lin, S.A. Hearn, D.L. Spector, G.J. Hannon, S.W. Lowe, Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence, *Cell* 113 (2003) 703–716.
- [56] W. Wang, J.X. Chen, R. Liao, Q. Deng, J.J. Zhou, S. Huang, P. Sun, Sequential activation of the MEK-extracellular signalregulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 3389–3403.
- [57] H. Iwasa, J. Han, F. Ishikawa, Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway, *Genes Cells* 8 (2003) 131–144.
- [58] R. Haq, J.D. Brenton, M. Takahashi, D. Finan, A. Finkielstein, S. Damaraju, R. Rottapel, B. Zanke, Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence, *Cancer Res.* 62 (2002) 5076–5082.
- [59] P. Sun, N. Yoshizuka, L. New, B.A. Moser, Y. Li, R. Liao, C. Xie, J. Chen, Q. Deng, M. Yamout, M.Q. Dong, C.G. Frangou, J.R. Yates, P.E. Wright, J. Han, PRAK Is Essential for ras-Induced Senescence and Tumor Suppression, *Cell* 128 (2007) 295–308.
- [60] J.F. Passos, T. Von Zglinicki, Oxygen free radicals in cell senescence: are they signal transducers? *Free Radic. Res.* 40 (2006) 1277–1283.
- [61] G.L. Dianov, J.L. Parsons, Co-ordination of DNA single strand break repair, *DNA Repair* 6 (2007) 454–460.
- [62] S.A. Gatz, L. Wiesmuller, Take a break—resveratrol in action on DNA, *Carcinogenesis* 29 (2008) 321–332.
- [63] K. Fukuhara, N. Miyata, Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (1998) 3187–3192.
- [64] S. Usha, I.M. Johnson, R. Malathi, Interaction of resveratrol and genistein with nucleic acids, *J. Biochem. Mol. Biol.* 38 (2005) 198–205.
- [65] N.K. Alvi, R.Y. Rizvi, S.M. Hadi, Interaction of quercetin with DNA, *Biosci. Rep.* 6 (1986) 861–868.
- [66] M.R. Webb, S.E. Ebeler, Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity, *Biochem. J.* 384 (2004) 527–541.
- [67] R.D. Snyder, P.J. Gillies, Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative, and topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells, *Environ. Mol. Mutagen.* 40 (2002) 266–276.
- [68] L.L. Woo, K. Onel, N.A. Ellis, The broken genome: genetic and pharmacologic approaches to breaking DNA, *Ann. Med.* 39 (2007) 208–218.
- [69] K.H. Cho, J.M. Pezzuto, J.L. Bolton, V.E. Steele, G.J. Kelloff, S.K. Lee, A. Constantinou, Selection of cancer chemopreventive agents based on inhibition of topoisomerase II activity, *Eur. J. Cancer* 36 (2000) 2146–2156.
- [70] J.Y. Jo, E. Gonzalez de Mejia, M. A. Lila, Effects of grape cell culture extracts on human topoisomerase II catalytic activity and characterization of active fractions, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2489–2498.
- [71] J.W. Harper, S.J. Elledge, The DNA Damage Response: Ten Years After, *Mol. Cell* 28 (2007) 739–745.

## 2.3 Capítulo 3 – Artigo a ser Submetido ao Journal of Neurooncology

### **Resveratrol and Quercetin Effect in a Rat Glioma Model**

Lauren L. Zamin<sup>a</sup>, Eduardo C. Filippi-Chiela<sup>a</sup>, Jose Vargas<sup>a</sup>, Luise Meurer<sup>b</sup>, Ana Paula Souza<sup>c</sup>, Cristina Bonorino<sup>c</sup>, Christianne Salbego<sup>c</sup>, Guido Lenz<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Patologia, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup>Faculdade de Biociências e Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>d</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Av. Ramiro Barcelos, 2600, UFRGS, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

\* Corresponding author: Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: +555133087620; Fax: +555133307003 Email: [lenz@ufrgs.br](mailto:lenz@ufrgs.br)

### Abstract

We have previously demonstrated that resveratrol (Rsv) and quercetin (Quer), two polyphenols widely found in vegetables, decreased glioma cell growth *in vitro*. Here, we asked whether these compounds could inhibit and/or decrease glioma growth in an *in vivo* rat model. We found that intraperitoneal daily Rsv(30mg/kg), Quer(50 mg/kg) and combined Rsv plus Quer treatment did not decrease tumor growth after 10 days of treatments. Instead we observed an increase in tumor volume after 15 days of Quer treatments that was blocked with combined Rsv plus Quer treatment. We observed that Rsv slightly reduced the coagulative necrosis, an indicator of bad prognosis. Rsv also slightly reduced the lymphocytic infiltration, that is a marker of good prognosis. This reduction was not observed in peripheral T-cells indicating that Rsv can reduce the T-cell tumor recruitment. Because we found a reduction in the body weight in animals that receive Rsv and combined Rsv plus Quer after 15 days of glioma implantation we examined whether these compounds could induce some hepatotoxicity. We did not find alteration in the liver pathology and the liver serum enzymes after treatments. Taken together these results show that Rsv and Quer did not decrease tumor growth in a rat glioma model. Despite our previous *in vitro* studies and reports in the literature that indicate that these compounds had antitumoral properties, the present result is a word of caution that has to be considered in the design of clinical trials and the indiscriminate use of these polyphenols as dietary supplements.

Keywords: Resveratrol, Quercetin, Glioblastoma, *in vivo* glioma model, tumor cell growth

## Introduction

Gliomas are the most common primary brain tumors, with a worldwide annual incidence of around 7 cases per 100,000 individuals [1]. The most frequent and most malignant gliomas are glioblastoma (GBM) that occur typically in older adults. Grossly, GBMs are heterogeneous intraparenchymal masses that show evidence of necrosis and hemorrhage. Microscopically, they consist of several cell types: the glioma cells proper, hyperproliferative endothelial cells, macrophages and trapped cells of the normal brain structures that are overrun by the invading glioma [2, 3]. Peritumor brain tissue shows various types of inflammatory responses, including activated macrophages and microglia, hypertrophic reactive astrocytes, vascular invasion and edema formation [4]. Despite the multimodal therapy approach, that basically consist in surgery followed by radio and/or chemotherapy, the prognostic remains very poor, with the majority of patients succumbing to the disease within a year [5].

Resveratrol (*trans-3,4,5-trihydroxystilbene*) (Rsv) is present in a number of plant, such as nuts, peanuts, grapes and consequently in red wine and grape juice [6]. Studies have suggested that Rsv can prevent the progression of a wide variety of pathologies, including vascular diseases, ischemic injuries, cancers, and neurodegenerative processes [7-10]. In 1997, it was reported that Rsv (1–25 $\mu$ M) inhibited the initiation and promotion of hydrocarbon-induced skin cancer in mice, as well as the progression of breast cancer in this species [11]. Its anticancer activity against human neoplasm was shown utilizing *in vivo* animals' models as well as human cancer cell lines, including those from breast [12-13], prostate [14-15], colon [16], brain [17-18] and oral squamous carcinoma [19]. Different mechanisms of cancer cell death induction were proposed for Rsv, including cell cycle arrest and apoptosis induction [20], autophagy cell death [21], necrosis [22] and senescence [17, 23]. The cell death phenotype is dependent on cell type and metabolic state of the cell, with Rsv being considered a promiscuous molecule able to activate many molecular targets [24].

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) (Quer) is a typical flavonoid present in the plant kingdom as a secondary metabolite found in red onions, grapes, apples, berries, cherries, broccoli, citrus fruits, tea (*Camellia sinensis*) and, at particularly high concentrations (180 mg per 100 g), in capers and lovage [25]. As cited by Middleton et al. (2000) [26] and Erlund (2004) [27], anti-oxidant, anti-carcinogenic, anti-inflammatory, and cardioprotective properties are several key biological functions ascribed to Quer. Middleton et al. (2000) [26] stressed the anti-carcinogenic properties of Quer that includes inhibition of the growth of cells

derived from human cancers such as those of stomach [28], colon [29, 30], brain [31], prostate [32] and breast [33]. Additionally, it suppresses the growth and development of uterine cervical cancer [34], melanomas [35], and intestinal tumors [36] in whole mice. At the molecular level, Quer acts as anticancer agent by down-regulating the expression of oncogenes (H-ras, c-myc and K-ras) and anti-oncogenes (p53) [37], or up-regulating cell cycle control protein (p21<sub>WAF1</sub> and p27<sub>KIP1</sub>) [38]. In addition, Quer inhibits different tyrosine and serine–threonine kinases, whose activities are linked to survival pathways such as MAPK and AKT/PKB [39].

We have previously demonstrated the combined effect of Rsv plus Quer in decreasing cell growth and inducing senescence-like growth arrest in chronically treated glioma cell line [17]. In this work we asked whether these drugs could inhibit and/or decrease glioma tumor growth in an *in vivo* rat model of glioma extensively used to test antitumoral interventions [40-42].

## **Methods**

### **Cell culture**

All culture materials were obtained from GIBCO Laboratories (Grand Island, NY). C6 rat glioma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, pH 7.4) plus 0.1 % amphoterecin B, 1 % penicillin/streptomycin and supplemented with 5 % fetal bovine serum. Cells were kept at a temperature of 37 °C, a minimum relative humidity of 95 %, and an atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub>.

### **Glioma implantation**

Rats (male *Wistar*, 8-weeks old) anesthetized with 90 mg/kg ketamine plus 12 mg/kg xylazine (Agener, Pouso Alegre, MG, Brazil) i.p. (intraperitoneal) were placed in a stereotactic frame and 5x10<sup>5</sup> C6 cells in a volume of 3 µL were injected at a depth of 6 mm in the right *striatum* with a Hamilton syringe. Injection coordinates with regard to bregma were 0.5 mm posterior and 3.0 mm lateral. All procedures used in the present study followed the “Principles of Laboratory Animal Care” of the National Institutes of Health (NIH) and were approved by the local Ethical Committee (protocol number 2008229).

## Treatments

A stock solution of Rsv was prepared in ethanol (50 mg/mL). Just before the animals injection the stock solution was dissolved in saline [43]. The maximal final ethanol concentration never exceeded 0.6 mL/kg. Quer suspension was prepared in 0.2 % Tween-80 saline solution (10 mg/mL) followed by sonication [44]. Five days after glioma implantation, the rats, divided in four groups, received: *group 1* - the vehicle where drugs were dissolved (saline + ethanol + 0.2 % Tween-80) corresponding to control (C) group; *group 2* - Rsv (30 mg/kg) (Chengdu Hawk Bio Engineerin, China); *group 3* Quer (50 mg/kg) (Sigma Chemical, St. Louis, MO); *group 4* - Rsv (30 mg/kg) plus Quer (50 mg/kg) i.p. daily for 10 or 15 days, as indicated. Fifteen or 20 days after glioma implantation, the rats were sacrificed by decapitation and the isolated brain immersed in 10 % paraformaldehyde in phosphate saline. After post-fixation for 24 h, the brains were sectioned into 4  $\mu$ M and stained with Hematoxylin/Eosin (HE). Blood samples were collected for posterior enzymatic assays ( $\gamma$ -glutamyl transferase, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil).

The liver was also removed, sectioned and fixed with 10 % paraformaldehyde for pathological analysis. For body weight analysis, the experimental groups were compared to the control group. The spleen was removed and placed in DMEM medium to posterior T-cell proliferation test.

## Pathological analysis and tumor volume quantification

At least five HE sections from each animal were analyzed by a pathologist, blinded for the experimental treatment regimen, to mitotic index, coagulative necrosis and lymphocytic infiltration. For tumor size quantification, the slices were imaged using a digital camera and tumor volume was calculated using Image J software (NIH Image, Rockville, MD).

## Cell proliferation/viability assay

T-cell proliferative responses were determined by a modified colorimetric assay [45] as described [46]. A single cell suspension of splenocytes from rats was obtained and cells were incubated at  $8 \times 10^5$  cells/mL with 1 % phytohaemagglutinin (PHA) (Sigma Chemical) or 2.5

mg/L concanavalin A (ConA) (Invitrogen, Carlsbad, CA). In the last 4 days of culture, 100  $\mu$ l of the supernatant was gently discarded and 30  $\mu$ L freshly prepared MTT [3-(4,5-dimethyl 2-thiazolyl) 2,5 diphenyl-2H-tetrazolium, Sigma] solution (5 mg/mL in RPMI-1640) was added to each well. The cell cultures were incubated for 4 h at 37° in a 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere. The dehydrogenase enzymes in metabolically active cells convert this substrate to formazan, producing a dark blue precipitate. After complete removal of the supernatant, 100  $\mu$ L of dimethyl sulphoxide (Sigma) was added to each well. The optical density (OD) was determined using a Biorad ELISA plate reader at wavelengths of 570 and 630 nm.

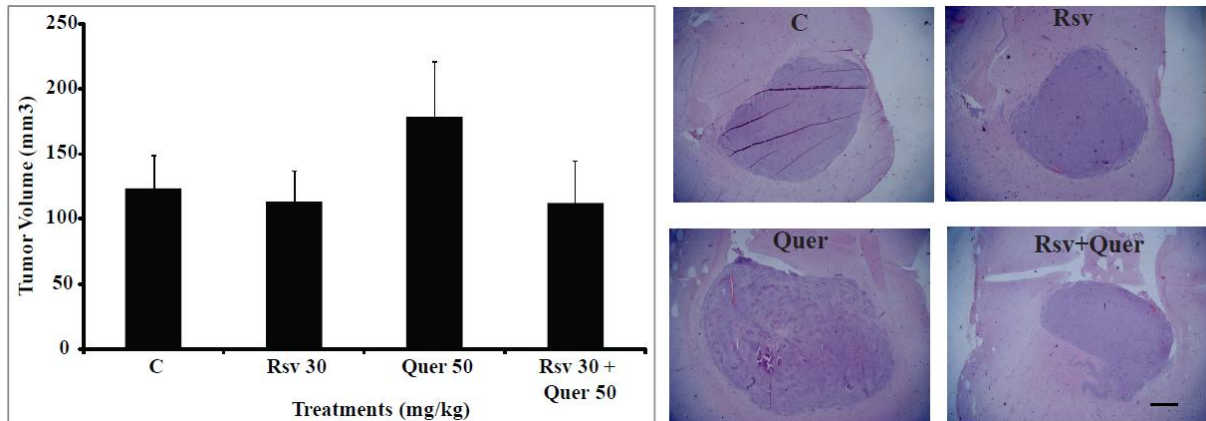
### **Statistical analysis**

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (standard error of the mean) and analyzed for statistical significance by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc for multiple comparisons (Tukey's test) using Biostat 5.0 software (Belem, PA, Brazil). Differences between mean values were considered significant when  $p < 0.05$ . For the pathological parameters, the Chi-Square test was used.

### **Results**

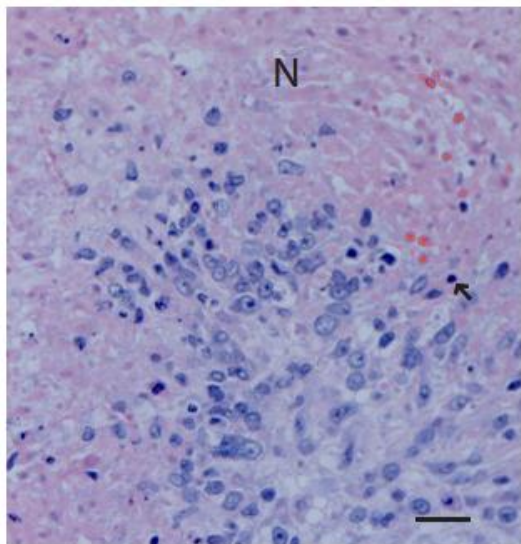
To investigate whether the induction of glioma cell death by Rsv and Quer previously found *in vitro* [17] could be effective also *in vivo* we implanted C6 glioma cells in the *striatum* of adult *Wistar* rats. After 5 days of glioma implantation we treated rats with daily i.p. injections of Rsv (30 mg/kg), Quer (50 mg/kg) or both for 10 days. There was no reduction in the tumor volume among the groups (Fig. 1). On the contrary, we noted a tendency of increase in the tumor volume in rats treated with Quer. Histopathological analysis of implanted tumors confirmed that they have characteristics that resemble human GBMS, with C6 cells demonstrated to grow in the intracerebral, intraventricular and intraparenchymal spaces (data not shown).





**Fig. 1** – Effect of Rsv and Quer on tumor volume of implanted glioma. Tumor volume was measured 15 days after implantation of C6 cells, corresponding to 10 days of Rsv and Quer treatment. At right side representative tumor images stained with HE are shown. The values were presented as means  $\pm$  S.E.M of 8 animals per group. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's post-test. Scale bars 1mm.

Gliomas from the untreated group presented a high mitotic index, nuclear pleomorphism, foci of tumor necrosis and lymphocytic infiltration, which are characteristics of GBMs in humans (Fig. 2) [42]. Although no statistical significant differences were observed among the groups in histopathological analysis, a slight reduction in necrosis and lymphocytic infiltration was found in Rsv plus Quer group (Table 1).



**Fig. 2:** Histological analysis of implanted gliomas. The sections of implanted rat glioma were stained with HE, as described in Section 2. Representative pictures of histological characteristics that define GBMs, as seen in rats implanted with gliomas (control group). Necrosis (N), and lymphocytic infiltration (arrow) were observed. Scale bars 10  $\mu$ M.

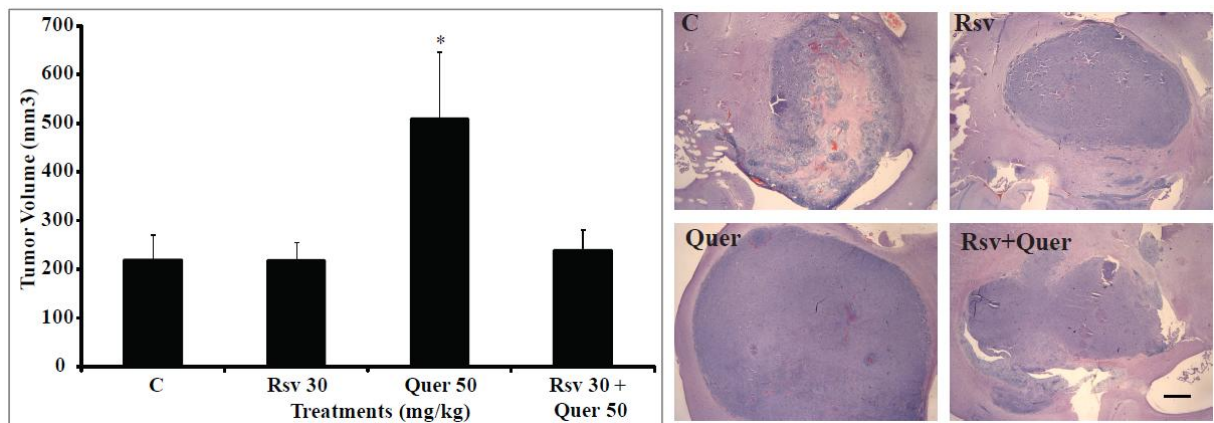
This finding led us to hypothesize that the time of treatment had been insufficient to observe some effect, since our previous data had indicated that the combined effect of Rsv plus Quer is mainly due to senescence induction that, *in vitro*, becomes clear after 4 to 5 days [17]. Therefore we treated the animals for 15 days. However, this only increased the positive effect that Quer produced on the tumors, with no treatment producing any reduction in tumor volume (Fig. 3). This increase was not observed in rats cotreated with Rsv plus Quer,

indicating that the Rsv was able to block the increase induced by Quer. Histopathological analysis showed that Rsv and cotreatment of Rsv plus Quer reduced the necrosis levels from 100 % of the tumors (control group) to 50 % and 55 % of the tumors, respectively (Table 1). Moreover, these treatments also reduced lymphocytic infiltration from 85 % (control) to 37 % for Rsv and 45 % for cotreatment.

**Table 1.** Histological characteristics of implanted gliomas.

Treatments	Lymphocytic Infiltration		Coagulative Necrosis		Mitotic Index (mitosis/HPF)	
C	5/10 (50%)	6/7 (85%)	6/10 (60%)	7/7 (100%)	15.36±2.29	9.97±3.21
Rsv 30	4/10 (40%)	3/8 (37.5%)	4/10 (40%)	4/8 (50%)	15.17±1.67	12.85±1.94
Quer 50	4/8 (50%)	2/3 (66%)	4/8 (50%)	3/3 (100%)	11.83±0.57	6.93±2.33
Rsv30+Quer50	2/10 (20%)	4/9 (45%)	3/10 (30%)	5/9 (55%)	11.83±1.04	13.4±1.58

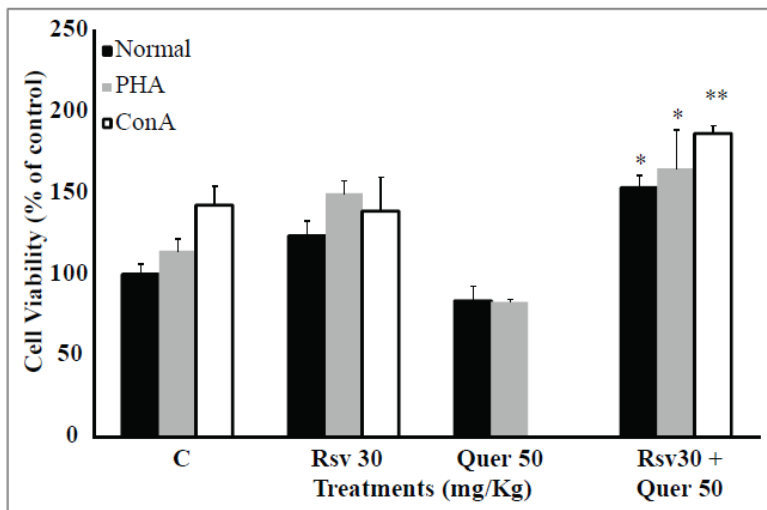
The histological variables (coagulative necrosis and lymphocytic infiltration) were regarded as present or absent. Mitosis were counted in ten high power fields (HPF) of the tumor, and the average of this counting was used as mitotic index (means ± S.E.M.). In which variable the left column indicates the characteristics after 15 days of glioma implantation (10 days of Rsv and Quer treatments) and the right column represent the characteristics after 20 days of glioma implantation (15 days of Rsv and Quer treatments).



**Fig. 3** – Effect of Rsv and Quer on tumor volume of implanted glioma. Tumor volume was measured 20 days after implantation of C6 cells, corresponding to 15 days of Rsv and Quer treatment. At right side representative tumor images stained with HE are shown. The values were presented as means ± S.E.M of 8 animals per group. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's post-test. \*Significantly different from control with  $p < 0.05$ . Scale bar 1mm.

