



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS CERRO LARGO

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – LICENCIATURA

LUÍZA SPOHR

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE O POTENCIAL ANTITUMORAL DO
RESVERATROL PARA GLIOMAS**

CERRO LARGO

2015

LUÍZA SPOHR

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE O POTENCIAL ANTITUMORAL DO
RESVERATROL PARA GLIOMAS**

**Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção de grau de
Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade
Federal da Fronteira Sul.**

Orientadora. Prof.^a Dr.^a Lauren Lúcia Zamin

CERRO LARGO

2015

APRESENTAÇÃO

Este trabalho tem como objetivo fazer uma revisão bibliográfica sobre o potencial do Resveratrol como quimioterápico para gliomas, para a publicação em forma de artigo na Revista Brasileira de Biociências. As normas da revista encontram-se no anexo A.

Revisão bibliográfica sobre o potencial antitumoral do resveratrol para gliomas

Potencial antitumoral do resveratrol para gliomas

Luíza Spohr¹, Lauren Lúcia Zamin²

¹Acadêmica do Curso de Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura. Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Unidade Bloco A. Rua Jacob Reinaldo Haupenthal, 1580, 97900-000. *Campus* Cerro Largo – RS.

²Professora. Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. lauren.zamin@uffs.edu.br. Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Unidade Bloco A. Rua Jacob Reinaldo Haupenthal, 1580, 97900-000. *Campus* Cerro Largo – RS.

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo fazer uma revisão bibliográfica sobre o potencial do Resveratrol (Rsv), um polifenol encontrado no vinho tinto com efeitos benéficos a saúde humana, como potencial quimioterápico para Glioblastoma (GBM), que são tumores cerebrais malignos primários e resultam em grande mortalidade. Trata-se de um estudo descritivo, qualitativo e desenvolvido a partir de revisões bibliográficas sobre o tema relacionado a GBM e a ação do Rsv como antitumoral. Foram utilizados artigos científicos disponíveis no site PubMed publicados entre os anos 2000 e 2015, utilizando as palavras chaves “Resveratrol e Glioma” e “Resveratrol e Glioblastoma”. Foram encontrados 81 artigos publicados demonstrando o potencial antitumoral do Rsv em modelos *in vivo* e *in vitro* de GBM, com efeito em diversos parâmetros celulares e moleculares. Os artigos *in vitro* demonstraram citotoxicidade do Rsv em linhagens de glioma humano, rato e camundongo, indução de apoptose, necrose e parada no ciclo celular. As principais vias de sinalização que o Rsv modulou para exercer este efeito antitumoral foram as vias da PI3-K, ERK e mTOR. Os estudos *in vivo* demonstraram que o tratamento com Rsv foi capaz de reduzir o crescimento tumoral e prolongar a sobrevivência dos animais que receberam implante intracraniano destes tumores. Nenhum dos artigos publicados verificou potencial tóxico do Rsv nos estudos realizados. Assim, este trabalho mostrou que o Rsv possui um grande potencial como quimioterápico ou adjuvante para o tratamento dos GBM, sendo um forte candidato a testes clínicos em humanos para tratar esta doença tão agressiva e fatal.

Palavras-chave: Tumor cerebral. Polifenol. Quimioprevenção.

Literature review on the anti-tumoral potential of resveratrol for gliomas

Abstract

This paper aims to make a literature review on the potential of Resveratrol (Rsv), a polyphenol found in red wine with beneficial effects on human health, as potential chemotherapy for glioblastoma (GBM), which are primary malignant brain tumors and result in large mortality. It is a descriptive, qualitative and developed study from literature reviews on the topic related to GBM and the action of Rsv as antitumor. Scientific articles available on PubMed website published between 2000 and 2015 were used. The key words "Resveratrol and glioma" and "Resveratrol and glioblastoma" were applied. 81 articles demonstrating the antitumoral potential of Rsv in *in vivo* and *in vitro* models of GBM were found with several effects on cellular and molecular parameters. The articles showed *in vitro* cytotoxicity effect of RSV in human glioma lines, rats and mice, induction of apoptosis, necrosis and cell cycle arrest. The main signaling pathways that RSV modulated to exert this antitumor effect were the PI3-K pathways, ERK and mTOR. *In vivo* studies have shown that Rsv treatment was able to reduce tumor growth and prolong survival of animals that received an intracranial implant of these tumors. None of the published articles found toxic potential of Rsv in their studies. This paper showed that the Rsv has great potential as a chemotherapeutic or adjuvant for the treatment of GBM and it is a strong candidate to human clinical trials to treat this so aggressive and fatal disease.

Key-word: Brain Tumor. Polyphenol. Chemoprevention.

INTRODUÇÃO

O termo “glioma” abrange todos os tumores que são de origem celular glial. Os gliomas são responsáveis por aproximadamente 80% dos tumores cerebrais malignos primários e resultam em mais mortalidade do que quaisquer outros tumores (Schwartzbaum *et al.* 2006).

A primeira classificação dos tumores do sistema nervoso central foi publicada em 1979 (Zulch 1979), seguida de revisões em 1993 (Kleihues 1993), 2000 (Kleihues 2000) e 2007 (Louis *et al.* 2007). Esta classificação é baseada na avaliação histológica por microscopia de luz convencional, bem como reações de imuno-histoquímica (Sehati & Liao 2003). De acordo com o grau de malignidade, os gliomas são classificados como: i. Astrocitomas, que estão subdivididos em pilocítico ou grau I; difuso ou grau II; anaplásico ou grau III; Glioblastoma multiforme (GBM – Fig. 1) ou grau IV; e ii. Oligodendrogliomas e oligoastrocitomas, que são grau II e grau III (Louis *et al.* 2001, Okada *et al.* 2009). Os GBMs compreendem 60-70% de todos os gliomas, os astrocitomas anaplásicos 10-15%, os oligodendrogliomas anaplásicos 10% e os oligoastrocitomas anaplásicos 5-20%. O restante pertence a tipos de tumores que não são tão comuns, como ependimomas anaplásico e gangliogliomas anaplásicos (Py & Kesari 2008).

Dois fatores, relativamente raros, apresentam riscos para glioma: exposição a altas doses de radiação iônica e mutações herdadas de genes altamente penetrantes associadas a síndromes raras (Schwartzbaum *et al.* 2006). A maioria dos pacientes diagnosticados com GBM estão com idade entre 55-87 anos. Apenas, aproximadamente, 5% dos pacientes têm uma história familiar da doença (Sathornsumetee & Rich 2008). Além disso, estudos apontam para um risco menor de glioma entre pessoas com problemas alérgicos e altos níveis de soro IgE (Schwartzbaum *et al.* 2006).

Os gliomas são mais comuns em homens do que em mulheres (7,45 versus 5,17/100 mil pessoas/ano) e o risco de desenvolver esse câncer durante a vida é de 0,65 % para homens e 0,5 % para mulheres (Cbtrus 2009). É menos comum entre os negros em comparação com populações caucasianas, embora essas diferenças de gênero sejam muito pequenas no caso do oligodendroglioma. O tratamento para a cura dos gliomas ainda tem sido pensado e o prognóstico para pacientes com a doença é muito pobre (Cbtrus 2009).

O tempo de sobrevida para pacientes com um tumor maligno no cérebro relaciona-se com a idade no momento do diagnóstico e o tipo do tumor. Para cada faixa etária, a probabilidade de sobrevivência é menor para os pacientes com glioma e, dentro de cada tipo histológico, a probabilidade de sobrevivência é menor para aqueles com maior faixa etária (Cbtrus 2009). Pacientes que sofrem de GBM tem uma sobrevida média de 15 meses (Okada *et al.* 2009, Chen *et al.* 2012, Westermarck 2012).

O mais comum e maligno de todos os gliomas é o GBM, sendo que a grande maioria se desenvolve rapidamente e sem evidência de lesão. O GBM pode ser primário ou secundário (Fig. 2), os primários normalmente ocorrem em indivíduos com idade maior de cinquenta anos, enquanto o secundário ocorre em indivíduos mais jovens. Eles surgem como tumores de baixo grau e, ao longo de alguns anos, progridem para GBMs (Jovcevska *et al.* 2013). No que se refere à GBMs secundários, as origens mais comuns de lesões cerebrais metastáticas são tumores primários de pulmão (65%), pele (melanoma, 10-40%), mama e trato gastrointestinal (Chi & Komaki 2010). Apesar de suas diferenças moleculares, os dois tipos de tumores são morfologicamente indistinguíveis e respondem de forma semelhante à terapia convencional (Jovcevska *et al.* 2013).

