

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Isabel Cristina da Costa Araldi

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOMODIFICADOR DO
RESVERATROL SOBRE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA
(MCF-7) IRRADIADAS**

Santa Maria, RS
2016

Isabel Cristina da Costa Araldi

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOMODIFICADOR DO RESVERATROL
SOBRE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA (MCF-7) IRRADIADAS**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Curso de Mestrado do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, Área
de Concentração em Farmacologia dos
Processos Oxidativos, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM,RS),
como requisito parcial para obtenção
do grau de **Mestre em Farmacologia**

Orientadora: Prof^a Dr^a. Liliane de Freitas Bauermann
Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

da Costa Araldi, Isabel Cristina
Avaliação do efeito radiomodificador do resveratrol
sobre células de câncer de mama (MCF-7) irradiadas /
Isabel Cristina da Costa Araldi.- 2016.
58 p. ; 30 cm

Orientadora: Liliâne de Freitas Bauermann
Coorientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, RS, 2016

1. Radiação ionizante 2. Resveratrol 3. Radioterapia
4. Neoplasias 5. Radiossensibilização I. de Freitas
Bauermann, Liliâne II. Mânica da Cruz, Ivana Beatrice
III. Título.

Isabel Cristina da Costa Araldi

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOMODIFICADOR DO RESVERATROL
SOBRE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA (MCF-7) IRRADIADAS**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Curso de Mestrado do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, Área
de Concentração em Farmacologia dos
Processos Oxidativos, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM,RS),
como requisito parcial para obtenção
do grau de **Mestre em Farmacologia**

Aprovado em 28 de novembro de 2016:

Liliane de Freitas Bauermann, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Roselei Fachinetto, Dra. (UFSM)

Michel Mansur Machado, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo milagre da vida. Por guiar meus caminhos desde cedo, me proteger e me proporcionar diversas experiências.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela formação de qualidade desde a graduação e pela oportunidade de início das atividades docentes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento e incentivo à pesquisa.

À todos os mestres que passaram pela minha trajetória acadêmica. Estejam certos que toda atenção, cada palavra de incentivo, fizeram toda a diferença e ajudaram a traçar meu caminho para chegar até aqui.

À Prof. Dr^a. Liliane Bauermann, pela acolhida, orientação, carinho e exemplo de ser humano e profissional. Desde que cheguei ao Laboratório de Fisiologia Experimental em 2011, foi muito mais que uma orientadora, esteve comigo em muitos momentos importantes. Sou eternamente grata a ti!

À Prof. Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz, pela co-orientação, abertura das portas do Laboratório de Biogenômica para a execução deste trabalho.

À equipe de física médica do Hospital Universitário de Santa Maria, ao Tadeu e ao Nelson, que foram fundamentais para o processo de irradiação das amostras de câncer de mama.

Aos integrantes do Laboratório de Biogenômica pela acolhida e auxílio nos experimentos, em especial, agradeço a Francine, Fernanda e Verônica por todo o suporte técnico. A ajuda de vocês foi muito importante.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Experimental pela parceria e incentivo durante todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Alan e Marina pelo auxílio na estatística, pelo carinho e apoio na reta final de execução deste trabalho.

Aos meus grandes amigos, Cristiana, Flávia, Francieli, Jaqueline, Micheli, Tatiana. Embora a convivência diária não seja mais possível, saibam que são importantes para mim, e que moram no meu coração.

Aos meus amigos do EaD/CTISM, pela amizade e parceria de sempre, pelas conversas irreverentes e diversos momentos de descontração e alegria.

Aos meus amigos da Quarta Colônia, Tiago e Marina pela amizade e parceria.

À minha família pelo incentivo, em especial, aos meus pais, que desde cedo me mostraram por meio de seus exemplos de vida que o trabalho duro e a persistência são elementos fundamentais para o alcance dos objetivos de vida.

A todos os que de uma forma ou outra contribuíram para a execução deste trabalho.

Gratidão!

“Se não puder voar, corra.

Se não puder correr, ande.

Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito”.

Martin Luther King

RESUMO

AValiação DO EFEITO Radiomodificador DO RESVERATROL SOBRE CÉLulas DE CâNCER DE MAMA (MCF-7) Irradiadas

AUTORA: Isabel Cristina da Costa Araldi

ORIENTADORA: Liliane de Freitas Bauermann

CO-ORIENTADORA: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

As neoplasias malignas constituem um problema de saúde pública, sendo que, cerca de 600 mil novos casos de câncer estão previstos para o Brasil no biênio 2016-2017. Neste contexto, o câncer de mama (CM) é o mais incidente em mulheres, atingindo cerca de 28% das brasileiras. A radioterapia constitui em uma modalidade terapêutica amplamente empregada no tratamento de CM em diversos estágios. Porém, radiorresistência, síndrome cutânea da radiação, incidência de novas neoplasias em células saudáveis irradiadas compõem os principais efeitos colaterais dessa prática. Dessa forma, este trabalho buscou investigar o potencial do resveratrol (RV) como radiomodificador do tipo radiosensibilizador em células de CM da linhagem MCF-7. Para isso, as células foram tratadas inicialmente com diferentes doses de RV (0, 10, 30 e 100µM) por 24 horas e então foram expostas à radiação ionizante (RI) (0, 1, 2 e 3 grays). Os resultados mostraram que a combinação de tratamentos mais citotóxica foi 10 µM e 3 grays, sendo essas doses escolhidas para os testes complementares. A análise de morte celular através de citometria de fluxo mostrou que em culturas de 24 horas após a RI a necrose/senescência parece estar relacionada à citotoxicidade, além da ativação da via extrínseca da apoptose, fenômeno que ficou claro ao observar a alta atividade das caspases 3 e 8 e baixa na relação bax/bcl-2. Testes envolvendo o metabolismo oxidativo mostraram que RV+RI são eficazes juntos, no sentido de proporcionar alto dano oxidativo ao DNA, proteínas e lipídios celulares, bem como diminuir a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A alta expressão de p53, não está envolvida primeiramente na apoptose intrínseca, mas sim no bloqueio da fase S do ciclo celular, que foi observado em culturas de células 72 horas após a RI. Assim, a condição pro-oxidante estabelecida pela combinação dos tratamentos, junto ao alto nível de expressão de p53 permite sugerir que a diminuição expressiva da proliferação celular em culturas de 72 horas parece estar relacionada a parada irreversível de crescimento ligada a necrose/senescência, bem como a ativação da apoptose.

Palavras-chave: Radiação ionizante. Resveratrol. Radioterapia. Neoplasias. Radiossensibilização.

ABSTRACT

EVALUATION OF RESVERATROL RADIOMODIFIER EFFECT ON IRRADIATED BREAST CANCER CELLS (MCF-7)

AUTHOR: Isabel Cristina da Costa Araldi
ADVISOR: Liliane de Freitas Bauermann
CO-ADVISOR: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Malignant neoplasias constitute a public health issue, with around 600 thousand new cases of cancer projected to be diagnosed in Brazil between 2016 and 2017. In this context, breast cancer is the most common type in women, reaching around 28% of Brazilian women. Radiation therapy is a therapeutic modality commonly applied in cases of breast cancer in different stages. However, radioresistance, cutaneous radiation syndrome and the occurrence of new neoplasias in healthy cells are the main side effects of this practice. Therefore, the aim of this work was to assess the potential of resveratrol (RV) as a radiosensitizer radiomodifier on breast cancer cells of the lineage MCF-7. For this end, cells were initially treated with different RV doses (0, 10, 30 and 100 μ M) for 24 hours and then exposed to ionizing radiation (IR) (0, 1, 2 e 3 grays). The results show that the most cytotoxic treatment combination was 10 μ M and 3 grays, which were the doses chosen for the additional tests. Cellular death assessment through flow cytometry showed that, in 24 hours cell cultures after IR, necrosis/senescence seem to be related to cytotoxicity, besides the activation of extrinsic apoptosis. This phenomenon was clear when the high activity of caspases 3 and 8, and the low bax/bcl-2 ratio were observed. Tests involving oxidative metabolism show that RV and IR are effective together, causing great oxidative damage in DNA, proteins and cellular lipids, as well as diminishing the activity of the antioxidative enzymes dismutase (SOD) and catalase (CAT). The high expression of p53 indicates not to be primarily related to intrinsic apoptosis, but to be indeed related to the interruption of cell cycle in the S phase, which was observed in 72 hours cellular cultures after IR. Thus, the pro-oxidative condition established by the treatment combination, together with the high level of the p53 expression, allow us to suggest that the significant decrease of cellular proliferation in 72 hours cultures seems to be related to the irreversible growth interruption linked to necrosis/senescence, as well as apoptosis activation.

Keywords: Ionizing radiation. Resveratrol. Radiotherapy. Neoplasias. Radiosensitization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferentes fases do ciclo celular	14
Figura 2 - Fatores etiológicos envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama	16
Figura 3 - Radiólise da água.....	19
Figura 4 - Acelerador linear do HUSM.....	20
Figura 5 - Esquema terapêutico do planejamento de irradiação.....	21
Figura 6 - Formas isoméricas do resveratrol.	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Esquemas terapêuticos empregados no tratamento do câncer de mama	18
Tabela 2 - Descrição dos volumes de tratamento adotados na radioterapia.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BI-RADS®	<i>Breast Imaging Reporting and Data System</i>
CAT	Catalase
CTV	<i>Clinical Target Volume</i>
DCFH-DA	2'-7'- Diclorofluoresceína Diacetato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTNB	5,5 ditióbis (ácido nitro-benzóico)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GPx	Glutathiona Peroxidase
GTV	<i>Gross Tumor Volume</i>
Gy	Gray - Unidade de dose de radiação absorvida
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ICRU	<i>Internacional Commission on Radiation Units and Measurements</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
ITV	<i>Internal Target Volume</i>
IP	Iodeto de Propídeo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Mili Molar
MTT	3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanômetro
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PTV	<i>Planning Target Volume</i>
RI	Radiação Ionizante
RLs	Radicais Livres
RNA	Ácido Ribonucleico
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
μM	Micro Molar
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 CICLO CELULAR E CÂNCER	14
2.2 CÂNCER DE MAMA	15
2.2.1 Diagnóstico	17
2.2.2 Tratamento	18
2.3 RADIAÇÃO IONIZANTE E RADIOTERAPIA	18
2.4 RADIOMODIFICADORES E RADIOSSENSIBILIZADORES	23
2.5 RESVERATROL	24
3. OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. METODOLOGIA E RESULTADOS	27
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO	57
ANEXO B – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO GEP/HUSM	58

1. INTRODUÇÃO

As células somáticas normais possuem capacidade de divisão limitada, sendo que após determinados eventos de replicação, ocorre parada do crescimento celular. Entretanto, podem ocorrer alterações que acarretam na perda de controle do ciclo celular, conduzindo ao desenvolvimento de câncer (KING, 2007).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2015a), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo se disseminar para outras regiões do corpo. Por apresentarem alta velocidade na divisão, estas células tendem a ser muito agressivas e de difícil controle, o que determina a formação de tumores ou neoplasias malignas.

São estimados para o Brasil, no biênio 2016-2017, aproximadamente 600 mil novos casos de câncer. Excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma, as neoplasias com maior frequência serão em homens: câncer de próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Em contrapartida, nas mulheres, os cânceres de mama (CM) (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) estarão entre os mais incidentes (BRASIL, 2015b).

De acordo com Torre et al. (2015), estima-se que 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes por câncer ocorreram no ano de 2012 em todo o mundo. Os cânceres de pulmão e mama são os mais frequentemente diagnosticados e as principais causas de morte por câncer em homens e mulheres, respectivamente, tanto em termos globais como em países menos desenvolvidos.

O tratamento do câncer pode ser realizado através da quimioterapia, radioterapia e intervenção cirúrgica. A combinação de mais de uma modalidade terapêutica pode ser utilizada, sendo uma prática comum no tratamento da maioria das neoplasias malignas (BRASIL, 2011).

A radioterapia é amplamente utilizada por causar lesões nas células tumorais, diretamente em suas moléculas de DNA ou indiretamente em suas moléculas de água, através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (DOBRZUŃSKA, 2013). Entretanto, esses danos também podem acometer as células saudáveis dos tecidos adjacentes que inevitavelmente são irradiadas, em virtude de que o campo de irradiação, por mais que delimite a região do tumor, a região espalhada ainda é capaz de atingir tecidos circunvizinhos à área. Ao nível celular, a irradiação do tecido sadio pode levar à morte celular ou mesmo

mutações no DNA, o que pode levar ao surgimento de tumores secundários. Em relação aos pacientes, esta exposição indesejada pode levar ao surgimento de efeitos adversos como inflamação.

Acredita-se que determinados produtos naturais possuam capacidade de modificar a resposta da RI nos tecidos biológicos. Desta forma, é interessante a busca de substâncias radiomodificadoras naturais, visando potencializar o tratamento radioterápico sobre as células cancerígenas, mitigando os efeitos deletérios causados pela radiação às células circunvizinhas, aliado a facilidade de obtenção e consumo de tais compostos. Dentre os produtos naturais amplamente utilizados e com várias propriedades biológicas já descritas na literatura destaca-se o resveratrol (RV).

O RV é um metabólito secundário produzido por plantas como a videira (*Vitis sp.*), em resposta adaptativa ao estresse químico e mecânico. Apresenta diversas atividades biológicas já descritas, como antioxidante, anti-inflamatória e quimioterápica. Ele foi capaz de atuar contra diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (RAI et al. 2016; POZOGUIZADO et al. 2002, 2005).