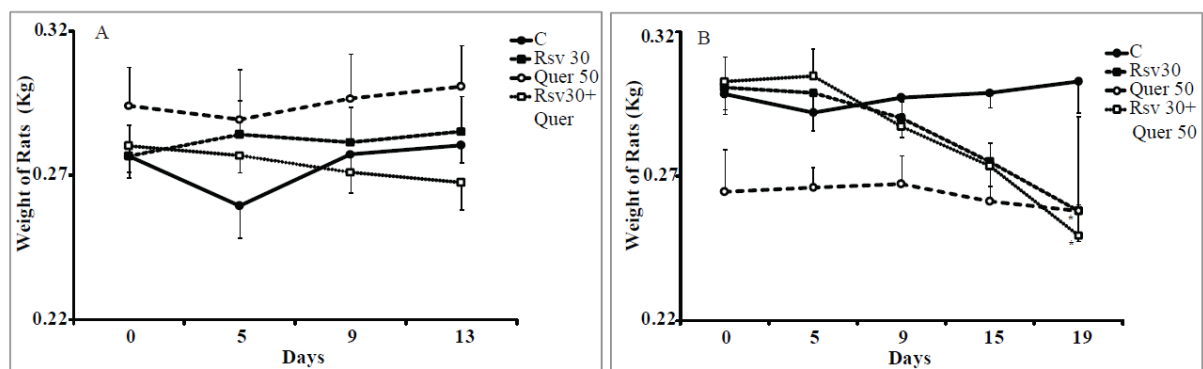
Since we found a slight decrease in lymphocytic infiltration in tumor area after Rsv and Rsv plus Quer treatments we wondered whether this effect was mediated by a decrease in systemic lymphocytic proliferation or just the tumor lymphocytic recruitment. For this, we analyzed the T-cell proliferation stimulated with PHA and ConA. Unexpectedly, we found an increased T-cell proliferation from rats cotreated with Rsv plus Quer. This effect can also be observed after PHA e ConA stimulation in this group (Fig. 4). Rats that were treated with

Quer presented a slight reduction in T-cell proliferation and rats treated with Rsv had similar effect to control.

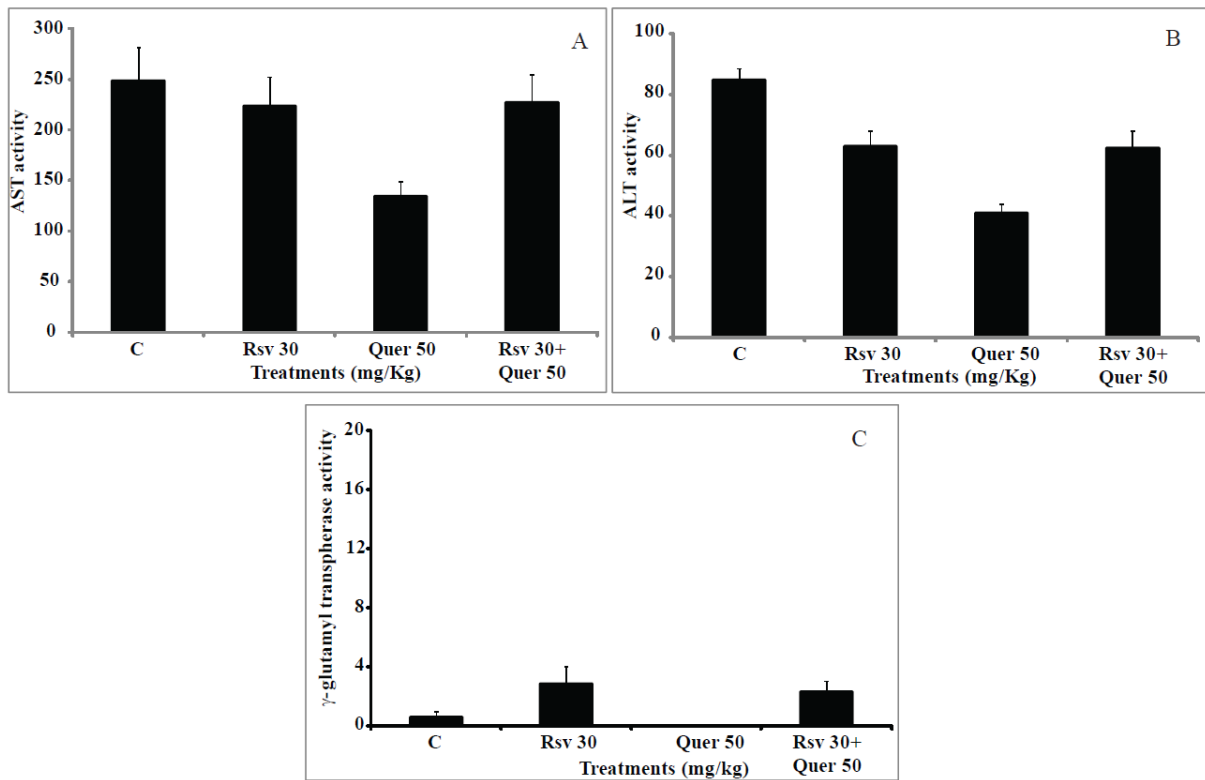


**Fig. 4:** T-cell proliferation *in vitro*. Splenocytes from 4 rats after 20 days of glioma implantation were incubated with PHA, ConA or only DMEM (normal) for 3 days. After, MTT assay was performed. Data are expressed as percentage of control.\*Significantly different from control (normal) with  $p < 0.05$ . Bars indicate mean  $\pm$  S.E.M, ANOVA, followed by Tukey's test,  $n = 4$  in triplicates.

We next compared the body weight of rats with implanted gliomas treated with Rsv and Quer. Until the thirteenth day of glioma implantation the body weight from treated rats did not differ from control group (Fig. 5A), however from fifteenth day, the rats treated with Rsv or Rsv plus Quer showed a diminished body weight (Fig. 5B). For this reason we investigated whether these drugs were inducing hepatotoxicity by measuring the hepatic enzymes  $\gamma$ -glutamyl transferase, ALT and AST in the rat blood serum. None of the treated animals presented significant alterations in the investigated enzymes, discarding hepatic alterations in the animals (Fig. 6A, B and C). Microscopic investigation of the liver by HE analysis demonstrated absence of signs of toxicity (data not shown).



**Fig. 5:** Body weight of animals with implanted gliomas. Animals were treated for 10 or 15 days as described in methods. Weights were observed daily. The values are represented as means  $\pm$  S.E.M of the animals used in this study ( $n = 8$  animals per group). Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test. \*Significantly different from the control group ( $p < 0.01$ ).



**Fig. 6.** Effect of Rsv and Quer on plasma transaminases activity after 20 days of glioma implantation. After 15 days of treatment, plasma was acquired followed by measurement of the activity of AST (aspartate aminotransferase) (A), ALT (alanine aminotransferase) (B) and  $\gamma$ -glutamyl transpherase (C). The values are represented as means  $\pm$  S.E.M of the 4 animals per group. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test.

## Discussion

We have previously demonstrated that Rsv and Quer treatment caused cytotoxic effects on glioma cell lines in an additive way [17]. It is well known that *in vitro* assays for growth and invasion only represent isolated aspects of the multiples process of the *in vivo* tumor growth [47]. For this reason, in the present work, we examined the effect of Rsv and Quer treatment using an *in vivo* glioma model that, despite its limitations, is useful for the study of growth, angiogenesis, immunology and invasion of gliomas [42] since it is established in the brain and presents several features observed in human GBMs. We found that Rsv did not change the volume in the rat tumor model while Quer increased the tumor volume after 15 days of treatment. Interestingly, the rats that received Rsv plus Quer did not show an increase in the tumor volume, presenting the same size as rats that receive only Rsv (Fig. 1 and 3).

The *in vivo* antitumor effects of Rsv has been studied in several reports [reviewed 48]. Rsv treatment (40 mg/kg/day for 28 days) efficiently suppressed the growth rate of neuroblastomas subcutaneously implanted and increased apoptosis, which was accompanied

by down-regulation of p21 and up-regulation of cyclin E [49]. Rats treated with Rsv (40 mg/kg/day, i.p.) had slower glioma growth rates in a subcutaneously inoculated Fischer rat RT-2 glioma, which correlated with tumor blood flow (indicated by the color Doppler vascularity index) and microvessel density (marked by the expression of CD31) [50]. Such differences from our work might be related to the animal models used, the amount of tumor cells inoculated, characteristics of the tumor cells or the plasma level of Rsv, and particularly the place of tumor implantation. Similarly to the our data, Tseng et al. [51] found that Rsv (40 mg/kg/day, i.p.) had no effect in decreasing tumor growth on intracerebral gliomas model (RT2 glioma cell line implanted in Fisher rats). They found that only an increased dose (100 mg/kg/day) affected intracerebral tumors growth and prolonged animal survival.

Numerous reports on the chemopreventive and anti-genotoxic effects of Quer have been published [reviewed in 52]. There are, however, studies that do appear to show an increased risk of tumors with Quer administration. In a study by Pamukcu et al. [53], albino Norwegian rats were fed a diet supplemented with 0.1 % Quer for 406 days. By the conclusion of the experiment, 80 % of treated rats had developed intestinal tumors and 20 % had bladder tumors. No tumors of either type were seen in control animals. Mean survival time was similar in treated and untreated animals [53]. This work raises similar concerns to our work that Quer may have a pro-tumoral effect.

The anticancer effect of mixture of polyphenols has been investigated. Schlachterman et al. [54], showed that combined dietary polyphenols Rsv, Quer and catechin at 0.5, 5, or 25 mg/kg reduced primary tumor growth of breast cancer xenografts in a nude mouse model. Intravenous administration of pterostilbene, a Rsv analogue, and Quer (20 mg/kg/day) to mice inhibits (73 %) metastatic growth of B16M-F10 melanoma cells in the liver, a common site for metastasis development [55]. Unexpectedly we found that Quer increased the tumor volume and Rsv was able to revert this effect but the combined anti-tumoral effect observed *in vitro* was not observed *in vivo*.

What makes treatment regimen that induces a very strong reduction in cell number due to apoptosis and senescence *in vitro* increase the tumor size *in vivo*, mainly considering the use of the exact same cell line? We considered three hypotheses: 1. modulation of the immune system, 2. angiogenesis and 3. stress from cell culture.

The immunodeficient status associated with gliomas was described more than twenty years ago. Initially, it was noted that the cellular immune response of patients and animals with gliomas was impaired [56-58]. The first reports described a lack of proliferation of the peripheral T cells of these patients after exposure to PHA [57, 58]. The aggressive nature of

gliomas is closely related to their capacity to evade the anti-tumoral immune response. Palma et al [59] investigated two hundred selected patients who were operated for GBM for the incidence of the lymphocytic infiltration in the histological slides and its possible relevance to a better clinical course. The group that exhibited a definite lymphocytic infiltration had a significantly longer preoperative history and postoperative survival than the other groups that presented slight or no infiltration. The mechanisms implicated in this phenomenon are only partially understood. Here, we found that lymphocytic infiltration was reduced by Rsv plus Quer. We tested if peripheral T cells of these rats were also affected. After exposure T cells to PHA and ConA we observed that T-cells proliferation was highest in rats treated with Rsv plus Quer, suggesting that these drugs had no negative, even positive, effect on peripheral T-cells proliferation and that an systemic immunosuppression is not responsible for the reduction in lymphocytic infiltration and increase in glioma size.

When normal cells are cultured *in vitro*, they enter senescence after some divisions [60]. Cancer-derived cell lines obviously somehow are able to circumvent this senescence, but which, as we have shown, can be re-activated [17]. It is reasonable to think that this reactivation with the combination of Rsv plus Quer requires the stressful conditions of the cell culture, since we did not observe significant reduction in mitotic index in the tumors of rats treated with the Rsv plus Quer.

Regions of necrosis and microvascular proliferation characterize high-grade malignant gliomas and are associated with bad prognosis [61, 62]. Evidence suggests that the necrotic regions may initially represent a migratory response to local hypoxia (perhaps brought about by coagulopathic events), followed by frank necrosis. The cells that palisade around the necrosis elaborate angiogenic (e.g., VEGF - vascular endothelial growth factor) and other growth factors, contributing to the marked angiogenesis in these tumors (including the so-called glomeruloid blood vessels) [62]. In recent years, Rsv has been found to inhibit angiogenesis [51, 63-65] and decrease VEGF expression in a rat glioma model [51]. Here, we found that Rsv treatment alone reduced the necrosis and this effect was also observed in cotreatment of Rsv and Quer. This effect can explain, at least in part, the Rsv prevalent effect above the rise in tumor volume observed with Quer treatment.

In a number of studies Quer was found to inhibit several steps of angiogenesis, including proliferation, migration and differentiation of endothelial cells [66-68]. However, following administration of Quer, the glucuronide (3G) and sulphate (3S) derivatives of Quer predominate [69]. Donini et al. [70] found that Quer conjugates exhibit divergent effects on the endothelium and on angiogenesis. On one hand, Quer3G and Quer itself have no effect, at

least at the concentration 1  $\mu\text{M}$ , on quiescent endothelium, while they inhibit endothelial functions and *in vivo* angiogenesis elicited by VEGF. On the other hand, Quer3S increases significantly the growth of quiescent endothelial cells reaching maximal activity at 1  $\mu\text{M}$ , while it has no effect on cell proliferation stimulated by VEGF.

Another important feature to mention is the concentration achieved in the brain after the treatments. We did not measure and do not know the plasma level in the rats treated with 30 mg/kg/day Rsv or 50mg/kg/day Quer. Studies in rodents indicate that Rsv and Quer cross the intact blood–brain barrier and reach concentrations in the range of 0.1 and 0.3  $\mu\text{mol/kg}$ , respectively [71, 72]. Glioma growth may break the blood–brain barrier, probably increasing the concentration reachable inside the glioma. One report mentioned that oral administration of 28 mg of Rsv to male rats achieves a peak plasma level  $>20$  ng/ml after 1 h [73]; accordingly, we estimated that a single dose of 30 mg/kg might result in a peak plasma level of  $\sim 20$   $\mu\text{M}$  that is close to the dose that we demonstrated inhibited glioma cell proliferation *in vitro* and induce senescence-like growth arrest [17].

It is worthwhile noting that Rsv is not toxic to primary astrocyte cultures and both Rsv and Quer are protective against oxygen and glucose deprivation in hippocampal organotypic cultures [10, 31] making these agents ideal for therapeutic intervention in central nervous system tumors. Moreover, other works described a protective action of Rsv to non-cancerous cells from several tissues [24]. The lack of liver toxicity in animals treated with Rsv corroborate these observations and open the possibility for higher concentrations of Rsv and Quer to be tested. Here, we show that Rsv and Quer did not decrease tumor growth in a rat glioma implantation model. However our previous studies and the literature indicate that these compounds had strong antitumoral properties [11-17]. Further studies are warranted to better determine the reasons by which these differences were found. These differences may lay in the heterogeneity of tumor cell lines, the animal model, the doses of the compounds, the time lapse between cell implantation and the beginning of treatments, the amount of cell implanted, and others.

Several clinical trials in humans are being made to test the efficiency of Rsv and Quer to treat several diseases, including cancer, neurodegenerative and aging-related pathologies. Moreover, Rsv and Quer have been commercialized as “miracle” phytotherapies drugs and people are taking them as if the chance of unwanted side effects was null. Thus, since we found that Quer can induce the glioma cell growth and because some properties of Quer, Rsv and other polyphenols are not well elucidated *in vivo*, it is very important to better elucidate

the effects of these compounds in animal models of some diseases before jumping to widespread human use.

#### **Conflict of interest:**

We declare that we have no conflict of interest.

#### **Acknowledgments:**

This study was supported by the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The authors thank to Neiva Copetti and Zelma Regina V. de Almeida for their excellent technical assistance, Jorge A. Quillfeldt for help with animal experiments, and Andressa Bernardi e Rudimar L. Frozza for help with the *in vivo* model.

#### **References**

1. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21:2683-2710
2. Kleihues P, Cavenee W (2000) Pathology and genetics of tumors of the nervous system. IARC Press, Lyon
3. Russel DS, Rubenstein LJ (1989) Pathology of tumors of the nervous system. Williams & Wilkins, Baltimore
4. Schiffer D (1997) Brain Tumors. Biology, Pathology, and Clinical References. Springer, New York, Berlin, Heidelberg
5. Sathornsumetee S, Rich JN, Reardon DA (2007) Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma. *Neurol Clin* 25:1111-1139
6. Harikumar KB, Aggarwal BB (2008) Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle* 7(8):1020-1035
7. Bradamante S, Barenghi L, Villa A (2004) Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc Drug Rev* 22:169-188
8. Wang Q, Xu J, Rottinghaus GE, Simonyi A, Lubahn D, Sun GY, Sun AY (2002) Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res* 958:439-447
9. Russo A, Palumbo M, Aliano C, Lempereur L, Scoto G, Renis M (2003) Red wine micronutrients as protective agents in Alzheimer-like induced insult. *Life Sci* 72:2369-2379
10. Zamin LL, Dillenburg-Pilla P, Argenta-Comiran R, Horn AP, Simao F, Nassif M, Gerhardt D, Frozza RL, Salbego C (2006) Protective effect of resveratrol against



- oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: involvement of PI3-K pathway. *Neurobiol Dis* 24:170–182
11. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997) Cancer chemopreventative activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275:218-220
  12. Pozo-Guisado E, Merino JM, Mulero-Navarro S, Lorenzo-Benayas MJ, Centeno F, Alvarez-Barrientos A, Fernandez-Salguero PM (2005) Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB. *Int J Cancer* 115:74-84
  13. Garvin S, Öllinger K, Dabrosin C (2006) Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts *in vivo*. *Cancer Lett* 231:113–122
  14. Hsieh TC, Wu JM (1999) Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp Cell Res* 249:109–115
  15. Wang TTY, Hudson TS, Wang TC, Remsberg CM, Davies NM, Takahashi Y, Kim YS, Seifried H, Vinyard BT, Perkins SN, Hursting SD (2008) Differential effects of resveratrol on androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis* 29(10):2001–2010
  16. Ider Y, Vincent F, Duranton B, Badolo L, Gosse F, Bergmann C, Seiler N, Raoul F (2000) Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes, and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett* 158:85–91
  17. Zamin LL, Filippi-Chiela EC, Dillenburg-Pilla P, Horn F, Salbego C, Lenz G (2009) Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Sci* 100:1655–1662
  18. Tseng SH, Lin SM, Chen JC, Su YH, Huang HY, Chen CK, Lin PY, Chen Y (2004) Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. *Clin Cancer Res* 10:2190–2202
  19. Elattar TM, Virji AS (1999) The effect of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Anticancer Res* 19:5407–5414
  20. Joe AK, Liu H, Suzui M, Vural ME, Xiao D, Weinstein IB (2002) Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 8:893-903
  21. Opiari AW, Jr., Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, Liu JR (2004) Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 64:696-703
  22. Michels G, Watjen W, Weber N, Niering P, Chovolou Y, Kampkotter A, Proksch P, Kahl R (2006) Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells. *Toxicology* 225:173-182
  23. Heiss EH, Schilder YDC, Dirsch VM (2007) Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells. *J Biol Chem* 282:26759-26766
  24. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T (2008) Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res* 658:68–94
  25. Bischoff SC (2008) Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11:733-740
  26. Middleton Jr. E, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* 42(4):673–751

27. Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Maenpaa J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A (2000) Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 56:545–553
28. Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N, Marui N, Matsumoto K, Fujioka A, Nishino H, Aoike A (1990) The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Lett* 260:10–13
29. Hosokawa N, Hosokawa Y, Sakai T, Yoshida M, Aoike A, Kawai K, Nishino H, Fukushima M (1990) Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possible cell-cycle-related 17 kDa protein in human colon cancer cells. *Int J Cancer* 45:1119–1124
30. Pawlikowska-Pawlega B, Jakubowicz-Gil J, Rzymowska J, Gawron A (2001) The effect of quercetin on apoptosis and necrosis induction in human colon adenocarcinoma cell line LS180. *Folia Histochem Cytobiol* 39:217–218
31. Braganhol E, Zamin LL, Canedo AD, Horn F, Tamajusuku AS, Wink MR, Salbego C, Battastini AM (2006) Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs* 17(6):663–671
32. Kampa M, Hatzoglou A, Notas G, Damianaki A, Bakogeorgou E, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin PM, Castanas E (2000) Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer* 37:223–233
33. Damianaki A, Bakogeorgou E, Kampa M, Notas G, Hatzoglou A, Panagiotou S, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin PM, Castanas E (2000) Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J Cell Biochem* 78:429–441
34. De S, Chakraborty J, Chakraborty RN, Das S (2000) Chemopreventive activity of quercetin during carcinogenesis in cervix uteri in mice. *Phytother Res* 14:347–351
35. Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, Aiello FB, Piantelli M (2000) Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 87:595–600
36. Mahmoud NN, Carothers AM, Grunberger D, Bilinski RT, Churchill MR, Martucci C, Newmark HL, Bertagnolli MM (2000) Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis* 21:921–927
37. Ranelletti FO, Maggiano N, Serra FG, Ricci R, Larocca LM, Lanza P, Scambia G, Fattorossi A, Capelli A, Piantelli M (2000) Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. *Int J Cancer* 85:438–445.
38. Casagrande F, Darbon JM (2001) Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol* 61:1205–1215.
39. Spencer JPE, Rice-Evans C, Williams RJ (2003) Modulation of prosurvival 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* 278:34783–34789
40. Bernardi A, Braganhol E, Jäger E, Figueiró F, Edelweiss MI, Pohlmann AR, Guterres SS, Battastini AMO (2009) Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces *in vivo* glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Lett* 281:53–63
41. Takano T, Lin JHC, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M (2001) Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Med* 7:1010–1015
42. Chekhonin VP, Baklaushev VP, Yusubalieva GM, Pavlov KA, Ukhova OV, Gurina OI (2007) Modeling and Immunohistochemical Analysis of C6 Glioma *In vivo*. *Cell Technologies in Biology and Medicine* 2:501–509
43. Garvin S, Ollinger K, Dabrosin C (2006) Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts *in vivo*. *Cancer Letters* 231:113–122

44. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zetler C, Marroni C, Marroni C, Gonzalez-Gallego J (2004) Quercetin prevents oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochemical Pharmacology* 68:1939–1946
45. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65:55–63
46. Motta A, Schmitz C, Rodrigues L, Ribeiro F, Teixeira C, Detanico T, Bonan C, Zwickey H, Bonorino C (2007) Mycobacterium tuberculosis heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation *in vitro*. *Immunology* 121:462–472
47. Kaczarek E, Zapf S, Bouterfa H, Tonn JRC, Westphal M, Giese A (1999) Dissecting glioma invasion: interrelation of adhesion, migration and intercellular contacts determine the invasive phenotype. *Int J Devl Neur* 17:625-641
48. Bishayee A (2009) Cancer Prevention and Treatment with Resveratrol: From Rodent Studies to Clinical Trials. *Cancer Prev Res* 2(5):409-418
49. Chen Y, Tseng SH, Lai HS, Chen WJ (2004) Resveratrol-induced cellular apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma cells and antitumor effects on neuroblastoma in mice. *Surgery* 136:57–66
50. Chen JC, Chen Y, Lin JH, Wu JM, Tseng SH (2006) Resveratrol suppresses angiogenesis in gliomas: evaluation by color Doppler ultrasound. *Anticancer Res* 26:1237–1246
51. Tseng SH, Lin SM, Chen JC, Su YH, Huang HY, Chen CK, Lin PY, Chen Y (2004) Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. *Clin Cancer Res* 10:2190–2202
52. Murakami A, Ashida H, Terao J (2008) Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* 269: 315-325
53. Pamukcu AM, Yalciner S, Hatcher JF, Bryan GT (1980) Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Res* 40:3468-3472
54. Schlachterman A, Valle F, Wall KM, Azios NG, Castillo L, Morell L, Washington AV, Cubano LA, Dharmawardhane SF (2008) Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model. *Transl Oncol* 1:19–27
55. Ferrer P, Asensi M, Segarra R, Ortega A, Benlloch M, Obrador E, Varea MT, Asensio G, Jorda L, Estrela JM (2005) Association between Pterostilbene and Quercetin Inhibits Metastatic Activity of B16 Melanoma. *Neoplasia* 7(1):37–47
56. Wood GW, Morantz RA (1982) *In vitro* reversal of depressed T lymphocyte function in the peripheral blood of brain tumor patients. *J Natl Cancer Inst* 68(1):27-33
57. Wood GW, Morantz RA (1983) Depressed T lymphocyte function in brain tumor patients: monocytes as suppressor cells. *J Neurooncol* 1(2):87-94
58. Yamasaki T, Handa H, Yamashita J, Namba Y and Hanaoka M (1983) Characteristic immunological responses to an experimental mouse brain tumor. *Cancer Res* 43(10): 4610-4617
59. Palma L, Lorenzo ND, Guidetti B (1978) Lymphocytic infiltrates in primary glioblastomas and recidivous gliomas Incidence, fate, and relevance to prognosis in 228 operated cases. *J Neurosurg* 49(6):854-861
60. Hayflick L (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37:614–636
61. Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Ohgaki H, Cavenee WK (2000) Pathology and Genetics of Tumours of the Central Nervous System. In: Kleihues P, Cavenee WK (eds). World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon, pp.6-69

62. Louis DN (2006) Molecular Pathology of Malignant Gliomas. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 1:97–117
63. Hsieh TC, Wu JM (1999) Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp Cell Res* 249:109–115
64. Kimura Y, Okuda H (2001) Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *J Nutr* 131:1844–1849
65. Brakenhielm E, Cao R, Cao Y (2001) Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *FASEB J* 15:1798–1800
66. Fan PS, Gu ZL, Sheng R, Liang ZQ, Wang XX, Zhu Y (2003) Inhibitory effect of quercetin on proliferation of human microvascular endothelial cells *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin* 24:1231–1234
67. Tan WF, Lin LP, Li MH, Zhang YX, Tong YG, Xiao D, Ding J (2003) Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. *Eur J Pharmacol* 459:255–262
68. Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji K (2001) Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis *in vitro*. *Cancer Lett* 171:11–16
69. Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MR, Williamson G (2001) Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res* 35:941–952
70. Donnini S, Finetti F, Lusini L, Morbidelli L, Cheynier V, Barron D, Williamson G, Waltenberger J, Ziche M (2006) Divergent effects of quercetin conjugates on angiogenesis. *Br J Nutr* 95:1016–1023
71. Asensi M, Medina I, Ortega A, Carretero J, Bano MC, Obrador E, Estrela JM (2002) Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic Biol Med* 33: 387–398
72. de Boer VCJ, Dihal AA, van der Woude H, Arts ICW, Wolfram S, Alink GM, Rietjens IMCM, Keijer J, Hollman PCH (2005) Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr* 135:1718–1725
73. Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Urien S, Tillement JP, Bertelli A (1996) Kinetics of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats. *Int J Clin Pharmacol Res* 16:77–81

### 3 DISCUSSÃO

Dentre os tumores cerebrais primário, o GBM é o mais comum, apresentando alta taxa de mortalidade e morbidade. A terapia convencional para GBMs recém diagnosticados, que inclui ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia com TMZ, tem surtido pouco efeito, com alta taxa de recorrência e progressão da doença (LOUIS, 2006). Dessa forma, torna-se urgente a busca por novas terapias a fim de aumentar a sobrevida destes pacientes. Os consideráveis avanços sobre o entendimento da biologia celular e molecular dos GBMs têm permitido o desenvolvimento de novas drogas direcionadas a alvos moleculares específicos envolvidos na iniciação, progressão e manutenção dos tumores (SATHORNSUMETEE E RICH, 2008). Neste trabalho, buscou-se aprimorar o conhecimento sobre a biologia dos GBMs, bem como procurar novas formas de terapia utilizando polifenóis amplamente distribuídos na natureza.

Inicialmente, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito antitumoral *in vitro* do resveratrol e da quercetina em linhagens de GBM humano (U87-MG e U138-MG), de rato (C6) e de camundongo (GL261) com diferentes doses e em diferentes tempos. A contagem do número de células indicou que tanto o resveratrol quanto a quercetina reduziram significativamente o número de células (capítulo 1 – figura 1). Ambos os compostos mostraram um efeito tempo e dose dependente, sendo as doses de resveratrol 50  $\mu\text{M}$  e de quercetina 100  $\mu\text{M}$  as que apresentaram uma maior redução no número de células após 72 h de tratamento. Interessantemente, quando foi realizado o tratamento combinado de doses menores de resveratrol (10  $\mu\text{M}$ ) e de quercetina (25  $\mu\text{M}$ ) foi observado um efeito aditivo e semelhante ao observado com as doses maiores isoladas.

Até onde vai o nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho a mostrar o efeito antitumoral da combinação de resveratrol e quercetina em gliomas. A vantagem da terapia que utiliza a combinação de diversos compostos em baixas concentrações é a minimização dos efeitos tóxicos e a redução do custo do tratamento quando comparado ao uso individual e em doses altas de cada composto (RUSSO, 2007).

Em um estudo prévio, foi demonstrado o efeito neuroprotetor do resveratrol em culturas organotípicas de hipocampo de rato submetidas à privação de oxigênio e

glicose (POG) (ZAMIN et al., 2006). As mesmas doses de resveratrol que mostraram um efeito neuroprotetor também mostraram um efeito antitumoral em glioma (capítulo 1). Isso sugere que este composto tem potencial citotóxico para células neoplásicas e citoprotetor para células saudáveis. Em outro trabalho, realizado por Braganhol e col. (2006), utilizando a quercetina no modelo supracitado, foram encontrados resultados similares aos obtidos com o resveratrol, onde a quercetina mostrou um efeito neuroprotetor frente à POG em culturas organotípicas de hipocampo. No mesmo trabalho, foi mostrado o efeito antitumoral em linhagens de glioma U138-MG, utilizando as mesmas concentrações que se mostraram neuroprotetoras. Diversos estudos têm demonstrado o efeito neuroprotetor do resveratrol e da quercetina em modelos de doença de Alzheimer, Parkinson, entre outros, e o efeito antitumoral em diferentes modelos, corroborando com o caráter duplo – antitumoral e neuroprotetor - destes compostos (seção 1.2.5 e 1.3.5).

Nesta tese, pra adicionar mais uma evidência de ausência de toxicidade em células saudáveis, culturas primárias de astrócitos foram tratadas com resveratrol, nas mesmas doses e tempos utilizados nas linhagens de GBM (capítulo 1 - figura 2C e 2D). Após 72 h de tratamento, não foi encontrado aumento de morte celular, corroborando com os resultados prévios obtidos. Essa característica torna esse composto bom candidato à utilização em terapias antitumorais, porém os mecanismos de ação que expliquem este efeito ambíguo ainda não foram esclarecidos.

A ausência de toxicidade destes compostos também foi demonstrada no modelo *in vivo*, onde a análise da atividade de enzimas marcadoras de lesão hepática (aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase,  $\gamma$ -glutamil transferase) não foi alterada nos animais tratados com resveratrol e quercetina em relação ao controle (capítulo 3 – figura 6). A análise histopatológica do fígado também não revelou alterações (dados não mostrados), sugerindo que estes compostos não apresentam toxicidade.

Dentre as linhagens de GBM estudadas, a C6 e a GL261 foram as mais sensíveis à indução de morte mediada por resveratrol e quercetina. Assim, optou-se por dar prosseguimento a este estudo utilizando apenas a linhagem C6. Além disso, o projeto inicial contemplava experimentação animal *in vivo* e essa linhagem, por ser isogênica para ratos e mostrar características semelhantes aos tumores encontrados em humanos (BENDA *et al.*, 1965; GROBBEN *et al.*, 2002), foi escolhida para este

propósito. Dessa maneira, poderia ser possível comparar os efeitos observados *in vitro* com os efeitos encontrados *in vivo*.

As diferentes respostas de cada linhagem frente ao mesmo tratamento podem ser explicadas pelas diferentes características que cada uma apresenta. Por exemplo, a linhagem U87-MG e a U138-MG possuem a proteína PTEN deletada, a linhagem U138-MG é mutada para TP53, já a C6 possui ambas as proteínas funcionais (ISHII *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2008). A heterogeneidade dos tumores é um dos principais desafios para quem os estuda e busca um tratamento para os pacientes acometidos dessa doença.

O próximo passo foi avaliar o tipo de morte celular induzida pelos tratamentos. Os resultados mostraram que a dose de 50  $\mu\text{M}$  de resveratrol induziu necrose, apoptose e parada no ciclo celular na fase G1 após 24 h de tratamento (capítulo 1- figura 2 e 3). O tratamento combinado de resveratrol 10  $\mu\text{M}$  mais quercetina 25  $\mu\text{M}$  induziu apenas apoptose. A quercetina sozinha (100  $\mu\text{M}$ ) não induziu nem necrose nem apoptose, apenas um bloqueio na fase S do ciclo celular após 24 h de tratamento.

É interessante ressaltar que a apoptose só foi detectada a partir de 48 h de tratamento com 50  $\mu\text{M}$  de resveratrol. Dessa forma a seguinte hipótese foi formulada: O resveratrol causou parada no ciclo celular em uma grande parte das células e depois levou essas a apoptose. As células que não pararam no ciclo celular morreram por necrose e os 5 % de células restantes, que resistiram à morte, foram as responsáveis pela ausência de bloqueio no ciclo celular obtida nos tempos de 48 e 72 h. A confirmação desta hipótese poderia ser obtida com análise microscópica individual ou uma curva de tempo mais detalhada, que ainda não pode ser realizada.

Como citado na seção 1.1.4.1 desta tese, a via da PI3K/AKT está superativada em GBM, induzindo crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Os resultados mostraram que ambas as drogas (resveratrol 10  $\mu\text{M}$  e quercetina 25  $\mu\text{M}$ ) inibiram a fosforilação/ativação da AKT, sendo o efeito da combinação dessas o mais pronunciado (capítulo 1 - figura 4A). Esse efeito não se deu via diminuição do imunoconteúdo da PTEN (capítulo 1 - figura 4B).

Para confirmar que a redução no número de células ocorreu devido à inibição da AKT pelos polifenóis, as mesmas foram tratadas com o inibidor da via, LY, a fim

de comparar o seu efeito com o observado para as drogas. Enquanto o cotratamento de resveratrol 10  $\mu\text{M}$  mais quercetina 25  $\mu\text{M}$  reduziu a fosforilação da AKT para 34 % e o número de células para 20 % (em relação ao controle), o LY reduziu para 26 e 70 %, respectivamente (capítulo 1 - figura 4C). Dessa forma, esses resultados indicam que apenas a inibição da fosforilação da AKT pelos compostos não é suficiente para causar a redução no número de células, indicando que outros mecanismos devem estar envolvidos nesse efeito.

No trabalho referido anteriormente (ZAMIN *et al.*, 2006) observou-se que o resveratrol na concentração de 50  $\mu\text{M}$  aumentava a fosforilação da AKT após POG, desta forma protegendo as células do hipocampo da morte celular induzida por esse evento. Quando as culturas foram cotratadas com LY mais resveratrol e posteriormente expostas à POG, o efeito neuroprotetor do resveratrol não foi observado. Esse conjunto de resultados aponta para a diversidade de ações do resveratrol e seu amplo espectro de alvos moleculares (KUNDU E SURH, 2008). Embora sejam células provenientes do mesmo órgão, as características das células que compõem uma fatia de hipocampo cerebral e a variabilidade de uma linhagem de GBM limitam a comparação.

Um trabalho realizado por Heiss e col. (2007) mostrou que o tratamento crônico com resveratrol (30  $\mu\text{M}$ ) induziu senescência celular em linhagem de câncer de cólon humano HCT116. Dessa forma, resolveu-se investigar o efeito do resveratrol e da quercetina na indução da senescência na linhagem de glioma C6. Os resultados mostraram que após 12 dias de tratamento contínuo com 25  $\mu\text{M}$  de resveratrol e o cotratamento com resveratrol 10  $\mu\text{M}$  mais quercetina 25  $\mu\text{M}$  levou à indução de senescência e à diminuição do crescimento celular (capítulo 1 - figura 5A, B, C). Importante notar que quando utilizadas sozinhas, resveratrol 10  $\mu\text{M}$  e quercetina 25  $\mu\text{M}$  não tiveram esse efeito.

Embora estes resultados tenham corroborado aqueles descritos por Heiss e col. (2007) e a hipótese inicial tenha sido confirmada, os resultados não deixaram de ser surpreendentes. Classicamente, o resveratrol e a quercetina são consideradas moléculas prólongevidade, promissoras no tratamento de doenças relacionadas ao envelhecimento, como síndrome metabólica, entre outros (RUSSO, 2007; HARIKUMAR E AGGARWAL, 2008). Demonstrar que esses compostos também induzem senescência em linhagens tumorais adicionou mais uma evidência para o



fato destes polifenóis possuírem diversos alvos e efeitos. Ao nosso conhecimento, este foi o segundo trabalho a demonstrar esse efeito pró-senescência do resveratrol em tumores e o primeiro a demonstrar isso em GBMs e utilizando a combinação desses dois polifenóis. Após a publicação do estudo descrito no primeiro capítulo, outro trabalho surgiu demonstrando a indução de senescência em linhagens de osteosarcoma e carcinoma de pulmão (RUSIN *et al.*, 2009) pelo resveratrol.

No capítulo 2 buscou-se a dose mínima capaz de induzir senescência. Após tratar as células com a combinação de resveratrol 5  $\mu\text{M}$  e quercetina 10  $\mu\text{M}$  não houve indução de senescência, apenas foi observado uma redução no crescimento celular. Porém, essa redução foi menor do que a causada pela combinação das doses de 10 e 25  $\mu\text{M}$  respectivamente (capítulo 2 - figura 1). Assim, a dose mínima requerida para a manifestação do fenótipo senescente foi a combinação de resveratrol 10  $\mu\text{M}$  e quercetina 25  $\mu\text{M}$  por um tratamento mínimo de 5 a 7 dias.

A partir desses resultados, prosseguiu-se a investigação dos mecanismos de indução da parada no crescimento celular e de senescência mediada por essas drogas. O resultado obtido na figura 4 (capítulo 1) indicou que o tratamento agudo com a combinação dessas drogas reduziu a fosforilação da AKT, porém essa redução não foi suficiente para causar a inibição do crescimento celular. Dessa forma, verificou-se se a redução da fosforilação da Akt estaria tendo um efeito na redução do crescimento e indução de senescência pelo tratamento crônico. Para isso, as células foram tratadas cronicamente com LY. Novamente, o LY não foi capaz de causar diminuição no crescimento celular nem indução de senescência, corroborando com os resultados obtidos para o efeito agudo.

O papel da AKT na indução de senescência ainda permanece controverso. Nogueira e col. (2009) demonstraram que a ativação da AKT induziu senescência prematura em cultura de fibroblasto de embrião de camundongo, e esta indução foi mediada pelo aumento de ROS induzido por AKT. Porém, outro trabalho mostrou que ao restaurar o gene RASSF1A em células tumorais, houve um aumento da indução da senescência após ativação da via Ras-MEK-ERK (Ras-Cinase ativadora de ERK ativada por mitógenos-Cinase regulada extracelularmente - *Ras-mitogen activated ERK activating kinase-Extracellularly regulated kinase*) e da inativação da via da AKT (THALER *et al.*, 2009). Novamente, diferentes respostas podem ser

obtidas ao estimular a mesma via, dependendo do tipo celular, da intensidade do estímulo e outros parâmetros que fazem a biologia celular tão diversa.

Foi observado que após 12 dias em cultura, quase todas as células tratadas com a combinação de 10  $\mu\text{M}$  de resveratrol e 25  $\mu\text{M}$  de quercetina estavam senescentes. Embora a senescência seja considerada um processo irreversível (COLLADO *et al.*, 2007), resolveu-se testar a capacidade dessas células se recuperarem do tratamento crônico. Para isso foi realizado um ensaio de formação de colônia com as células restantes do tratamento por 12 dias. Estas foram plaqueadas em baixa densidade e permanecerem sem tratamento por 7 dias. Os resultados obtidos mostraram que a formação de colônias foi reduzida para 40 % com tratamento prévio de resveratrol 25  $\mu\text{M}$  e com a combinação de 10  $\mu\text{M}$  de resveratrol e de 25  $\mu\text{M}$  quercetina. Provavelmente estas células foram as que sobreviveram ao tratamento de 12 dias, pois não foi observado indução de senescência ao final do ensaio clonogênico (capítulo 1 - figura 5D e E).

Uma vez constatada a indução de parada no crescimento celular e a indução da senescência pelo resveratrol e pela quercetina, resolveu-se investigar melhor os mecanismos de ação destas drogas. Para tal, no capítulo 2 foram estudadas diversas vias clássicas de indução de senescência, como a via da p53, da pRB, da p38, da ERK e da mTOR (essa menos evidente no processo de senescência e mais no processo de indução de autofagia) (COLLADO E SERRANO, 2010). Os resultados indicaram que a combinação de 10  $\mu\text{M}$  de resveratrol e 25  $\mu\text{M}$  quercetina modularam principalmente a via da p53, diminuindo a curva de crescimento da linhagem deficiente nesta proteína (U251) sem induzir senescência. Essa diminuição da curva de crescimento foi menor do que a observada em C6. Trabalhos prévios utilizando a linhagem U251 e o tratamento com resveratrol mostraram que esse é capaz de induzir apoptose nesta linhagem (em concentrações próximas a 100  $\mu\text{M}$ ) (JIANG *et al.*, 2005) e autofagia (150  $\mu\text{M}$ ) (LI *et al.*, 2009).

Dessa forma, foi formulada a seguinte hipótese: Em C6 foi observada a ocorrência de apoptose e senescência, o que levou a uma redução drástica na curva de crescimento. Em U251, não foi observada senescência, apenas uma moderada redução na curva de crescimento. Visto que a literatura relata que o resveratrol nessa linhagem causa apoptose e autofagia, concluí-se então que a ocorrência

concomitante da apoptose e da senescência foram os principais causadores da morte celular observada em C6.

Dentre os diversos estímulos que podem conduzir a senescência, um deles é a indução de dano ao DNA (CAMPISI E DI FAGAGNA, 2007). Através da realização de um ensaio de cometa alcalino, verificou-se que após 24 h do cotratamento de 10  $\mu$ M de resveratrol e 25  $\mu$ M de quercetina houve um aumento no índice de dano ao DNA (capítulo 2 - figura 5A). Esse dano envolveu quebra dupla de DNA, o que foi demonstrado pelo aumento da  $\gamma$ H2AX (capítulo 2 - figura 5B), que é um indicador deste tipo de lesão (ROGAKOU *et al.*, 1998). Além disso, quebras simples podem gerar quebras duplas durante a replicação celular (BERRA *et al.*, 2006).

Outro estímulo indutor de senescência é o aumento de ROS (CHEN *et al.*, 1995). Esse pode disparar senescência diretamente ou por induzir dano oxidativos nas bases do DNA (SLUPPHAUG *et al.*, 2003). Essas lesões podem ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucléicos ou, muitas vezes, podem levar à formação de quebras em uma das cadeias do DNA ou quebras simples em posições aproximadamente simétricas nas duas cadeias do DNA (SLUPPHAUG *et al.*, 2003). Embora predomine na literatura que os polifenóis utilizados neste trabalho têm uma forte ação antioxidante (RUSSO, 2007), decidiu-se investigar se estes compostos não estariam, neste caso, aumentando a produção de ROS. Em acordo com os relatos da literatura (RUSSO, 2007), os resultados indicam que não houve aumento na produção de ROS pela combinação de 10  $\mu$ M de resveratrol e de 25  $\mu$ M de quercetina, com essa última apresentando um moderado efeito antioxidante (capítulo 2 - figura 5C).

Como a combinação de resveratrol e quercetina pode causar tantos efeitos que não são observados quando estas moléculas são utilizadas individualmente, principalmente senescência e quebras duplas de DNA? Estariam elas atuando em vias diferentes? Estaria o resveratrol aumentando a disponibilidade e/ou estabilidade da quercetina ou vice-versa? Estaria um mediando um efeito inicial essencial para o efeito posterior do outro? Para isso, foram geradas algumas hipóteses baseadas nos resultados obtidos e na literatura, que serão descritas a seguir.

Essas moléculas, principalmente o resveratrol, possuem diversas formas de interação com o DNA já descritas e foram aprofundadamente revisadas por Gatz e Wiesmuller (2008). Diversos trabalhos descreveram que o resveratrol pode afetar

vários aspectos do metabolismo do DNA, dentre eles a replicação, recombinação, reparo, relaxamento e manutenção dos telômeros (GATZ E WIESMULLER, 2008).

Foi demonstrado que tanto o resveratrol quanto a quercetina interagem diretamente com o DNA, ligando-se a esse, sendo a quercetina um possível agente intercalante (ALVI *et al.*, 1986; FUKUHARA E MIYATA, 1998; SNYDER E GILLIES, 2002; WEBB E EBELER, 2004; USHA *et al.*, 2005). Além disso, em dois estudos, o resveratrol foi caracterizado como um inibidor catalítico de topoisomerase II (CHO *et al.*, 2000; JO *et al.*, 2005) e a quercetina um inibidor catalítico de topoisomerase I e II (CHO *et al.*, 2000).

Assim a seguinte hipótese foi formulada:

A quercetina intercala entre as bases do DNA, o que leva a uma mudança na conformação dessa molécula. Com a inibição das topoisomerasas, tornada mais forte pela associação dos dois compostos, o DNA sofre uma torção grande demais, o que acaba causando uma quebra nas suas fitas. Essa quebra leva a ativação da via da p53, causando uma parada no ciclo celular, e recrutamento de mecanismos de reparo a fim de corrigir o dano. Como esse dano é grande demais para ser eficientemente reparado, algumas células entram em apoptose e outras ficam em um estado de senescência. Cabe ressaltar que a parte inicial desta hipótese não foi testada nesta tese. Testes *in vitro* e com inibidores específicos de topoisomerase são necessários para a confirmação dessa hipótese.