A maioria dos pacientes com GBM, após o diagnóstico histológico, são normalmente submetidos a tratamento, incluindo ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Ressecção quase total, se possível, melhora significativamente a sobrevivência. A

radioterapia tem sido o principal tratamento para GBM durante décadas porque oferece benefício de sobrevivência inequívoca (Sathornsumetee & Rich 2008). A Temozolamida (TMZ) é um agente citotóxico de alquilação, que, se administrada concomitantemente à radioterapia, resulta em uma melhora na sobrevida global mediana de 12,1 – 14,6 meses, quando comparado com pacientes tratados apenas com a radiação (Weathers & Gilbert 2014).

É bem sabido que uma dieta saudável pode atrasar a ocorrência de distúrbios neurológicos relacionados com a idade, tais como acidente vascular cerebral e outras doenças. Cientistas investigaram intensamente os mecanismos de ação pelos quais a dieta protetora, e particularmente o vinho tinto, previne doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade. Apesar de existirem inúmeros polifenóis presentes no vinho tinto que podem ser responsáveis pelo seu efeito benéfico, o Resveratrol (Rsv) tem atraído uma atenção especial, pois é considerado um polifenol derivado de vinho tinto com efeitos cardioprotetores (Baur & Sinclair 2006, Wu & Hsieh 2011). O Rsv ocorre principalmente em uvas, amoras e amendoins (Fig. 3) (Kulkarni & Cantó 2014).

A molécula do Rsv foi isolada primeiramente da raiz da planta *Veratrum grandiflorum* O. Loes, em 1940 (Takaoka 1940), e, quase 20 anos mais tarde, da raiz de uma planta tradicional da cultura chinesa e japonesa Ko-jo-kon (*Polygonum cuspidatum*) por Nonomura *et al.* (1963). Esta planta era usada na medicina tradicional asiática para tratar dermatite supurativa, gonorreia e dislipidemia (Soleas *et al.* 1997). O Rsv é sintetizado nas plantas em resposta a estresses ambientais, tais como radiação Ultravioleta e ataque de fungos.

O Rsv ganhava pouca atenção, até um artigo estampar a frase "o paradoxo francês", em que foi sugerido que as pessoas da França, que consomem um nível relativamente elevado de gordura saturada, tiveram uma mortalidade relativamente baixa de doença cardíaca coronária, presumivelmente como resultado do consumo do vinho (Renaud & Lorgeril 1992).

Mais tarde, o Rsv foi apontado como um ingrediente ativo no vinho tinto, responsável por reduzir lipídeos séricos (Siemann & Creasy 1992), mas é claro que a concentração de Rsv no vinho é relativamente baixa (Guilford & Pezzuto 2011).

O Rsv se mostra como uma ótima opção para melhorar a saúde vascular através da redução da hipertensão e da neutralização contra a insuficiência cardíaca e a doença cardíaca isquêmica. Além disso, há ampla evidência de que o Rsv protege contra a obesidade, melhora a sensibilidade à insulina, reduz a glicose sérica e melhora a doença renal diabética em roedores (revisado em Vang *et al.* 2011). Da mesma forma, foi mostrado que o Rsv possui efeitos neuroprotetores em modelos experimentais de acidente vascular cerebral e é conhecido por retardar o processo de envelhecimento e prolongar a vida em diversas espécies (revisado em Singh *et al.* 2015).

Este composto parece ter potencial contra uma variedade de doenças (Fig. 4), mas um dos seus benefícios para a saúde mais evidentes é a sua capacidade quimiopreventiva, bem como os efeitos terapêuticos contra vários tumores. As propriedades quimiopreventivas do Rsv foram descobertas pela primeira vez em 1997 por Jung e seus colegas, quando eles demonstraram a anti-iniciação, anti-promoção e atividades anti-progressão tumoral do Rsv em diferentes modelos. Com base nesta pesquisa, outros pesquisadores demonstraram que o Rsv inibe o crescimento do tumor *in vivo* (Singh *et al.* 2015).

Tem sido relatado que o Rsv pode induzir muitas das respostas celulares, incluindo a parada do ciclo celular, diferenciação e apoptose. Mais recentemente, demonstrou-se que o Rsv pode agir como um agente quimiopreventivo para tumores, inibindo a iniciação do tumor, a promoção e a progressão em uma variedade de sistemas de cultura de células e em modelos animais. O Rsv pode inibir várias enzimas importantes envolvidas na carcinogênese, incluindo a ribonucleotideo-redutase, a NADH: ubiquinona oxidoreductase e o citocromo humano P450 (Jiang *et al.* 2005).

Alguns estudos tem focado na capacidade do Rsv atuar como quimioterápico em gliomas humanos (Zamin *et al.* 2009, Jiang *et al.* 2005). Dessa forma, o objetivo deste trabalho é fazer uma revisão bibliográfica sobre o potencial do Rsv como quimioterápico para gliomas.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão bibliográfica sobre o tema relacionado a gliomas e a ação do Rsv como antitumoral. Foram utilizados nesse processo de pesquisa artigos disponíveis no *site* PubMed. O período de referência utilizado foi aquele compreendido entre 2000 e 2015, dando maior destaque para os artigos publicados após o ano de 2010. As principais palavras chaves utilizadas na busca de referências foram: “Resveratrol e Glioma”; “Resveratrol e Glioblastoma”. Embora haja limitações, este trabalho tem como objetivo verificar o uso do Rsv como antitumoral contra gliomas e que assim possa descrever padrões atuais de resultados obtidos com o uso do Rsv para prevenir ou diminuir a progressão da doença.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos primeiros estudos demonstrando o potencial do Rsv como agente antitumoral foi realizado por Jang *et al.* (1997). Neste trabalho, o efeito antitumoral do Rsv foi demonstrado em diversos modelos tumorais, entre eles um modelo de carcinogênese em cultura de glândulas mamárias de camundongo, onde o Rsv inibiu, de maneira dose dependente, o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas induzidas por DMBA (7,12-dimetilbenzo(a)-antraceno). Neste trabalho não foi observada toxicidade, o que foi confirmado pelo exame morfológico das glândulas mamárias. Desde então diversos estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram o potencial efeito antitumoral do Rsv em tumores, tais como os GBMs. Como ilustra a Fig. 5, a cada ano mais trabalhos são publicados estudando o efeito do Rsv em gliomas, e em especial em GBM. Um resumo desses estudos é fornecido no Quadro 1.

No trabalho apresentado por Sayd *et al.* (2014), foram avaliados os efeitos do Rsv em culturas de células-tronco de glioblastoma (GSC) derivados de três biópsias de GBM distintas e de um oligoastrocitoma de grau III em comparação com duas culturas de células-tronco embrionárias e/ ou neurais (NSCs) humanas derivadas de cérebros fetais, com foco em membros da família das sirtuínas como possíveis mediadores da ação do Rsv. Observou-se uma dupla ação do Rsv em GSCs: bloqueou a proliferação de GSC até a dose de 150 μ M e induziu necrose em doses mais elevadas. Em oposição, o Rsv não teve nenhum efeito sobre o comportamento de NSC. Para determinar os mecanismos subjacentes dos efeitos do Rsv, foi estudado o seu efeito sobre a família de sirtuínas dependentes de NAD desacetilases (SIRT). A análise de *Western blot* mostrou que SIRT1 e SIRT3 foram expressos por ambas as GSCS e NSCs enquanto a expressão SIRT2 foi restrita a GSCS. O bloqueio farmacológico da atividade SIRT2 ou a regulação negativa da expressão SIRT2 com RNA de interferência (siRNAs – *small interfering RNA*) reverteu o efeito inibidor do Rsv sobre a proliferação

celular. Já, a inibição ou expressão da atividade SIRT2, não reverteu a necrose observada na presença de altas doses de Rsv em GSC.

No trabalho realizado por Zamin *et al.* (2009), foram avaliados que o Rsv e a Quercetina (Quer) diminuíram o número de células em quatro linhagens celulares de glioma, mas não em astrócitos de ratos. Baixas doses de Rsv (10 μM) ou Quer (25 μM) não acarretaram nenhum efeito sobre a indução da apoptose, mas tiveram um forte efeito na ativação da caspase 3/7 quando administrados em conjunto. As análises de *Western blot* mostraram que o Rsv (10 μM) e a Quer (25 μM) causaram uma redução na fosforilação da Akt, mas esta redução não foi suficiente por si só para mediar os efeitos destes polifenóis. Rsv e Quer cronicamente administrados apresentaram um forte sinergismo na indução da senescência como parada de crescimento celular. Estes resultados sugerem que a combinação de polifenóis pode potencializar a atividade antitumoral, reduzindo assim a concentração terapêutica necessária para o tratamento do glioma.