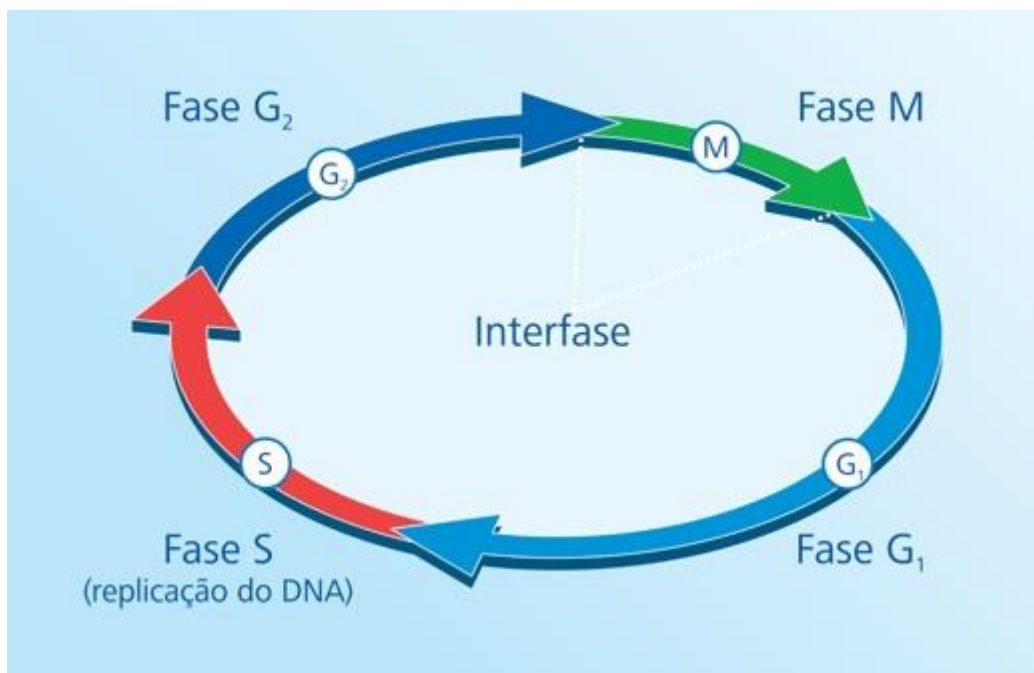
Logo, o presente estudo pretende investigar os efeitos do RV sobre células de câncer de mama da linhagem MCF-7 submetidas à RI (raios-X).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CICLO CELULAR E CÂNCER

A proliferação celular ordenada ocorre através de ciclos celulares, que por sua vez são divididos em intérfase e fase mitótica. Durante a intérfase a célula prepara-se para a divisão celular, tendo alta atividade metabólica. É dividida em três fases: G₁, S e G₂. A fase S corresponde a replicação do DNA e as fases G são períodos em que ocorre duplicação de componentes citosólicos. Células que permanecem muito tempo em G₂ e que não possuem capacidade de divisão, são ditas estar no estado G₀. A mitose (M), por sua vez, consiste na divisão celular propriamente dita, na qual a célula-mãe divide-se em duas células filhas de igual número cromossômico (TORTORA, 2010). A Figura 1 mostra as diferentes fases do ciclo celular.

Figura 1 - Diferentes fases do ciclo celular



Fonte: Marcel Jacques, adaptado de Alberts (2010).

Nas células humanas, existem mecanismos capazes de controlar a divisão celular, que podem ser ativados nos casos de danos ao DNA celular. A proteína p53 desempenha atividade

supressora tumoral através da interrupção da proliferação celular e da apoptose ou morte celular programada (VOUSDEN, 2002; RIVOIRE et al., 2001; BOLASÉLL et al., 2000). Em situações fisiológicas, p53 atua no reparo de danos durante as fases G1 ou S do ciclo celular, sejam eles induzidos ou espontâneos (BOLASÉLL et al., 2000). Caso haja falha nos mecanismos de reparo, seus níveis aumentam e inicia-se o processo de indução da apoptose, ou bloqueio irreversível do crescimento ligado à senescência (GUDKOV, KOMAROVA, 2003).

Havendo mutação de p53 ocorre a redução da possibilidade de eliminação de células geneticamente danificadas, o que pode levar ao início de um processo carcinogênico, visto que a consequência é a produção de proteínas sem capacidade de reparar danos ao DNA e que também não atua na via indutora de morte celular (RIVOIRE et al., 2001; VAGUNDA et al., 2006).

Outra forma de controle da divisão celular é através da limitação de números de vezes que determinadas células possam se dividir, devido ao encurtamento telomérico e a baixa ação da telomerase nestas células. Quando esse número de divisões é alcançado, a célula entra em senescência, o que não ocorre em casos de células cancerígenas, uma vez que aumentam a atividade da enzima telomerase, tornando-se praticamente imortalizadas (BOGO, 2009).

As neoplasias malignas ou câncer resultam de crescimento e proliferação celulares anormais, cuja propriedade característica é a capacidade de invasão de tecidos adjacentes através da corrente sanguínea ou vasos linfáticos, e formação de tumores secundários, denominados metástases (ALBERTS, 2010).

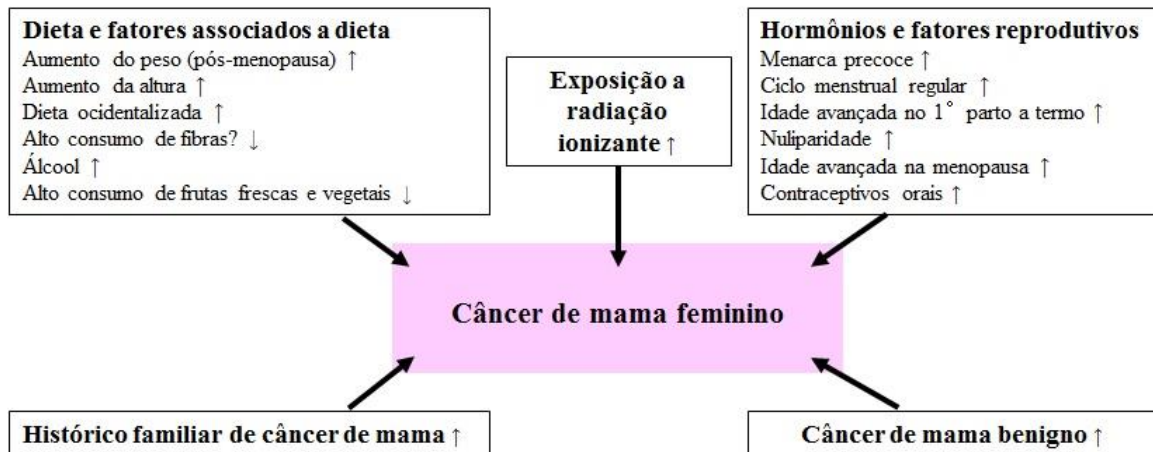
Neste sentido, os cânceres são classificados de acordo com os tecidos e tipos celulares dos quais derivam. Os derivados de células epiteliais são os carcinomas, de células de tecido conectivo e muscular são os sarcomas e os demais são leucemias e linfomas, por sua vez, são os que derivam de células da linhagem branca ou de suas precursoras (ALBERTS, 2010).

2.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama (CM) é o câncer mais frequentemente diagnosticado e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo, com número estimado de 1,7 milhões de casos e 521.900 mortes, em 2012. Sozinho, o CM é responsável por 25% de todos os casos de câncer e 15% de todas as mortes por câncer entre as mulheres (TORRE et al., 2015).

Muitos fatores estão envolvidos no desenvolvimento desta neoplasia, os genéticos/hereditários, comportamentais/ambientais, endócrinos/história reprodutiva e idade. A Figura 2 exemplifica os fatores etiológicos envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama (TAVASSOLI, DEVILEE, 2003).

Figura 2 - Fatores etiológicos envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama



Fonte: Adaptado de Tavassoli, Devilee (2003).

O carcinoma da mama invasivo é um grupo de tumores epiteliais malignos caracterizados por invasão de tecidos adjacentes e uma marcada tendência à metástase para locais distantes. A grande maioria destes tumores são adenocarcinomas e acredita-se que sejam derivados do epitélio parenquimatoso mamário, particularmente células da unidade lobular ductal terminal (TDLU). Carcinomas de mama exibem uma vasta gama de fenótipos morfológicos, tipos histopatológicos específicos e possuem determinados prognósticos ou características clínicas (TAVASSOLI, DEVILEE, 2003).

Um importante parâmetro utilizado para escolha do melhor tipo de tratamento é o nível de estadiamento do CM. Essa avaliação tem como objetivo proporcionar um bom prognóstico às pacientes de CM. O estadiamento clínico do CM envolve o cálculo aproximado do tamanho do tumor e a estimativa do envolvimento dos linfonodos axilares, pelo exame físico e a mamografia. Os tumores podem ser classificados em: estágio I (tumores < 2 cm e confinados à mama), estágio II (tumores < 5 cm com envolvimento ou não dos linfonodos axilares móveis), estágio IIIa (tumores > 5 cm, acompanhados ou não por envolvimento de linfonodos axilares), estágio IIIb (lesões mais avançadas) e estágio IV (todos os tumores com metástase à distância) (SINGLETERARY, CONNOLLY, 2008).

2.2.1 Diagnóstico

Com o intuito de facilitar a detecção precoce do CM é indicado o autoexame de mamas periódicos em mulheres sem sintomas. Ele consiste de uma técnica padronizada de observação e palpação das mamas. Segundo as Diretrizes para a Detecção Precoce do Câncer de Mama no Brasil (BRASIL, 2015c), o Ministério da Saúde indica os sinais clínicos considerados como referência urgente para exames complementares de diagnóstico, tais como:

- Aparecimento de nódulo mamário em mulheres com idade maior que 50 anos.
- Nódulo mamário em mulheres com mais de 30 anos, persistentes em mais de um ciclo menstrual.
- Nódulo mamário endurecido e fixo ou em crescimento, em mulheres, independente da idade.
- Lesão da pele não responsiva a tratamentos tópicos.
- Tumor palpável unilateral em homens acima de 50 anos.
- Aumento progressivo do tamanho da mama com a presença de sinais de edema, como pele com aspecto de casca de laranja.
- Alteração na forma do mamilo.

Em relação ao diagnóstico das lesões palpáveis, a ultrassonografia (USG) é o método recomendado de avaliação por imagem, em mulheres até 34 anos e para mulheres com 35 anos ou mais indica-se a mamografia. Em contrapartida, para o diagnóstico das lesões não palpáveis, é seguida a proposta do *Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS®)*, publicado pelo Colégio Americano de Radiologia (ACR) e recomendada pelo Colégio Brasileiro de Radiologia (CBR). Dependendo da categoria na qual as lesões mamárias se encontram, são indicados controles radiológicos além do histopatológico. Neste último, o resultado apresenta a descrição das características da neoplasia, do estado linfonodal, do comprometimento das margens cirúrgicas de ressecção e o resultado dos marcadores prognósticos avaliados por imunohistoquímica (BRASIL, 2004).

2.2.2 Tratamento

As modalidades terapêuticas empregadas no tratamento do CM são a cirurgia e a radioterapia, para o tratamento loco-regional, e quimioterapia e hormonioterapia, para tratamento sistêmico (BARROS et al., 2001).

Em casos de detecção precoce, há maior possibilidade de cura, enquanto que em caso de metástases, o objetivo do tratamento é melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevida da paciente (BRASIL, 2016).

Para a escolha do melhor esquema terapêutico são levados em conta o estadiamento da doença, idade, comorbidades, menopausa, além de preferências da paciente (BRASIL, 2016). A Tabela 1 mostra um resumo dos esquemas terapêuticos preconizados pelo INCA, de acordo com o estadiamento da doença.

Tabela 1 - Esquemas terapêuticos empregados no tratamento do câncer de mama

Estágios	Esquema terapêutico
I e II	1º Cirurgia e tratamento complementar com radioterapia em alguns casos. 2º Tratamento sistêmico em situações de risco de recorrência (idade da paciente, comprometimento linfonodal, tamanho tumoral, grau de diferenciação).
III	1º Tratamento sistêmico (geralmente quimioterápico). 2º Tratamento local (cirurgia e radioterapia).
IV	1º Tratamento sistêmico. Tratamento local apenas em casos de indicações restritas.

Fonte: Adaptado de BRASIL (2016).

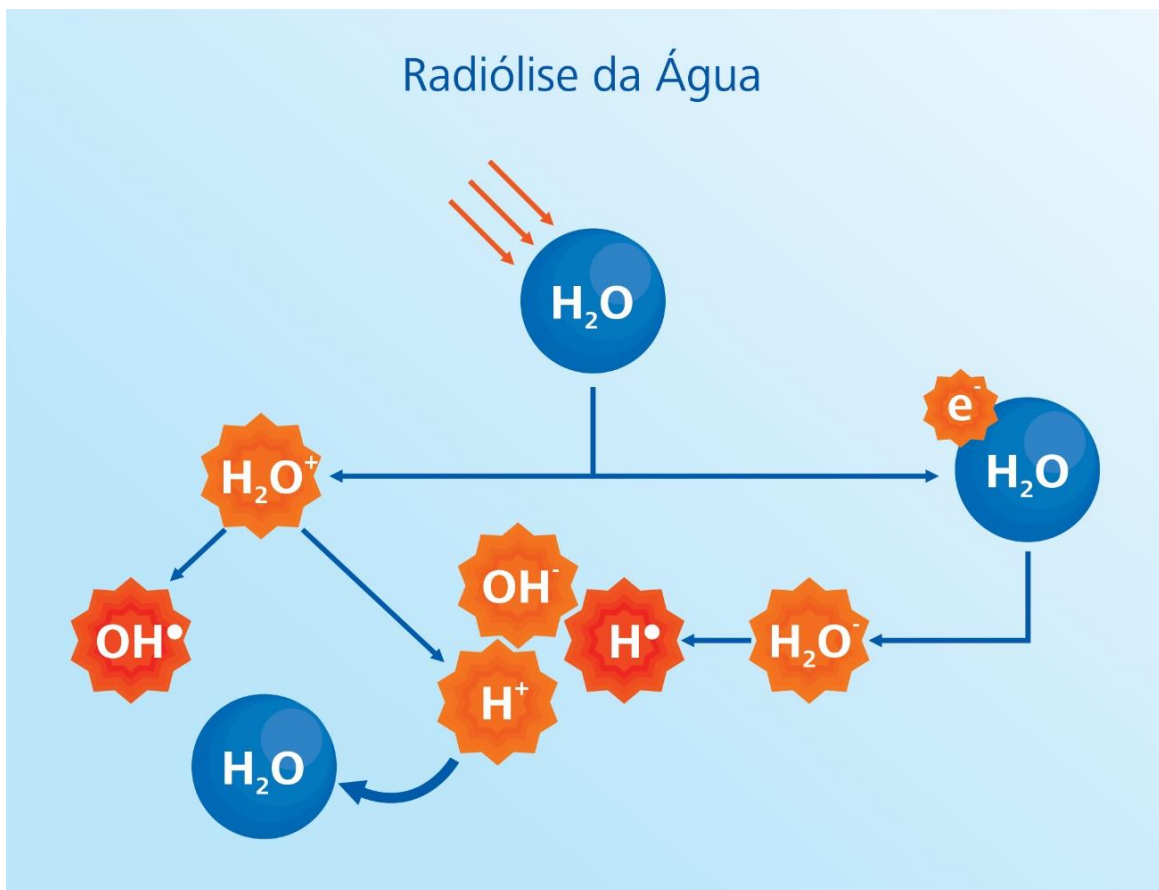
2.3 RADIAÇÃO IONIZANTE E RADIOTERAPIA

A radiação ionizante (RI) é a radiação eletromagnética ou partícula de alta energia que, ao interagir com o meio absorvedor, possui a propriedade de transferir, de forma integral

ou parcial, energia para os átomos e moléculas deste meio, resultando no fenômeno chamado ionização (KAPLAN, 1978).