Uma vez que estes resultados foram obtidos, resolveu-se verificar se estes compostos teriam um efeito antitumoral *in vivo*. Para elucidar tal questão, foi utilizado um modelo de implante da linhagem C6 em cérebro de ratos, modelo este amplamente empregado na literatura (TAKANO *et al.*, 2001; MORRONE *et al.*, 2006; CHEKHONIN *et al.*, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Surpreendentemente, ao final de 10 dias de tratamentos i.p. com resveratrol 30 mg/kg e quercetina 50 mg/kg, o volume do tumor não foi alterado nesses grupos. O grupo tratado apenas com quercetina apresentou uma tendência a um aumento no volume tumoral (capítulo 3 – figura 1). Dessa forma, decidiu-se prolongar o tempo de tratamento para 15 dias. Dessa vez, o aumento do tamanho do tumor induzido pelo tratamento com quercetina foi considerado estatisticamente significativo, sendo os demais grupos iguais ao controle (capítulo 3 – figura 1).

É interessante ressaltar que os animais tratados concomitantemente com resveratrol e quercetina apresentaram um efeito similar ao tratamento com

resveratrol sozinho, não mostrando o aumento observado com a quercetina. Isso leva a crer que o resveratrol está inibindo a estimulação do crescimento tumoral mediado pela quercetina. Mas de que maneira isso estaria ocorrendo? Porque os dados *in vitro* não se repetiram *in vivo*? Levantaram-se então quatro hipóteses para explicar esse fenômeno: 1. Hipótese necrótica/angiogênica; 2. Modulação do sistema imunológico; 3. Estresse da cultura; 4. Concentração das drogas no cérebro.

A primeira hipótese é a de que a quercetina aumenta o volume tumoral por estimular a angiogênese. Nesse caso, o resveratrol bloqueia este estímulo, o que explica o efeito prevalente do resveratrol quando os dois tratamentos são combinados. Para formular essa hipótese, foram integrados dados da literatura com os resultados encontrados neste trabalho, que mostraram que o resveratrol diminuiu a necrose.

Na literatura, regiões de necrose e proliferação microvascular são características de tumores cerebrais malignos de alto grau (III e IV) e são associados a mau prognóstico (KLEIHUES *et al.*, 2000; LOUIS, 2006). Evidências sugerem um ciclo vicioso entre hipóxia, necrose, e angiogênese. Conforme o tumor cresce, a demanda energética aumenta. Essa demanda em geral não é suprimida, criando uma região de hipóxia, principalmente no centro do tumor. As células que adquirem certa resistência a essa condição conseguem migrar para a periferia do tumor e/ou para dentro do tecido sadio, criando uma região central altamente necrótica, e uma região perinecrótica (paliçada) de células tumorais densamente empacotadas. As células da paliçada liberam fatores angiogênicos como VEGF, aumentando a microproliferação vascular. Outra consequência da hipóxia é que esta pode levar a seleção clonal de células mais malignas, resistentes a apoptose e mutadas para p53 (revisado em LOUIS, 2006). Esta seleção de clones mais agressivos resulta em um maior aumento da demanda energética, que aumenta a região de hipóxia e necrose, criando assim o ciclo vicioso. Esta constante seleção de células mais resistentes a condição de hipóxia pode explicar, ao menos em parte, a grande variabilidade encontrada dentro destes tumores. Reforçando a hipótese de que o resveratrol diminui a necrose por diminuir a angiogênese (e assim revertendo o efeito da quercetina) estão trabalhos prévios, que demonstraram esta capacidade repressora angiogênica do resveratrol (HSIEH E WU, 1999; KIMURA E OKUDA, 2001; BRAKENHIELM *et al.*, 2001) inclusive num modelo de gliomas *in vivo* (TSENG *et al.*, 2004).

A segunda hipótese é a de que a quercetina causa imunossupressão nos animais e esta está sendo revertida pelo resveratrol. A imunodeficiência em pacientes com gliomas já foi demonstrada (WOOD E MORANTZ, 1982; 1983) e a diminuição dos infiltrados linfocitário no tumor são associados a mau prognóstico (PALMA *et al.*, 1978). Após a exposição à fitohemaglutinina e à concanavalina A das células T obtidas de cultura de baço dos animais com gliomas tratados com resveratrol e quercetina, observou-se que a proliferação das células T foi levemente menor em animais tratados com quercetina e maior nos animais tratados com a combinação de resveratrol e quercetina (capítulo 3 – figura 4), sugerindo que a quercetina isolada pode estar causando uma imunossupressão que é revertida pelo resveratrol.

Por outro lado, a infiltração linfocítica dentro do tumor foi reduzida pela combinação de resveratrol e quercetina e por resveratrol sozinho após 10 dias de tratamento e novamente pela combinação após 15 dias de tratamento (capítulo 3 – tabela 1). Se a hipótese anterior da diminuição da angiogênese pelo resveratrol for confirmada, ela pode ser responsável por essa diminuição na infiltração linfocitária. Juntamente, a diminuição da necrose observada pelo resveratrol pode estar diminuindo a liberação de fatores quimiotáticos que recrutam células do sistema imunológico para o tumor.

A terceira e a quarta hipóteses podem explicar porque o efeito antitumoral *in vitro* não se repetiu *in vivo*. A terceira hipótese baseia-se nas condições de estresse de cultivo celular. Quando células normais são cultivadas *in vitro*, elas entram em um estado de senescência após sofrerem algumas divisões (HAYFLICK, 1965). Linhagens celulares derivadas de tumores muitas vezes conseguem ultrapassar essa condição senescente, e proliferam continuamente até encontrarem um estímulo que as induza a entrar neste estado novamente (CAMPISI E DI FAGAGNA, 2007). Como neste trabalho atribuí-se o principal efeito antitumoral da combinação de resveratrol e quercetina à indução de senescência *in vitro*, este efeito pode estar sendo potencializado pelas condições de cultura, e uma vez que as células foram colocadas num ambiente *in vivo*, elas podem ter perdido a capacidade de entrar em senescência. A indução da senescência nos gliomas *in vivo* não foi medida, apenas observou-se que não houve diminuição do índice mitótico dos tumores, que pode ser um indício indireto de ausência de senescência. Assim como as demais hipóteses

formuladas anteriormente e sem comprovação experimental, fica como uma perspectiva de trabalho futuro.

A quarta hipótese seria a de que as concentrações de resveratrol e quercetina que atingiram o cérebro foram muito baixas. Como demonstrado na primeira figura do capítulo 2, doses menores do que 10  $\mu\text{M}$  de resveratrol e 25  $\mu\text{M}$  de quercetina tinham pouco efeito na indução de senescência *in vitro*. A concentração dessas drogas *in vivo* não foi medida, apenas utilizou-se dados da literatura que mostraram que, em roedores, o resveratrol e a quercetina podem atingir concentrações no cérebro entre 0,1 e 0,3  $\mu\text{mol/kg}$  respectivamente (ASENSI *et al.*, 2002; DE BOER *et al.*, 2005). Importante avaliar também que o crescimento dos gliomas dentro do cérebro pode alterar a barreira hematoencefálica, aumentando a sua permeabilidade, permitindo que uma dose maior seja alcançada dentro do tumor. Bertelli e col. (1996) encontraram um pico de >20 ng/mL no plasma de ratos após 1 h de administração de 28 mg/kg de resveratrol via oral. Assim, estimou-se que uma dose de 30 mg/kg poderia resultar em um pico de 20  $\mu\text{M}$ , que está próximo da dose capaz de inibir o crescimento tumoral *in vitro* e induzir senescência. Contudo, deve-se considerar que a dose que chega ao cérebro será muito menor. Assim, a ausência de efeito antitumoral do resveratrol *in vivo* pode ser devido a baixa concentração obtida no cérebro, insuficiente para inibir do crescimento tumoral.

O efeito antitumoral do resveratrol *in vivo* foi demonstrado em diversos estudos (revisado por BISHAYEE, 2009). Os diferentes resultados obtidos nesses trabalhos e no nosso podem ser explicados pelas diferentes variáveis utilizadas, tais como os modelos animais, a quantidade de células tumorais inoculadas, as características moleculares diversas de cada tumor e a quantidade de resveratrol utilizada no tratamento e a que atingiu determinado órgão em estudo. Diversos registros demonstrando os efeitos quimiopreventivo da quercetina têm sido publicados (revisado em MURAKAMI *et al.*, 2008). Todavia, Pamukcu e col. (1980) alimentaram ratos com uma dieta suplementada com 1 % de quercetina por 406 dias e ao final do experimento 80 % dos animais tratados desenvolveram tumores intestinais e 20 % desenvolveram tumor de bexiga. Nenhum tumor foi encontrado nos animais controle levantando a possibilidade de a quercetina ter algum papel pró-tumoral.

Apesar de não termos encontrado um efeito antitumoral *in vivo* do resveratrol e da quercetina ter causado um aumento do volume do tumor, não se pode descartar

essas moléculas como potenciais quimioterápicos, pois os resultados *in vitro* indicam um potencial antitumoral. Torna-se necessário uma melhor análise *in vivo*, alterando-se alguns parâmetros, como por exemplo dosagem, via de administração, tempo, quantidade de célula implantada, etc.

Como já mencionado na introdução desta tese, muitos pesquisadores estão tentando superexpressar o resveratrol em plantas (revisado em DELAUNOIS *et al.*, 2009) e a quercetina tem sido adicionada a diversos alimentos (List of Existing Food Additives (MHLW, 1996)), baseado nos estudos que mostraram efeitos benéficos à saúde em modelos *in vitro*, em animais e em estudos epidemiológicos associativos. O resveratrol e a quercetina podem ser encontrados em farmácias e são vendidos sem restrições. A facilidade em se adquirir esses compostos pode ser verificada num site de busca da internet bastante utilizado, como o GOOGLE. Ao colocar a palavra chave “comprar resveratrol” aparecem mais de 30 mil anúncios em português e 746 mil em inglês, com frases como estas: “Prolonga a vida”, “A nova marca antiidade e antirrugas”, “O Elixir da Juventude”. Já a busca por “comprar quercetina” resultou em 16 mil e 160 mil anúncios em português e inglês respectivamente, e a principal propaganda foi “Antioxidante”. É preciso ter muita cautela ao propor a utilização destes e outros compostos derivados de plantas como agentes terapêuticos, dado os resultados obtidos *in vivo*. Além disso, o fato de serem compostos naturais causa uma falsa sensação de segurança, os eximindo de qualquer efeito nocivo. Apesar disso, esses compostos ainda são bastante promissores, visto os resultados obtidos *in vitro* e os relatos da literatura (revisado em RUSSO, 2007) que apontam cada vez mais para a utilização da combinação de diversas substâncias, em baixas doses, similares às concentrações encontradas nos alimentos *in natura*.



## 4 CONCLUSÕES

### 4.1 Principais Resultados Encontrados:

- O resveratrol e a quercetina induziram diminuição do número de células de maneira tempo e dose dependente nas linhagens de glioma humano (U87 e U138), de camundongo (GL261), e de rato (C6), sendo a última a mais sensível;
- O resveratrol e a quercetina não causaram efeito tóxico em cultura primária de astrócitos;
- Resveratrol em altas doses (50  $\mu\text{M}$ ) induziu apoptose, necrose, diminuição do índice mitótico e parada no ciclo celular e quercetina (100  $\mu\text{M}$ ) induziu parada no ciclo celular;
- O cotratamento agudo de resveratrol (10  $\mu\text{M}$ ) e quercetina (25  $\mu\text{M}$ ) – 24 – 72 h - induziu diminuição do índice mitótico e levou a apoptose;
- O cotratamento crônico de resveratrol (10  $\mu\text{M}$ ) e quercetina (25  $\mu\text{M}$ ) – 12 dias – induziu senescência celular;
- O modelo *in vivo* nos mostrou que o resveratrol 30 mg/kg/dia, quercetina 50mg/kg/dia, e a combinação de ambos não foi capaz de reduzir o volume tumoral após 10 dias de tratamento. Além disso, a quercetina aumentou o volume desse após 15 dias de tratamento;
- O resveratrol teve um efeito prevalente quando combinado com a quercetina visto que este foi capaz de impedir o aumento do volume tumoral induzido pela quercetina.

### 4.2 Mecanismos Investigados Envolvidos nos Efeitos Observados Anteriormente:

- O cotratamento agudo de resveratrol (10  $\mu\text{M}$ ) e quercetina (25  $\mu\text{M}$ ) levou a inibição da fosforilação da AKT;
- O cotratamento agudo de resveratrol (10  $\mu\text{M}$ ) e quercetina (25  $\mu\text{M}$ ) – 24 h - induziu quebra dupla de DNA;
- O cotratamento crônico de resveratrol (10  $\mu\text{M}$ ) e quercetina (25  $\mu\text{M}$ ) induziu senescência celular dependente de p53;
- O resveratrol e a combinação das drogas reduziram a infiltração linfocitária nos tumores *in vivo*, principalmente após 15 dias de tratamento, bem com reduziram a incidência de necrose coagulativa neste período;
- A combinação de resveratrol e quercetina aumentou a proliferação de células T periféricas após estímulo com fitohemaglutinina e concanavalina A.

#### **4.3 Mecanismos Investigados Não Envolvidos na Indução de Senescência Mediada pelas Drogas:**

- Não houve alteração na fosforilação da proteína RB, nem no imunoconteúdo da p15 e p27;
- Não houve diferença na diminuição da morte celular ou indução da senescência ao associar o inibidor da p38 com o resveratrol e a quercetina;
- Não houve diferença na diminuição da morte celular ou indução da senescência ao associar o inibidor da ERK1/2 com o resveratrol e a quercetina;
- Não houve indução da senescência ao associar o inibidor da mTOR com os polifenóis.
- Não houve aumento na produção de ROS após tratamento com resveratrol e quercetina.

#### **4.4 Mecanismos Investigados que Não Foram Alterados no Modelo de Gliomas *In Vivo*:**

- Não houve alteração no índice mitótico dos tumores dos ratos tratados com resveratrol e quercetina;
- Não foi encontrado indício de lesão hepática nos ratos tratados com os polifenóis.

## 5 PERSPECTIVAS

### 5.1 Modelo *in vitro*

- Verificar por qual o mecanismo a combinação das drogas causa dano ao DNA, se por intercalação, inibição de topoisomerase, formação de adutos, entre outros;
- Verificar se o resveratrol e a quercetina estão modulando o sistema de reparo, analisando por *western blot* diversas proteínas envolvidas neste processo;

### 5.2 Modelo *in vivo*

- Verificar o efeito do tratamento *in vivo* com resveratrol em doses maiores (50 – 100 mg/kg) e implantando uma menor quantidade de células tumorais (por exemplo  $2 \times 10^5$ );
- Realizar pré-tratamento com resveratrol e quercetina pra investigar um potencial preventivo desses compostos.
- Analizar quanto chega de resveratrol e quercetina no cérebro por técnicas de HPLC;
- Tentar utilizar outras vias de administração do resveratrol e da quercetina, como por exemplo via oral.
- Verificar se o resveratrol e a quercetina estão induzindo apoptose *in vivo* com anticorpos anti-bax, caspase ativada, TUNEL;
- Verificar se o resveratrol e a quercetina estão induzindo senescência celular nos tumores;
- Verificar se o resveratrol está diminuindo a angiogênese utilizando imunohistoquímica para VEGF;
- Verificar se a quercetina esta aumentando o tamanho do tumor por induzir angiogênese tratando os animais com talidomida, um inibidor desse processo;

## 6 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.** v. 24, p. 2783-2840. 2004.
- AGNEZ-LIMA, L.F.; MEDEIROS, S.R.B.; MARQUES, R.CP.; PINHEIRO, M.M.; MENCK, C.F.M. Processos de reparo de DNA: garantindo a estabilidade do material genético. In: **Mutagênese Ambiental**. RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES E.K. Canoas, RS, BR: Editora da Ulbra. 2003. Cap. 3, p. 49-80.
- AGULLO, G.; GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; VIALA, C.; REMESY, C.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Biochem Pharmacol.** v. 53, n. 11, p. 1649-1657. 1997.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology of the Cell. In: **DNA Replication, Repair, and Recombination**. New York, USA: Garland Science. 2008. Cap. 5, p. 295-316.
- ALVA, A.S.; GULTEKIN, S.H.; BAEHRECKE, E.H. Autophagy in human tumors: cell survival or death? **Cell Death Differ.** v. 11, p. 1046-1048. 2004.
- ALVI, N.K.; RIZVI, R.Y.; HADI, S.M. Interaction of quercetin with DNA. **Biosci Rep.** v. 6, n. 10, p. 861-868. 1986.
- ANEKONDA, T.S. Resveratrol - a boon for treating Alzheimer's disease? **Brain Res Rev.** v. 52, n. 2, p. 316-326. 2006.
- ASENSI, M.; MEDINA, I.; ORTEGA, A.; CARRETERO, J.; BANO, M.C.; OBRADOR, E.; ESTRELA, J.M. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. **Free Radic Biol Med.** v. 33, p. 387-398. 2002.
- BAEHRECKE, E.H. Autophagy: dual roles in life and death? **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 6, p. 505-510. 2005.
- BAKKENIST, C.J.; KASTAN, M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. **Nature** v. 421, p. 499-506. 2003.
- BARNES, D.E.; LINDAHL, T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. **Annu Rev Genet.** v. 38, p.445-476. 2004.
- BAUR, J.A.; PEARSON, K.J.; PRICE, N.L.; JAMIESON, H.A.; LERIN, C.; KALRA, A.; PRABHU, V.V.; ALLARD, J.S.; LOPEZ-LLUCH, G.; LEWIS, K.; PISTELL, P.J.; POOSALA, S.; BECKER, K.G.; BOSS, O.; GWINN, D.; WANG, M.; RAMASWAMY, S.; FISHBEIN, K.; SPENCER, R.G.; LAKATTA, E.G.; LE COUTEUR, D.; SHAW, R.J.; NAVAS, P.; PUIGSERVER, P.; INGRAM, D.K.; DE CABO, R.; SINCLAIR, D.A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature.** v. 444, p. 337-342. 2006.
- BENDA, P.; LIGHTBODY, J.; SATO, G.; LEVINE, L.; SWEET, W. Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. **Science.** v. 161, p. 370-371. 1965.
- BEN-PORATH, I.; WEINBERG, R.A. The signals and pathways activating cellular senescence. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 37, p. 961-976. 2005.
- BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim Nova.** v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

- BERTELLI, A.A.; GIOVANNINI, L.; STRADI, R.; URIEN, S.; TILLEMENT, J.P.; BERTELLI, A. Kinetics of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats. **Int J Clin Pharmacol Res.** v. 16, p. 77-81. 1996.
- BISCHOFF, S.C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** v. 11, p. 733-740. 2008.
- BISHAYEE, A. Cancer Prevention and Treatment with Resveratrol: From Rodent Studies to Clinical Trials. **Cancer Prev Res.** v. 2, n. 5, p. 409-418. 2009.
- BOHNEN, N.I.; KURLAND, L.T. Brain tumor and exposure to pesticides in humans: A review of the epidemiologic data. **J Neurol Sci.** v. 132, p. 110-121. 1995.
- BOITEUX, S.; GUILLET, M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. **DNA Repair.** v. 3, n. 1, p. 1-12. 2004.
- BONNET, D.; DICK, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nat Med.** v. 3, p. 730-737. 1997.
- BOOCOCK, D.J.; FAUST, G.E.; PATEL, K.R.; SCHINAS, A.M.; BROWN, V.A.; DUCHARME, M.P.; BOOTH, T.D.; CROWELL, J.A.; PERLOFF, M.; GESCHER, A.J.; STEWARD, W.P.; BRENNER, D.E. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 16, p. 1246-1252. 2007.
- BOOTS, A.W.; HAENEN, G.R.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **Eur J Pharmacol.** v. 585, p. 325-337. 2008.
- BOYA, P.; ANDREAU, K.; PONCET, D.; ZAMZAMI, N.; PERFETTINI, J.L.; METIVIER, D.; OJCIUS, D.M.; JÄÄTTELÄ, M.; KROEMER, G. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. **J Exp Med.** v. 197, p. 1323-1334. 2003.
- BRADAMANTE, S.; BARENGHI, L.; VILLA, A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. **Cardiovasc Drug Rev.** v. 22, p. 169-188. 2004.
- BRAGANHOL, E.; ZAMIN, L.L.; CANEDO, A.D.; HORN, F.; TAMAJUSUKU, A.S.; WINK, M.R.; SALBEGO, C.; BATTASTINI, A.M. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. **Anticancer Drugs.** v. 17, n. 6, p. 663-671. 2006.
- BRAKENHIELM, E.; CAO, R.; CAO, Y. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. **FASEB J.** v. 15, p. 1798-1800. 2001.
- BREM, S.; ROZENTAL, J.M.; MOSKAL, J.R. What is the etiology of human brain tumors? A receptor on the first Lebow conference. **Cancer.** v. 76, p. 709-713. 1995.
- CAMPISI, J.; DI FAGAGNA, F.D. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 8, p. 729-740. 2007.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature.** v. 455, p. 1061-1068. 2008.
- CANTLEY, L.C.; NEEL, B.G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. **Proc Nat Acad Sci U S A.** v. 9, p. 4240-4245. 1999.
- CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; NICOLETTI, I.; ZAGNONI, I. Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. **J Agric Food Chem.** v. 51, p. 5226-5231. 2003.