O trabalho desenvolvido por Sun *et al.* (2013) teve como objetivo elucidar a correlação da sensibilidade ao Rsv com atividades de biotransformação em células de GBM de humano e de rato para a terapia personalizada contra GBM. A sensibilidade das células U251, C6 e RG2 ao Rsv foi avaliada, bem como os padrões metabólicos e a capacidade enzimática da metabolização do Rsv. Todas as células foram sensíveis a 100 μM de Rsv em termos de interrupção de crescimento e aumento da apoptose. O principal metabólito do Rsv em células U251 foi o monossulfato, que é biotransformado pelas sulfotransferases (SULTs) e em células RG2 e C6 foi o monoglicuronídeo que é gerado por UDP-glicuronoil transferase (UGT). Ambos os metabólitos mostraram menor eficácia terapêutica. Estes resultados sugerem que (1) a atividade de biotransformação do Rsv diminuiu a sensibilidade em células de GBM de rato e humano; (2) os padrões metabólicos do Rsv são discrepantes entre as células de GBM humanas e de ratos; (3) o trans-Rsv é um anti-tumoral mais potente e eficaz

do que o monossulfato ou monoglicuronídeo; e (4) o valor de células RG2 e C6 no estabelecimento de modelo terapêutico *in vivo* à base de Rsv.

No trabalho desenvolvido por Yang *et al.* (2015) foi investigado o papel da proto-oncoproteína Pokemon (POK fator ontogénico mielóide e eritróide), uma proteína repressora de transcrição que regula a expressão de muitos genes e desempenha um importante papel na tumorigênese, nos efeitos biológicos induzidos por Rsv e o efeito do Rsv na expressão de Pokemon em células de glioma. Verificou-se que a super-expressão de Pokemon diminuiu a apoptose celular, senescência e efeitos anti-proliferativos induzidos por Rsv. Além disso, foi mostrado que o Rsv pode diminuir de maneira eficaz a atividade do promotor Pokemon e a expressão de Pokemon. Além disso, o Rsv também inibiu a atividade de ligação de DNA Sp1 no promotor Pokemon, considerando que não influenciou a expressão e translocação nuclear do SP1. Além disso, foi descoberto que o Rsv poderia aumentar o recrutamento de HDAC1, mas diminuiu o recrutamento de p300 ao promotor Pokemon. Assim, todos esses resultados ampliam a compreensão sobre o mecanismo anticancerígeno do Rsv em células de glioma.

No trabalho apresentado por Filippi-Chiela *et al.* (2013), linhagens de células de glioma foram tratadas com Rsv e TMZ, sozinho ou em combinações, e a indução e o papel da autofagia, da apoptose, da dinâmica do ciclo celular, da expressão proteica e estado de fosforilação foram medidos. Foram avaliados os efeitos do tratamento crônico com estes compostos sobre a indução de senescência e a capacidade clonogênica. Como esperado, a TMZ causou uma parada no ciclo celular na fase G2 e extensa resposta a danos ao DNA. O Rsv não reduziu essa resposta, mesmo aumentando os níveis de pATM, pChk2 e gammaH2AX, mas reverteu a parada em G2 induzida por TMZ, aumentando os níveis de ciclina B e pRb (S807/811) e reduzindo os níveis de pWee1 (S642) e pCdk1 (Y15). Isto sugere um estado celular de passagem forçada através do ponto G2, apesar do grande dano ao DNA, um cenário que pode produzir catástrofe mitótica. De fato, a proporção de células com

elevada irregularidade nuclear aumentou de 6 para 26% em 48 horas após o co-tratamento. Em longo prazo, foi observada uma redução da capacidade clonogênica, acompanhada por uma grande indução de senescência. A presença de Rsv obriga as células tratadas com TMZ a passar através da mitose levando à catástrofe mitótica e senescência, reduzindo a capacidade clonogênica das células de glioma e aumentando os efeitos crônicos da TMZ.

No trabalho desenvolvido por Lin *et al.* (2012), investigou-se o mecanismo responsável pela morte celular induzida por TMZ e a possibilidade de o Rsv aumentar a eficácia da TMZ. A TMZ induziu tanto morte celular por apoptose quanto a autofagia citoprotetora através da ativação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da ruptura do sinal extracelular regulado por quinase (ERK), o qual foi suprimido por Rsv, resultando em diminuição da autofagia e aumento da apoptose, sugerindo que as vias ROS/ERK desempenham papel crucial no destino das células após tratamento com TMZ. A Análise isobolográfica indicou que a combinação do Rsv e TMZ tem um efeito sinérgico. Além disso, um estudo *in vivo* de xenoenxerto de camundongo também mostrou que a co-administração de Rsv e TMZ reduzem os volumes tumorais pela supressão da autofagia mediados por ROS/ERK, e, subsequentemente, induziu a apoptose. Dessa forma, estes dados indicam que a autofagia induzida por TMZ e mediada por ROS/ERK protege os gliomas da apoptose, e a combinação do Rsv com TMZ pode melhorar a eficácia da quimioterapia para tumores cerebrais.

O trabalho apresentado por Huang *et al.* (2012) demonstrou que o Rsv é capaz de reverter a resistência a TMZ de células de GBM T98G que possuem atividade relativamente elevada de MGMT (O(6)-metilguanina-DNA-metiltransferase – proteína responsável pela resistência a TMZ). Os dados mostraram que o tratamento combinado com TMZ e Rsv resultou num potencial antitumoral melhor do que com TMZ sozinho, diminuiu o IC50 da TMZ (concentração que inibe 50% da atividade do tumor) e aumentou a indução de apoptose

em células T98G resistentes a TMZ. Coloração com Hoechst 33258 revelou aumento da morfologia apoptótica, como agregação e condensação da cromatina nuclear e citoplasmática, nas células que recebem tratamento conjugado. A análise de *Western blot* demonstrou uma significativa diminuição do conteúdo intracelular e a translocação do fator nuclear NF- κ B e aumento da clivagem de caspase-3 em células expostas a tratamento combinado, em comparação com aquelas células tratadas apenas com TMZ. Este estudo melhorou o conhecimento sobre o mecanismo de resistência à TMZ e sugeriu uma nova estratégia para quimioterapia à base de TMZ em pacientes com GBM.

O trabalho desenvolvido por Tseng *et al.* (2004) teve como objetivo investigar os efeitos do Rsv como antitumoral e antiangiogênico em células de glioma de rato RT-2. O Rsv demonstrou exercer efeitos citotóxicos e induzir a apoptose nestas células de maneira tempo e dose dependente ($P < 0,05$). O Rsv (40 mg/kg/dia) exerceu efeitos antitumorais significativos nos tumores implantados subcutaneamente (s.c.), incluindo taxas mais lentas de crescimento do tumor, maior tempo de sobrevivência dos animais e taxa mais elevada de sobrevivência dos animais ($P < 0,05$). Em contraste, o Rsv afetou tumores intracerebrais apenas nas doses maiores (100 mg/kg/dia), prolongando a sobrevivência do animal ($P < 0,05$), sem afetar a taxa de sobrevivência. A expressão do VEGF em células de glioma e a proliferação de células ECV304 foram inibidas pelo Rsv de um modo dependente da concentração. Análises de imunohistoquímica mostraram que ratos com implante s.c. e tratados com Rsv tiveram menos densidade microvascular tumoral do que os ratos do grupo controle ($P < 0,01$). Em suma, o Rsv causou citotoxicidade significativa e apoptose em células de glioma, teve efeitos antitumorais nos tumores implantados s.c., implantados intracerebralmente e angiogênese inibida em gliomas s.c.

Os dados obtidos no trabalho realizado por Jiang *et al.* (2005) mostraram que o Rsv induziu a morte de células U251 dependente da dose e do tempo, tal como medido pela

libertação de lactato-desidrogenase e ensaios de fragmentação de DNA internucleossomal. O Rsv induziu a ativação da caspase-3 e aumentou a clivagem do substrato de caspase, poli (ADP-ribose) polimerase. O Rsv induziu a fragmentação de DNA e a libertação de citocromo c das mitocôndrias para o citoplasma e a ativação de caspase-9. O Rsv também aumentou a expressão da proteína pró-apoptótica Bax e a sua translocação para a mitocôndria, inibiu a proliferação da linhagem U251 e induziu a parada do crescimento celular em G0/G1. Estes resultados sugerem que múltiplas vias de sinalização podem estar subjacentes a morte apoptótica de glioma U251 induzida pelo Rsv, o que garante uma maior exploração como um agente anticancerígeno no glioma humano.