Nas células vivas, a RI pode provocar alterações químicas e biológicas. Isto pode ocorrer de forma direta através da interação com biomoléculas e causando a quebra de ligações químicas. Desta forma, pode danificar diretamente a principal molécula celular, o DNA, através da quebra de uma ou ambas as fitas. Indiretamente, a radiação interage com moléculas de água, o maior constituinte celular, provocando o rompimento de suas ligações (radiólise), culminando na produção de Radicais Livres (RLs) e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (Figura 3). Logo, estes produtos da radiólise da água podem interagir e provocar danos em ácidos nucleicos, proteínas e lipídios celulares (AZZAM et al., 2012).

Figura 3 - Radiólise da água



Fonte: Marcel Jacques, adaptado de CNEN.

Por ter esse mecanismo de ação, a RI é amplamente utilizada no tratamento de neoplasias. Cerca de 50% dos pacientes com câncer são tratados com RI. Em muitos casos, ela é eficaz, causando o desaparecimento do tumor e controle da doença. Nos demais, pode levar a regressão do tamanho do tumor, o que alivia a pressão, reduz hemorragias, dores e outros sintomas, proporcionando alívio aos pacientes (BRASIL, 2011; HILLMAN, SINGH-GUPTA, 2011).

A teleterapia, é uma modalidade de radioterapia em que a fonte de radiação é externa ao paciente, ou seja, não invasiva, posicionada a no mínimo 20 cm de sua superfície. É empregada para o tratamento de tumores superficiais ou localizados a uma profundidade de aproximadamente 10 cm no paciente ou então em situações de intervenção radiocirúrgica. Dessa forma, são utilizados, na maioria das aplicações, feixes de raios γ das máquinas de telecobaltoterapia ou raios-X e elétrons de altas energias gerados por aceleradores lineares. (SILVA, 2008).

No Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), é amplamente utilizado o acelerador linear para o tratamento radioterápico (Figura 4).

Figura 4 - Acelerador linear do HUSM.



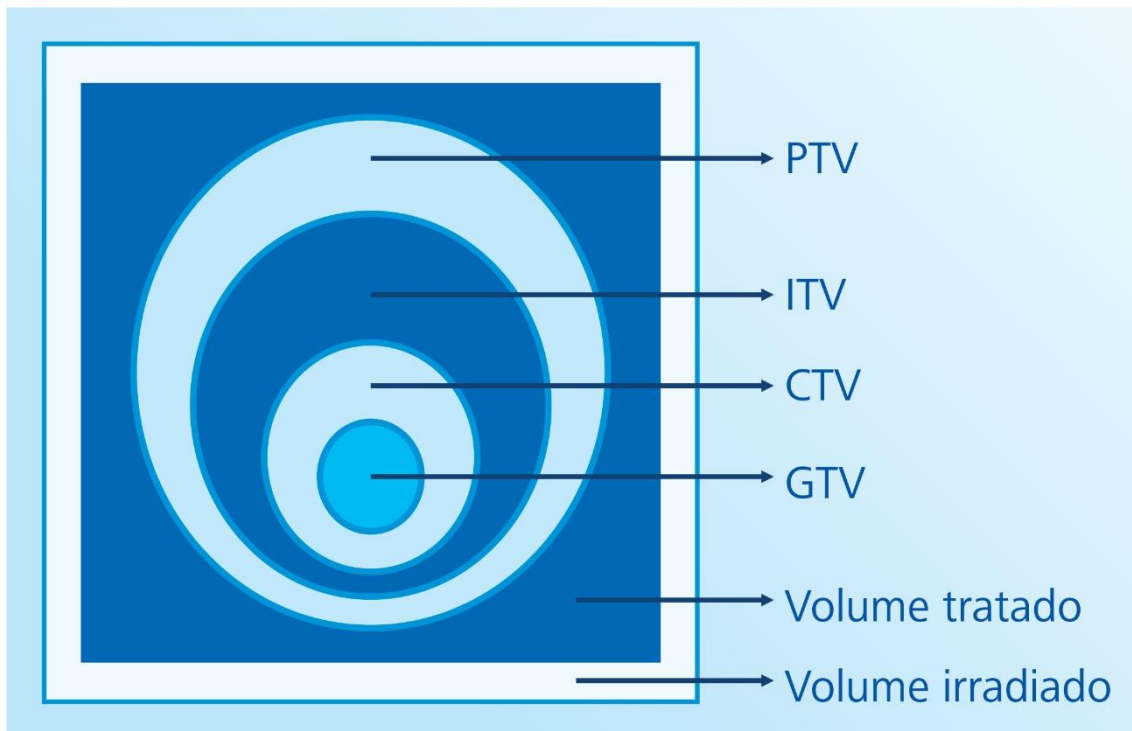
Fonte: Isabel Cristina da Costa Araldi.

Este equipamento usa microondas de frequência de 3,0 GHz para acelerar elétrons, através de um tubo linear. Os elétrons ganham energia viajando em fase com o campo elétrico que é formado no interior do tubo acelerador. O próprio feixe de elétrons de alta energia pode ser usado no tratamento de tumores superficiais, ou pode atingir um alvo para produzir raios-X para tratar tumores profundos (SILVA, 2008).

Para o planejamento e execução do tratamento radioterápico no Brasil, são seguidas a norma ICRU-50 (*Internacional Commission on Radiation Units and Measurements*) e a ICRU-62. Elas contêm informações para prescrição, registro e relato dos tratamentos com feixes de fótons (BRASIL, 2000).

Segundo essas normas, a determinação da área a ser irradiada é iniciada antes mesmo do planejamento, onde se define o GTV (“*gross tumor volume*”/volume tumoral) e CTV (“*clinical target volume*”/volume alvo). Durante o planejamento, são determinados órgãos de risco, o ITV (“*internal target volume*”/volume interno do alvo) e PTV (“*planning target volume*”/volume de planejamento). Após o planejamento, são definidos mais dois volumes, o volume tratado e o volume irradiado (BRASIL, 2000). A Figura 5 esquematiza as áreas irradiadas enquanto a Tabela 2 apresenta a definição dos diferentes volumes utilizados como referência para o tratamento radioterápico

Figura 5 - Esquema terapêutico do planejamento de irradiação



Fonte: Marcel Jacques, adaptado de Brasil (2000).

Tabela 2 - Descrição dos volumes de tratamento adotados na radioterapia

Volume	Definição
GTV – Volume Tumoral Visível	É relacionado à área com maior concentração de células malignas. Sua delimitação é feita por análise da anatomia topográfica e biologia celular.
CTV – Volume Tumoral Clínico	Corresponde ao volume de tecido com GTV visível e/ou doença maligna microscópica subclínica. O delineamento do CTV é determinado por meio de anatomia topográfica, sem levar em consideração a movimentação do paciente e órgãos, e também, fatores técnicos.
ITV – Volume Interno do Alvo	Volume é a soma do CTV com a IM (margens internas), isto é, leva em consideração a variação da posição e forma.
PTV – Volume de Planejamento	O PTV é o CTV acrescido das margens de erros (IM + SM - <i>Margem de Set-up</i> (posicionamento)). Busca garantir que todos os tecidos inclusos no CTV recebam a dose prescrita.
Volume Tratado	VT é o volume de uma isodose de escolha do radioterapeuta a fim de alcançar o objetivo do tratamento. Leva em considerações limitações técnicas.
Volume Irradiado	Corresponde ao volume tecidual que recebe uma dose significativa em relação a tolerância dos tecidos normais. É limitado de acordo com a técnica de tratamento utilizada.

Fonte: Adaptado de BRASIL (2000).

No entanto, existem algumas limitações decorrentes da aplicação desta modalidade terapêutica, sendo eles os efeitos colaterais imediatos e tardios e a radiorresistência das células tumorais (HILLMAN, SINGH-GUPTA, 2011). No caso de pacientes em tratamento de CM, o tratamento radioterápico conduz frequentemente à síndrome cutânea da radiação, com sensação de queimadura e peso na região irradiada além de inchaço. Outro efeito colateral comum relatado é o cansaço. Essas alterações tóxicas tendem a desaparecer em até 12 meses, e, em alguns pacientes, a mama pode ficar com aspecto mais rígido e de menor tamanho. Algumas mulheres relatam dor na mama. E, em menor proporção, pode ocorrer fratura da costela, e o desenvolvimento de novos tumores (NCCN, 2012).

Uma maneira de amenizar os efeitos colaterais e potencializar o efeito da RI sobre células tumorais é a utilização de compostos radiomodificadores do tipo radiosensibilizadores.

2.4 RADIOMODIFICADORES E RADIOSENSIBILIZADORES

Radiomodificadores são substâncias capazes de reduzir os efeitos prejudiciais da RI. Para a clínica, é interessante que os radiomodificadores tenham nenhuma ou baixa toxicidade e ação sinérgica com outras drogas. Ainda não existem compostos que possuam estas propriedades, e dentre os já desenvolvidos, a Amifostina[®] mostrou-se mais eficiente, sendo autorizada apenas para o tratamento radioterápico do câncer de cabeça e pescoço (ANDRADE et al., 2009), porém, apresenta elevada toxicidade (HALL, 2006). Assim, para células de câncer a redução dos efeitos deletérios ao organismo se dá através do emprego de substâncias/esquemas terapêuticos que atuem na radiosensibilização, potencializando o tratamento radioterápico.

Os radiosensibilizadores são agentes químicos ou farmacológicos que aumentam os efeitos letais da radiação se for administrada de forma concomitante. Foram descobertos ao longo dos anos muitos compostos que modificam a resposta à radiação nas células de mamíferos, mas não são utilizados na prática porque eles não mostram um efeito diferencial entre tumores e tecidos normais, ou seja, aumentam a sensibilidade de células tumorais e normais na mesma medida (HALL, 2006).

Um parâmetro empregado na avaliação da radiosensibilização induzida por compostos é a capacidade de atuar na citotoxicidade e diminuição da proliferação celular (FANG, et al. 2013).

Em relação ao ciclo celular, sabe-se que a sensibilidade à RI aumenta nas fases mais proliferativa (fase M e G2), sendo que a mesma diminui na síntese de DNA (fase S). Especificamente para nêutrons e raios-X a maior sensibilidade à radiação é observada na mitose e a menor sensibilidade no final da fase S (ANDRADE, BAUERMANN, 2010).

Segundo Andrade e Bauermann (2010), os mecanismos envolvidos nas alterações da radiosensibilidade ao longo do ciclo não estão completamente elucidados, tendo dois modelos propostos e indícios de relação genótipo-dependente. O primeiro modelo leva em consideração as mudanças no envelhecimento e quantidade de material genético. Assim, a fase da mitose é muito radiosensível devido ao alto nível de compactação do DNA, o que o torna inacessível às enzimas de reparo (SEGRETO, 2000). Já o segundo modelo defende a ideia de

que existe a correlação entre a radiosensibilidade da célula e a variação dos níveis de sulfidrila nas diferentes etapas do ciclo celular, sendo a radiosensibilidade proporcional à sua concentração (ANDRADE, BAUERMAN, 2010).

Alguns compostos naturais têm demonstrado potencial na radiosensibilização de células tumorais, como a curcumina, isoflavonas da soja e resveratrol (GIRDHANI et al. 2009; HILLMAN, SINGH-GUPTA, 2011; FANG, 2012, 2013).

2.5 RESVERATROL

Estudos recentes têm demonstrado que a dieta inadequada pode influenciar no desenvolvimento do câncer. Nos Estados Unidos da América (EUA), são estimadas que 1/3 das mortes relacionadas ao câncer poderiam ser evitadas através de uma modificação na dieta, sugerindo que o aumento do consumo de frutas, vegetais e grãos pode ser usado como uma estratégia para reduzir a incidência de câncer (VENUGOPAL, LIU, 2012). Dessa forma, alimentação saudável é reconhecida para prevenção e tratamento do câncer (GREENWALD, 2004; ABUJAH et al., 2015).

O resveratrol (RV) (3,5,4' – trihidroxiestilbeno) é um composto polifenólico, incluso no grupo das fitoalexinas sintetizado nas plantas em resposta ao estresse em casos de ataque fúngico, dano mecânico e radiação ultravioleta (SAUTTER et al., 2005). Dentre as plantas que o produzem, destacam-se as videiras (*Vitis labrusca*, *Vitis vinífera*) e a casca da uva é a porção da planta onde há maior concentração desse composto. Logo, tanto o vinho como o suco de uva constituem boas fontes de RV.

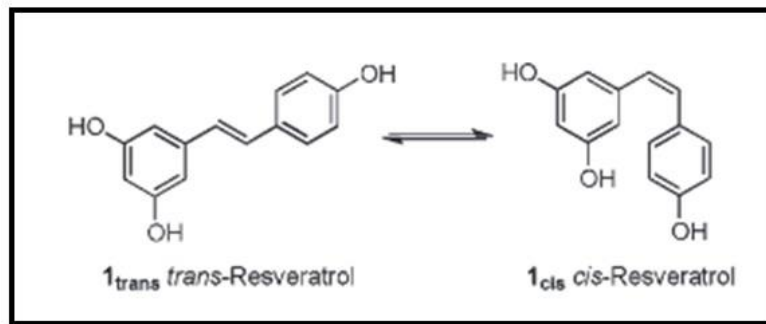
As plantas sintetizam duas formas isoméricas de RV: o *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e o *cis*-resveratrol (*cis*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno). Contudo, a forma *cis* é pouco estável, e transforma-se em *trans* na presença de luz visível (RODRÍGUEZ et al., 2012).

Dentre as inúmeras atividades descritas para este polifenol, destacam-se ação antioxidante (LEONARD et al., 2003; MARTÍN et al., 2004), cardioprotetora (HUNG et al., 2000; GURUSAMY et al., 2010), anti-inflamatória (SUBBARAMAIAH et al., 1998), além de atividade antitumoral (KULKARNI, CANTÓ, 2015; SCHNEIDER et al., 2000). Em relação à atividade quimioterápica, o RV mostrou-se eficaz contra linhagens de câncer de mama, tireóide, leucemia, câncer cólon retal, ovário e próstata (FANG et al., 2013; RAI et al., 2016).