- CARROLL, T.J.; TENEGGI, V.; JOBIN, M.; SQUASSANTE, L.; TREYER, V.; HANY, T.F.; BURGER, C.; WANG, L.; BYE, A.; VON SCHULTHESS, G.K.; BUCK, A. Absolute quantification of cerebral blood flow with magnetic resonance, reproducibility of the method, and comparison with H<sub>2</sub>(15)O positron emission tomography. **J Cereb Blood Flow Metab.** v. 22, n. 9, p.1149-1156. 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.** v. 61, p.1205-1215. 2001.
- CBTRUS. 2009-2010 **CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in Eighteen States in 2002-2006.** Published by the Central Brain Tumor Registry of the United States, Hinsdale, IL. Disponível em: <<http://www.cbtrus.org/2009EighteenStates/CBTRUSReport-2002-006.pdf>>. Acesso em: 23 de Jan. de 2010.
- CELESTE, A.; PETERSEN, S.; ROMANIENKO, P.J.; FERNANDEZ-CAPETILLO, O.; CHEN, H.T.; SEDELNIKOVA, O.A.; REINA-SAN-MARTIN, B.; COPPOLA, V.; MEFFRE, E.; DIFILIPPANTONIO, M.J.; REDON, C.; PILCH, D.R.; OLARU, A.; ECKHAUS, M.; CAMERINI-OTERO, R.D.; TESSAROLLO, L.; LIVAK, F.; MANOVA, K.; BONNER, W.M.; NUSSENZWEIG, M.C.; NUSSENZWEIG, A. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. **Science** v. 296, p. 922-927. 2002.
- CELL SIGNAL TECHNOLOGY. Disponível em <[www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)>. Acesso em: 20 de jan. de 2010.
- CHEKHONIN, V.P.; BAKLAUSHEV, V.P.; YUSUBALIEVA, G.M.; PAVLOV, K.A.; UKHOVA, O.V.; GURINA, O.I. Modeling and Immunohistochemical analysis of C6 glioma *In vivo*. **Cell Technol Biol Med.** v. 2, p. 501-509. 2007.
- CHEN, Q.; FISCHER, A.; REAGAN, J.D.; YAN, L.J.; AMES, B.N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 92, p. 4337-4341. 1995.
- CHEN, T.J.; JENG, J.Y.; LIN, C.W.; WU, C.Y.; CHEN, Y.C. Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. **Toxicology.** v. 223, p. 113-126. 2006.
- CHEN, Y.; TSENG, S.H.; LAI, H.S.; CHEN, W.J. Resveratrol-induced cellular apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma cells and antitumor effects on neuroblastoma in mice. **Surgery.** v. 136, n. 1, p. 57-66. 2004.
- CHEN, Y.C.; SHEN, S.C.; LEE, W.R.; HOU, W.C.; YANG, L.L.; LEE, T.J.F. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. **J Cel Biochem.** v. 82, p. 537-548. 2001.
- CHEN, W.Y.; WANG, D.H.; YEN, R.C.; LUO, J.; GU, W.; BAYLIN, S.B. Tumor Suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. **Cell.** v. 123, p. 437-448. 2005.
- CHENG, Y.; QIU, F.; YE, Y.C.; GUO, Z.M.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Autophagy inhibits reactive oxygen species-mediated apoptosis via activating p38-nuclear factor-kappa B survival pathways in oridonin-treated murine fibrosarcoma L929 cells. **FEBS J.** v. 276, p. 1291-1306. 2009.
- CHO, S.Y.; PARK, S.J.; KWON, M.J.; JEONG, T.S.; BOK, S.H.; CHOI, W.Y.; JEONG, W.I.; RYU, S.Y.; DO, S.H.; LEE, C.S.; SONG, J.C.; JEONG, K.S. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP

- kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. **Mol Cell Biochem.** v. 243, n. 1-2, p. 153-160. 2003.
- CHO, K.H.; PEZZUTO, J.M.; BOLTON, J.L.; STEELE, V.E.; KELLOFF, G.J.; LEE, S.K.; CONSTANTINOU, A. Selection of cancer chemopreventive agents based on inhibition of topoisomerase II activity. **Eur J Cancer.** v. 36, p. 2146-2156. 2000.
- CHOI, C.; BENVENISTE, E.N. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. **Brain Res Rev.** v. 44, p. 65-81. 2004.
- CHRISTMANN, M.; TOMICIC, M.T.; ROOS, W.P.; KAINA, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology** v. 193, p. 3-34. 2003.
- COLLADO, M.; BLASCO, M.A.; SERRANO, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. **Cell** v. 130, p. 223-233. 2007.
- COLLADO, M.; SERRANO, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. **Nature Rev Cancer.** v. 10, p. 51-57. 2010.
- CONSTANTINOU, A.; MEHTA, R.; RUNYAN, C.; RAO, K.; VAUGHAN, A.; MOON, R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. **J Nat Prod.** v. 58, p. 217-225. 1995.
- CREASY, L.L.; COFFEE, M. Phytoalexin production potential of grape berries. **J Am Soc Hortic Sci.** v. 113, p. 230-234. 1988.
- CROWELL, J.A.; KORYTKO, P.J.; MORRISSEY, R.L.; BOOTH, T.D.; LEVINE, B.S. Resveratrol-associated renal toxicity. **Toxicol Sci.** v. 82, p. 614-619. 2004.
- D'ADDA DI FAGAGNA, F.; TEO, S.H.; JACKSON, S.P. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. **Genes Dev.** v. 18, p. 1781-1799. 2004.
- DE BOER, V.C.J.; DIHAL, A.A.; VAN DER WOUDE, H.; ARTS, I.C.W.; WOLFFRAM, S.; ALINK, G.M.; RIETJENS, I.M.C.M.; KEIJER, J.; HOLLMAN, P.C.H. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs, **J Nutr.** v. 135, p. 1718-1725. 2005.
- DEBNATH, J.; BAEHRECKE, E.H.; KROEMER, G. Does autophagy contribute to cell death? **Autophagy.** v. 1, p. 66-74. 2005.
- DELAUNOIS, B.; CORDELIER, S.; CONREUX, A.; CLÉMENT, C.; JEANDET, P. Molecular engineering of resveratrol in plants. **Plant Biotechnol J.** v. 7, n. 1, p. 2-12. 2009.
- DENECKER, G.; VERCAMMEN, D.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. **Cell Mol Life Sci.** v. 58, p. 356-370. 2001.
- DE OLIVEIRA, M.S.; CECHIM, G.; BRAGANHOL, E.; SANTOS, D.G.; MEURER, L.; DE CASTRO JR, C.G.; BRUNETTO, A.L.; SCHWARSTMANN, G.; BATTASTINI, A.M.O.; LENZ, G.; ROESLER, R. Anti-proliferative effect of the gastrin-release peptide receptor antagonist RC-3095 plus temozolomide in experimental glioblastoma models. **J Neurooncol.** v. 93, p. 191-201. 2009.
- DIETRICH, N.; THASTRUP, J.; HOLMBERG, C.; GYRD-HANSEN, M.; FEHRENBACHER, N.; LADEMANN, U.; LERDRUP, M.; HERDEGEN, T.; JÄÄTTELÄ, M.; KALLUNKI, T. JNK2 mediates TNF-induced cell death in mouse embryonic fibroblasts via regulation of both caspase and cathepsin protease pathways. **Cell Death Differ.** v. 11, p. 301-313. 2004.
- DI LEONARDO, A.; LINKE, S.P.; CLARKIN, K.; WAHL, G.M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. **Genes Dev.** v. 8, p. 2540-2551. 1994.

- DIMRI, G.P.; ITAHANA, K.; ACOSTA, M.; CAMPISI, J. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14/ARF tumor suppressor. **Mol Cell Biol.** v. 20, p. 273-285. 2000.
- DIZDAROGLU, M. Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. **Mutat Res.** v. 591, n. 1-2, p. 45-59. 2005.
- DIZDAROGLU, M.; KIRKALI, G.; JARUGA, P. Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. **Free Radic Biol Med.** v. 45, n. 12, p. 1610-1621. 2008.
- DUDÁSOVÁ, Z.; DUDÁS, A.; CHOVANEC, M. Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Rev.** v. 28, n. 5, p. 581-601. 2004.
- DUERR, E.M.; ROLLBROCKER, B.; HAYASHI, Y.; PETERS, N.; MEYER-PUTTLITZ, B.; LOUIS, D.N.; SCHRAMM, J.; WIESTLER, O.D.; PARSONS, R.; ENG, C.; VON DEIMLING, A. PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. **Oncogene.** v.16, p. 2259-2264. 1998.
- EDWARDS, R.L.; LYON, T.; LITWIN, S.E.; RABOVSKY, A.; SYMONS, J.D.; JALILI, T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. **J Nutr.** v. 137, p. 2405-2411. 2007.
- EISEN, J.A.; HANAWALT, P.C. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and process. **Mutat Res.** v. 435, n. 3, p. 171-213. 1999.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol.** v. 35, n. 4, p. 495-516. 2007.
- ESHLEMAN, J.S.; CARLSON, B.L.; MLADEK, A.C.; KASTNER, B.D.; SHIDE, K.L.; SARKARIA, J.N. Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 xenografts to fractionated radiation therapy. **Cancer Res.** v. 62, p. 7291-7297. 2002.
- EVANS, M.D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M.S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutat Res.** v. 567, n. 1, p.1-61. 2004.
- FALNES, P.O.; JOHANSEN, R.F.; SEEBERG, E. AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. **Nature.** v. 419, p. 178-182. 2002.
- FANG, X.K.; GAO, J.; ZHU, D.N. Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. **Life Sci.** v. 82, p. 615-622. 2008.
- FERRI, K.F.; KROEMER, G. Mitochondria – the suicide organelles. **Bioessays.** v. 23, p. 111-115. 2001.
- FERRY, D.R.; SMITH, A.; MALKHANDI, J.; FYFE, D.W.; DETAKATS, P.G.; ANDERSON, D.; BAKER, J.; KERR, D.J. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition. **Clin Cancer Res.** v. 2, p. 659-668. 1996.
- FIERS, W.; BEYAERT, R.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. **Oncogene.** v. 18, p. 7719-7730. 1999.
- FILIPPI-CHIELA, E.C.; ZAMIN, L.L.; LENZ, G. Autophagy interplay with apoptosis and the cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of Resveratrol in glioma cells. Manuscrito submetido à revista European Journal of Cell Biology em 20 de março de 2010.
- FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Fd Chem. Toxic.** v. 33, n. 12, p. 1061-1080. 1995.



- FORMIGLI, L.; PAPUCCI, L.; TANI, A.; SCHIAVONE, N.; TEMPESTINI, A.; ORLANDINI, G.E.; CAPACCIOLI, S.; ORLANDINI, S.Z. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. **J Cell Physiol**. v. 182, p. 41-49. 2000.
- FRIEDBERG, E.C. A brief history of the DNA repair field. **Cell Res**. v. 18, p. 3-7. 2008.
- FRIEDBERG, E.C. DNA damage and repair. **Nature**. v. 421, n. 6921, p. 436-440. 2003.
- FUEYO, J.; GOMEZ MANZANO, C.; YUNG, W.K.; CLAYMAN, G.L.; LIU, T.J.; BRUNER, J.; LEVIN, V.A.; KYRITSIS, A.P. Adenovirus-mediated p16/CDKN2 gene transfer induces growth arrest and modifies the transformed phenotype of glioma cells. **Oncogene**. v. 12, p. 103-110. 1996.
- FUKUHARA, K.; MIYATA, N. Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent. **Bioorg Med Chem Lett** v. 8, p. 3187-3192. 1998.
- FURNARI, F.B.; FENTON, T.; BACHOO, R.M.; MUKASA, A.; STOMMEL, J.M.; STEGH, A.; HAHN, W.C.; LIGON, K.L.; LOUIS, D.N.; BRENNAN, C.; CHIN, L.; DEPINHO, R.A.; CAVENEE W.K. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev**. v. 21, p. 2683-2710. 2007.
- GALLUZZI, L.; MAIURI, M.C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ**. v. 14, p. 1237-1243. 2007.
- GATZ, S.A.; WIESMULLER, L. Take a break—resveratrol in action on DNA **Carcinogenesis**. v. 29, n. 2, p. 321-332. 2008.
- GILL, E.E.; FAST, N.M. Stripped-down DNA repair in a highly reduced parasite. **BMC Mol Biol**. v. 8, n. 24, p. 1-14. 2007.
- GLIADEL. Disponível em <<http://www.gliadel.com/>>. Acesso em: 23 de jan. de 2010.
- GOOGLE. Disponível em <[www.google.com.br](http://www.google.com.br)>. Acesso em 24 de mar. de 2010 com as palavras chaves comprar resveratrol (buy resveratrol) e comprar quercetina (buy quercetina).
- GROBBEN, B.; DE DEYN, P.P.; SLEGERS, H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. **Cell Tissue Res**. v. 310, p. 257-270. 2002.
- HACKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell Tissue Res**. v. 301, p. 5-17. 2000.
- HAGIWARA, M.; INOUE, S.; TANAKA, T.; NUNOKI, K.; ITO, M.; HIDAKA, H. Differential effects of flavonoids as inhibitors of tyrosine protein kinases and serine/threonine protein kinases. **Biochem Pharmacol**. v. 37, n. 15, 2987-2992. 1988.
- HARBORNE, J.B. Flavonoids in the environment: structure activity relationships. **Prog Clin Biol Res**. v. 280, p. 17-27. 1988.
- HARBORNE, J.B. Nature, distribution and function of plant flavonoids. **Prog Clin Biol Res**. v. 213, p. 15-24. 1986.
- HARIKUMAR, K.B.; AGGARWAL, B.B. Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. **Cell Cycle**. v. 7, n. 8, p. 1020-1035. 2008.
- HARRISON, J.C.; HABER, J.E. Surviving the Breakup: The DNA damage checkpoint. **Annu Rev Genet**. v. 40, p. 209-235. 2006.
- HARTLEY, K.O.; GELL, D.; SMITH, G.C.; ZHANG, H.; DIVECHA, N.; CONNELLY, M.A.; ADMON, A.; LEES-MILLER, S.P.; ANDERSON, C.W.; JACKSON, S.P. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. **Cell**. v. 82, p. 849-856. 1995.

- HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; BORZELLECA, J.F.; FLAMM, G.W. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food Chem Toxicol.** v. 45, p. 2179-2205. 2007.
- HAYFLICK, L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. **Exp Cell Res.** v. 37, p. 614-636. 1965.
- HEDIN, P.A.; WANGEA, S.K. Roles of flavonoids in plant resistance to insects. **Prog Clin Biol Res.** v. 213, p. 87-100. 1986.
- 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.** v. 282, n. 37, p. 26759-26766. 2007.
- HELMBOLD, H.; DEPERT, W.; BOHN, W. Regulation of cellular senescence by Rb2/p130. **Oncogene.** v. 25, p. 5257-5262. 2006.
- HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **J Agric Food Chem.** v. 40, p. 2379-2383. 1992.
- HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VAN DE PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. **J Agric Food Chem.** v. 41, p. 1242-1246. 1993.
- HIROSE, Y.; BERGER, M.S.; PIEPE, R.S. p53 Effects Both the Duration of G2/M Arrest and the Fate of Temozolomide-treated Human Glioblastoma Cells. **Cancer Res.** v. 61, p. 1957-1963, 2001.
- HOEIJMAKERS, J.H. Nucleotide excision repair I: from E.Coli to yeast. **Trends Genet.** v. 9, n. 5, p. 173-177. 1993a.
- HOEIJMAKERS, J.H. Nucleotide excision repair I: from yeast to mammals. **Trends Genet.** v. 9, n. 6, p. 211-217. 1993b.
- HOLLAND, E.C. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. **Nature Rev Gen.** v. 2, p. 120-129. 2001a.
- HOLLAND, E.C. Progenitor cells and glioma formation. **Curr Opin Neurol.** v. 14, n. 6, p. 683-688. 2001b.
- HOWITZ, K.T.; BITTERMAN, K.J.; COHEN, H.Y.; LAMMING, D.W.; LAVU, S.; WOOD, J.G.; ZIPKIN, R.E.; CHUNG, P.; KISIELEWSKI, A.; ZHANG, L.L.; SCHERER, B.; SINCLAIR, D.A. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature.** v. 425, p. 191-196. 2003.
- HSIEH, T.C.; WU, J.M. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. **Exp Cell Res.** v. 249, p. 109-115. 1999.
- IANZINI, F.; MACKEY, M.A. Spontaneous premature chromosome condensation and mitotic catastrophe following irradiation of HeLa S3 cells. **Int J Radiat Biol.** v. 72, p. 409-421. 1997.
- INSKIP, P.D.; LINET, M.S.; HEINEMAN, E.F. Etiology of brain tumors in adults. **Epidemiol Rev.** v. 17, p. 382-414, 1995.
- ISHII, N.; MAIER, D.; MERLO, A.; TADA, M.; SAWAMURA, Y.; DISERENS, A.C.; VAN MEIR, E.G. Frequent co-alterations of TP53, p16/ CDKN2A, p14<sup>ARF</sup>, PTEN Tumor suppressor Genes in Human Glioma Cell lines. **Brain Pathol.** v. 9, p. 469-479. 1999.
- ITAHANA, K.; CAMPISI, J.; DIMRI, G.P. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. **Methods Mol Biol.** v. 371, p. 21-31. 2007.

- ITO, H.; DAIDO, S.; KANZAWA, T.; KONDO, S.; KONDO, Y. Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. **Int J Oncol**. v. 26, p. 1401-1410. 2005.
- JACKSON, S.P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. **Carcinogenesis**. v. 23, n. 5, p. 687-696. 2002.
- JANG, J.H.; SURH, Y.J. Protective effect of resveratrol on  $\beta$ -amyloid-induced oxidative PC12 cell death. **Free Radical Bio Med**. v. 34, n. 8, p. 1100-1110. 2003.
- JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G.O.; SLOWING, K.V.; THOMAS, C.F.; BEECHER, C.W.W.; FONG, H.H.S.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; MEHTA, R.G.; MOON, R.C.; PEZZUTO, J.M. Cancer chemopreventative activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**. v. 275, p. 218-220. 1997.
- JEANDET, P.; DOUILLET-BREUIL, A.C.; BESSIS, R.; DEBORD, S.; SBAGHI, M.; ADRIAN, M. Phytoalexins from the vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. **J Agric Food Chem**. v. 50, p. 2731-2741. 2002.
- JEONG, J.; JUHN, K.; LEE, H.; KIM, S.H.; MIN, B.H.; LEE, K.M.; CHO, M.H.; PARK, G.H.; LEE, K.H. SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. **Exp Mol Med**. v. 39, p. 8-13. 2007.
- JIANG, H.; SHANG, X.; WU, H.; GAUTAM, S.C.; AL-HOLOU, S.; LI, C.; KUO, J.; ZHANG, L.; CHOPP, M. Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. **J Exp Ther Oncol**. v. 8, n. 1, p. 25-33. 2009.
- JIANG, H.; ZHANG, L.; KUO, J.; KUO, K.; GAUTAM, S.C.; GROG, L.; RODRIGUEZ, A.I.; KOUBI, D.; HUNTER, T.J.; CORCORAN, G.B.; SEIDMAN, M.D.; LEVINE, R.A. Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. **Mol Cancer Ther**. v. 4, p. 554-561. 2005.
- JIN, F.; WU, Q.; LU, Y.F.; GONG, Q.H.; SHI, J.S. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA induced Parkinson's disease in rats. **Eur J Pharmacol**. v. 600, p. 78-82. 2008.
- JINNO-OUE, A.; SHIMIZU, N.; HAMADA, N.; WADA, S.; TANAKA, A.; SHINAGAWA, M.; OHTSUKI, T.; MORI, T.; SAHA, M.N.; HOQUE, A.S.; ISLAM, S.; KOGURE, K.; FUNAYAMA, T.; KOBAYASHI, Y.; HOSHINO, H. Irradiation with carbon ion beams induces apoptosis, autophagy, and cellular senescence in a human glioma-derived cell line. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. v. 76, n. 1, p. 229-241. 2010.
- JO, J.Y.; GONZALEZ DE MEJIA, E.; LILA, M.A. Effects of grape cell culture extracts on human topoisomerase II catalytic activity and characterization of active fractions. **J Agric Food Chem**. v. 53, p. 2489-2498. 2005.
- KAINA, B.; CHRISTMANN, M. DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs. **Int J Clin Pharmacol Ther**. v. 40, n. 8, p. 354-367. 2002.
- KAMIJO, T.; WEBER, J.D.; ZAMBETTI, G.; ZINDY, F.; ROUSSEL, M.F.; SHERR, C. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 95, p. 8292-8297. 1998.
- KANZAWA, T.; GERMANO, I.M.; KOMATA, T.; ITO, H.; KONDO, Y.; KONDO, S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. **Cell Death Differ**. v. 11, p. 448-457. 2004.

- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** v. 26, p.239-257. 1972.
- KIESEWITTER, H.; KOSCIELNY, J.; KALUS, U.; VIX, J.M.; PEIL, H.; PETRINI, O.; VAN TOOR, B.S.J.; DE MEY, C. Efficacy of orally administered extract of red vine leaf AS 195 (folia *Vitis viniferae*) in chronic venous insufficiency (Stages I-II). **Arzneimittelforschung**. v. 50, p. 109-117. 2000.
- KIM, E.J.; CHOI, C.H.; PARK, J.Y.; KANG, S.K.; KIM, Y.K. Underlying mechanism of quercetin-induced cell death in human glioma cells. **Neurochem Res**. v. 33, n. 6, p. 971-979. 2008.
- KIMURA, Y.; OKUDA, H. Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. **J Nutr**. v. 131, p. 1844-1849. 2001.
- KLEIHUES, P.; BURGER, P.C.; ALDAPE, K.D.; et al. Glioblastoma. In: LOUIS, D.N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.D.; CAVENEE, W.K. eds. **WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System**. IARC Press, Lyon, France. 2007. p. 33-49.
- KLEIHUES, P.; BURGER, P.C.; COLLINS, V.P.; NEWCOMB, E.W.; OHGAKI, H.; CAVENEE, W.K. Pathology and genetics of tumours of the central nervous system. In: KLEIHUES, P.; CAVENEE, W.K. editors. **WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System**. IARC Press, Lyon, France. 2000. p. 6-69.
- KOPP, P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox? **Eur J Endocrinol**. v. 138, p. 619-620. 1998.
- KROEMER, G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 304, p. 433-435. 2003.
- KUC, J. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. **Annu Rev Phytopathol**. v. 33, p. 275-297. 1995.
- KUNDU, J.K.; SURH, Y.J. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. **Cancer Lett**. v. 269, p. 243-261. 2008.
- KUO, P.C.; LIU, H.F.; CHAO, J.I. Survivin and p53 modulate quercetin-induced cell growth inhibition and apoptosis in human lung carcinoma cells, **J Biol Chem**. v. 279, n. 53, p. 55875-55885. 2004.
- KURATSU, J.; TAKESHIMA, H.; USHIO, Y. Trends in the incidence of primary intracranial tumors in Kumamoto, Japan. **Int J Clin Oncol**. v. 6, p. 183-191. 2001.
- KUROSAKA, K.; TAKAHASHI, M.; WATANABE, N.; KOBAYASHI, Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. **J Immunol**. v. 171, p. 4672-4679. 2003.
- KURZ, T.; TERMAN, A.; BRUNK, U.T. Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. **Arch Biochem Biophys**. v. 462, p. 220-230. 2007.
- LANGCAKE, P.; PRYCE, R.J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury, **Physiol Plant Pathol**. v. 9, p. 77-86. 1976.
- LEDUR, P.F. **Expressão de genes envolvidos na regulação da apoptose em gliomas**. 2006. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências

- Biológicas). Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- LEE, I.H.; CAO, L.; MOSTOSLAVSKY, R.; LOMBARD, D.B.; LIU, J.; BRUNS, N.E.; TSOKOS, M.; ALT, F.W.; FINKEL, T. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 105, n. 9, p. 3374-3379. 2008a.
- LEE, J.H.; PAULL, T.T. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. **Science**. v. 308, p. 551-554. 2005.
- LEE, K.W.; KANG, N.J.; HEO, Y.S.; ROGOZIN, E.A.; PUGLIESE, A.; HWANG, M.K.; BOWDEN, G.T.; BODE, A.M.; LEE, H.J.; DONG, Z. Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine. **Cancer Res**. v. 68, p. 946-955. 2008b.
- LEFRANC, F.; KISS, R. Autophagy, the Trojan horse to combat glioblastomas. **Neurosurg Focus**. v. 20, n. 3E7, p.1-6. 2006.
- LEGLER, J.M.; RIES, L.A.; SMITH, M.A.; WARREN, J.L.; HEINEMAN, E.F.; KAPLAN, R.S.; LINET, M.S. Brain and other central nervous system cancers: Recent trends in incidence and mortality. **J Natl Cancer Inst**. v. 91, p. 1382-1390. 1999.
- LEIST, M.; SINGLE, B.; CASTOLDI, A.F.; KUHNLE, S.; NICOTERA, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **J Exp Med**. v. 185, p. 1481-1486. 1997.
- LEVINE, B.; YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? **J Clin Invest**. v. 115, p. 2679-2688. 2005.
- LI, J.; QIN, Z.; LIANG, Z. The prosurvival role of autophagy in Resveratrol-induced cytotoxicity in human U251 glioma cells. **BMC Cancer**. v. 9, p. 215. 2009.
- LIN, A.W.; BARRADAS, M.; STONE, J.C.; VAN AELST, L.; SERRANO, M.; LOWE, S.W. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. **Genes Dev**. v. 12, p. 3008-3019. 1998.
- LIN, C.W.; HOU, W.C.; SHEN, S.C.; JUAN, S.H.; KO, C.H.; WANG, L.M.; CHEN, Y.C. Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKCd/ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells. **Carcinogenesis**. v. 29, n. 9, p.1807-1815. 2008.
- LOIS, C.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 90, p. 2074-2077. 1993.
- LOKE, W.M.; PROUDFOOT, J.M.; MCKINLEY, A.J.; NEEDS, P.W.; KROON, P.A.; HODGSON, J.M.; CROFT, K.D. Quercetin and its *in vivo* metabolites inhibit neutrophil-mediated low-density lipoprotein oxidation. **J Agric Food Chem**. v. 56, p. 3609-3615. 2008.
- LOUIS, D.N. Molecular pathology of malignant gliomas. **Annu Rev Pathol Mech Dis**. v. 1, p. 97-117. 2006.
- LOUIS, D.N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.D.; CAVENEE, W.K.; BURGER, P.C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B.W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol**. v. 114, p. 97-109. 2007.
- LOZOYA, X.; REYES-MORALES, H.; CHAVEZ-SOTO, M.A.; MARTINEZ-GARCIA MDEL, C.; SOTO-GONZALEZ, Y.; DOUBOVA, S.V. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. **J Ethnopharmacol**. v. 83, p. 19-24. 2002.