No estudo realizado por Zhang *et al.* (2007), foi determinado o efeito do Rsv sobre o crescimento celular e a apoptose de linhagem de células de glioma de rato C6, bem como a linhagem de células de fibroblastos de rato 3T3, *in vitro*. Ao mesmo tempo, foi investigado o envolvimento da caspase-3 na apoptose destas linhagens induzida por Rsv. A exposição ao Rsv exibiu um efeito anti-proliferativo significativo e induziu um aumento na população de células apoptóticas em linhagens C6 de modo dependente da concentração e do tempo, mas não em células normais de fibroblasto 3T3. Foi observado um aumento distinto de células C6 em fase S após o tratamento com Rsv, em comparação com alterações insignificantes na distribuição do ciclo celular de células 3T3. Teste de TUNEL, coloração por Hematoxilina-Eosina (HE), e microscópio eletrônico de varredura revelou morfologia anormal em células C6 tratados com Rsv. Os dados mostraram que o Rsv pode aumentar a expressão e induzir a ativação da caspase-3 em células de glioma de rato C6. Estes resultados sugerem que o Rsv tem efeito significativo sobre indução da apoptose em células de glioma C6 *in vitro* e a caspase-3 pode atuar como um potente mediador no processo.

Yuan *et al.* (2012) verificou o impacto do Rsv sobre os efeitos antitumorais da TMZ *in vitro* ou *in vivo*. Foi descoberto que a combinação do Rsv e da TMZ resultou

significativamente em parada do ciclo celular G2/M, provocou um aumento robusto na expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (marcador de diferenciação de astrócitos), e regulou negativamente a expressão de metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9). Um estudo adicional mostrou que a TMZ em combinação com o Rsv notavelmente aumentou a produção de ROS, o que serve como um sinal para ativação de AMPK. Subsequentemente, a AMPK ativada inibiu a sinalização de mTOR e reprimiu a proteína antiapoptótica Bcl-2, a qual contribuiu aditivamente com efeitos antiproliferativos na combinação do tratamento. Em um modelo de xenoenxerto ortotópico de GBM, o tratamento TMZ mais Rsv reduziu significativamente o volume do tumor, que foi confirmado pela diminuição da expressão de Ki-67, um marcador de índice de proliferação. Esses resultados demonstram que o Rsv pode aumentar os efeitos antitumorais de GBM mediados por TMZ, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, via AMPK-TSC-mTOR dependente de ROS.

Jiang *et al.* (2009) estudou o efeito do Rsv na via de sinalização PI3-K/Akt e mTOR em células de glioma humano U251. O Rsv diminuiu a expressão e a fosforilação de Akt. Os inibidores da via PI3K e da Akt reforçaram a indução da liberação de lactato desidrogenase (LDH) e ativação de caspase 3. O Rsv também reduziu a fosforilação da proteína ribossômica S6 e o inibidor de mTOR, rapamicina, aumentou ainda mais a morte celular induzida pelo Rsv. Estes resultados sugerem que a baixa regulação de vias de sinalização Pi3k/Akt/mTOR podem ser importantes mediadores de apoptose induzidas por Rsv em células de glioma.

Em outro estudo, Jiang *et al.* (2010) testou o efeito do tratamento combinado com Rsv e sulforafano, em doses baixas, sobre a proliferação celular, migração e morte em células de glioma humano U251. O estudo mostrou que o tratamento combinado com Rsv e sulforafano inibiu a proliferação e migração celular, reduziu a viabilidade celular, induziu a liberação de LDH, diminuiu a sobrevivência e a fosforilação de Akt e aumentou a ativação de caspase-3.

O uso da combinação de componentes alimentares bioativos tais como o Rsv e sulforafano, pode ser um método viável para o tratamento do glioma.

CONCLUSÃO

A revisão mostrou que o Rsv é uma molécula promissora para o tratamento dos Gliomas, em especial os GBMs. Os estudos apresentados nesta revisão indicaram que o Rsv pode causar diminuição do tamanho tumoral, induzir apoptose, parada no ciclo celular, entre outros efeitos, em modelos *in vitro* e *in vivo*. Um ponto importante a destacar é que o Rsv se mostrou uma boa droga para usar como coadjuvante ao tratamento com TMZ. Mesmo considerando todos os aspectos promissores desta molécula, há uma necessidade de reforçar estudos mais consistentes em modelos de animais antes de transpor o uso do Rsv para humanos, pois há a necessidade de melhor conhecer a farmacodinâmica, a farmacocinética, as interações e os possíveis efeitos colaterais do uso deste composto.

Agradecimentos

Agradeço a concessão de bolsa realizada pelo Programa de Iniciação Científica e Tecnológica – PRO-ICT Edital Nº 134/UFFS/2014.

REFERÊNCIAS

- BAUR, J. A. & SINCLAIR, D. A. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat Rev Drug Discov*, 5: 493–506.
- CBTRUS. 2009-2010. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in Eighteen States in 2002-2006. Published by the Central Brain Tumor Registry of the United States, Hinsdale, IL. Disponível em: <<http://www.cbtrus.org/2009EighteenStates/CBTRUSReport-2002-006.pdf>> Acesso em: 29 mar. 2015.
- CHANDANA, S. R., MOVVA, S., ARORA, M. & SINGH, T. 2008. Primary brain tumors in adults. *Am Fam Physician*, 77: 1423-1430.
- CHEN, J., LI, Y., YU, T. S., MCKAY, R. M., BURNS, D. K., KERNIE, S. G. & PARADA, L. F. 2012. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 488: 522-526.
- CHI, A. & KOMAKI, R. 2010. Treatment of brain metastasis from lung cancer. *Cancers (Basel)*, 2: 2100-2137.
- FILIPPI-CHIELA, E. C., THOMÉ, M. P., SILVA, B. M. M., PELEGRINI, A. L., LEDUR, P. F., GARICOCHEA, B., ZAMIN, L. L. & LENZ, G. 2013. Resveratrol abrogates the Temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the Temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer*: 1-13.
- GUILFORD, J. M. & PEZZUTO, J. M. 2011. Wine and health: a review. *Am J Enol Vitic*, 62: 471–486.
- HUANG, H., LIN, H., ZHANG, X. & LI, J. 2012. Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF- κ B-dependent pathway. *Oncol Rep*, 27: 2050-2056.
- JANG, M., CAI, L., UDEANI, G. O., SLOWING, K. V., THOMAS, C. F., BEECHER, C. W., FONG, H. H., FARNSWORTH, N. R., KINGHORN, A. D., MEHTA, R. G., MOON, R. C. & PEZZUTO, J. M. 1997. Cancer chemopreventative activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275: 218-220.
- JIANG, H., SHANG, X., WU, H., GAUTAM, S. C., AL-HOLOU, S., LI, C., KUO, J., ZHANG, L. & CHOPP, M. 2009. Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. *J Exp Ther Oncol*, 8: 25-33.
- JIANG, H., SHANG, X., WU, H., HUANG, G., WANG, Y., AL-HOLOU, S., GAUTAM, S. C. & CHOPP, M. 2010. Combination Treatment with Resveratrol and Sulforaphane Induces Apoptosis in Human U251 Glioma Cells. *Neurochem Res*, 35: 152-161.
- JIANG, H., ZHANG, L., KUO, J., KUO, K., GAUTAM, S. C., GROG, L., RODRIGUEZ, A. I., KOUBI, D., HUNTER, T. J., CORCORAN, G. B., SEIDMAN, M. D. & LEVINE, R. A. 2005. Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Mol Cancer Ther*, 4: 554–561.