Pozo-Guizado (2002, 2005) elucida a influência do RV sobre a apoptose em células de CM da linhagem MCF-7. Além disso, Rai et al. (2016), observaram a ação quimiossensibilizadora do RV em células MCF-7 e MDA-MB 231, por meio da inibição da proliferação celular e indução da apoptose potencializando o efeito da doxorrubicina, fármaco utilizado no tratamento quimioterápico do CM.

Entretanto, embora existam alguns estudos que mostram o potencial de algumas substâncias naturais como radiosensibilizadoras (HILLMAN, SINGH-GUPTA, 2011; PORTO, 2012), existe uma carência de estudos relacionando a ação radiosensibilizadora do RV em CM.

Figura 6 - Formas isoméricas do resveratrol.



Fonte: Adaptado de Rodríguez et al. (2012).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito radiomodificador do RV em células de câncer de mama da linhagem MCF-7 expostas à RI.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir da exposição das células neoplásicas MCF-7 ao RV e a RI, pretende-se avaliar seus efeitos:

- Na viabilidade e proliferação celular, por meio dos testes de citotoxicidade do Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), morte e distribuição de células no ciclo celular por meio de análise de citometria de fluxo.

- Em marcadores do metabolismo oxidativo, através do teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), teste de carbonilação de proteínas, atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e quantificação da 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina;

- Na atividade de enzimas associadas à apoptose, caspase 3 e caspase 8.

- Na expressão de genes associados à apoptose e à proliferação celular (Bax, Bcl-2 e p53).

4. METODOLOGIA E RESULTADOS

A metodologia e os resultados deste estudo estão organizados sob a forma de um manuscrito científico submetido na revista *Toxicology in Vitro*.

Título: The in vitro resveratrol effect on MCF-7 breast cancer cells ionizing radiation exposed

Autores: Isabel Cristina da Costa Araldi^{1,2}, Verônica Farina Azzolin^{1,3}, Fernanda Barbisan^{1,3}, Francine Carla Cadoná³, Cibele Ferreira Teixeira^{1,3}, Fernando Primitivo Romero Bordin², Tadeu Baumhardt⁴, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,3}, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte³, Liliane de Freitas Bauermann^{1,2}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

² Laboratório de Fisiologia Experimental, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

³ Laboratório de Biogenômica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

⁴ Hospital Universitário de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

* The author to whom correspondence should be addressed. Tel: +55 5532209380; Fax: 55 5532208241; E-mail: lgfbauermann@gmail.com

Abstract

Radiation therapy is commonly applied in cases of breast cancer. However, radioresistance and side effects are limiting factors of this practice. Therefore, studying substances that can enhance the radiation effect and, at the same time, protect normal cells is very relevant. Thus, the aim of this work was to assess the radiosensitizer effect of resveratrol (RV) on breast cancer cells (MCF-7). A bigger cytotoxic and antiproliferative effect was observed in the treatment with 10 μ M of resveratrol + 3 ionizing radiation (IR) grays. Our results indicate that, after 24 h of cell culture, an induction of necrosis/senescence occurred, besides the activation of extrinsic apoptosis pathway through a decrease of Bax/Bcl-2 ratio and a high activity of caspases 3 and 8. Moreover, our data show that this treatment affects oxidative cell metabolism, increasing oxidative protein, lipid and membrane damage, and also acts to decrease the antioxidant enzyme activity. The antiproliferative effect on 72 h cultures may be associated with the high expression of p53 and interruption of cell cycle in the S phase. Therefore, our results suggest that resveratrol has a potential in the radiosensitization of breast cancer cells.

Keywords

Radiotherapy; Breast cancer; Resveratrol; Antioxidant; Radiomodifier; Radiosensitizer.

Introduction

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer and the major cause of cancer death among women worldwide. This cancer is solely responsible for 25% of all cancer cases and 15% of all cancer deaths among women [1,2]. Due to the complex breast cancer biology, it is necessary to use multiple therapeutic modalities, including combinations of radiation and chemotherapy in addition to surgery [3]. Therefore, approximately 50% of cancer patients are treated with ionizing radiation (IR) to destroy cancer cells, and it plays an important role in local control after surgery [3,4].

Despite the clinical relevance of IR, radioresistance is one of the great problems that hinder the breast cancer treatment due to intrinsic radiosensitivity of each individual [5,6]. A strategy to minimize this problem could be the use of active molecules, which could selectively act to increase the radiosensitivity of breast tumor cells. Moreover, these molecules could also mitigate the effects of IR in tissue adjacent healthy cells irradiated during radiotherapy treatment, and even the bystander effect.

Resveratrol (RV) (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a phytoalexin synthesized in plants in response to stress caused by fungal attack, mechanical damage and ultraviolet radiation [7]. Among several biological functions assigned to it, there is a chemotherapeutic activity against breast and other cancers, such as leukemia, lymphomas, and colon, prostate, liver, melanoma, lung, head, neck and pancreas cancer [8,9,10,11].

Despite existing some studies evaluating RV effect on cancer cells exposed to IR, investigations in breast cancer cells are still incipient. There are few previous studies investigating the possible radio sensitizing effects of RV in cancer [12,13,14,15]. Therefore, we decided to investigate the *in vitro* effects of RV on the irradiation response in MCF-7 breast cancer cells; evaluating viability, apoptosis induction, and proliferative cell modulation.

Material and Methods

The investigation was performed using the human breast cancer cell line MCF-7 (ATCC® HTB-22™) in controlled conditions. The cells were exposed to RV and IR. Their effect on viability, cell proliferation, cell cycle modulation and oxidative metabolism parameters were subsequently evaluated.

Cell culture conditions

The cancer cell line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS), supplemented with 1% penicillin/streptomycin and amphotericin B. The cells were cultured at 37°C with 5% CO₂ and were expanded to reach the optimal amount for the experiments. Cell suspension was placed in cell culture bottles (2.5 × 10⁵ cells/well).

Treatment with RV and IR

After cell attachment, seventy percent confluent MCF-7 cells were treated with RV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 0, 10, 30 e 100 µM concentrations for 24 h. Then, the cell culture bottles (75 cm²) containing Hank's solution were irradiated with X-rays (1, 2 and 3 Gy) on an Elekta linear accelerator, Precise System model (Elekta, Stockholm, Sweden) at room temperature. Further, the cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 24 and 72 h in order to realize the assays.

Viability and cell proliferation assay

The MCF-7 viability and cellular proliferation were firstly evaluated by MTT Assay. The supernatant of the treatments was removed and the cells were resuspended in phosphate buffer (PBS, 0.01 M; pH 7.4). The MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyltetrazolic bromide) reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in a 5 mg/mL PBS added into a 96-well plate containing the sample treatments and was incubated for 1 h at 37°C. Next, the supernatant was removed from the wells and the cells were resuspended in 200µL of DMSO (dimethyl sulfoxide). The absorbance at 560 nm was read in the

fluorimeter[16].

After viability and cell proliferation assays, the best doses of RV and IR for further analysis were chosen.

Apoptosis and cell cycle by flow cytometry

Complementary analysis of flow cytometry was performed to confirm the treatment cytotoxicity using Annexin-V-FITC and Propidium Iodide (PI) staining kit (BD Pharmingen™). Annexin-V-FITC can detect early apoptotic process, whereas PI allows late or necrotic apoptotic cells to be identified. The detection is completed through the bond the cell receptors form with these fluorescents antibodies, Annexin-V and PI. The analysis was performed following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded in 6-well plates at 1×10^6 cells per well in 2 mL of different treatments in DMEM and were incubated for 24 h. Following incubation, the cells were trypsinized in order to ensure that they were detached, and washed twice with cold PBS before being resuspended in 1X Binding Buffer at a concentration of 1×10^6 cells/mL. After transferring the cells into 100 μ L of the solution (1×10^5 cells), the contents were placed into a 5 mL culture tube. The resuspended cells were subjected to a gentle vortex and stained with 5 μ L of Annexin-V-FITC and 5 μ L of PI. Right after a short incubation (15 min) in the dark at room temperature, 400 μ L of 1X Binding Buffer was added to each tube, and the cell fluorescence was analyzed by flow cytometry according to the manufacturer's specifications [17].

The cell cycle analysis [18] was also performed using flow cytometry after 24 h of the cells' irradiation process. The PI reagent binds to the DNA by intercalating between the bases with little or no sequence preference. PI also binds to RNA, making it necessary to treat with nucleases in order to distinguish between RNA and DNA staining. In our work, cells were seeded in 6-well plates at 5×10^4 cells per well in 2 mL of different treatments in DMEM and were incubated for 24 h. Following incubation, the cells were trypsinized, washed with PBS and resuspended in 70% ethanol. Next, the cells were stored at -20°C overnight. In order to conduct the analysis, the cells were centrifuged and washed once with PBS, before being resuspended in 500 μ L PI-solution in PBS: 50 μ g/mL PI from 50 \times stock solution (2.5 mg/mL) 0.1mg/mL RNase A 0.05% Triton X-100 and incubated for 40 min at 37°C . Lastly, 3 mL of PBS were added to wash the cells and to perform resuspension in 500 μ L PBS in order to conduct flow analysis.

Furthermore, we determined the influence of this treatment on caspases 3 and 8

activities by Assay Kits, Fluorimetric (BioVision, Mountain View, CA). The fluorescence intensity of caspase-3 and caspase-8 were recorded at a 400 nm wavelength for excitation, and at a 505 nm wavelength for emission. The caspase's activity was calculated as Fluorescence intensity (FI)/min/ml= $\Delta FIt/(t \times v)$, where ΔFIt = difference in fluorescence intensity between time zero and time t minutes, t = reaction time in min, and v = volume of sample in mL. All results were obtained from three independent experiments. Protein content was determined by Labtest[®] kit.

Gene expression analysis by RT-PCR (qRT-PCR) analysis

Total RNA was extracted using Trizol, accordingly to the manufacturer's instructions (Ludwing-Biotec, Brazil). The extracted RNA was measured by Thermo Scientific NanoDrop[™] 1000 Spectrophotometer at a 532 nm wavelength. In order to execute the reverse transcription, RNA was used, whereby the samples of RNA (1 µg/mL) were added to 0.2 µL of DNAase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C for 5 min, followed by heating at 65 °C for 10 min. The cDNA was generated with 1 µL of Iscript cDNA and 4 µL of Mix Iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA). The reaction consisted on the upcoming steps: heating at 25 °C for 5 min, at 42 °C for 30 min, and at 85 °C for 5 min, following incubation at 5 °C for 60 min. qRT-PCR was performed in the Passo One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) with SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at 95 °C for 3 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. The reactions of each sample were made in triplicate, using 0.5µM of each primer and 2X Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for the final volume of 15 µL. The Beta-acting gene played the housekeeping role [19]. Table 1 shows the primers used on qRT-PCR analysis.

Table 1 here

Oxidative metabolism assays

To evaluate the MCF-7 cells response in relation to RV plus IR on oxidative metabolism markers, we performed the protein carbonylation assay according to Montagner et al. [20]. The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, 8- hydroxy-2'-deoxyguanosine, activity of antioxidant enzymes, catalase (CAT), superoxide dismutase

(SOD) and glutathione-peroxidase (GPx) determination using Kits Abcam according to the instructions of the manufacturer with microplate reader Thermo Scientific Multiskan® EX.

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). All experiments were replicated three times. To perform the statistical analysis, we used mean \pm standard error of each independent experiment.

To calculate means of each treatment, outlier's data from repeated wells with variation bigger than 20% were excluded, since it clearly represented experimental errors. The results related to viability and antiproliferative effect of RV and IR were expressed as a percent (%) of control group. Therefore, the data were submitted to two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey Test. The statistical tests were performed using Graph Pad Prism Software.

Results

The RV effects at different concentrations of breast cancer irradiated at 1, 2 and 3 Gy were evaluated in 24 h cell cultures (Figure 1). The radiosensitivity effect of RV was not dose-dependent since a higher cytotoxic effect was found when breast cancer was exposed to 10 μ M RV at 3 Gy IR.

Figure 1 here

Potential apoptosis induction by RV treatment was evaluated and the results are presented in Figure 2. As expected, IR triggered higher necrosis on breast cancer cells. The RV treatment with and without IR did not change this pattern. A complementary analysis did not find activation of genes associated with intrinsic apoptosis pathway (Bax/Bcl-2 ratio and p53) when compared with the control group. However, caspases 3 and 8 were upregulated in cells that were only irradiated and exposed to RV plus IR, indicating activation of extrinsic apoptosis pathway.

Figure 2 here

The RV effect on oxidative metabolism of breast cancer with and without IR was also

analysed (Figure 3). In 24 h cell cultures, IR presented similar protein carbonylation levels to the ones in the control cells. However, RV triggered higher protein carbonylation levels and this effect was highly potentiated when cells were concomitantly treated with RV and IR. However, this effect disappeared in 72 h cell culture cells. Whereas any treatment increased significantly lipoperoxidation of 24 h cell cultures, in 72 h higher lipoperoxidation levels were observed in breast cancer cells exposed to RV. This result was potentiated when cells were concomitantly treated with RV plus IR. IR or IR plus RV presented a strong genotoxic effect on breast cancer cells evaluated by 8-deoxyguanosine levels. However, cells exposed just to RV did not change the DNA damage pattern when compared to untreated control group.

Treatment modulated significantly antioxidant enzymes levels. Cells treated just with RV presented higher SOD and catalase levels than the control group. However, levels of this enzyme were lower in the presence of IR or IR plus RV. On the other hand, all treatments increased significantly GPx levels in relation to the control group.

Figure 3 here

An exploratory analysis by MTT assay of RV effect on the breast cancer cell cycle was performed (Figure 4A). Results showed that, when cells were concomitantly treated with 10 μ M RV and IR, a strong cell proliferative inhibition was observed in breast cancer cell cultures. The other RV concentrations did not showed similar results.

Cell cycle analysis showed an important synergic effect between RV and IR, since cells concomitantly exposed to these agents interrupted cell cycle in the S phase (Figure 4B). Isolated cells exposed to RV or IR did not showed any effect on breast cancer cultures.

Figure 4 here

Discussion

Radioresistance is a great problem related with the radiotherapy used to treat breast cancer. Therefore, investigations searching radiomodifiers molecules that could potentiate IR effect are relevant. Considering the robust evidence that RV has antitumor effect, the present study investigated the interaction between IR and RV on breast cancer cells. In general, our

results indicated that RV could improve IR.