- MACKEY, M.A.; MORGAN, W.F.; DEWEY, W.C. Nuclear fragmentation and premature chromosome condensation induced by heat shock in S-phase Chinese hamster ovary cells. **Cancer Res.** v. 48, p. 6478-6483. 1988.
- MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Am J Pathol.** v. 146, p. 3-15. 1995.
- MARAMBAUD, P.; ZHAO, H.; DAVIES, P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. **J Biol Chem.** v. 280, p. 37377-37382. 2005.
- MARTINO, J.C.; GREEN, D.R. Breaking the mitochondrial barrier. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 2, p. 63-67. 2001.
- MEMISOGLU, A.; SAMSON, L. Contribution of base excision repair, nucleotide excision repair, and DNA recombination to alkylation resistance of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **J Bacteriol.** v. 182, n. 8, p. 2104-2112. 2000.
- MHLW, 1996. List of Existing Food Additives. Ministry of Health, Labour, and Welfare (MHW), Japan. Disponível em <<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/list-exst.add>>. Acesso em 20 de fev. de 2010.
- MICHALOGLU, C.; VREDEVELD, L.C.; SOENGAS, M.S.; DENOYELLE, C.; KUILMAN, T.; VAN DER HORST, C.M.; MAJOUR, D.M.; SHAY, J.W.; MOOI, W.J.; PEEPER, D.S. BRAF<sup>E600</sup>-associated senescence-like cell cycle arrest of human nevi. **Nature.** v. 436, p. 720-724. 2005.
- MICHELS, G.; WÄTJEN, W.; WEBER, N.; NIERING, P.; CHOVOLOU, Y.; KAMPKÖTTER, A.; PROKSCH, P.; KAHL, R. Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells. **Toxicology.** v. 225, p. 173-182. 2006.
- MIRACCO, C.; COSCI, E.; OLIVERI, G.; LUZI, P.; PACENTI, L.; MONCIATTI, I.; MANNUCCI, S.; DE NISI, M.C.; TOSCANO, M.; MALAGNINO, V.; FALZARANO, S.M.; PIRTOLI, L.; TOSI, P. Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. **Int J Oncol.** v. 30, p. 429-436. 2007.
- MONTEIRO, G.T.R.; KOIFMAN, F. Mortalidade por tumores de cérebro no Brasil, 1980-1998. **Caderno de Saúde Pública.** v. 19, n. 4, p. 1139-1151. 2003.
- MOON, Y.J.; WANG, L.; DICENZO, R.; MORRIS, M.E. Quercetin pharmacokinetics in humans. **Biopharm Drug Dispos.** v. 29, p. 205-217. 2008.
- MORRONE, F.B.; OLIVEIRA, D.L.; GAMERMANN, P.; STELLA, J.; WOFCHUK, S.; WINK, M.R.; MEURER, L.; EDELWEISS, M.I.A.; LENZ, G.; BATTASTINI, A.M.O. *In vivo* glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model **BMC Cancer.** v. 6, p. 226-236. 2006.
- 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.** v. 98, p. 761-769. 2002.
- MUNRO, J.; BARR, N.I.; IRELAND, H.; MORRISON, V.; PARKINSON, E.K. Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. **Exp Cell Res.** v. 295, p. 525-538. 2004.
- MURAKAMI, A.; ASHIDA, H.; TERAOKA, J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. **Cancer Lett.** v. 269, p. 315-325. 2008.

- NAKAMURA, M.; WATANABE, T.; KLANGBY, U.; ASKER, C.; WIMAN, K.; YONEKAWA, Y.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. p14<sup>ARF</sup> deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. **Brain Pathol.** v. 11, p. 159-168. 2001.
- NOGUEIRA, V.; PARK, Y.; CHEN, C.C.; XU, P.Z.; CHEN, M.L.; TONIC, I.; UNTERMAN, T.; HAY, N. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. **Cancer Cell.** v. 14, p. 458-470. 2009.
- NONOMURA, S.; KANAGAWA, H.; MAKIMOTO, A. Chemical constituents of polygonaceous plants. In: Studies on the components of Ko-jo-kon (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.). **Yakugaku Zasshi.** v. 83, p. 988-990. 1963.
- OHGAKI, H.; DESSEN, P.; JOURDE, B.; HORSTMANN, S.; NISHIKAWA, T.; DI PATRE, P.; BURKHARD, C.; SCHULER, D.; PROBST-HENSCH, N.M.; MAIORKA, P.C.; BAEZA, N.; PISANI, P.; YONEKAWA, Y.; YASARGIL, M.G.; LUTOLF, U.M.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Res.** v. 64, p. 6892-6899. 2004.
- OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. **J Neuropathol Exp Neurol.** v. 64, p. 479-489. 2005.
- ONO, K.; NAKANE, H. Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. **J Biochem.** v. 108, n. 4, p. 609-613. 1990.
- PACHOLEC, M.; BLEASDALE, J.E.; CHRUNYK, B.; CUNNINGHAM, D.; FLYNN, D.; GAROFALO, R.S.; GRIFFITH, D.; GRIFFOR, M.; LOULAKIS, P.; PABST, B.; QIU, X.; STOCKMAN, B.; THANABAL, V.; VARGHESE, A.; WARD, J.; WITHKA, J.; AHN, K. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. **J Biol Chem.** v. 285, n. 11, p. 8340-8351. 2010.
- PALMA, L.; LORENZO, N.D.; GUIDETTI, B. Lymphocytic infiltrates in primary glioblastomas and recidivous gliomas Incidence, fate, and relevance to prognosis in 228 operated cases. **J Neurosurg.** v. 49, n. 6, p. 854-861. 1978.
- PAMUKCU, A.M.; YALCINER, S.; HATCHER, J.F.; BRYAN, G.T. Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **Cancer Res.** v. 40, p. 3468-3472. 1980.
- PAN, T.; JANKOVIC, J.; LE, W. Potential therapeutic properties of green tea polyphenols in Parkinson's disease. **Drugs Aging.** v. 20, n. 10, p. 711-721. 2003.
- PAPAIT, R.; MAGRASSI, L.; RIGAMONTI, D.; CATTANEO, E. Temozolomide and carmustine cause large-scale heterochromatin reorganization in glioma cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 379, p. 434-439. 2009.
- PARDAL, R.; CLARKE, M.; MORRISON, S. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. **Nat Rev Cancer.** v. 3, p. 895-902. 2003.
- PARK, H.J.; YANG, J.Y.; AMBATI, S.; DELLA-FERA, M.A.; HAUSMAN, D.B.; RAYALAM, S.; BAILE, C.A. Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. **J Med Food.** v. 11, n. 4, p. 773-783. 2008.
- PDRNS. Quercetin. In: **Physicians' Desk Reference For Nutritional Supplements.** 1 ed. Physicians' Desk Reference (PDR), Demoines, Iowa/Medical Economics Data Production Company, Montvale, New Jersey. 2001. p. 390-392.
- POMERANTZ, J.; SCHREIBER-AGUS, N.; LIEGEOIS, N.J.; SILVERMAN, A.; ALLAND, L.; CHIN, L.; POTES, J.; CHEN, K.; ORLOW, I.; LEE, H.W.; CORDON-CARDO, C.; DEPINHO, R.A. The Ink4a tumor suppressor gene

- product, p19<sup>Arf</sup>, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. **Cell**. v. 92, p. 713-723. 1998.
- POST, S.; WENG, Y.C.; CIMPRICH, K.; CHEN, L.B.; XU, Y.; LEE, E.Y. Phosphorylation of serines 635 and 645 of human Rad17 is cell cycle regulated and is required for G(1)/S checkpoint activation in response to DNA damage. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 98, p. 13102-13107. 2001.
- PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Nucleotide excision repair in yeast. **Mutat Res**. v. 451, n. 1-2, p. 13-24. 2000.
- PRESTON-MARTIN, S. Epidemiology of primary CNS neoplasms. **Neurol Clin**. v. 14, p. 273-290. 1996.
- PYTEL, P.; LUKAS, R.V. Update on diagnostic practice: tumors of the nervous system. **Arch Pathol Lab Med**. v. 133, p. 1062-1077. 2009.
- RANELLETTI, F.O.; MAGGIANO, N.; SERRA, F.G.; RICCI, R.; LAROCCA, L.M.; LANZA, P.; SCAMBIA, G.; FATTOROSSO, A.; CAPELLI, A.; PIANTELLI, M. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. **Int J Cancer**. v. 85, p. 438-445. 2000.
- REDON, C.; PILCH, D.; ROGAKOU, E.; SEDELNIKOVA, O.; NEWROCK, K.; BONNER, W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. **Curr Opin Genet Dev**. v. 12, p. 162-169. 2002.
- REIFENBERGER, G.; LIU, L.; ICHIMURA, K.; SCHMIDT, E.E.; COLLINS, V.P. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. **Cancer Res**. v. 53, p. 2736-2739. 1993.
- RENAUD, S.C.; GUEGUEN, R.; SCHENKER, J.; D'HOUTAUD, A. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. **Epidemiology**. v. 9, p. 184-188. 1998.
- REYNOLDS, B.A.; WEISS, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science**. v. 255, p. 1707-1710. 1992.
- RIVERA, L.; MORON, R.; SANCHEZ, M.; ZARZUELO, A.; GALISTEO, M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. **Obesity**. v. 16, p. 2081-2087. 2008.
- ROBINSON, D.R.; WU, Y.M.; LIN, S.F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. **Oncogene**. v. 19, p. 5548-5555. 2000.
- ROGAKOU, E.P.; PILCH, D.R.; ORR, A.H.; IVANOVA, V.S.; BONNER, W.M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. **J Biol Chem**. v. 273, p. 5858-5868. 1998.
- RONINSON, I.B. Tumor cell senescence in cancer treatment. **Cancer Res**. v. 63, p. 2705-2715. 2003.
- RUSIN, M.; ZAJKOWICZ, A.; BUTKIEWICZ, D. Resveratrol induces senescence-like growth inhibition of U-2 OS cells associated with the instability of telomeric DNA and upregulation of BRCA1. **Mech Ageing Dev**. v. 130, n. 8, p. 528-537. 2009.
- RUSSO, G.L. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. **Biochem Pharmacol**. v. 74, p. 533-544. 2007.
- SATHORNSUMETEE, S.; RICH, J.N. Designer therapies for glioblastoma multiforme. **Ann NY Acad Sci**. v. 1142, p. 108-132. 2008.
- SATHORNSUMETEE, S.; RICH, J.N.; REARDON, D.A. Diagnosis and treatment of highgrade astrocytoma. **Neurol Clin**. v. 25, p. 1111-1139. 2007.
- SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**. v. 407, p. 784-788. 2000.



- SAVITSKY, K.; BAR-SHIRA, A.; GILAD, S.; ROTMAN, G.; ZIV, Y.; VANAGAITE, L.; TAGLE, D.A.; SMITH, S.; UZIEL, T.; SFEZ, S. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. **Science**. v. 268, p. 1749-1753. 1995.
- SCHÄRER, O.D. Hot topics in DNA repair: the molecular basis for different disease states caused by mutations in TFIIH and XPG. **DNA Repair**. v. 7, n. 2, p. 339-344. 2008.
- SCHLACHTERMAN, A.; VALLE, F.; WALL, K.M.; AZIOS, N.G.; CASTILLO, L.; MORELL, L.; WASHINGTON, A.V.; CUBANO, L.A.; DHARMAWARDHANE, S.F. Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model. **Transl Oncol**. v. 1, p. 19-27. 2008.
- SCHLEGEL, J.; PIONTEK, G.; KERSTING, M.; SCHUERMANN, M.; KAPPLER, R.; SCHERTHAN, H.; WEGHORST, C.; BUZARD, G.; MENNEL, H. The p16/Cdkn2a/Ink4a gene is frequently deleted in nitrosourea-induced rat glial tumors. **Pathobiology**. v. 67, p. 202-206. 1999.
- SCHLESSINGER, J. Cell signalling by receptor tyrosine kinases. **Cell**. v. 103, p. 211-225. 2000.
- SCHOFIELD, M.J.; HSIEH P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. **Annu. Rev. Microbiol**. v. 57, p. 579-608. 2003.
- SERRANO, M.; LIN, A.W.; MCCURRACH, M.E.; BEACH, D.; LOWE, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>INK4a</sup>. **Cell**. v. 88, p. 593-602. 1997.
- SHAKIBAEI, M.; HARIKUMAR, K.B.; AGGARWAL, B.B. Resveratrol addiction: to die or not to die. **Mol Nutr Food Res**. v. 53, p. 115-128. 2009.
- SHARMA, S.V.; HABER, D.A.; SETTLEMAN, J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. **Nat Rev Cancer**. v. 10, n. 4, p. 241-253. 2010.
- SHERR, C.J.; ROBERTS, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev**. v. 13, p. 1501-1512. 1999.
- SHINTANI, T.; KLIONSKY, D.J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science**. v. 306, p. 990-995. 2004.
- SHOSKES, D.A.; ZEITLIN, S.I.; SHAHED, A.; RAJFER, J., Quercetin in men with category III chronic prostatitis: a preliminary prospective, double-blind, placebo-controlled trial. **Urology**. v. 54, p. 960-963. 1999.
- SHRIVASTAV, M.; DE HARO, L.P.; NICKOLOFF, J.A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. **Cell Res**. v. 18, n. 1, p. 134-147. 2008.
- SIGNORELLI, P.; GHIDONI, R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. **J Nutr Biochem**. v. 16, p. 449-466. 2005
- SIMONYI, A.; WANG, Q.; MILLER, R.L.; YUSOF, M.; SHELAT, P.B.; SUN, A.Y.; SUN, G.Y. Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. **Mol Neurobiol**. v. 31, p. 135-147. 2005.
- SINGH, M.; ARSENEAULT, M.; SANDERSON, T.; MURTHY, V.; RAMASSAMY, C. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. **J Agric Food Chem**. v. 56, n. 13, 4855-4873. 2008.
- SINGH, S.K.; CLARKE, I.D.; HIDE, T.; DIRKS, P.B. Cancer stem cells in nervous system tumors. **Oncogene**. v. 23, p. 7267-7273. 2004a.
- 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**. v. 432, p. 396-401. 2004b.

- SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutat Res.** v. 531, n. 1-2, p. 231-251. 2003.
- SMITH, G.C.; CARY, R.B.; LAKIN, N.D.; HANN, B.C.; TEO, S.H.; CHEN, D.J.; JACKSON, S.P. Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 96, p. 11134-11139. 1999.
- SNYDER, R.D.; GILLIES, P.J. Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative, and topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells. **Environ Mol Mutagen.** v. 40, p. 266-276. 2002.
- SOLEAS, G.J.; DIAMANDIS, E.P.; GOLDBERG, D.M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clin Biochem.** v. 30, p. 91-113. 1997.
- SOLEAS, G.J.; GRASS, L.; JOSEPHY, P.D.; GOLDBERG, D.M.; DIAMANDIS, E.P. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. **Clin Biochem.** v. 35, p. 119-124. 2002.
- SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C.; WILLIAMS, R.J. Modulation of prosurvival 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.** v. 278, p. 34783-34789. 2003.
- SPERANDIO, S.; DE BELLE, I.; BREDESEN, D.E. An alternative, non-apoptotic form of programmed cell death. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 97, p.14376-14381. 2000.
- STILLER, C.A.; NECTOUX, J. International incidence of childhood brain and spinal tumours. **Int J Epidemiol.** v. 23, p. 458-464. 1994.
- STOCKMANN-JUVALA, H.; NAARALA, J.; LOIKKANEN, J.; VÄHÄKANGAS, K.; SAVOLAINEN, K. Fumonisin B1-induced apoptosis in neuroblastoma, glioblastoma and hypothalamic cell lines. **Toxicology.** v. 225, p. 234-241. 2006.
- STUPP, R.; HEGI, M.E.; MASON, W.P.; BENT, M.J.; VAN, D.E.N.; TAPHOORN, M.J.; JANZER, R.C.; LUDWIN, S.K.; ALLGEIER, A.; FISHER, B.; BELANGER, K.; HAU, P.; BRANDES, A.A.; GIJTENBEEK, J.; MAROSI, C.; VECHT, C.J.; MOKHTARI, K.; WESSELING, P.; VILLA, S.; EISENHAEUER, E.; GORLIA, T.; WELLER, M.; LACOMBE, D.; CAIRNCROSS, J.G.; MIRIMANOFF, R.O. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **Lancet Oncol.** v. 10, p. 459-466. 2009.
- SUZUKI, M.; BOOTHMAN, D.A. Stress-induced premature senescence (SIPS)-influence of SIPS on radiotherapy. **J Radiat Res.** v. 49, p. 105-112. 2008.
- SZATMÁRI, T.; LUMNICZKY, K.; DÉSAKNAI, S.; TRAJCEVSKI, S.; HÍDVÉGI, E.J.; HAMADA, H.; SÁFRÁNY, G. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. **Cancer Sci.** v. 97, n. 6, p. 546-553. 2006.
- TAKAOKA, M. Die synthese von resveratrol und seinen derivaten. Über die phenolischen substanzen der weissen nieswurz (*Veratrum grandifolium* Loes. Fil). **Proc Imp Acad.** v. 16, p. 405-407. 1940.
- TAKANO, T.; LIN, J.H.C.; ARCUINO, G.; GAO, Q.; YANG, J.; NEDERGAARD, M. Glutamate release promotes growth of malignant G.gliomas. **Nature Med.** v. 7, p. 1010-1015. 2001.

- TANIGAWA, S.; FUJII, M.; HOU, D.X. Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. **Biosci Biotechnol Biochem.** v. 72, n. 3, p. 797-804. 2008.
- TAYLOR, D.M.; MAXWELL, M.M.; LUTHI-CARTER, R.; KAZANTSEV, A.G. Biological and potential therapeutic roles of sirtuin deacetylases **Cell Mol Life Sci.** v. 65, n. 24, p. 4000-4018. 2008.
- TEMPLETON, A.; HOFER, S.; TÖPFER, M.; SOMMACAL, A.; FRETZ, C.; CERNY, T.; GILLESSEN, S. Extraneural spread of glioblastoma - report of two cases. **Onkologie.** v. 31, p. 192-194. 2008.
- THALER, S.; HÄHNEL, P.S.; SCHAD, A.; DAMMANN, R.; SCHULER, M. RASSF1A mediates p21<sup>Cip1/Waf1</sup>-dependent cell cycle arrest and senescence through modulation of the Raf-MEK-ERK pathway and inhibition of Akt. **Cancer Res.** v. 69, p. 1748-1757. 2009.
- THEOHARIDES, T.C.; BIELORY, L. Mast cells and mast cell mediators as targets of dietary supplements. **Ann Allergy Asthma Immunol.** v. 93, p. S24-S34. 2004.
- THOMPSON, C.L.; SANCAR, A. Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. **Oncogene.** v. 21, n. 58, p. 9043-9056. 2002.
- TIBBETTS, R.S.; CORTEZ, D.; BRUMBAUGH, K.M.; SCULLY, R.; LIVINGSTON, D.; ELLEDGE, S.J.; ABRAHAM, R.T. Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. **Genes Dev.** v. 14, p. 2989-3002. 2000.
- TOMAS-BARBERAN, F.A.; MAILLARD, M.; HOSTELLMAN, K. Antifungal flavonoids from the leaf surface of *Helichrysum nitens* and from the stem bark of *Erythrina berteroana*. **Prog Clin Biol Res.** v. 280, p. 61-65. 1988.
- TOUSSAINT, O.; MEDRANO, E.E.; VON ZGLINICKI, T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. **Exp Gerontol.** v. 35, p. 927-945. 2000.
- TREWICK, S.C.; HENSHAW, T.F.; HAUSINGER, R.P.; LINDAHL, T.; SEDGWICK, B. Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. **Nature.** v. 419, p. 174-178. 2002.
- TRUMP, B.F.; BEREZESKY, I.K.; CHANG, S.H.; PHELPS, P.C. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicol Pathol.** v. 25, p. 82-88. 1997.
- 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.** v. 10, p. 2190-2202. 2004.
- TURINI, M.; REDAELLI, A. Primary brain tumours: a review of research and management. **Int J Clin Pract.** v. 55, n. 7, p. 471-475. 2001.
- UHRBOM, L.; NISTEAR, M.; WESTERMARK, B. Induction of senescence in human malignant glioma cells by p16<sup>INK4A</sup>. **Oncogene.** v. 15, p. 505-514. 1997.
- ULLRICH, A.; SCHLESSINGER, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. **Cell.** v. 61, p. 203-212. 1990.
- USHA, S.; JOHNSON, I.M.; MALATHI, R. Interaction of resveratrol and genistein with nucleic acids. **J Biochem Mol Biol.** v. 38, p. 198-205. 2005.
- VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell Death Differ.** v. 15, p. 1153-1162. 2008.
- VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis **Anat Histol Embryol.** v. 31, p. 214-223. 2002.