- JOVCEVSKA, I., KOCEVAR, N. & KOMEL, R. 2013. Glioma and glioblastoma – how much do we (not) know? *Mol Clin Oncol*, 1 (6): 935-941.
- KLEIHUES, P., BURGER, P. C. & SCHEITHAUER B. W. 1993. *Histological typing of tumors of the central nervous system*. 2nd ed. International histological classification of tumors. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- KLEIHUES, P. & CAVENEE, W. K. 2000. *Pathology and genetics of tumors of the nervous system*. World Health Organization classification of tumors. Lyon: IARC.
- KULKARNI, S. S. & CANTÓ, C. 2014. The molecular targets of resveratrol. *Biochim Biophys Acta*, 6: 1114-1123.
- LIN, C. J., LEE, C. C., SHIH, Y. L., LIN, T. Y., WANG, S. H., LIN, Y. F. & SHIH, C. M. 2012. Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy. *Free Radic Biol Med*, 52: 377-391.
- LOUIS, D. N., HOLLAND, E. C. & CAIRNCROSS, J. G. 2001. Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am J Pathol*, 159: 779-786.
- LOUIS, D. N., OHGAKI, H., WIESTLER, O. D., CAVENEE, W. K., editors. 2007. World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. Lyon: IARC.
- NONOMURA, S., KANAGAWA, H. & MAKIMOTO, A. 1963. Chemical constituents of polygonaceous plants. In. Studies on the components of Ko-jo-kon (*Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc.). *Yakugaku Zasshi*, 83: 988-990.
- OKADA, H., KOHANBASH, G., ZHU, X., KASTENHUBER, E. R., HOJI, A., UEDA, R. & FUJITA, M. 2009. Immunotherapeutic approaches for glioma. *Crit Rev Immunol*, 29: 1-42.
- PY, W. & KESARI, S. 2008. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*, 359: 492-507.
- RENAUD, S. & LORGERIL, M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339: 1523–1526.
- SARKAR, C., JAIN, A. & SURI, V. 2009. Currents concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian J Cancer*, 46: 108-119.
- SATHORNSUMETEE, S. & RICH, J. N. 2008. Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Ann NY Acad Sci*, 1142: 108 – 132.
- SAYD, S., THIRANT, C., EL-HABR, E. A., LIPECKA, J., DUBOIS, L. G., BOGEAS, A., TAHIRI-JOUTI, N., CHNEIWEISS, H. & JUNIER, M. P. 2014. Sirtuin-2 Activity is Required for Glioma Stem Cell Proliferation Arrest but not Necrosis Induced by Resveratrol. *Stem Cell Rev*, 10: 103-113.
- SCHWARTZBAUM, J. A., FISHER, J. L., ALDAPE, K. D. & WRENSCH, M. 2006. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*, 2: 494-503.
- SEHATI, N. & LIAU, L. M. 2003. Adjuvant treatment for gliomas. *Contemp Neurosurg*, 25: 1-9.
- SIEMANN, E. H. & CREAMY, L. L. 1992. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J Enol Vitic*, 43: 49–52.

- SINGH, C. K., NDIAYE, M. A. & AHMAD, N. 2015. Resveratrol and cancer: challenges for clinical translation. *Biochim Biophys Acta*, 6: 1178-1185.
- SOLEAS, G. J., DIAMANDIS, E. P. & GOLDBERG, D. M. 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem*, 30: 91-113.
- SUN, Z., SHI, S., LI, H., SHU, X. H., CHEN, X. Y., KONG, Q. Y. & LIU, J. 2013. Evaluation of resveratrol sensitivities and metabolic patterns in human and rat glioblastoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 72: 965-973.
- TAKAOKA, M. 1940. Die synthese von resveratrol und seinen derivaten. Uber die phenolischen substanzen der weissen nieswurz (*Veratrum grandifolium* Loes. Fil). *Proc Imp Acad*, 16: 405-407.
- TSENG, S. H., LIN, S. M., CHEN, J. C., SU, Y. H., HUANG, H. Y., CHEN, C. K., LIN, P. Y. & CHEN, Y. 2004. Resveratrol Suppresses the Angiogenesis and Tumor Growth of Gliomas in Rats. *Clin Cancer Res*, 10: 2190-2202.
- VANG, O., AHMAD, N., BAILE, C. A., BAUR, J. A., BROWN, K., CSISZAR, A., DAS, D. K., DELMAS, D., GOTTFRIED, C., LIN, H. Y., MA, Q. Y., MUKHOPADHYAY, P., NALINI, N., PEZZUTO, J. M., RICHARD, T., SHUKLA, Y., SURH, Y. J., SZEKERES, T., SZKUDELSKI, T., WALLE, T. & WU, J. M. 2011. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One*, 6: 19881.
- XUE, Y. Q., DI, J. M., LUO, Y., CHENG, K. J., WEI, X. & SHI, Z. 2014. Resveratrol oligomers for the prevention and treatment of cancers. *Oxid Med Cell Longev*, 2014: 1-9.
- WEATHERS, S. P. & GILBERT, M. R. 2014. Advances in treating glioblastoma. *F1000Prime Rep*, 6: 6-46.
- WESTERMARK, B. 2012. Glioblastoma - a moving target. *Ups J Med Sci*, 117: 251-256.
- WU, J. M. & HSIEH, T. C. 2011. Resveratrol: a cardioprotective substance. *Ann N Y Acad Sci*, 1215: 16-21.
- YANG, Y., CUI, J., XUE, F., OVERSTREET, A. M., ZHAN, Y., SHAN, D., LI, H., LI, H., WANG, Y., ZHANG, M., YU, C. & XU, Z. Q. D. 2015. Resveratrol Represses Pokemon Expression in Human Glioma Cells. *MolNeurobiol*, 1-13.
- YUAN, Y., XUE, X., GUO, R. B., SUN, X. L. & HU, G. 2012. Resveratrol Enhances the Antitumor Effects of Temozolomide in Glioblastoma via ROS-dependent AMPK-TSC-mTOR Signaling Pathway. *CNS NeurosciTher*, 18: 536-546.
- ZAMIN, L. L., FILIPPI-CHIELA, E. C., DILLENBURG-PILLA, P., HORN, F., SALBEGO, C. & LENZ, G. 2009. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Sci*, 100: 1655-1662.
- ZHANG, W., FEI, Z., ZHEN, H., ZHANG, J. & ZHANG, X. 2007. Resveratrol inhibits cell growth and induces apoptosis of rat C6 glioma cells. *J Neurooncol*, 81: 231-240.

ZULCH, K. J. 1979. Histological typing of tumors of the central nervous system. International histological classification of tumors. N. 21. Geneva: World Health Organization.

LISTA DE LEGENDAS

Tabela 1: Rsv e Glioma: Estudos in vivo e in vitro. Legenda: ERK – sinal extracelular regulado por quinase; GBM – glioblastoma multiforme; GSC – células tronco de glioblastoma; i.p – intraperitoneal; MGMT – O(6)-metilguanina-DNA-metiltransferase; NSC – células tronco embrionárias e/ou neural; Pokemon - POK fator ontogénico mielóide e eritróide; Quer – quercetina; ROS – espécies reativas de oxigênio; Rsv – resveratrol; s.c – subcutâneo; SIRT – sirtuínas dependentes de NAD desacetilases; TMZ – temozolamida; XIAP – proteína inibidora de apoptose ligada ao X.

Figura 1: Sequências de ressonância magnética em um paciente com GBM frontoparietal. Fonte: Chandana *et al.* (2008).

Figura 2: Alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento e na progressão de tumores astrocíticos. Fonte: Sarkar *et al.* (2009). Abreviaturas: LOH – *Loss of heterozygosity* – Perda da heterozigosidade; PDGFR – *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* – Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas. CDK – *Cyclin-dependent kinase* – Quinase dependente de ciclina; PTEN – *Phosphatase and tensin homolog* – Proteína homóloga a Fosfatase e a Tensina; TP53 – *Tumor Protein P53* – Proteína tumoral P53.

Figura 3: Estrutura química e algumas fontes do Rsv.

Figura 4: Descrição de algumas áreas de atuação do polifenol Rsv. Fonte: Xue *et al.* (2014).

Figura 5: Número de artigos encontrados no *site* Pubmed por ano utilizando as palavras chave “Resveratrol and Gliomas”. * Pesquisa realizada até final de julho de 2015.

Documentos Suplementares

Quadro 1: Rsv e Glioma: Estudos *in vivo* e *in vitro*.