Treatments showed an increased of cytotoxic effects in 24 h culture MCF-7 cells at 10uM plus 3 grays. This fact may be associated with antitumor activity described on RV in cancer cells [21,22] associated with RI effects such as EROs production.

Lang et al [23] demonstrated the influence of RV concentration on cellular viability treating ovarian cancer cells (OVCAR-3) with 30 and 100uM for 48 h with RV. The highest concentration presented a high rate of premature apoptosis, late/necrosis, whereas the lowest decreased these levels considerably. These results help to explain the cytotoxic effects found on our work, since, besides the decline of viable cells in 10uM+3Gy, we observed necrosis followed by apoptosis as the major types of death on treatments RV, IR, RV+IR, possible influenced by doses and exposure time. The cytotoxic effect of RV+IR may be due to the sensitizer effect of RV, which added to that of IR, is known to lead to cellular death by necrosis and apoptosis [24].

Flow cytometry analyses appoint to cells that were only irradiated showing more apoptosis index than others, which is evidenced for caspases 3 and 8 activities. RV+IR treatment also showed high caspases activities. Thus, the Bax/Bcl-2 ratio and caspases activities suggest extrinsic apoptosis pathway activation for RV+IR treatment.

Kim et al [25] studied different doses of RV (0; 12.5; 25; 50 e 100) in MCF-7 cells treated for 48 hours. RV proved to help decreasing cell viability and inducing apoptosis in a dose-dependent manner, with bax increase, bcl-2 decrease and caspase 9 activation.

Pozo-Guisado et al [8] also observed an increase in the MCF-7 cells' apoptosis index, given that from 50uM, RV induced a decrease of bcl-2 in a dose-dependent manner. This result is in accordance with the ones found on our experiment, since there was no increase rate of bax/bcl-2 in the treatments at a 10 uM of RV. Therefore, it is possible to suggest that low doses of RV, IR and RV+IR can active first the extrinsic apoptosis pathway.

In our work, 10 uM of RV alone was not enough to increase caspases activity, however, it increased p53 activity. The p53 protein has an essential role in tumoral suppression [26,27]. The major p53 expression was found in RV treatment. This result is in accordance to other researches that indicate the antiproliferative effect of this polyphenol. Chin et al [28] treated MDA-MB-231 breast cancer cells with RV (10 μ M RV for 4 h daily \times 6 d) and observed an increase of this gene expression. Kundu & Surh [29] showed the antiproliferative effect of RV, acting on D1 cyclin and Cdk4 in human prostate (DU-145) (MCF-7) and breast cancer cells, associated with an induction of p53 and p21^{WAF1/CIP1}.

RV+IR treatment also presented a high level of p53, higher than the one of cells that

were only irradiated. This can be explained by the influence association of the p53 expression activation by RV allied with damage to the double-strand DNA due to irradiation consequences, which was demonstrated by the high production of 8- deoxyguanosine.

It is believed that the damage caused to the DNA, allied with the oxidative mitochondrial damage in response to IR, has caused the p53 expression. The p53 superexpression is characterized by acting to retain cells in G1 and S cellular cycle or stimulate cells to enter apoptosis [30,26], besides being associated to [12,28].

According to Waring & Müllbacher [30] a p53 increase leads to a higher Fas transcription, which leads to the apoptotic cellular death through caspases 8 activation.

In relation to oxidative metabolism, RV increased the lipid peroxidation and protein carbonylation index. The ROS increase by RV was detected in previous researches, associated with the apoptosis induction [31, 24]. Filomeni et al observed in MCF-7 cells treated with RV (50 µg/mL), besides ROS, an increase of MDA. Lang et al also detected an increase of ROS by RV in ovarian cancer cells. The group that received RV+IR showed an even higher increase of this oxidative damage. This allows us to infer that RV increased oxidative damage caused by radiation, since radiolysis is IR's first line of actuation [32].

The most expressive damage caused by IR is the rupture of double-strand DNA, caused by ROS, such as OH [33]. This was highlighted by the higher 8-deoxyguanosina index. This marker's second higher index was during RV+IR treatment, which also explains the high rate of oxidative damage to DNA. The SOD, CAT and GPx activity was higher in cells treated only with RV. The reason for that is probably an adaptive response to damage caused by ROS. It is important to emphasize that the combination of treatments decreased SOD and CAT activity in comparison to the non-treated group. Unfortunately, there is a lack of literature data about the effects of RV+IR in these oxidative metabolism markers in cancer cells. The works that have associated this treatments assess cellular viability and proliferation through markers of cellular cycle control, apoptosis, senescence and necrosis [12,15,34,35].

Cells cultivated for 72 h after IR presented less proliferation when previously treated with 10uM of RV+ 3 IR grays. These results contrast with those of Kim et al., who noted less proliferation with a higher dose of RV, however, RV exposure time was longer. Moreover, cellular cycle analysis by flow citometry allows us to observe arrest at phase S of the cellular cycle in cells exposed to RV+IR. Joe et al [36], testing only 300uM dose of RV 24 h in MCF-7, HCE-7 and SW480, noted arrest at the S phase of the cycle, and the D1 cyclin expression seemed to be the first to be affected in this process. Kuwajerwala [37], treating prostate cancer cells with RV, observed an increase of cells in the S phase together with an inhibition of DNA

synthesis. These results can be explained by a negative feedback mechanism in which transcriptional repressors, like E2F6, act at the end of the S phase and inactivate transcription in a timely manner [38].

Fang et al, studying the radioresistant melanoma cell lines SK-Mel-5 and HTB- 65, suggest a synergistic radiosensitizing effect of RV, since an apoptosis induction was observed together with expression downregulation of the cyclins pro-proliferative molecules B and D, cdk2, and cdk4. Fang et al observed the antiproliferative effects of RV+IR in prostate cancer cells with senescence and apoptosis induction associated with high expression of p-H2A.X, p15, p21, p53, and lower cyclins B and D, and cdk2. Luo et al hypothesize in their work that RV makes tumoral cells sensible to premature senescence caused by radiation in lung cancer cells (NSCLC), through DNA damage due to ROS.

Following our results interpretation, we have observed radiosensitivity *in vitro* of MCF-7 cells treated with RV. This treatment seems to have a synergic effect, which was observed by the increase of cytotoxicity, the decreased of cellular proliferation through the potentiation of damage caused by ROS in cellular macromolecules, besides arrest in the S phase of the cellular cycle, with activation of different pathways of cellular death, such as apoptosis and necrosis/senescence. Thus, more studies must be conducted in order to clarify the mechanisms related to cellular death potentiated by RV+IR due to the possibilities that RV links itself to various receptors and influences a number of metabolic routes in different cellular types.

Acknowledgements

The authors thanks to CAPES, FAPERGS and CNPq for grants and fellowships.

References:

- [1] Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., J.F., Lortet-Tieulent, J., Jemal A. 2015. Global Cancer Statistics, 2012. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 65, 87–108.
- [2] Tavassoli, F.A., Devilee, P. (Eds.). 2003. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press. 9-110.
- [3] Zhao, F., Ming J., Zhou, Y., Fan. L. 2016. Inhibition of Glut1 by WZB117 sensitizes radioresistant breast cancer cells to irradiation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 77, 963–972.
- [4] Hillman, G. G., Singh-Gupta, V. 2011. Soy isoflavones sensitize cancer cells to radiotherapy. *Free Radical Biology & Medicine.* 51, 289–298.
- [5] Jameel, J.K., Rao, V.S.; Cawkwell, L.; Drew, P.J. 2004. Radioresistance in carcinoma of the breast. *Breast.* 13, 452–460.
- [6] Hall, J.S., Iype, R., Senra, J., Taylor, J., Armenoult, L., Oguejiofor, K., Li, Y., Stratford, I., Stern, P.L., O'Connor, M.J., Miller, C. J., West, C.M. 2014. Investigation of radiosensitivity gene signatures in cancer cell lines. *PLoS One.* 22, e86329.
- [7] Sautter, C.K.; S. Denardin; Alves, A.O., Mallmann, C.A., Penna, N.G., Hecktheuer, L.H. 2005. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 25(3), 437-442.
- [8] Pozo-Guisado, E., Merino, J.M., Mulero-Navarro, S., Lorenzo-Benayas, M.J., Centeno, F., Alvarez-Barrientos, A., Fernandez-Salguero, P.M. 2005. Resveratrol- induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kB. *Int. J. Cancer.* 115, 74–84.
- [9] Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S., Takada, Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 24(5A), 2783-840.
- [10] Masuelli, L., Stefano, E.D., Fantini, M., Mattera, R., Benvenuto, M., Marzocchella, L., Sacchetti, P., Focaccetti, C., Bernardini, R., Tresoldi, I., Izzi, V., Mattei, M., Frajese, G.V., Lista, F., Modesti, A., Bei, R. 2014. Resveratrol potentiates the in vitro and in vivo anti-tumoral effects of curcumin in head and neck carcinomas. *Oncotarget,* 5(21), 10745–10762.

- [11] Shakibaei, M., Harikumar, K.B., Aggarwal, B.B. 2009. Resveratrol addiction: To die or not to die. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 115–128.
- [12] Luo, H., Wang, L., Schulte, B.A., Yang, A., Tang, S., Wang, G.Y. 2013. Resveratrol enhances ionizing radiation-induced premature senescence in lung cancer cells. *International Journal of Oncology.* 43, 1999-2006.
- [13] Scarlatti, F., Sala, G., Ricci, C., Maioli, C., Milani, F., Minella, M., Botturi, M., Ghidoni, R. 2007. Resveratrol sensitization of DU145 prostate cancer cells to ionizing radiation is associated to ceramide increase. *Cancer Letters.* 253, 124–130.
- [14] Rashid, A., Liu, C., Sanli, T., Tsiani, E., Singh, G., Bristow, R.G., Dayes, I., Lukka, H., Wright, J., Tsakiridis, T. 2011. Resveratrol enhances prostate cancer cell response to ionizing radiation. Modulation of the AMPK, Akt and mTOR pathways. *Radiat Oncol.* 6, 144.
- [15] Fang, Y., DeMarco, V.G., Nicholl, M.B. 2012. Resveratrol enhances radiation sensitivity in prostate cancer by inhibiting cell proliferation and promoting cell senescence and apoptosis. *Cancer Sci.* 103(6), 1090–1098.
- [16] Barbisan, F., Motta, J.R., Trott, A., Azzolin, V., Dornelles, E.B., Marcon, M., Algarve, T.D., Duarte, M.M., Mostardeiro, C.P., Unfer, T.C., Schott, K.L., da Cruz, I.B., 2014. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS One* 9, e107299.
- [17] Zhao, X., Huang, S., Luo, H., Wan, X., Gui, Y., Li, J., Wu, D., 2014. Evaluation of vesicular stomatitis virus mutant as an oncolytic agent against prostate cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7, 1204–1213.
- [18] William-Faltaos, D., Rouillard, P., Lechat, G., 2006. Bastian. Cell cycle arrest and apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines. *Anticancer Res.* 26, 2093–2099.
- [19] Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- [20] Montagner, G.F.F.S., Sagrillo, M., Machado, M.M., Almeida, R.C., Mostardeiro, C.P., Duarte, M.M.M.F., Cruz, I.B.M., 2010. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol. in Vitro* 5, 1410–1416.
- [21] Nakagawa, H., Kiyozuka, Y., Uemura, Y., Senzaki, H., Shikata, N., Hioki, K., Tsubura, A. 2001. Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. *J Cancer Res Clin Oncol.* 127-258.
- [22] Fang, Y., Bradley, M.J., Cook, K.M., Herrick, E.J., Nicholl, M.B. 2013. A potential role for resveratrol as a radiation sensitizer for melanoma treatment. *Journal of surgical research.* 183, 645-653.

- [23] Lang, F., Qin, Z., Li, F., Zhang, H., Fang, Z., Hao, E. 2015. Apoptotic Cell Death Induced by Resveratrol Is Partially Mediated by the Autophagy Pathway in Human Ovarian Cancer Cells. *PLoS One*. 10(6), e0129196.
- [24] Cohen–Jonathan, E., Bernhard, E.J., McKenna, W.G., 1999. How does radiation kill cells? *Current Opinion in Chemical Biology*. 3, 77–83.
- [25] Kim, Y., Choi, B.Y.T., Lee, Y.T., Park, D.I., Rhee, S., Park, K., Choi, Y.H. 2004. Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncology Reports*. 11,441-446.
- [26] El-Deiry, W.S. .2003. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene*. 22, 7486–7495
- [27] Sabin, R.J., Anderson, R.M. 2011. Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integrity*. 2,7.
- [28] Chin, Y., Hsieh, M., Yang, S., Tsai, P., Wang, S., Wang, C., Lee, Y., Cheng, G., HuangFu, W., London, D., Tang, H., Fu, E., Yen, Y. Liu, L.F., Lin, H., Davis, P.J. 2014. Anti-proliferative and gene expression actions of resveratrol in breast cancer cells in vitro. *Oncotarget*. 5(24), 12891-12907.
- [29] Kundu, J.K., Surh, Y. 2008. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters* 269, 243–261.
- [30] Waring, P., Müllbacher, A. 1999. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunology and Cell Biology*. 77, 312–317.
- [31] Filomeni, G., Graziani, I., Rotilio, G., Ciriolo, M.R. 2007. Trans-Resveratrol induces apoptosis in human breast cancer cells MCF-7 by the activation of MAP kinases pathways. *Genes Nutr*. 2, 295–305.
- [32] Azzam, E.I., Jay-Gerin, J., Pain, D. 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury *Cancer Lett*. 327(0), 48–60.
- [33] Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F., Herskind, C. 2016. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int. J. Mol. Sci.*,17,102.
- [34] Pozo-Guisado, E., Merino, J.M., Mulero-Navarro, S., Lorenzo-Benayas, M.J., Centeno, F., Alvarez-Barrientos, A., Salguero, P.M.F. 2002. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-321 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. *Biochemical Pharmacology*. 64, 1375-1386.
- [35] Fang, Y., Bradley, M. J., Cook, K. M., Herrick, E. J., Nicholl, M. B. 2013. A potential role for resveratrol as a radiation sensitizer for melanoma treatment. *Journal of surgical research*. 183, 645-653.

[36] Joe, A.K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M.E., Xiao, D., Weinstein, I.B. 2002. Resveratrol Induces Growth Inhibition, S-phase Arrest, Apoptosis, and Changes in Biomarker Expression in Several Human Cancer Cell Lines. *Clinical Cancer Research*. 8, 893–903.