- VAN HEEMST, D.; DEN REIJER, P.M.; WESTENDORP, R.G. Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers. **Eur J Cancer**. v. 43, p. 2144-2152. 2007.
- VAN MEIR, E.G. **CNS Cancer: models, markers, prognostic factors, targets and therapeutic approaches**, Humana Press, Springer, 2009, p. 1284.
- VAZIRI, H.; BENCHIMOL, S. Alternative pathways for the extension of cellular life span: inactivation of p53/pRb and expression of telomerase. **Oncogene**. v. 18, p. 7676-7680. 1999.
- VIAU, C.M. **Avaliação da captação do íon metálico Sn<sup>2+</sup> e seus efeitos tóxicos e genotóxicos em células eucarióticas**: 16-25. 2009. 188f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- VICENCIO, J.M.; GALLUZZI, L.; TAJEDDINE, N.; ORTIZ, C.; CRIOLLO, A.; TASDEMIR, E.; MORSELLI, E.; YOUNES, A.B.; MAIURI, M.C.; LAVANDERO, S.; KROEMER, G. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path – a mini-review. **Gerontology**. v. 54, p. 92-99. 2008.
- VLAHOS, C.J.; MATTER, W.F.; HUI, K.Y.; BROWN, R.F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-21-benzopyran-4-one (LY294002). **J Biol Chem**. v. 269, p. 5241-5248. 1994.
- WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M.H.; OATIS, J.E.; Jr., WALLE, U.K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metab Dispos**. v. 32, p. 1377-1382. 2004.
- WALLE, T.; OTAKE, Y.; WALLE, U.K.; WILSON, F.A. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. **J Nutr**. v. 130, p. 2658-2661. 2000.
- WALLE, T.; WALLE, U.K.; HALUSHKA, P.V. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. **J Nutr**. v. 131, p. 2648-2652. 2001.
- WANG, I.K.; LIN-SHIAU, S.Y.; LIN, J.K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome crelease and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. **Eur J Cancer**. v. 35, p. 1517-1525. 1999.
- WEBB, M.R.; EBELER, S.E. Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity. **Biochem J**. v. 384, p. 527-541. 2004.
- WEN, P.Y.; KESARI, S. Malignant gliomas in adults. **N Engl J Med**. v. 359, p. 492-507. 2008.
- WESTPHAL, M.; HILT, D.C.; BORTEY, E.; DELAVAUULT, P.; OLIVARES, R.; WARNKE, P.C.; WHITTLE, I.R.; JÄÄSKELÄINEN, J.; RAM, Z. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. **Neuro Oncol**. v. 5, p. 79-88. 2003.
- WETERINGS, E.; VERKAIK, N.S.; KEIJZERS, G.; FLOREA, B.I.; WANG, S.Y.; ORTEGA, L.G.; UEMATSU, N.; CHEN, D.J.; VAN GENT, D.C. The Ku80 carboxy terminus stimulates joining and artemis-mediated processing of DNA ends. **Mol Cell Biol**. v. 29, n. 5, p. 1134-1142. 2009.
- WOOD, G.W.; MORANTZ, R.A. *In vitro* reversal of depressed T lymphocyte function in the peripheral blood of brain tumor patients. **J Natl Cancer Inst**. v. 68, n. 1, p. 27-33. 1982.
- WOOD, G.W.; MORANTZ, R.A. Depressed T lymphocyte function in brain tumor patients: monocytes as suppressor cells. **J Neurooncol**. v. 1, n. 2, p. 87-94. 1983.

- YAMANAKA, R.; SAYA, H. Molecularly targeted therapies for glioma. **Ann Neurol.** v. 66, p. 717-729. 2009.
- YANG, L.; WANG, S.; SUNG, B.; LIM, G.; MAO, J. Morphine induces ubiquitin proteasome activity and glutamate transporter degradation. **J Biol Chem.** v. 283, p. 21703–21713. 2008.
- YE, R.; GOODARZI, A.A.; KURZ, E.U.; SAITO, S.; HIGASHIMOTO, Y.; LAVIN, M.F.; APPELLA, E.; ANDERSON, C.W.; LEES-MILLER, S.P. The isoflavonoids genistein and quercetin activate different stress signaling pathways as shown by analysis of site-specific phosphorylation of ATM, p53 and histone H2AX. **DNA Repair.** v. 3, n. 3, p. 235-244. 2004.
- YU, C.; SHIN, Y.G.; CHOW, A.; LI, Y.; KOSMEDER, J.W.; LEE, Y.S.; HIRSCHELMAN, W.H.; PEZZUTO, J.M.; MEHTA, R.G.; VAN BREEMEN, R.B. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. **Pharm Res.** v. 19, p. 1907-1914. 2002.
- ZAMIN, L.L.; DILLENBURG-PILLA, P.; ARGENTA-COMIRAN, R.; HORN, A.P.; SIMAO, F.; NASSIF, M.; GERHARDT, D.; FROZZA, R.L.; SALBEGO, C. Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: involvement of PI3-K pathway, **Neurobiol Dis.** v. 24, p. 170-182. 2006.
- ZEISS, C.J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. **Vet Pathol.** v. 40, p. 481-495. 2003.
- ZHU, J.; WOODS, D.; MCMAHON, M.; BISHOP, J.M. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. **Genes Dev.** v. 12, p. 2997-3007. 1998.
- ZWICK, E.; BANGE, J.; ULLRICH, A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. **Endocr Relat Cancer.** v. 8, n. 3, p. 161–17. 2001.

## 7. ANEXO

### Lauren Lúcia Zamin

#### Curriculum Vitae

Nome em Citação bibliográficas: Zamin LL

---

#### Formação Acadêmica/Titulação

- 2006** Doutorado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Em preparação  
Orientador: Guido Lenz  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2004 - 2006** Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica).  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Efeito Neuroprotetor do Resveratrol em um Modelo in vitro de Isquemia Cerebral: Envolvimento das vias PI3-k e MAPK, Ano de obtenção: 2006  
Orientador: Christianne Gazzana Salbego  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2000 - 2005** Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2000 - 2003** Graduação em Ciências Biológicas.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Neuroprotective Effect of 17beta-Estradio in Organotypic Slice Cultures of Rat Hipocampus Exposed To Oxygen and Glucose Deprivation  
Orientador: Christianne Gazzanna Salbego  
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

---

#### Atuação profissional

##### 1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

---

###### Vínculo institucional

- 2006 - Atual** Vínculo: Aluna de doutorado , Enquadramento funcional: Aluna de doutorado , Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva
- 2004 - 2006** Vínculo: Estudante de Mestrado , Enquadramento funcional: Mestrado, Regime: Dedicação Exclusiva
- 2003 - 2003** Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Iniciação científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicação Exclusiva
- 2003 - 2004** Vínculo: Bolsista FAPERGS , Enquadramento funcional: Iniciação científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicação Exclusiva
- 2001 - 2002** Vínculo: Bolsista Propesq , Enquadramento funcional: Iniciação científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicação Exclusiva
- 2000 - 2000** Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicação Exclusiva

---

###### Atividades

- 08/2000 - 12/2000** Estágio  
*Estágio:*

---

## Áreas de atuação

1. Biologia Molecular
2. Citologia e Biologia Celular
3. Bioquímica
4. Biofísica
5. Neuroquímica
6. Biologia Geral

---

## Idiomas

<b>Inglês</b>	Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
<b>Espanhol</b>	Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem
<b>Italiano</b>	Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem
<b>Português</b>	Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

---

## Prêmios e títulos

- 2003** 1º lugar no XXIV Concurso Acadêmico de Pesquisa Científica, Faculdade de Farmácia - UFRGS

## Produção em C, T& A

---

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. SIMÃO, Fabrício, ZAMIN, Lauren Lúcia, FROZZA, Rudimar Luiz et al. Protective profile of oxcarbazepine against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice culture could involve PI3K cell signaling pathway.. *Neurological Research (New York)*. , v.31, p.1044 - 1048, 2009.
2. ZAMIN, Lauren Lúcia, CHIELA, Eduardo F. C., PILLA, Patrícia Dilenburg et al. Resveratrol and Quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cell. *Cancer Science*. , v.100, p.1655 - 1662, 2009.
3. ZAMIN, Lauren Lúcia, NASSIF, Melissa Calegari, HOPPE, Juliana et al. B-amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves Akt/PKB, GSK-3?, and PTEN. *Neurochemistry International*. , v.50, p.229 - 235, 2007.
4. BRAGANHOL, Elizandra, ZAMIN, Lauren Lúcia, CANEDO, Andrés Delgado et al. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line.. *Anti-Cancer Drugs*. , v.17, p.663 - 671, 2006.
5. ZAMIN, Lauren Lúcia, TAGLIARI, Bárbara, SALBEGO, Christianne Gazana et al. Homocysteine increases neuronal damage in hippocampal slices receiving oxygen and glucose deprivation. *Metabolic Brain Disease*. , v.21, p.273 - 278, 2006.

6. TAGLIARI, Bárbara, ZAMIN, Lauren Lúcia, SALBEGO, Christianne Gazana et al.  
Hyperhomocysteinemia increases damage on brain slices exposed to in vitro model of oxygen and glucose deprivation: prevention by folic acid. *International Journal of Developmental Neuroscience*. , v.24, p.285 - 291, 2006.
7. ZAMIN, Lauren Lúcia, PILLA, Patrícia Dilenburg, COMIRAN, Ricardo Argenta et al.  
Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. *Neurobiology of Disease*. , v.24, p.170 - 182, 2006.
8. CIMAROSTI, Helena, OSHEA, r, JONES, n, ZAMIN, Lauren Lúcia et al.  
The effects of estradiol on estrogen receptor and glutamate transporter expression in organotypic hippocampal cultures exposed to oxygen--glucose deprivation.. *Neurochemistry International*. , v.31, p.483 - 490, 2006.
9. SANTIN, Katiane, NASSIF, Melissa Calegari, HOPPE, Juliana et al.  
Envolvimento das proteínas GSK3B e iNOS na neurotoxicidade induzida pelo peptídeo AB42 em cultura organotípica de hipocampo de ratos. *Caderno de Farmácia*. , v.21, p.C1 - C8, 2005.
10. CIMAROSTI, Helena, ZAMIN, Lauren Lúcia, FROZZA, Rudimar Luiz et al.  
Estradiol Protects Against Oxygen and Glucose Deprivation in Rat Hippocampal Organotypic Cultures and Activates Akt and Inactivates GSK-3. *Neurochemical Research*. , v.30, p.191 - 199, 2005.
11. CIMAROSTI, Helena, SIQUEIRA, Ionara Rodrigues, ZAMIN, Lauren Lúcia, NASSIF, Melissa Calegari et al.  
Neuroprotection and Protein Damage Prevention by Estradiol Replacement in Rat Hippocampal Slices Exposed to Oxygen-Glucose Deprivation. *Neurochemical Research*. , v.30, p.583 - 589, 2005.
12. NASSIF, Melissa Calegari, CIMAROSTI, Helena, ZAMIN, Lauren Lúcia, SALBEGO, Christianne Gazana et al.  
Estrógenos versus isquemia cerebral: hormônio feminino como agente neuroprotetor. *Infarma (Brasília)*. , v.16, p.60 - 63, 2004.
13. ZAMIN, Lauren Lúcia, CIMAROSTI, Helena, NASSIF, Melissa Calegari et al.  
Fitoestrógenos: Moléculas de Plantas Trazendo Benefícios para os Seres Humanos. *Infarma (Brasília)*. , v.16, p.75 - 78, 2004.
14. NASSIF, Melissa Calegari, CIMAROSTI, Helena, BALK, Rodrigo S., ZAMIN, Lauren Lúcia et al.  
Avaliação do efeito do tratamento crônico com 17B-estradiol em ratas ovariectomizadas submetidas a estresse em um modelo in vitro de fatias hipocâmpais. *Caderno de Farmácia*. , v.19, 2003.
15. ZAMIN, Lauren Lúcia, CIMAROSTI, Helena, HORN, Ana Paula et al.  
Avaliação do potencial neuroprotetor do 17B-estradiol em fatias de cultura organotípica de hipocampo de rato submetidas à privação de oxigênio e glicose. *Caderno de Farmácia*. , v.19, 2003.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. CHIELA, Eduardo F. C., ZAMIN, Lauren Lúcia, SALBEGO, Christianne Gazana et al.  
Resveratrol and Temozolomide have additive cytotoxic effect, induced autophagy and alter the cycle of U87-MG cells In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2009, Águas de Lindóia.  
**XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq**. , 2009.
2. LOPEZ, Patricia Luciana da Costa, SILVA, Andrew Oliveira da, CHIELA, Eduardo F. C., ZAMIN, Lauren Lúcia et al.  
RNA Interference of the Caspase Inhibitors XIAP and Survivin Modulate Apoptosis in Gliomas In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular,



2009, Águas de Lindóia.

**XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.** , 2009.

3. VARGAS, Jose Eduardo, ZAMIN, Lauren Lúcia, CHIELA, Eduardo F. C. et al.

Estudo dos mecanismos moleculares de indução de senescência em gliomas após tratamento com polifenóis In: XI Reuniao anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre.

**XI Reuniao anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS.** , 2009.

4. LOPEZ, Patricia Luciana da Costa, SILVA, Andrew Oliveira da, CHIELA, Eduardo F. C., ZAMIN, Lauren Lúcia et al.

Interferência deRNA e super expressão de um transgene através de vetor viral para sensibilidade de gliomas In: XI Reuniao anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre.

**XI Reuniao anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS.** , 2009.

5. CHIELA, Eduardo F. C., ZAMIN, Lauren Lúcia, PELEGRINI, Alessandra Luisa et al.

Resveratrol and Temozolomide additive cytotoxic effect in glioma cells: the role of autophagy and cell cycle modulation In: XI Reuniao anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre.

**XI Reuniao anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS.** , 2009.

6. RIZZO, Lucas Bortolotto, CHIELA, Eduardo F. C., ZAMIN, Lauren Lúcia, LENZ, Guido et al.

Resveratrol e Quercetina exercem efeito citotóxico aditivo em glioma p53+ através da indução de senescência In: XXI Salão de Iniciação Científica, 2009, Porto Alegre.

**XXI Salão de Iniciação Científica.** , 2009.

7. ZAMIN, Lauren Lúcia, CHIELA, Eduardo F. C., VARGAS, Jose Eduardo et al.

Resveratrol e Quercetina: Mecanismo de Indução de senescência em Gliomas in vitro e Efeito antitumoral in vivo In: XI Reuniao anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre.

**XI Reuniao anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS.** , 2009.

8. TAGLIARI, Bárbara, ZAMIN, Lauren Lúcia, ALEXANDRE NETTO, Carlos et al.

Hyperhomocysteinemia increases damage on brain slice exposed to in vitro model of oxygen and glucose deprivation: prevention by folic acid In: I IBRO/LARC Congress of Neuroscience of Latin American, Caribbean and Iberian Peninsula, 2008, Buzios.

**I IBRO/LARC Congress of Neuroscience of Latin America, Caribbean and Iberian Peninsula.** , 2008.

9. ZAMIN, Lauren Lúcia, CHIELA, Eduardo F. C., SALBEGO, Christianne Gazana et al.

Resveratrol and Quercetin modulate PI3-K/Akt pathway and decrease the cell number of glioma lineage C6 and U87MG In: I IBRO/LARC Congress of Neuroscience of Latin American, Caribbean and Iberian Peninsula, 2008, Buzios.

**I IBRO/LARC Congress of Neuroscience of Latin America, Caribbean and Iberian Peninsula.** , 2008.

10. CHIELA, Eduardo F. C., ZAMIN, Lauren Lúcia, SALBEGO, Christianne Gazana et al.

Resveratrol potencializa o efeito da Temozolomida e induz autofagia em células de glioma humano U87-MG In: 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2008, Porto Alegre.

**28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** , 2008.

11. CHIELA, Eduardo F. C., ZAMIN, Lauren Lúcia, PILLA, Patrícia Dilenburg et al.

Avaliação do efeito do resveratrol, quercetina e paclitaxel sobre a proliferação da linhagem C6 de glioma de rato In: XX Reunião Anual da Fesbe, 2007, Águas de Lindóia.

**XX Reunião Anual da Fesbe.** , 2007.

12. NASSIF, Melissa Calegari, HORN, Ana Paula, HOPPE, Juliana, ZAMIN, Lauren Lúcia et al. Beta-amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves AKT/PKB, GSK3beta and PTEN In: III Meeting on the Molecular Mechanisms of Neurodegeneration, 2007, Milan.  
**III Meeting on the Molecular Mechanisms of Neurodegeneration.** , 2007.
13. SOUSA, Fabrício Garmus, MATUO, Renata, GRIVICICH, Ivana et al. p38 MAPK-dependent anti-mutagenesis and cytotoxicity induced by *Agaricus blazei* beta-glucan In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2007, Porto Alegre.  
**IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.** , 2007.
14. ZAMIN, Lauren Lúcia, CHIELA, Eduardo F. C., TAMAJUSUKU, Alessandra et al. Resveratrol and Quercetin decrease the cell number and viability in several glioma lineages In: VII São Paulo Research Conferences Cancêr: da Biologia Molecular ao tratamento, 2007, São Paulo.  
**VII São Paulo Research Conferences Cancêr: da Biologia Molecular ao tratamento.** , 2007.
15. ZAMIN, Lauren Lúcia, CHIELA, Eduardo F. C., SALBEGO, Christianne Gazana et al. Resveratrol and Quercetin induced cell death in several glioma lineage In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2007, Porto Alegre.  
**IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.** , 2007.
16. ZAMIN, Lauren Lúcia, GERHARD, Daniéli, HORN, Ana Paula et al. Resveratrol protects against oxygen and glucose deprivation rat hippocampal organotypic cultures and activates AKT and inactivates GSK-3beta. In: III Meeting on the Molecular Mechanisms of Neurodegeneration, 2007, Milan.  
**III Meeting on the Molecular Mechanisms of Neurodegeneration.** , 2007.
17. CHIELA, Eduardo F. C., ZAMIN, Lauren Lúcia, PILLA, Patrícia Dilenburg et al. Sensibilidade comparada das linhagens de glioma C6, U87 e GL261 aos resveratrol, quercetina e paclitaxel In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007, Porto Alegre.  
**27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** , 2007.
18. CHIELA, Eduardo F. C., ZAMIN, Lauren Lúcia, PILLA, Patrícia Dilenburg et al. Sensibilidade comparada das linhagens de glioma C6, U87 e GL261 aos potenciais compostos anti-tumorais resveratrol e quercetina In: XIX Salão de Iniciação Científica, 2007, Porto Alegre.  
**XIX Salão de Iniciação Científica.** , 2007.
19. BRAGANHOL, Elizandra, ZAMIN, Lauren Lúcia, CANEDO, Andrés Delgado et al. Anti-proliferative effect of quercetin in human U138MG glioma cell line In: Advances in the diagnosis and treatment of brain diseases, 2006, Porto Alegre.  
**Advances in the diagnosis and treatment of brain diseases.** , 2006.
20. BRAGANHOL, Elizandra, ZAMIN, Lauren Lúcia, CANEDO, Andrés Delgado et al. Anti-proliferative effect of quercetin in human U138MG glioma cell line In: XXI Reunião anual da FESBE, 2006, Águas de Lindóia.  
**XXI Reunião anual da FESBE.** , 2006.
21. SANTIN, Katiane, GERHARD, Daniéli, HORN, Ana Paula, ZAMIN, Lauren Lúcia et al. Avaliação do efeito do alcalóide Boldina na proliferação da linhagem de glioma U138-MG e possível envolvimento da via de sinalização MAPK/ERK In: XXI Reunião anual da FESBE, 2006, Águas de Lindóia.  
**XXI Reunião anual da FESBE.** , 2006.
22. ZAMIN, Lauren Lúcia, PILLA, Patrícia Dilenburg, COMIRAN, Ricardo Argenta et al. Avaliação do envolvimento da sinalização mediada pela PI3K/AKT na ação neuroprotetora do resveratrol em cultura organotípica de hipocampo de rato In: IV Oficina de Neurociências, 2006, Garibaldi.  
**IV Oficina de Neurociências.** , 2006.
23. HORN, Ana Paula, GERHARD, Daniéli, ZAMIN, Lauren Lúcia, SIMÃO, Fabrício et al.

Cellular death in hippocampus in response to PI3K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation In: 4th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair: Cerebral Ischemia and Stroke, 2006, Magdeburg.

**4th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair: Cerebral Ischemia and Stroke.** , 2006.

24. HOPPE, Juliana, NASSIF, Melissa Calegari, SANTIN, Katiane et al.

Envolvimento da proteína cinase B (AKT) e da fosfatase da proteína PI3-K (PTEN) na neurotoxicidade provocada pelo peptídeo AB25-35 em cultura organotípica de hipocampo de rato In: XXI Reunião anual da FESBE, 2006, Águas de Lindóia.

**XXI Reunião anual da FESBE.** , 2006.

25. COMIRAN, Ricardo Argenta, SIMÃO, Fabrício, ZAMIN, Lauren Lúcia, FROZZA, Rudimar Luiz et al.

Estudo do efeito neuroprotetor da oxcarbazepina em culutras organotípicas de hipocampo submetidas à privação de oxigênio e glicose e seu possível envolvimento com a via da PI3-K In: XXI Reunião anual da FESBE, 2006, Águas de Lindóia.

**XXI Reunião anual da FESBE.** , 2006.

26. THOMAZI, Ana Paula, ZAMIN, Lauren Lúcia, SALBEGO, Christianne Gazana et al.

Glutamato uptake in hippocampal slices and organotypic cultures from rats exposed to oxygen and glucose deprivation In: Advances in the diagnosis and treatent of brain diseases, 2006, Porto Alegre.

**Advances in the diagnosis and treatent of brain diseases.** , 2006.

27. MAIER, Mariana r, GERHARD, Daniéli, HORN, Ana Paula, ZAMIN, Lauren Lúcia et al.

Investigação do Efeito antiproliferativo da Boldina na linhagem de glioma U138-MG In: IV Oficina de Neurociencias, 2006, Garibaldi.

**IV Oficina de Neurociencias.** , 2006.

28. GERHARD, Daniéli, MAIER, Mariana r, HORN, Ana Paula, ZAMIN, Lauren Lúcia et al.

Investigação do envolvimento da via de sinalização MAPK/ERK no efeito antiproliferativo da boldina sobre a linhagem de glioma U138-MG In: IV Oficina de Neurociencias, 2006, Garibaldi.

**IV Oficina de Neurociencias.** , 2006.

29. COMIRAN, Ricardo Argenta, ZAMIN, Lauren Lúcia, PILLA, Patrícia Dilenburg et al.

Investigação do envolvimento dos transportadores de glutamato GLAST e GLT1 no efeito neuroprotetor do resveratrol em culturas organotípicas de hipocampo submetidas à privação de oxigênio e glicose In: XXI Reunião anual da FESBE, 2006, Águas de Lindóia.

**XXI Reunião anual da FESBE.** , 2006.

30. JORGE, Renan S., THOMAZI, Ana Paula, ZAMIN, Lauren Lúcia, COMIRAN, Ricardo Argenta et al.

Padronização da técnica de captação de glutamato em cultura organotípica de hipocampo expostas a um modelo de isquemia in vitro In: XXI Reunião anual da FESBE, 2006, Águas de Lindóia.