Modelo de Tumor Utilizado no estudo	Dose e Via de Administração	Efeito sobre a Tumorigênese e Mecanismo de ação	Referência
<i>In vitro</i> : Linhagem de GBM de rato C6, de humano U87-MG e U138-MG e de camundongo GL261.	Rsv (10, 25 e 50 μ M) e Quer (25, 100 μ M) no meio de cultivo por 24-72 h.	Positivo: Rsv e Quer diminuíram o número de células, induziram senescência celular, inibição da via da Akt, sendo o efeito da combinação de Rsv (10 μ M) e Quer (25 μ M) maior do que das doses isoladas.	Zamin <i>et al.</i> (2009)
<i>In vitro</i> : Linhagens de GSCs obtidas de biópsias de GBM humano (TG1, TG1N, TG10 e TG 16) ou de Oligoastrocitoma (OB1), e Linhagens de NSCs (NSC24 e NSC25) obtidas de cérebro fetal humano.	Rsv (50, 100, 150, 200, 250 e 300 μ M) no meio de cultivo durante 24 h.	Observou-se uma dupla ação do Rsv: em GSCs houve bloqueio da proliferação celular, inibição do ciclo celular, indução de apoptose com doses até 150 μ M e indução de necrose em doses mais elevadas e modulação de SIRT-2.; em NSC nenhum efeito foi observado.	Sayd <i>et al.</i> (2014)
<i>In vitro</i> : Linhagem de GBM de rato C6 e RG2 e de humano U251.	Rsv (doses 20, 40, 80 e 100 μ M) no meio de cultivo por 48 h.	Positivo: Todas as linhagens foram sensíveis a 100 μ M Rsv, em termos de interrupção de crescimento e aumento da apoptose.	Sun <i>et al.</i> (2013)
<i>In vitro</i> : Linhagem de GBM humano U87-MG, T98G e U251, e células embrionárias de rim humano - Hek293 T.	<i>In vitro</i> : As células foram tratadas com 100 μ M de Rsv, no meio de cultivo durante 24 h.	Positivo: Rsv diminuiu a viabilidade celular, induziu apoptose e senescência celular e diminuiu a expressão da Pokemon.	Yang <i>et al.</i> (2015)
<i>In vitro</i> : Linhagem de GBM humano U87-MG, U-138 MG e U251.	As células receberam 30 ou 100 μ M de Rsv no meio de cultivo por 48 h.	Positivo: Rsv causou parada no ciclo celular, diminuiu a viabilidade celular, induziu catástrofe mitótica e senescência e modulou proteínas do sistema de reparo de DNA.	Filippi-Chiela <i>et al.</i> (2013)
<i>In vitro</i> : Linhagens de GBM humana U87MG e GBM8401. <i>In vivo</i> : Células U87MG foram implantadas s.c. em camundongos fêmeas nude adultas (BALB/c nu/nu).	<i>In vitro</i> : 2,5; 5; 10; 20 μ M de Rsv e 10, 20, 50 μ M de TMZ <i>In vivo</i> : TMZ e Rsv foram injetados i.p. nos animais uma vez ao dia por 12 dias nas doses de 10 e 12, 5 mg/kg, respectivamente.	<i>In vitro</i> : TMZ induziu apoptose e autofagia citoprotetora através da ativação de ROS e da ruptura do sinal da ERK, o qual foi suprimido por Rsv, resultando em diminuição da autofagia e aumento da apoptose, de maneira sinérgica com a TMZ. <i>In vivo</i> : a co-administração de Rsv e TMZ reduziram os volumes tumorais pela supressão da autofagia mediados por ROS/ERK, e, subsequentemente, induziram a apoptose.	Lin <i>et al.</i> (2012)
<i>In vitro</i> : Linhagens de GBM humano T98G, A172, U251MG e U87MG.	As células foram expostas ao Rsv (200, 400, 600 e 800 μ M) e a TMZ (100, 200, 300 e 400 μ M) por 24, 48 e 72 h.	O Rsv inibiu a viabilidade celular e induziu apoptose na linhagem T98G de maneira dose dependente. O Rsv reforçou estes eventos quando administrado junto com a TMZ. O Rsv e a TMZ inibiram a expressão da XIAP e da Survivina. O Rsv bloqueou a expressão da MGMT.	Huang <i>et al.</i> (2012)

<p><i>In vitro</i>: Linhagens de GBM de rato RT-2 e Linhagem de célula endotelial humana ECV304.</p> <p><i>In vivo</i>: Células RT-2 foram implantadas s.c. e intracranialmente em ratos Fischer.</p>	<p>As linhagens foram tratadas com 0; 0,1; 1; 5; 10; 25; 100; 250 ou 500 μM de Rsv por 6, 24 ou 48 h.</p> <p><i>In vivo</i>: Os animais foram tratados i.p. com Rsv nas doses de 10, 40 ou 100 mg/Kg i.p. diariamente durante 4 semanas.</p>	<p><i>In vitro</i>: Exerceu citotoxicidade e induziu apoptose.</p> <p><i>In vivo</i>: Rsv (40 mg/kg/dia) teve efeito antitumoral nos tumores implantados s.c., diminuindo a taxa de crescimento dos tumores e aumentando a sobrevida dos animais. Nos tumores implantados intracranialmente apenas a dose de 100mg/kg/dia prolongou a sobrevivência dos animais. Rsv também inibiu a angiogênese.</p>	<p>Tseng <i>et al.</i> (2004)</p>
<p><i>In vitro</i>: Linhagens de GBM humano U251 e U87.</p>	<p>Rsv nas concentrações 0, 10, 50 e 100 μM foi adicionado ao meio de cultivo por 6, 24 e 48h.</p>	<p>Rsv induziu parada no ciclo celular, morte celular por necrose e apoptose de maneira tempo e dose dependente.</p>	<p>Jiang <i>et al.</i> (2005)</p>
<p><i>In vitro</i>: Linhagem de células de fibroblastos de camundongo 3T3 e Linhagens de GBM de rato C6.</p>	<p>As linhagens foram tratadas com 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 μM de Rsv no meio de cultivo por 24, 48, 72 e 96 h.</p>	<p>O Rsv induziu morte celular por apoptose apenas nas linhagens tumorais.</p>	<p>Zhang <i>et al.</i> (2007)</p>
<p><i>In vitro</i>: Linhagem de GBM humano SHG44.</p> <p><i>In vivo</i>: Células SHG44 foram implantadas intracranialmente em camundongos fêmeas nude adultas (BALB/c nu/nu)</p>	<p><i>In vitro</i>: As células foram tratadas com 1, 5, 10, 25 e 50 μM de Rsv e/ou 10, 50, 100, 200 e 500 μM de TMZ.</p> <p><i>In vivo</i>: Os animais foram tratados por gavagem com Rsv 40 mg/kg e/ou TMZ 68 mg/kg.</p>	<p><i>In vitro</i>: O Rsv diminuiu o número de células, induziu apoptose, causou parada no ciclo celular, aumentou a produção de ROS, inibiu a via de sinalização da mTOR, previniu a migração celular e a metástase, reforçando o efeito da TMZ.</p> <p><i>In vivo</i>: O Rsv reduziu o volume tumoral, principalmente quando utilizado junto com a TMZ.</p>	<p>Yuan <i>et al.</i> (2012)</p>
<p><i>In vitro</i>: Linhagens de GBM U251.</p>	<p>As células foram tratadas com 0, 1, 10, 25, 50 e 100 μM de Rsv por até 24h.</p>	<p>Rsv diminuiu a expressão e a fosforilação da Akt, aumentou a morte celular por necrose e apoptose, reduziu a fosforilação da proteína ribossomal S6.</p>	<p>Jiang <i>et al.</i> (2009)</p>
<p><i>In vitro</i>: Linhagens de GBM humano U251 e U87.</p>	<p>Células foram tratadas com 25 μM de Rsv por até duas semanas.</p>	<p>O Rsv inibiu a proliferação e a migração celular, induziu a morte celular por necrose e apoptose, diminuiu a fosforilação da Akt e aumentou a ativação da caspase-3.</p>	<p>Jiang <i>et al.</i> (2010)</p>

Figura 1.

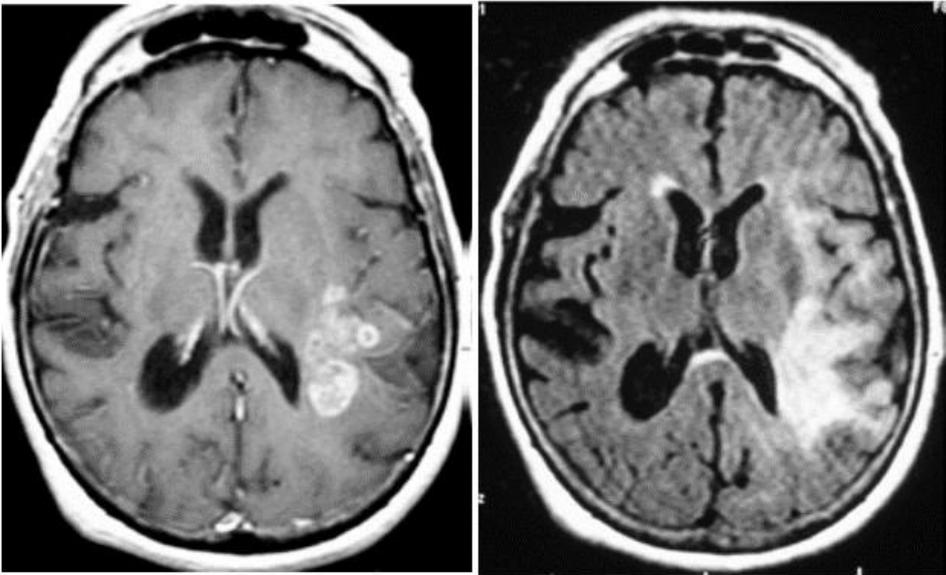


Figura 2.