[37] Kuwajerwala, N., Cifuentes, E., Gautam, S., Menon, M., Barrack, E.R., Reddy, G.P. 2002. Resveratrol induces prostate cancer cell entry into S phase and inhibits DNA synthesis. *Cancer Res*. 62(9), 2488-92.

[38] Bertoli, C., Skotheim, J.M., de Bruin, R.A. 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14(8), 518-28.

Table

Table 1. Gene primers list.

Genes	Primers	
	Sense	Antisense
β actina	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA
p53	TTGGGTCTTTGAACCCTTGCT	GTGCAGGCCAACTTGTTTCAGT
Bax	CCCTTTTCTACTTTGCCAGCAA	CCCGGAGGAAGTCCAATGT
Bcl-2	GAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGT	AGTCATCCACAGGGCGATGT

Figures

Figure 1. Effect of resveratrol (RV), ionizing radiation (IR) and their combination (RV+IR) on MCF-7 breast cancer cell line viability after 24 h cultures. (A) Viable cells frequency determined by MTT spectrophotometric assay. Treatments were compared by Two-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Different letters indicate statistical difference among treatments ($p \leq 0.05$). Data are shown as % of untreated control group; Mean \pm SEM are obtained from three independent repetitions.

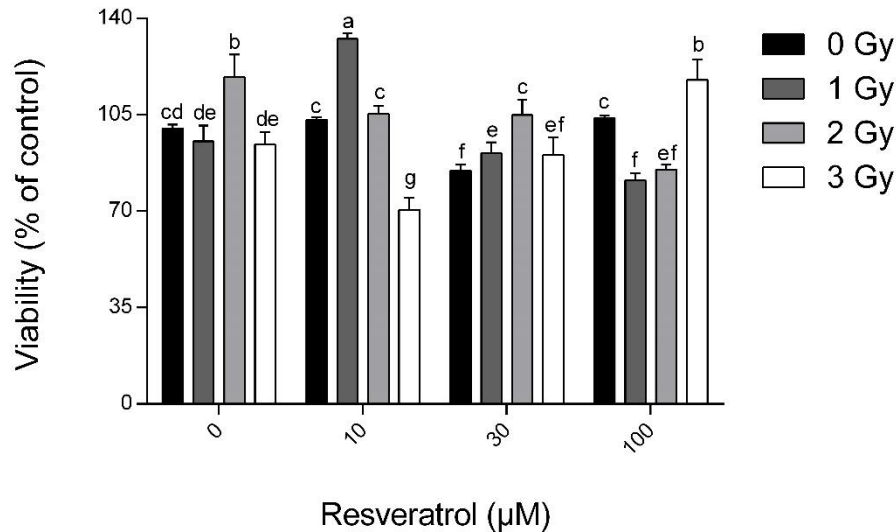


Figure 2. Flow cytometry analysis with propidium iodide (PI) and Annexin V to evaluate the influence of treatments on necrosis and apoptosis induction (A). Caspases levels of MCF-7 breast cancer cells treated to resveratrol and ionizing radiation exposition. (B) Caspase 3, (C) Caspase 8. Representative Bax/Bcl-2 ratio of gene expression (D). p53 gene expression. Data of gene expression were normalized by β -actin gene. Mean \pm SD and SEM are obtained from three independent repetitions. Different letters indicated significant differences ($p < 0.05$) by Two-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test.

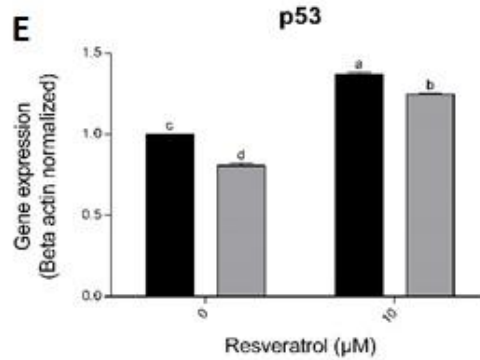
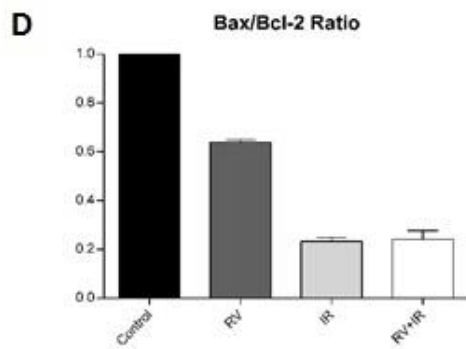
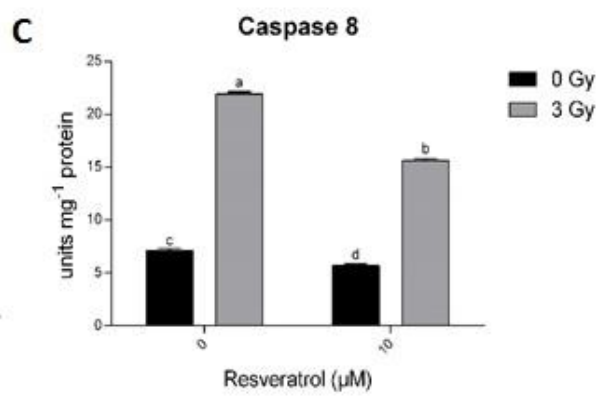
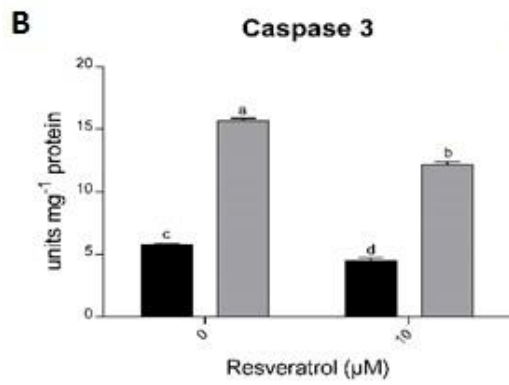
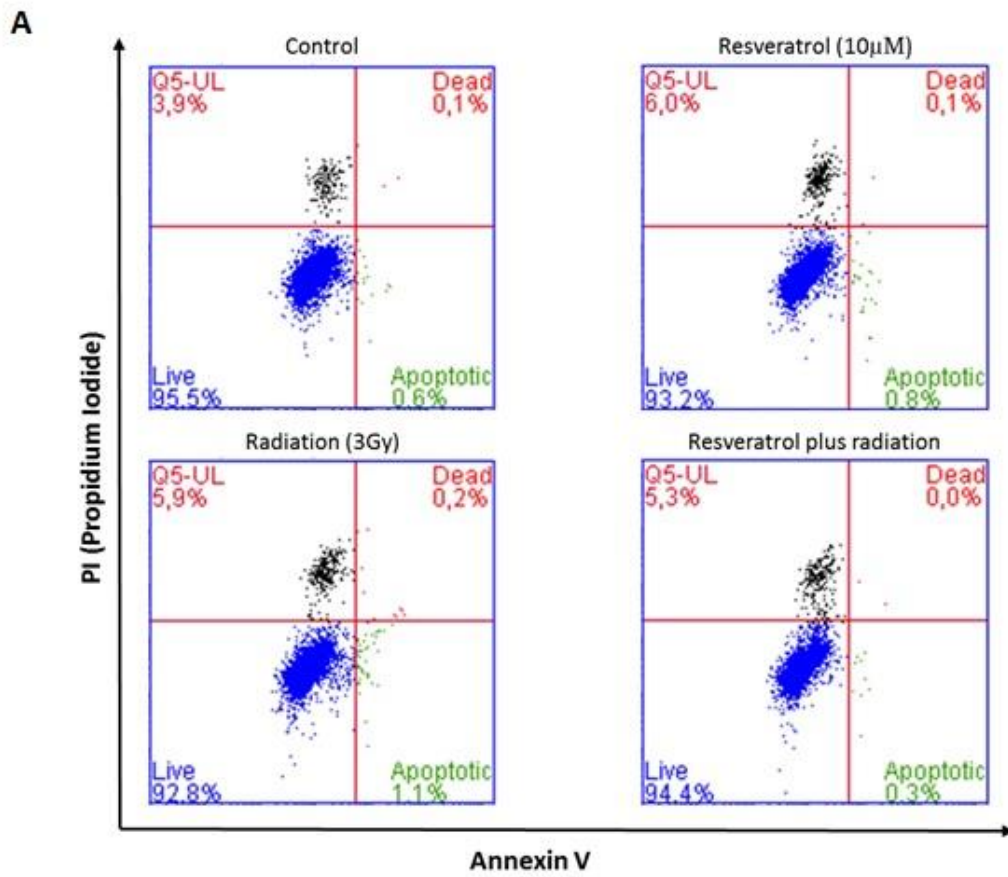


Figure 3. Effect of resveratrol, ionizing radiation and their combination in oxidative metabolism parameters. Protein carbonylation (A). MDA production by TBARS assay (B). DNA damage index by 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine assay (C). Activity of antioxidant enzymes SOD (D), CAT (E) and GPx (F). All experiments were performed in 24 h cell culture, except (B) which was performed in 72 h cell culture. Data are shown as % of untreated control group. Mean \pm SEM are obtained from three independent repetitions. Different letters indicated significant differences ($p < 0.05$) by two-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test.

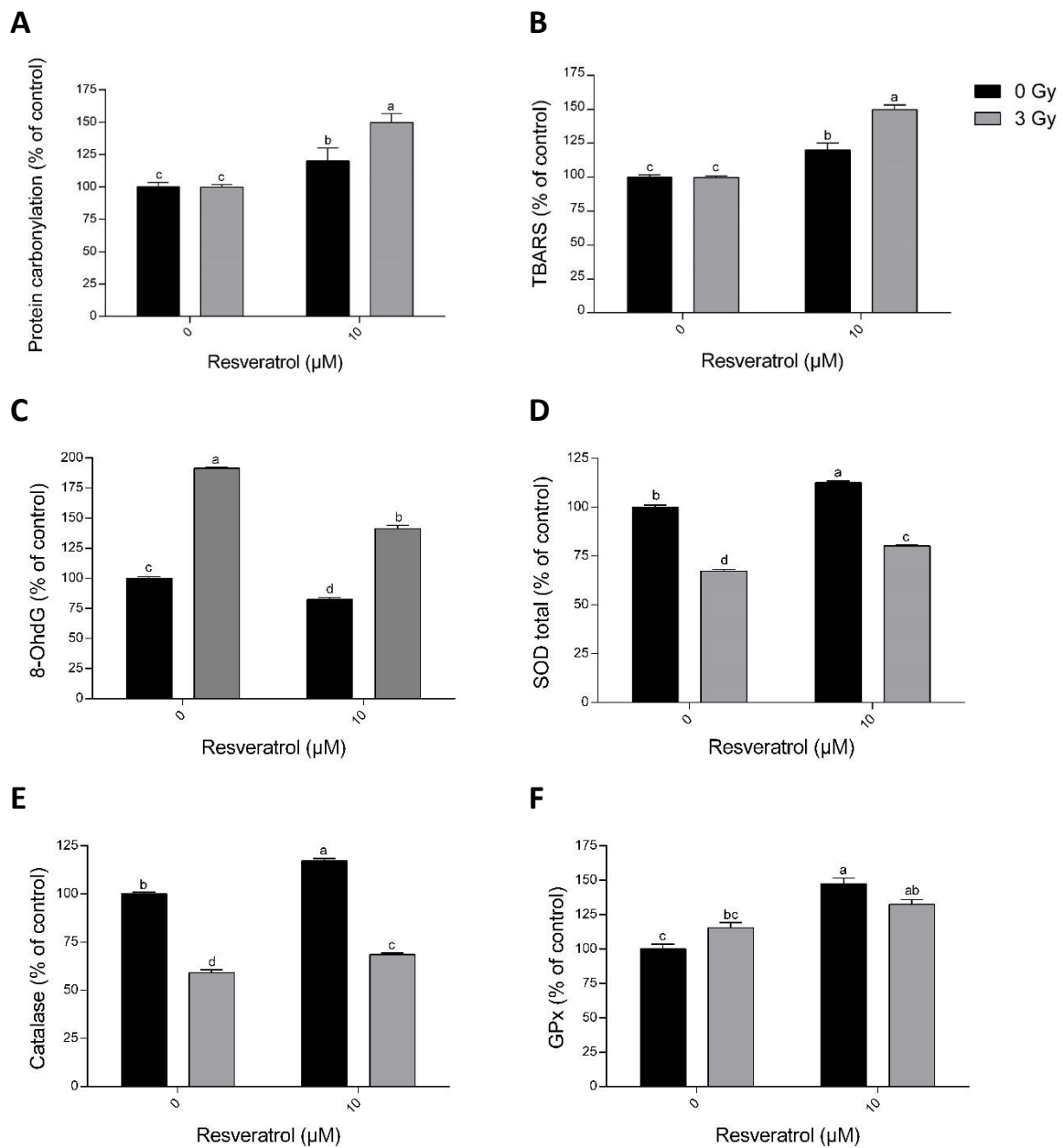
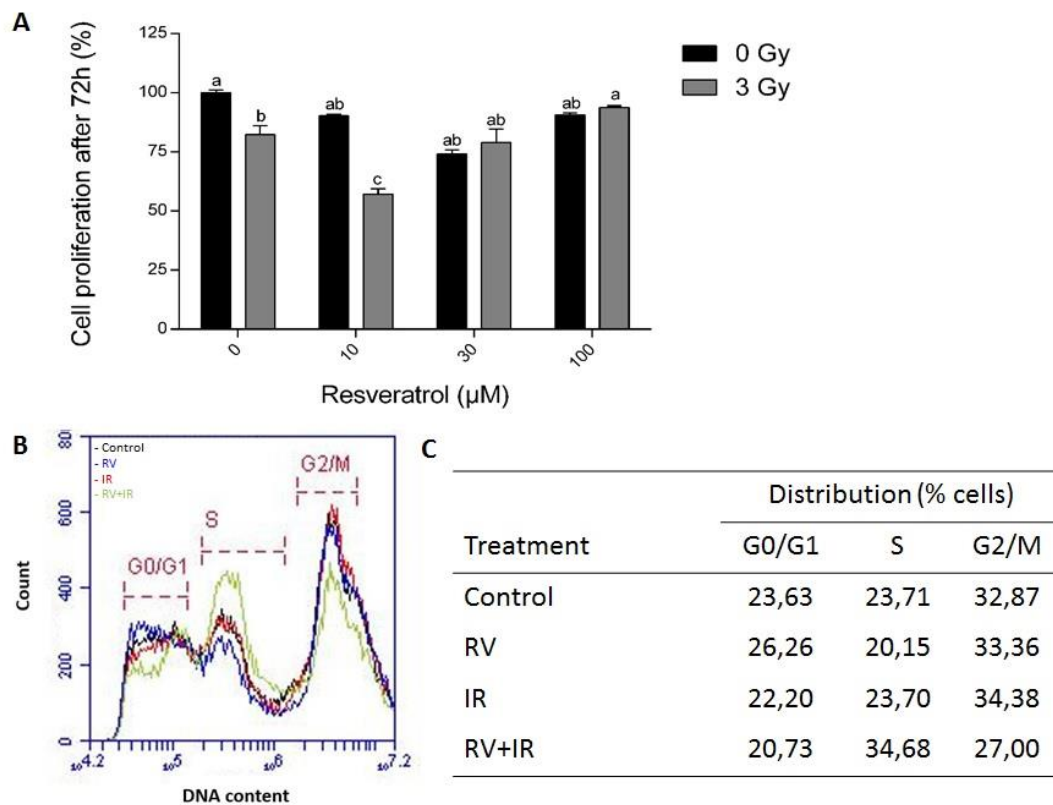


Figure 4. Effect of resveratrol (RV), ionizing radiation (IR) and their combination (RV+IR) on MCF-7 breast cancer cell line viability after 72 h cultures. (A) Cell proliferation frequency determined by MTT spectrophotometric assay. Treatments were compared by Two-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Different letters indicate statistical difference among treatments ($p \leq 0.05$). Data are shown as % of untreated control group. Mean \pm SEM are obtained from three independent repetitions. (B e C) Distribution of total cells in each phase of cell cycle. Data were analysed with BD Accuri C6 software.