**XXI Reunião anual da FESBE.** , 2006.

31. SALBEGO, Christianne Gazana, ZAMIN, Lauren Lúcia, PILLA, Patrícia Dilenburg et al.

Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: involment of PI3-k pathway In: 4th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair: Cerebral Ischemia and Stroke, 2006, Magdeburg.

**4th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair: Cerebral Ischemia and Stroke.** , 2006.

32. FROZZA, Rudimar Luiz, NASSIF, Melissa Calegari, HOPPE, Juliana, ZAMIN, Lauren Lúcia et al.

Toxicity of beta-amyloid peptides AB1-42 and AB23-35 in organotypic hippocampal slices culture In: Advances in the diagnosis and treatent of brain diseases, 2006, Porto Alegre.

**Advances in the diagnosis and treatent of brain diseases.** , 2006.

33. FROZZA, Rudimar Luiz, CIMAROSTI, Helena, OSHEA, r, ZAMIN, Lauren Lúcia et al.

Ação neuroprotetora do 17 B-estradiol: possível envolvimento dos receptores estrogênicos (ERS) In:

XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2005, Águas de Lindóia.  
**XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.** , 2005.

34. PILLA, Patrícia Dilenburg, ZAMIN, Lauren Lúcia, NASSIF, Melissa Calegari et al.  
Avaliação do potencial neuroprotetor do resveratrol: possível envolvimento das enzimas Akt e GSK-3Beta In: XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2005, Águas de Lindóia.

**XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.** , 2005.

35. SALBEGO, Christianne Gazana, ALEXANDRE NETTO, Carlos, ROCHA, Elizabete Rocha da, ZAMIN, Lauren Lúcia et al.

Efeito neuroprotetor do estradiol e seus possíveis mecanismos de ação em modelos in vitro de isquemia cerebral In: MOSTRA Pós-graduação UFRGS, 2005, Porto Alegre.

**mostra inova.** , 2005.

36. ZAMIN, Lauren Lúcia, PILLA, Patrícia Dilenburg, HORN, Ana Paula et al.

Efeito neuroprotetor do Resveratrol em culturas organotípicas de hipocampo de rato submetidas à privação de oxigênio e glicose: possível envolvimento da via PI-3K In: Simpósio Internacional Vinho e Saúde, 2005, Bento Gonçalves.

**Vinho e Saúde- vinho como alimento natural.** , 2005.

37. TAGLIARI, Bárbara, ZAMIN, Lauren Lúcia, FRANZON, Renata et al.

Effect of Antioxidants on Brain injury caused by ischemia in ovariectomized rats In: XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2005, Águas de Lindóia.

**XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.** , 2005.

38. FERREIRA, Gabriela, ZAMIN, Lauren Lúcia, PILLA, Patrícia Dilenburg et al.

Envolvimento da proteína ERK1/2 no efeito neuroprotetor mediado pelo resveratrol In: XXI Semana Acadêmica da FFFCMPA, 2005, Porto Alegre.

**XXI Semana Acadêmica da FFFCMPA.** , 2005.

39. ZAMIN, Lauren Lúcia, SALBEGO, Christianne Gazana

Envolvimento das vias PI-3K e MAPK no efeito neuroprotetor do resveratrol em um modelo in vitro de isquemia cerebral In: VII Reunião Anual do PPG Biologia Molecular e Celular do CBIot, 2005, Porto Alegre.

**VII Reunião Anual do PPG Biologia Molecular e Celular do CBIot.** , 2005.

40. TAGLIARI, Bárbara, ZAMIN, Lauren Lúcia, SALBEGO, Christianne Gazana et al.

Homocisteína aumenta o dano tecidual em fatias de hipocampo: estudos em modelos de isquemia in vitro In: MOSTRA de Pós-Graduação UFRGS, 2005, Porto Alegre.

**mostra inova.** , 2005.

41. COMIRAN, Ricardo Argenta, ZAMIN, Lauren Lúcia, PILLA, Patrícia Dilenburg et al.

Investigação do envolvimento da via da MAPK no efeito neuroprotetor do resveratrol em culturas organotípicas de hipocampo de rato submetidas à privação de oxigênio e glicose In: XXVI Concurso Acadêmico de pesquisa científica, 2005, Porto Alegre.

**XXVI Concurso Acadêmico de pesquisa científica.** , 2005.

42. HORN, Ana Paula, SIMÃO, Fabrício, NASSIF, Melissa Calegari et al.

Investigação do envolvimento das proteínas ERK e GSK-3B no efeito neuroprotetor do pré-condicionamento isquêmico In: XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2005, Águas de Lindóia.

**XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.** , 2005.

43. HOPPE, Juliana, NASSIF, Melissa Calegari, SANTIN, Katiane, ZAMIN, Lauren Lúcia et al.

Neurotoxicidade do peptídeo AB42 em cultura organotípica de hipocampo de ratos e possível envolvimento da proteína GSK-3B In: XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2005, Águas de Lindóia.

**XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.** , 2005.

44. NASSIF, Melissa Calegari, HOPPE, Juliana, SANTIN, Katiane, ZAMIN, Lauren Lúcia et al. Neurotoxicity induced by AB25-35 in organotypic hippocampal culture and the possible neuroprotection of atorvastatin and 17 $\beta$ -estradiol In: First Chilean International Symposium on neurodegenerative diseases, 2005, Santiago.  
**International Symposium on neurodegenerative diseases.** , 2005.
45. NASSIF, Melissa Calegari, HOPPE, Juliana, HORN, Ana Paula, ZAMIN, Lauren Lúcia et al. Neurotoxicity induced by amyloid B-peptide (AB42) in organotypic hippocampal cultures and involvement of GSK3B and iNOS proteins In: II Neurotoxicity Society Meeting, 2005, Vina del Mar.  
**Final program and Abstracts.** , 2005.
46. COMIRAN, Ricardo Argenta, ZAMIN, Lauren Lúcia, HORN, Ana Paula et al. O Efeito neuroprotetor do resveratrol contra a privação de oxigênio e glicose em culturas organotípicas de hipocampo de rato e o seu possível envolvimento com a via da PI3-K In: XVII Salão de Iniciação Científica, 2005, Porto Alegre.  
**XVII Salão de Iniciação Científica.** , 2005.
47. FROZZA, Rudimar Luiz, CIMAROSTI, Helena, HORN, Ana Paula et al. Possível mecanismo da ação neuroprotetora do 17 beta-estradiol em culturas organotípicas expostas à privação de oxigênio e glicose In: XVII Salão de Iniciação Científica, 2005, Porto Alegre.  
**XVII Salão de Iniciação Científica.** , 2005.
48. PILLA, Patrícia Dilenburg, ZAMIN, Lauren Lúcia, NASSIF, Melissa Calegari et al. Potencial neuroprotetor do resveratrol: possível envolvimento das enzimas Akt e GSK-3 $\beta$  In: XXI Semana Acadêmica da FFFCMPA, 2005, Porto Alegre.  
**XXI Semana Acadêmica da FFFCMPA.** , 2005.
49. PILLA, Patrícia Dilenburg, ZAMIN, Lauren Lúcia, BERNARDI, Andressa et al. Resveratrol inibe a proliferação celular em linhagem de glioma humano e de rato In: Simpósio Internacional vinho e saúde, 2005, Bento Gonçalves.  
**Vinho e Saúde - Vinho como alimento natural.** , 2005.
50. ZAMIN, Lauren Lúcia, PILLA, Patrícia Dilenburg, NASSIF, Melissa Calegari et al. Resveratrol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3 $\beta$  In: XXXIV Reunião Anual da SBBq, 2005, Águas de Lindóia.  
**XXXIV Reunião Anual da SBBq.** , 2005.
51. NASSIF, Melissa Calegari, TAVARES, Alexandre Altino, ZAMIN, Lauren Lúcia, CIMAROSTI, Helena et al. Atividade do Extrato de Kava (Piper methysticum) em Modelo in vitro de Lesão Celular e Avaliação de um Possível Mecanismo de Neuroproteção In: XIX Reunião Anual de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2004, Águas de Lindóia.  
**XIX Reunião Anual de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE.** , 2004.
52. PILLA, Patrícia Dilenburg, ZAMIN, Lauren Lúcia, NASSIF, Melissa Calegari et al. Avaliação do potencial neuroprotetor do resveratrol em cultura organotípica de hipocampo de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose In: XVI Salão de Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre.  
**XVI Salão de Iniciação Científica.** , 2004.
53. NASSIF, Melissa Calegari, ZAMIN, Lauren Lúcia, CIMAROSTI, Helena et al. Efeito Neuroprotetor do 17 $\beta$ -Estradiol em Fatias de Cultura Organotípica de Hipocampo de Rato Submetidas à Privação de Oxigênio e Glicose In: XIX Reunião Anual Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2004, Águas de Lindóia.  
**XIX Reunião Anual Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.** , 2004.
54. CIMAROSTI, Helena, ZAMIN, Lauren Lúcia, FROZZA, Rudimar Luiz et al. Estrogen protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures by a mechanism involving protein kinase B In: 24th Annual Meeting of the Australian Neuroscience Society (ANS), 2004, Melbourne.

**Livro de Resumos do 24th Annual Meeting of the Australian Neuroscience Society (ANS).** , 2004.

55. CIMAROSTI, Helena, ZAMIN, Lauren Lúcia, FROZZA, Rudimar Luiz et al. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase cascade in the estrogen neuroprotection against brain ischemia in an in vitro model of cellular death In: 4th Forum of European Neuroscience (FENS), 2004, Lisboa.

**4th Forum of European Neuroscience (FENS).** , 2004.

56. NASSIF, Melissa Calegari, TAVARES, Alexandre Altino, HORN, Ana Paula et al. Neuroprotective activity of Kava-Kava extract (Piper Methisticum), in Organotypic culture of Rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation In: II INTERNATIONAL CONGRESS ON NEUROREGENERATION, 2004, Rio de Janeiro.

**II INTERNATIONAL CONGRESS ON NEUROREGENERATION.** , 2004.

57. PILLA, Patrícia Dilenburg, ZAMIN, Lauren Lúcia, NASSIF, Melissa Calegari et al. O Efeito neuroprotetor do Resveratrol avaliado em cultura organotípica de hipocampo de rato submetidos à privação de oxigênio e glicose In: XXX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos, 2004, Porto Alegre.

**XXX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos - XXV Concurso Acadêmico de pesquisa científica.** , 2004.

58. FROZZA, Rudimar Luiz, CIMAROSTI, Helena, HORN, Ana Paula, ZAMIN, Lauren Lúcia et al. O efeito neuroprotetor do 17Betaestradiol em um modelo in vitro de privação de oxigênio e glicose pode envolver as enzimas AKT e GSK3B In: XXX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos, 2004, Porto Alegre.

**XXX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos - XXV Concurso Acadêmico de Pesquisa Científica.** , 2004.

59. FROZZA, Rudimar Luiz, CIMAROSTI, Helena, HORN, Ana Paula, ZAMIN, Lauren Lúcia et al. Possível envolvimento das enzimas AKTe GSK3Beta na ação neuroprotetora do 17B-estradiol In: XVI Salão de Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre.

**XVI Salão de Iniciação Científica.** , 2004.

60. FROZZA, Rudimar Luiz, CIMAROSTI, Helena, HORN, Ana Paula et al. Possível Envolvimentoda Proteína AKT na Ação Neuroprotetora do 17 beta -Estradiol em um Modelo in vitro de Isquemia In: XIX Reunião Anual Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2004, Águas de Lindóia.

**XIX Reunião Anual Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.** , 2004.

61. ZAMIN, Lauren Lúcia, CIMAROSTI, Helena, NASSIF, Melissa Calegari et al. 17beta-estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3beta In: II INTERNATIONAL CONGRESS ON NEUROREGENERATION, 2004, Rio de Janeiro.

**II INTERNATIONAL CONGRESS ON NEUROREGENERATION.** , 2004.

62. ZAMIN, Lauren Lúcia, BUZIN, Luciane, CIMAROSTI, Helena et al. Avaliação do efeito do lítio sobre a captação de glutamato em fatias hipocâmpais expostas à privação de oxigênio e glicose In: XV Salão de Iniciação Científica, 2003, Porto Alegre-RS.

**XV Salão de Iniciação Científica.** , 2003.

63. NASSIF, Melissa Calegari, CIMAROSTI, Helena, BALK, Rodrigo S., ZAMIN, Lauren Lúcia et al. Avaliação do efeito do tratamento crônico com 17B estradiol em ratas ovariectomizadas submetidas a estresse sobre um modelo de isquemia in vitro de fatias hipocâmpais In: XXIX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos, 2003, Porto Alegre.

**XXIX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos.** , 2003.

64. BUZIN, Luciane, CIMAROSTI, Helena, FROZZA, Rudimar Luiz, ZAMIN, Lauren Lúcia et al. Avaliação do potencial neuroprotetor do lítio em fatias hipocâmpais expostas a um modelo de isquemia in vitro In: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental -

FeSBE, 2003, Pinhais-PR.

**XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.** , 2003.

65. ZAMIN, Lauren Lúcia, CIMAROSTI, Helena, HORN, Ana Paula et al.

Avaliação do potencial neuroprotetor do 17β-estradiol em fatias de cultura organotípica de hipocampo de rato submetidas à privação de oxigênio e glicose In: XXIX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos, 2003, Porto Alegre.

**XXIX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos.** , 2003.

66. ZAMIN, Lauren Lúcia, CIMAROSTI, Helena, NASSIF, Melissa Calegari et al.

Avaliação do provável efeito neuroprotetor do estrógeno e da genisteína num modelo in vitro de morte celular In: XXVIII Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos, 2003, Porto Alegre.

**Farmacêutico Generalista.** , 2003.

67. NASSIF, Melissa Calegari, CIMAROSTI, Helena, BALK, Rodrigo S. et al.

Efeito do tratamento agudo e crônico com 17 β-estradiol em fatias hipocâmpais de ratas ovariectomizadas submetidas a estresse expostas a um modelo in vitro de isquemia In: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2003, Pinhais-PR.

**XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE.** , 2003.

68. NASSIF, Melissa Calegari, CIMAROSTI, Helena, BALK, Rodrigo S. et al.

Efeito do tratamento crônico com 17 β-estradiol em ratas ovariectomizadas sobre modelo de isquemia in vitro em fatias hipocâmpais In: XV Salão de Iniciação Científica, 2003, Porto Alegre.

**XV Salão de Iniciação Científica.** , 2003.

69. FROZZA, Rudimar Luiz, CIMAROSTI, Helena, ZAMIN, Lauren Lúcia, BUZIN, Luciane et al.

Estudo do efeito neuroprotetor do 17β-estradiol em cultura organotípica de hipocampo de rato: possível envolvimento da AKT In: XV Salão de Iniciação Científica, 2003, Porto Alegre.

**XV Salão de Iniciação Científica.** , 2003.

70. ZAMIN, Lauren Lúcia, CIMAROSTI, Helena, FROZZA, Rudimar Luiz et al.

Estudo sobre o efeito neuroprotetor da Genisteína num modelo in vitro de morte celular: Envolvimento da fosforilação proteica em tirosina In: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2003, Pinhais - PR.

**XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.** , 2003.

71. ZAMIN, Lauren Lúcia, CIMAROSTI, Helena, HORN, Ana Paula et al.

Investigação do efeito neuroprotetor do 17 β-estradiol em fatias de cultura organotípica de hipocampo de rato submetidas à privação de oxigênio e glicose In: XV Salão de Iniciação Científica, 2003, Porto Alegre-RS.

**XV Salão de Iniciação Científica.** , 2003.

72. ZAMIN, Lauren Lúcia, CIMAROSTI, Helena, FROZZA, Rudimar Luiz et al.

Investigation of the neuroprotective effect of Genistein and Verification of the phosphorylation of tyrosine in an in vitro model of cellular death In: XXXII Reunião Anual da SBBq, 2003, Caxambu.

**XXXII Reunião Anual - Programa e Resumos.** , 2003.

73. NASSIF, Melissa Calegari, CIMAROSTI, Helena, BALK, Rodrigo S., ZAMIN, Lauren Lúcia et al.

Neuroprotective effect of 17 β-estradiol in Slices of rat hippocampus exposed to an in vitro model of ischemia In: XXXII Reunião Anual da SBBq, 2003, Caxambu.

**XXXII Reunião Anual - Programa e resumos.** , 2003.

74. ZAMIN, Lauren Lúcia, CIMAROSTI, Helena, TAVARES, Alexandre Altino et al.

ESTUDO SOBRE O POTENCIAL EFEITO NEUROPROTETOR DA GENISTEÍNA NUM MODELO DE FATIAS HIPOCÂMPAIS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE In: II Oficina de Neurociências, 2002, Garibaldi.

**II Oficina de Neurociências.** , 2002.

75. ZAMIN, Lauren Lúcia, CIMAROSTI, Helena, TAVARES, Alexandre Altino et al.

ESTUDO SOBRE O POTENCIAL EFEITO NEUROPROTETOR DA GENISTEÍNA NUM MODELO E

FATIAS HIPOCAMPAIS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DE GLICOSE E OXIGÊNIO In: XIV Salão de Iniciação Científica, 2002, Porto Alegre.

**XI Salão de Iniciação Científica.** , 2002.

76. CIMAROSTI, Helena, RODNIGHT, Richard, ZAMIN, Lauren Lúcia, TAVARES, Alexandre Altino et al.

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO LÍTIO NUM MODELO IN VITRO DE MORTE CELULAR In: II Oficina de Neurociências, 2002, Garibaldi.

**II Oficina de Neurociências.** , 2002.

77. ZAMIN, Lauren Lúcia, TAVARES, Alexandre Altino, SALBEGO, Christianne Gazana et al.

INVESTIGATION OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF LITHIUM: AN IN VITRO MODEL OF CELLULAR DEATH In: XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, 2002, Porto Alegre.

**XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular.** , 2002.

78. CIMAROSTI, Helena, RODNIGHT, Richard, TAVARES, Alexandre Altino, ZAMIN, Lauren Lúcia et al.

INVESTIGATION OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF LITHIUM IN AN IN VITRO MODEL OF CELLULAR DEATH In: Farmápolis, 2002, Florianópolis.

**XI Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos.** , 2002.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

1. CHIELA, Eduardo F. C., ZAMIN, Lauren Lúcia, SALBEGO, Christianne Gazana et al.

Resveratrol potencializa o efeito da Temozolomida e induz autofagia em células de glioblastoma humano U87-MG In: II Simpósio Internacional Vinho e Saúde, 2008, Bento Gonçalves.

**II Simpósio Internacional Vinho e Saúde.** , 2008.

#### **Apresentação de Trabalho**

1. ZAMIN, Lauren Lúcia, CHIELA, Eduardo F. C., BARBIERI, Nicolle et al.

**Avaliação das propriedades antitumorais dos compostos bioativos do vinho Resveratrol e Quercetina e potenciais mecanismos de ação**, 2008. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

2. ZAMIN, Lauren Lúcia

**Efeitos Neuroprotetores do Resveratrol**, 2006. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

#### **Demais produções bibliográficas**

1. CHIELA, Eduardo F. C., ZAMIN, Lauren Lúcia, LENZ, Guido

**Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle in the growth inhibiting effect of resveratrol in.** Artigo Submetido. :European Journal of Cell Biology, 2010. (Outra produção bibliográfica)

#### **Orientações e Supervisões**

##### **Coorientações concluídas**

##### **Trabalhos de conclusão de curso de graduação**

1. Eduardo Cremonese Filippi Chiel. **Alterações celulares induzidas pelo resveratrol e efeito da combinação deste com temozolomida em células da linhagem de glioblastoma humano U87-MG.** 2008. Curso (Biomedicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2. Patrícia Dillenburg Pilla. **Efeito do resveratrol sobre células normais e tumorais (astrócitos e gliomas) do sistema nervoso central de ratos.** 2006. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul



## Eventos

### Participação em eventos

1. Apresentação Oral no(a) **II Simpósio Internacional Vinho e Saúde**, 2008. (Simpósio)  
Avaliação das propriedades antitumorais dos compostos bioativos do vinho Resveratrol e Quercetina e potenciais mecanismos de ação.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I IBRO/LARC Congress of Neuroscience of Latin American, Caribbean and Iberian Peninsula**, 2008. (Congresso)  
Resveratrol and Quercetin modulate PI3-K/Akt pathway and decrease the cell number of glioma lineage C6 and U87MG.
3. **Curso Básico de Citometria de Fluxo**, 2008. (Outra)
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VII São Paulo Research Conferences Câncer: da Biologia Molecular ao Tratamento**, 2007. (Congresso)  
Resveratrol and Quercetin decrease the cell number and viability in several glioma lineages.
5. **Oncogenes and Human Cancer: the next 25 years**, 2007. (Congresso)
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Simpósio Internacional Vinho e Saúde**, 2005. (Simpósio)  
Simpósio Internacional Vinho e Saúde.
7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **II INTERNATIONAL CONGRESS ON NEUROREGENERATION**, 2004. (Congresso)  
II INTERNATIONAL CONGRESS ON NEUROREGENERATION.
8. Apresentação Oral no(a) **XV Salão de Iniciação Científica**, 2003. (Outra)  
XV Salão de Iniciação Científica.
9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVIII Reunião Anual da Federação de sociedades de Biologia Experimental**, 2003. (Congresso)  
XVIII Reunião Anual da Federação de sociedades de Biologia Experimental.
10. Apresentação Oral no(a) **XXIX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos**, 2003. (Outra)  
XXIX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos.
11. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXXII Reunião Anual da SBBq**, 2003. (Congresso)  
XXXII Reunião Anual da SBBq.
12. **9º Congresso Florestal**, 2003. (Congresso)
13. Apresentação de Poster / Painel no(a) **II Oficina de Neurociências**, 2002. (Oficina)  
II Oficina de Neurociência.
14. Apresentação Oral no(a) **XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular**, 2002. (Congresso)  
XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular.
15. Apresentação Oral no(a) **XIV Salão de Iniciação Científica**, 2002. (Outra)  
XIV Salão de Iniciação Científica.
16. Apresentação Oral no(a) **XXVIII Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos**, 2002. (Outra)  
XXVIII Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos.
17. **V Encontro Gaúcho de Imunologia**, 2001. (Encontro)

---

### Outras informações relevantes

**1** Monitoria da disciplina MAT02218 - Bioestatística. Realizada no período de 01/04/01 a 15/05/02 sob a orientação da professora Sídia Maria Callegari Jacque, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Estágio Docente na disciplina Biologia Molecular básica (BIO12007) para o curso de Ciências Biológicas, da UFRGS, no segundo semestre de 2006, totalizando 60hs, ministrando aulas teóricas e práticas sob a orientação do professor Dr. Henrique Ferreira. Participação no Processo Seletivo para a contratação de Professor Substituto na área de Biofísica Geral, do Departamento de Biofísica, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, tendo sido aprovada e classificada na sexta colocação.

---

### **Citações em bases bibliográficas**

**Web of Science** Número total de citações : 87; Número de trabalhos : 9 Data : 25/03/2010  
Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações: Zamin LL