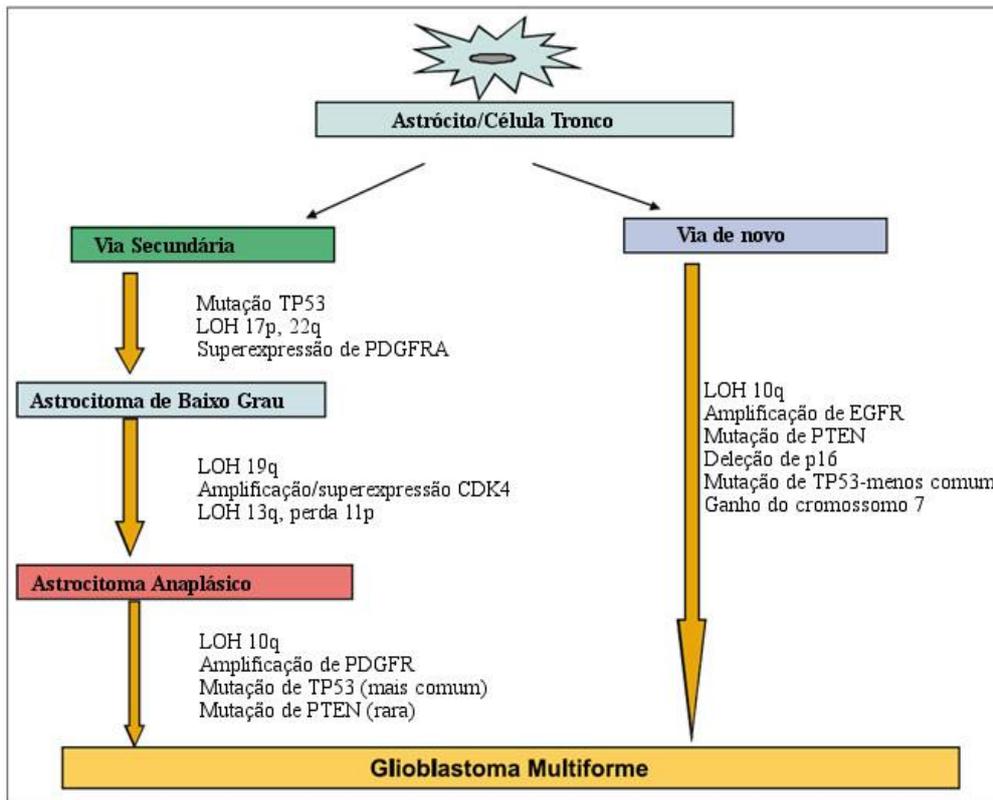


Figura 3.

RESVERATROL

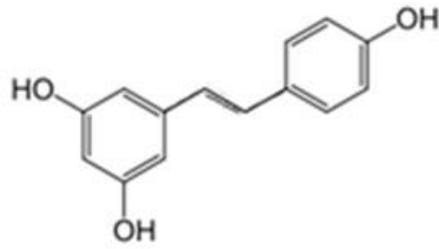
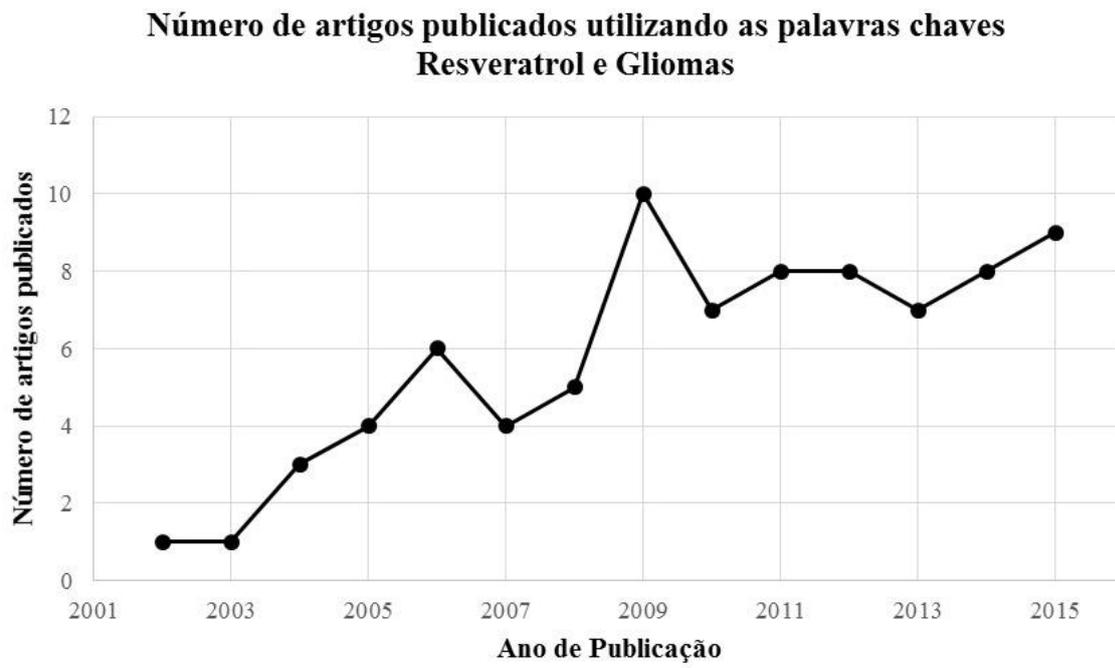


Figura 4.



Figura 5.



ANEXO 01

Diretrizes para Autores

Arquivo contendo as Diretrizes para os Autores, em formato Adobe PDF, pode ser obtido aqui. Leia as normas para submissão com a máxima atenção. Documentos submetidos fora das normas não poderão ser avaliados e, aos autores, será solicitada a sua correção, sob pena de arquivamento.

Para submissões em língua inglesa, **as quais serão priorizadas para publicação**, a Revista Brasileira de Biociências exige que, se aprovados para publicação, os manuscritos passem sob **nova e criteriosa revisão do texto final para publicação**, a encargo dos autores. **O serviço de revisão dos textos em inglês será feito por profissional designado pela Revista Brasileira de Biociências e será pago diretamente ao responsável pelo serviço, pelos autores.** Mesmo que a versão inicial do manuscrito para avaliação tenha passado por revisão de especialista na língua inglesa, ainda assim **a versão final de um manuscrito aceito deverá passar por nova revisão.**

PREPARANDO OS ARQUIVOS

Os textos deverão ser formatados em uma coluna, usando a fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento duplo e todas as margens com uma polegada (2,54 cm), em formato de papel A4. Todas as páginas devem ser numeradas sequencialmente. Não numere as linhas. O manuscrito deverá estar em formato Microsoft® Word DOC (versão 2 ou superior). Arquivos em formato RTF também serão aceitos. **Não submeta arquivos em formato Adobe® PDF.** O arquivo que contém o texto principal do manuscrito **não deverá incluir qualquer tipo de figura ou tabela.** Estas deverão ser submetidas como documentos suplementares, separadamente. Ao submeter um manuscrito, o autor responsável pela submissão deverá optar por uma das seguintes seções: ‘Artigo completo’, ‘Revisão’ ou ‘Nota científica’. Todos os manuscritos submetidos no envio on-line deverão subdivididos em **DOCUMENTO PRINCIPAL** e **DOCUMENTO(S) SUPLEMENTAR(ES)**.

DOCUMENTO PRINCIPAL

Primeira página. Deverá conter as seguintes informações:

- a) Título do trabalho, conciso e informativo, com a primeira letra em maiúsculo, sem abreviações;
- b) Nome completo e por extenso do(s) autor(es), com iniciais em maiúsculo;
- c) Título resumido do trabalho, com até 75 caracteres (incluindo espaços);
- d) afiliações e endereço completo de todos os autores (instituição financiadora (auxílio ou bolsas), deverá constar nos Agradecimentos);
- e) Identificação do autor para contato e respectivo e-mail (apenas o autor para contato deverá fornecer um e-mail).

Segunda página. Deverá conter as seguintes informações:

- a) Resumo: incluir o título do trabalho em português, quando o trabalho for escrito em inglês;

b) Abstract: incluir o título do trabalho em inglês, quando o texto for em português. Tanto Resumo como o Abstract deverão conter, no máximo, 250 (duzentos e cinquenta) palavras, estruturados em apresentação, contendo o contexto e proposta do estudo, resultados e conclusões (por favor, omita os títulos);

c) Palavras-chave e key words para indexação: no máximo cinco, não devendo incluir palavras do título.

Páginas subsequentes. ‘Artigos completos’ e ‘Notas científicas’ deverão estar estruturados em **Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão** (Resultados e Discussão podendo ser reunidos), **Agradecimentos e Referências**, seguidos de uma **lista completa das legendas das figuras e tabelas** (submetidos como documentos suplementares).