5. DISCUSSÃO

A radioterapia é uma etapa importante para o tratamento de muitos pacientes com CM. Apesar das vantagens relacionadas aos danos nas células tumorais, existem limitações que interferem no tratamento, como radiorresistência, efeito *bystander* e síndrome cutânea da irradiação. Logo a pesquisa de compostos ativos que potencializem seletivamente os efeitos da RI em células de câncer se faz necessário. Dessa forma, este estudo buscou investigar o efeito *in vitro* do RV em células de CM MCF-7 expostas à RI. Os resultados obtidos são discutidos a seguir.

Primeiramente foi observado em culturas de 24 horas maior citotoxicidade com a dose de 10 μ M de RV + 3 grays de RI, evidenciada pelo teste MTT. Tal evento pode ser associado em decorrência da atividade quimioterápica atribuída ao RV, aliado aos efeitos deletérios da RI. A citotoxicidade inicial mostra estar associada à necrose/senescência e também à ativação da via extrínseca da apoptose. Esses eventos ficam mais claros ao analisar os dados obtidos por meio do teste de apoptose, relação bax/bcl-2, atividade das caspases e expressão de p53.

A irradiação pode levar a morte celular através de apoptose, necrose (após catástrofe mitótica) e parada de crescimento irreversível ligada à senescência, na qual as células ficam metabolicamente ativas, porém incapazes de divisão (COHEN-JONATHAN et al., 1999; GUDKOV, KOMAROVA, 2003). Neste contexto, o RV tem mostrado efeito contra células tumorais por meio da indução de apoptose. Kim et al. (2004), estudaram diferentes doses de RV (0; 12,5; 25; 50 e 100 μ M) em células MCF-7 tratadas por 48 horas. O RV mostrou atuar na diminuição da viabilidade celular, e indução da apoptose de maneira dose-dependente, com aumento de bax, diminuição de bcl-2 e ativação da caspase 9.

Pozo-Guisado et al. (2005), também observaram aumento do índice de apoptose em células MCF-7 sendo que a partir de 50 μ M o RV induziu diminuição de bcl-2 de maneira dose-dependente. Esse resultado está em consonância com os encontrados nesse experimento pois a dose de 10 μ M de RV não aumentou a taxa de bax/bcl-2 nas células tratadas, o que nos permite sugerir que baixas doses de RV, IR e RV+IR podem ativar primeiramente a via extrínseca da apoptose, uma vez que foi observada alta atividade das caspases.

A proteína p53 exerce um papel fundamental na supressão do câncer (MIRZAYANS et al., 2013; EL-DEIRY, 2003). Em células tumorais que mantém sua funcionalidade normal, ela pode desempenhar efeito antiproliferativo através da indução da apoptose intrínseca (mitocondrial por ativação de bax) e extrínseca (por FAS, TNF e TRAIL) (FRIDMAN et al., 2003). Em células irradiadas que escaparam da apoptose, após serem danificadas pela RI,

ocorre a catástrofe mitótica seguida de necrose, ou as células permanecem vivas mas com parada irreversível no crescimento, por meio da ação da p53. Além da p53, a constante exposição das células à EROs parece estar envolvida na manutenção da parada irreversível de crescimento (GUDKOV, KOMAROVA, 2003).

Neste trabalho, observou-se maior nível de expressão de p53 nas células expostas somente ao RV. Esses resultados estão de acordo ao encontrado por Chin et al. (2014), que observaram efeito antiproliferativo do RV (10 μ M / 4 hs/ 6 dias) associado ao aumento da expressão de p53 em células de CM da linhagem MDA-MB-231. De forma similar, Kundu e Surh (2008) relataram efeito anti-proliferativo do RV, com atuação sobre a ciclina D1 e Cdk4 em células de câncer de próstata humana (DU-145) e de mama (MCF-7), associado com a indução de p53 e p21^{WAF1/CIP1}.

As células que receberam RV+RI também apresentaram altos níveis de expressão de p53, maior que das células somente expostas à RI. Isso pode ser explicado pela influência da ativação da expressão de p53 pelo RV aliado ao estímulo da expressão de p53 em decorrência do dano as duplas fitas de DNA causado pela RI, o que fica evidenciado pela alta produção de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina nas células irradiadas.

As EROs podem danificar macromoléculas celulares, favorecer a quebra de fitas duplas do DNA e ativar ambas as vias da apoptose. Essa ativação pode ocorrer por meio do acúmulo de ceramidas, envolvendo a ativação da esfingomielinase e por p53. As EROs podem influenciar na transcrição de p53, catástrofe mitótica, e parada irreversível do ciclo celular, levando a apoptose, necrose e senescência, respectivamente (GUDKOV, KOMAROVA, 2003). Ainda, as EROs estão ligados intimamente ao dano indireto da RI, fazendo parte da cascata de eventos que podem levar a morte celular.

O aumento de EROs por RV foi detectado em pesquisas anteriores, associado a indução de apoptose (FILOMENI et al., 2007; LANG et al., 2015; SCARLATTI et al., 2007). Filomeni et al. (2007) observaram em células MCF-7 tratadas com RV (50 μ g/mL) além de EROs, aumento de MDA. Lang et al. (2015) em células de câncer ovariano detectaram aumento de EROs por RV. Scarlatti et al. (2007) ao tratarem células DU-145 com 16 μ M de RV por 72 horas e expor à 3 grays fracionados de RI, observaram que o RV agiu sinergicamente na indução de morte celular, sendo o acúmulo de ceramidas identificados nesse processo, possibilitando a ativação da apoptose.

No presente estudo, as células que receberam RV+RI mostraram alto dano oxidativo, tendo o RV contribuído para o aumento de oxidação em macromoléculas, evidenciado pela maior taxa de peroxidação em proteínas em cultura de células de 24hs e lipídios, em cultura

de células 72 hs após RI. Assim, fica evidenciado que o dano da integridade das membranas se intensificam com o tempo, em decorrência do aumento da produção de EROs. A produção de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina foi alta nas células RV+RI, sendo maior que das células apenas expostas ao RV, indicando dano oxidativo genotóxico. Porém em RV+RI a produção foi menor que das células apenas irradiadas, possivelmente influenciado pela atividade *scavenger* do RV.

A atividade da SOD, CAT e GPx foi maior em células apenas tratadas com RV. Provavelmente seja em virtude de uma resposta adaptativa aos danos causados por EROs. É importante salientar que a combinação de tratamentos diminuiu a atividade da SOD e CAT quando comparado ao tratamento RV. Infelizmente há uma escassez de dados literatura sobre os efeitos da RV+RI nestes marcadores de metabolismo oxidativo em células de câncer. Os trabalhos que associam esses tratamentos avaliam a viabilidade e proliferação celular, através de marcadores de controle do ciclo celular, apoptose, necrose e senescência (POZOGUISADO et al., 2002; FANG et al., 2012, 2013; LUO et al., 2013).

Assim, é possível relacionar o aumento da atividade enzimática nas células expostas ao RV, com a funcionalidade antioxidante ou até mesmo uma resposta adaptativa ao aumento do dano oxidativo celular. Porém, o RV combinado à RI, atua na diminuição dos níveis dessas enzimas, e pode influenciar na manutenção do estado pro-oxidante, fator necessário para estímulo de rotas antiproliferativas.

O funcionamento de um tratamento contra o câncer é diretamente proporcional a sua ação na diminuição da proliferação celular (FANG et al., 2013) e está relacionado com ativação de vias de morte e parada irreversível de crescimento. Células cultivadas por 72 hs após a RI apresentaram menor proliferação quando tratadas previamente com 10µM de RV+3 grays. Kim et al. (2004), observaram menor proliferação celular com 100µM de RV. Porém, este trabalho avaliou a proliferação no tempo de 48 horas após a exposição. Além disso, os resultados mostraram o efeito da influência da combinação dos tratamentos RV+RI na diminuição expressiva da proliferação celular.

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo permitiu observar bloqueio na fase S do ciclo celular em células expostas à RV+RI. Sugere-se que esse fato esteja relacionado com a parada irreversível de crescimento ligado à senescência mediada pelo aumento da expressão de p53. Assim, mesmo as células estando vivas e metabolicamente ativas podem ter perdido a capacidade de divisão, o que explicaria a diminuição da proliferação celular em cultura de 72 horas. Como mecanismo de controle do ciclo celular, a p53 é indutora da proteína p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}, que é um membro da família dos inibidores do ciclo celular, incluindo a p27 e

p57, e são capazes de inibir as CDKs (quinases dependentes de ciclinas), reguladores-chave do ciclo celular. Eles também são capazes de bloquear a replicação do DNA por ligação ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (MACIP et al., 2002).

Joe et al. (2002) testando apenas a dose de 300 μ M de RV em MCF-7, HCE-7 e SW480 observaram bloqueio na fase S do ciclo, sendo que a expressão da ciclina D1 pareceu ser a primeira afetada nesse processo. Kuwajerwala et al. (2002) tratando células de câncer de próstata (LNCaP) com RV observaram que doses maiores que 15 μ M causaram aumento de células na fase S e inibição da síntese de DNA. Dessa forma, acredita-se que a apenas a dose de RV utilizada neste trabalho tenha sido insuficiente para desencadear aumento e bloqueio na fase S. Entretanto, a influência do RV, juntamente à da RI causaram este efeito. Logo, estes resultados podem ser explicados por um mecanismo de *feedback* negativo no qual repressores transcricionais, como E2F6, possivelmente atuaram no final da fase S inativando a transcrição em tempo hábil (BERTOLI et al., 2013) ou por meio da ligação dos inibidores do ciclo da família do p21 ao PCNA.

Fang et al. (2013) ao estudar linhagens de melanoma radorresistentes SK-Mel-5 e HTB-65 sugerem efeito sinérgico radiosensibilizador ao RV, pois observaram indução de apoptose, juntamente com *downregulation* na expressão das moléculas pró proliferativas: ciclinas B e D, cdk2 e cdk4. Fang et al. (2012) observaram efeitos antiproliferativos de RV+RI em células de câncer de próstata com indução de senescência e apoptose, associados a alta expressão de p-H2A.X, p15, p21, p53, e baixa de ciclinas B e D e cdk2. Luo et al. (2013) hipotetizaram em seu trabalho que RV sensibiliza células tumorais à senescência prematura causada pela radiação em células de câncer de pulmão (NSCLC), por meio de dano ao DNA mediado por EROs.

Esta pesquisa apresentou algumas limitações metodológicas, como: (a) por se tratar de um estudo *in vitro*, não permite extrapolação dos resultados para situações *in vivo*; (b) análise de marcadores limitados relacionados à proliferação celular, em relação ao alto número de receptores e vias metabólicas que o RV é capaz de exercer influência; (c) uso de uma única dose de RI, visto que em tratamento radioterápico os pacientes recebem várias doses fracionadas e que possuem efeito cumulativo.

De qualquer modo as limitações descritas não diminuem a relevância dos resultados obtidos, mas sim indicam a necessidade de investigações adicionais.

Nestes termos, o conjunto dos resultados sugere radiosensibilização *in vitro* do RV sobre células MCF-7. Este tratamento aparenta ter efeito sinérgico observado pelo aumento da citotoxicidade, diminuição da proliferação celular através da potencialização de danos

causados por EROs em macromoléculas celulares, além de parada na fase S do ciclo celular, com ativação de vias diferentes de morte celular, como necrose/senescência e apoptose.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A exposição das células MCF-7 ao RV e RI, foi citotóxica, envolvendo indução de necrose/senescência, ativação da rota apoptótica extrínseca, alta expressão de p53 e diminuição da proliferação celular.

Essa diminuição da proliferação pode ser relacionada a condição pro-oxidante proporcionada por RV+RI, em virtude do aumento de danos oxidativos à proteínas e lipídios celulares, alta taxa de dano oxidativo ao DNA e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes.

Assim, o tratamento prévio à RI com RV exerceu influência sobre a sobrevivência celular, sugerindo ação radiomodificadora do tipo radiosensibilizadora ao RV em células de CM MCF-7.

Levando em consideração os trabalhos na literatura, este estudo parece o primeiro trabalho a abordar o efeito do RV em células de CM expostas à RI, por meio da análise de marcadores de viabilidade e proliferação celular aliado a marcadores do metabolismo oxidativo.

Como perspectivas futuras, pretende-se trabalhar com maior tempo de exposição ao RV, doses repetidas de RI, de modo a mimetizar o tratamento radioterápico, uma vez que este geralmente é fracionado. Essa perspectiva estende-se também para as células saudáveis, no sentido de verificar o efeito radiomodificador seletivo do RV, por meio da radioproteção das células saudáveis que inevitavelmente são irradiadas durante a radioterapia.

Também é de interesse o trabalho com modelo *in vivo* para avaliação do comportamento dos resultados, tendo em vista a maior complexidade do sistema biológico, e maior aplicabilidade dos resultados para seres humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUJAH, C. I. et al. Functional components and medicinal properties of food: a review. **J Food Sci Technol.**, v. 52(5), p. 2522–2529. 2015.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ANDRADE, E. R.; BAUERMANN, L. F. **Introdução à radiobiologia: Conexões Bioquímicas e Biomoleculares**. 1. ed. Santa Maria: UFSM, 2010.

ANDRADE, E. R. et al. Radiomodifying effect of organic grape juice supplementation on hematological parameters and organ weight in whole-body X-irradiation in rats. **Nutr Hosp.**, v. 24(3), p. 297-303. 2009.

AZZAM, E. I.; JAY-GERIN, J. P.; PAIN, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. **Cancer Letters**, v. 327, p. 48–60. 2012.

BARROS, A. C. S. D. et al. Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama. **Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, p. 1-15. 2001.

BERTOLI, Cosetta et al. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 8, p.518-528. 2013.

BOGO, D. **Avaliação *in vitro* da atividade antineoplásica do ácido lecanórico e de seus produtos de modificação estrutural**. 2009. 67 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste)–Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

BOLASÉLL, A. H. T.; ZETTLER, C. G.; VINHOLES, J.; MACHADO, S. M.; KLIEMANN, C. Indicadores de prognóstico em câncer de mama com axila negativa: receptor de estrógeno e expressão de p53 e de c-cerbB-2. **RBGO**, v. 22, n. 7, p.449-454, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Controle do câncer de mama: Tratamento**. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoos_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/tratamento> Acesso em: 24 de setembro de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **O que é o câncer?** Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322> Acesso em: 03 de março de 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA. 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Diretrizes para a Detecção Precoce do Câncer de Mama no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA 2015c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer.** Rio de Janeiro: INCA. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Controle do câncer de mama: documento de consenso.** Rio de Janeiro: INCA. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Curso para técnicos em radioterapia.** Rio de Janeiro: INCA. 2000.

CHIN, Y., et al. Anti-proliferative and gene expression actions of resveratrol in breast cancer cells in vitro. **Oncotarget.** v. 5(24), p. 12891-12907. 2014.

CNEN. **Radiações ionizantes e a vida.** Rio de Janeiro: Comissão Nacional de Energia Nuclear. Disponível em: <<http://www.cnen.gov.br/images/cnen/documentos/educativo/radiacoes-ionizantes.pdf>>. Acesso em: 15 de nov. de 2016.

COHEN-JONATHAN, E.; BERNHARD, E. J.; MCKENNA, W. G. How does radiation kill cells? **Current Opinion in Chemical Biology.** v. 3, p. 77-83. 1999.

DOBRZUŃSKA, M. M. Resveratrol as promising natural radioprotector. A review. **Rocz Panstw zakl Hig.,** v. 64(4), p. 255-262. 2013.

EL-DEIRY, W. S. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. **Oncogene,** v. 22, n. 47, p.7486-7495. 2003.

FANG, Y.; BRADLEY, M. J.; COOK, K. M.; HERRICK, E. J.; NICHOLL, M. B. A potential role for resveratrol as a radiation sensitizer for melanoma treatment. **Journal of surgical research,** v. 183, p. 645-653. 2013a.

FANG, Y.; DEMARCO, V. G.; NICHOLL, M. B. Resveratrol enhances radiation sensitivity in prostate cancer by inhibiting cell proliferation and promoting cell senescence and apoptosis. **Cancer Sci.,** v. 103(6), p. 1090-1098. 2012b.

FILOMENI, G., et al. Trans-Resveratrol induces apoptosis in human breast cancer cells MCF-7 by the activation of MAP kinases pathways. **Genes Nutr.,** v. 2, p. 295-305. 2007.

FRIDMAN, J. S, et al. Control of apoptosis by p53. **Oncogene,** v. 22, n. 56, p.9030-9040. 2003.

GARVIN, S.; OLLINGER, K.; DABROSIN, C. Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. **Cancer Lett.** v. 231(1), p. 113-22. 2006.

GIRDHANI, S. et al. Enhancement of Gamma Radiation-induced Cytotoxicity of Breast Cancer Cells by Curcumin. **Molecular and Cellular Pharmacology,** v. 1(4), p. 208-217. 2009.

GREENWALD, P. Clinical trials in cancer prevention: current results and perspectives for the future. **The journal of Nutrition,** v. 134, p. 3507S-3512S. 2004.

GUDKOV, A. V.; KOMAROVA, E. A. THE ROLE OF p53 IN DETERMINING SENSITIVITY TO RADIOTHERAPY. **Nature Reviews**, v. 3, p. 117-129. 2003.

GURUSAMY N., et al. Cardioprotection by resveratrol: a novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway. **Cardiovascular Research**, v. 86, p. 103–112. 2010.

HALL, E. J. **Radiobiology for the Radiologist**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Wilkins & Williams, 2006.

HILLMAN, G. G.; SINGH-GUPTA, V. Soy isoflavones sensitize cancer cells to radiotherapy. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 289–298. 2011.

HUNG, L. M. et al. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 549–555. 2000.

JOE, A.K., et al. Resveratrol Induces Growth Inhibition, S-phase Arrest, Apoptosis, and Changes in Biomarker Expression in Several Human Cancer Cell Lines. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 893–903. 2002.

KAPLAN, I. **Física Nuclear**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978.

KIM, Y., CHOI, B.Y.T., LEE, Y.T., PARK, D.I., RHEE, S., PARK, K., CHOI, Y.H.. Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. **Oncology Reports**, v. 11, p. 441-446. 2004.

KING, T. C. **Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2007.

KULKARNI, S.S.; CANTÓ, C. The molecular targets of resveratrol. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1852(6), p. 1114-23. 2015.

KUNDU, J.K., SURH, Y. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. **Cancer Letters**, v. 269, p. 243–261. 2008.

KUWAJERWALA, N., et al. Resveratrol induces prostate cancer cell entry into S phase and inhibits DNA synthesis. **Cancer Res.**, v. 62(9), p. 2488-92. 2002.

LANG, F., et al. Apoptotic Cell Death Induced by Resveratrol Is Partially Mediated by the Autophagy Pathway in Human Ovarian Cancer Cells. **PLoS One**, v. 10(6), e0129196. 2015.

LEONARD, S.S. et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p. 1017–1026. 2003.

LUO, H., et al. Resveratrol enhances ionizing radiation-induced premature senescence in lung cancer cells. **International Journal of Oncology**. v. 43, p. 1999-2006. 2013.

MACIP, S. et al. Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. **The Embo Journal**, v. 21, n. 9, p.2180-2188. 2002.

MARTÍN, A. R. et al. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 1399–1410. 2004.

MIRZAYANS, R. et al. Ionizing Radiation-Induced Responses in Human Cells with Differing TP53 Status. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p.22409-22435. 2013.

NCCN, National Comprehensive Cancer Network®. **Linhas de orientação NCCN para doentes™**. Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental. v. 2. p 1-110. 2011.

PORTO, B. A. A. **Influência da ação oxidante do selênio na indução da radiosensibilidade e morte celular na levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais)–Centro de desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2012.

POZO-GUISADO, E. et al. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-321 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 1375-1386. 2002.

POZO-GUISADO, E. et al. Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-κB. **Int. J. Cancer**, v. 115, p. 74–84. 2005.

RAI, G.,; MISHRA, S.; SUMAN, S.; SHUKLA, Y. Resveratrol improves the anticancer effects of Doxorubicin in vitro and in vivo models: A mechanistic insight. **Phytomedicine**, v. 23, p. 233–242. 2016.

RIVOIRE, W. A. et al. Bases biomoleculares da oncogênese cervical/Molecular basis of cervical oncogenesis. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47(2), p. 179-184. 2001.

RODRÍGUEZ, R. Á et al. Theoretical and experimental exploration of the photochemistry of resveratrol: beyond the simple double bond isomerization. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, p. 9175–9182. 2012.

SAUTTER, C. K. et al. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25(3), p. 437-442. 2005.

SCARLATTI, F., et al. Resveratrol sensitization of DU145 prostate cancer cells to ionizing radiation is associated to ceramide increase. **Cancer Letters**. v. 253, p. 124–130. 2007.

SCHNEIDER, Y. et al. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. **Cancer Letters**, v. 158, p. 85-91. 2000.

SEGRETO, H. R. C.; SEGRETO, R. A. Revisão e atualização em radiobiologia. Aspectos celulares, moleculares e clínicos. **A Folha Médica**, v. 119, p. 9-27. 2000.

SILVA, J. O. **Avaliação dos parâmetros dosimétricos em feixes de fótons de radioterapia usando fototransistor SMT**. 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Departamento de Energia Nuclear, Recife, 2008.

SINGLETERY, S. E.; CONNOLLY, J. L. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 56, n. 1, p. 37-47. 2008.

SUBBARAMAIAH, K. et al. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 34, p. 21875-21882. 1998.

TAVASSOLI, F.A.; DEVILEE, P. (Eds.). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. **IARC Press**, p. 9-110. 2003.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, p. 87–108. 2015.

TORTORA, G. J., DERRICKSON, B. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**, 12^a edição. Guanabara Koogan, 07/2010. VitalSource Bookshelf Online.

VAGUNDA, V, S.; MARDOVÁ, J.; VAGUNDOVÁ, M.; JANDÁKOVÁ, E.; Z`ALOUĐÍK, J., KOUKALOVÁ, H. Correlations of Breast Carcinoma Biomarkers and p53 Tested by FASAY and Immunohistochemistry, **Pathol. Res. Pract.**, v. 199, p. 795–801, 2003.

VENUGOPAL, R. & LIU, R. H. Phytochemicals in diets for breast cancer prevention: The importance of resveratrol and ursolic acid. **Food Science and Human Wellness**, v. 1, p. 1–13. 2012.

VOUSDEN, K. H. Activation of the p53 tumor suppressor protein. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1602, p. 47-59, 2002.

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

Isabel Araldi <araldi.isabel@gmail.com>

Fwd: Submission Confirmation

2 mensagens

Liliane de Freitas Bauermann <lgfbauermann@gmail.com>
Para: Isabel Araldi <araldi.isabel@gmail.com>

9 de novembro de 2016 13:14

----- Forwarded message -----

From: Toxicology in Vitro <tiv@elsevier.com>
Date: 2016-11-09 13:12 GMT-02:00
Subject: Submission Confirmation
To: lgfbauermann@gmail.com, lgfbauermann@hotmail.com

Re: The in vitro resveratrol effect on MCF-7 breast cancer cells exposed to ionizing radiation
Research paper

Toxicology in Vitro

Title: The in vitro resveratrol effect on MCF-7 breast cancer cells exposed to ionizing radiation

Authors: Isabel Cristina da Costa Araldi; Verônica Farina Azzolin; Fernanda Barbisan; Francine Carla Cadoná; Cibele Ferreira Teixeira; Fernando Primitivo Romero Bordin; Tadeu Baumhardt; Ivana Beatrice Mânica da Cruz; Marta Maria Medeiros Frescura Duarte; Liliane de Freitas Bauermann

Article Type: Research paper

Dear Liliane,

Your submission entitled "The in vitro resveratrol effect on MCF-7 breast cancer cells exposed to ionizing radiation" has been received by Toxicology in Vitro.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/tiv/>.

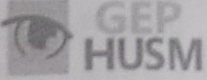
Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

Toxicology in Vitro

ANEXO B – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO GEP/HUSM



**Gerência de Ensino e Pesquisa
do Hospital Universitário de Santa Maria**

FOLHA DE REGISTRO E ACOMPANHAMENTO DE PROJETOS

Nº Inscrição GEP: 033 / 2015 Data: 29/09/2015

Pesquisador: Liliane de Freitas Bauermann Função: Professora Assistente

SGAPE: 227178 Telefone: (51) 916211693 Unidade/Curso: Dep. de Física E-mail: liliane@h.usm.br

Título: Implicações da epidemia da quarentena (Pavlovius uspona) e da neutralização de um hospício sob o ponto de vista da neurociência

TIPO DE PROJETO: Pesquisa Extensão Institucional

FINALIDADE ACADÊMICA: TCC Especialização Dissertação Tese Iniciação Científica

TIPO DE PESQUISA: Inovações Tecnológicas em Saúde Ciências Sociais e Humanas Aplicadas a Saúde
 Ensaio Clínico: Fase I Fase II Fase III Fase IV Epidemiológico Infraestrutura Avaliação de Tecnologia em Saúde Biomédica (Stricto Sensu) Clínica Epidemiológica Observacional Pré-Clinica
 Qualitativa Sistema de Saúde Planejamento e Gestão de Políticas, Programa e Serviços da Saúde Outras Ações de C & T

FONTE DE FINANCIAMENTO: Recursos do Pesquisador HUSM Agência Pública de fomento nacional (Capes, Cnpq, Fapergs, etc) Agência Pública de fomento internacional Indústria Farmacêutica

GRUPO DE PESQUISA:
 Não Sim, Qual: Implicações de radicais livres em proteólise

OBS: A fonte de financiamento da pesquisa deverá estar claramente definida no projeto. Caso haja custos para o HUSM a forma de ressarcimento deverá estar definida no projeto e com o setor envolvido.

Liliane de Freitas Bauermann
Pesquisador Responsável

Avaliação e Aprovação Setorial

Atenção Chefia: favor ler o projeto e avaliar as condições de realização no Setor antes de assinar.

Setores envolvidos	Concorda com o projeto		Assinatura e carimbo dos responsáveis
<u>Departamento de Radioterapia</u>	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<u>Liliane de F. Bauermann</u> CRB: 17045 - 03D MEC: LP 02218/89 UFESM - MAT 2227178
<u>Departamento de Física</u>	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<u>Prof. Dra. Ivana Beatrice Manica da Cruz</u>
<u>Setor de Radioterapia do HUSM</u>	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<u>José Carlos da Rosa Gama</u> Chefe do Serviço - SIAPE: 381674 Radioterapia - HUSM/UFESM

PARECER COMISSÃO CIENTÍFICA GEP: De acordo Data: 15/06/11

PARECER: Av CEP

FINAL/GEP: Prof. Beatriz Silveira Porto
Gerente de Ensino e Pesquisa
HUSM - EBS/UFESM
SIAPE 1146155

Assinatura e Carimbo
Data: 16/06/11