Os nomes científicos, incluindo os gêneros e categorias infragenéricas, deverão estar em *itálico*. As siglas e abreviaturas, quando utilizadas pela primeira vez, deverão ser precedidas do seu significado por extenso. Ex.: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Escrever os números até dez por extenso, a menos que sejam seguidos de unidade de medida, ou indiquem numeração de figuras e tabelas. Utilize um espaço para separar as unidades de medidas dos valores (10 m, por exemplo; não use 10m). A unidade de temperatura em graus Celsius deve ser escrita com um espaçamento entre o valor numérico (23 °C, por exemplo; não use 23°C). A posição preferencial de cada figura ou tabela não deverá ser indicada no texto. Isso ficará a critério do editor, durante a editoração. Sempre verifique que as figuras e tabelas estejam citadas no texto. No texto, use abreviaturas (Fig. 1 e Tab. 1, por exemplo). Evitar notas de rodapé. Se necessárias, utilizar numeração arábica em sequência.

As citações de autores no texto deverá seguir os seguintes exemplos: Baptista (1977), Souza & Barcelos (1990), Porto *et al.* (1979) e (Smith 1990, Santos *et al.* 1995). Citar o(s) autor(es) das espécies só a primeira vez em que as mesmas forem referidas no texto. Citações de resumos de simpósios, encontros ou congressos deverão ser evitadas. Use-as somente se for absolutamente necessário. Comunicações pessoais não deverão ser incluídas na lista de Referências, mas poderão ser citadas no texto. A obtenção da permissão para citar comunicações pessoais e dados não publicados é de exclusiva responsabilidade dos autores. Abreviatura de periódicos científicos deverá seguir o Index Medicus/MEDLINE. Citações, nas Referências, deverão conter todos os nomes dos autores (não use *et al.*)

As referências deverão seguir **rigorosamente** (sob pena de arquivamento da submissão) os seguintes exemplos (respeitar espaçamentos e uso do itálico, por favor):

Artigos publicados em periódicos:

BONGERS, F., POPMA, J., MEAVE, J. & CARABIAS, J. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio*, 74: 55-80.

QUADRA, A. A. & AMÂNCIO, A. A. 1978. A formação de recursos humanos para a saúde. *Ciência e Cultura*, 30(12): 1422-1426.

ZANIN, A., MUJICA-SALLES, J. & LONGHI-WAGNER, H. M. 1992. Gramineae: Tribo Stipeae. *Boletim do Instituto de Biociências*, 51: 1-174. (Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul, 22).

Livros publicado por editoras:

CLEMENT, S. & SHELFORD, V. E. 1960. *Bio-ecology: an introduction*. 2nd ed. New York: J. Willey. 425 p.

LOWE-MCCONNEL, R.H. 1987. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge: Cambridge University Press. 382 p.

Capítulos de livro:

CEULEMANS, R. & SAUGIER, B. 1993. Photosynthesis. In: RAGHAVENDRA, A. S. (Ed.). *Physiology of Trees*. New York: John Wiley & Sons. p. 21-50.

NAKATANI, K., BAUMGARTNER, G. & CAVICCHIOLI, M. 1997. Ecologia de ovos e larvas de peixes. In: VAZZOLER, A. E. A. M., AGOSTINHO A. A. & HAHN, N. S. (Eds.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM. p. 281-306.

Anais de encontros, congressos, etc.:

CARNEIRO, F. G. 1997. Numerais em esfero-cristais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 49., 1997, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Ed. da UFMG. 1 CD-ROM.

SANTOS, R. P. & MARIATH, J. E. A. 2000. Embriologia de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: estudo da antera e grão de pólen e sua aplicação no melhoramento. In: WINGE, H. (Org.). CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2., 2000, Encantado, RS e REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, 3., 2000, Encantado, RS. *Anais...* Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO. p. 140-142.

Dissertações de mestrado, doutorado:

DILLENBURG, L. R. 1986. *Estudo fitossociológico do estrato arbóreo da mata arenosa de restinga em Emboaba, RS*. 106 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.

Links de páginas disponíveis na Internet:

POLÍTICA. 1998. In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática. Disponível em: <http://www.priberam.pt/Dicionarios/dlp.htm>. Acesso em: 8 mar. 1999.

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX. 2012. Disponível em:<<http://www.ipni.org>>. Acesso em: 26 ago. 2012. Para documentos com DOI® (Digital Object Identifier) conhecido, seguir o exemplo abaixo (não usar “Disponível em:<....>Acesso em:....”):

SANTOS, R.P., MARIATH, J.E.A. & HESSE, M. 2003. Pollenkit formation in *Ilex paraguariensis* A.St.Hil. (Aquifoliaceae). *Plant Syst. Evol.*, 237: 185-198.<<http://dx.doi.org/10.1007/s00606-002-0257-2>>

Em trabalhos de taxonomia vegetal e florística, as seguintes normas específicas deverão ser observadas:

1. *Chaves de identificação*: dicotômicas, indentadas, utilizando alternativas 1-1'. Os táxons devem ser numerados em ordem alfabética, dentro de sua categoria taxonômica e na ordem em que aparecerão no texto.

2. As *descrições* devem ser sucintas e uniformes.

3. *Autores de nomes científicos* devem ser citados de forma abreviada, de acordo com Brummit & Powell (1992).

4. *Citações e abreviaturas* das Opus Princeps devem seguir Stafleu et al. (1976-1988). No caso de periódicos, seguir Bridson & Smith (1991). Como alternativa, seguir o *International Plant Names Index* (IPNI - <http://www.ipni.org/index.html>), onde as citações seguem as obras mencionadas acima.

5. *Índice de nomes científicos* citados no manuscrito: no caso de monografias, o índice deve relacionar, em ordem alfabética, os táxons abaixo do nível de gênero, sem os autores, colocando em negrito a página onde inicia a descrição do táxon. Os nomes válidos devem ser citados em letra normal e os sinônimos em itálico.

6. Incluir a lista de exsicatas apresentadas no manuscrito:

Schultz, A. : 12 (2.8-ICN), 25 (2.9-BLA, ICN)

12 e 25=números do coletor.

2.8=2 número do gênero e 8 número da espécie, no trabalho.

ICN=sigla do herbário onde está depositado o espécime citado.

Caso o trabalho trate apenas de um gênero:

Schultz, A. : 110 (3-ICN)

3=número da espécie.

No caso de dois ou mais coletores, citar apenas o primeiro.

Se o coletor não tiver número de coleta:

Barreto, I. L. : BLA 1325 (número do gênero e espécie, ou só o número da espécie).

7. *Material examinado*: deverá ser citado apenas material selecionado, um exemplar por município. Se a relação de material selecionado for muito extensa (ou se o autor não julgar necessário), citar todos os municípios. De modo a demonstrar a distribuição geográfica do táxon e não ultrapassar o número de páginas previstas, deverão ser citados apenas um ou poucos exemplares por região fisiográfica (Fortes 1959). Quando forem dois coletores usar o

&. Mais de dois coletores, citar o primeiro e usar o et al. Países, estados, municípios e localidades devem ser citados em ordem alfabética.

Exemplos:BRASIL. RIO GRANDE DO SUL: **Torres**, 23 maio 1975, *L.R. Dillenburg 17* (ICN);

Tupanciretã, 8 jul. 1977, *L.R.M. Baptista et al.* 911 (ICN); **Uruguaiana**, 25 mar. 1978; *M.L. Porto s.n.* (ICN 2530);

Vacaria, 1 abr. 1975, *B. Irgang & P. Oliveira 45* (BLA, ICN).

Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul:

1. *Lupinus albescens* Hook. & Arn., *Bot. Misc.* 3: 201. 1833 (Fig. 1).

Sinonímia (citar o basiônimo, quando for o caso. Citar outros sinônimos somente quando for estritamente necessário para o conhecimento do táxon na área estudada).

Descrição: baseada em material do Rio Grande do Sul, em dois parágrafos, vegetativo e reprodutivo.

Distribuição geográfica: geral e no Rio Grande do Sul, esta última utilizando as regiões fisiográficas de Fortes (1959). Não devem ser utilizados mapas com pontos de coleta no Rio Grande do Sul.

Habitat:

Observações:

Material selecionado: citar somente material do Rio Grande do Sul. Se necessário, por deficiência deste material, citar “material adicional examinado” de outras regiões.

DOCUMENTOS SUPLEMENTARES

Figuras. Todas as imagens (ilustrações, fotografias, fotomicrografias, eletromicrografias e gráficos) são consideradas ‘figuras’. Figuras e tabelas devem ser fornecidos como arquivos separados (documentos suplementares), nunca incluídos no texto do documento principal. Figuras coloridas serão permitidas e os editores estimulam que os autores assim o façam. **Não haverá cobrança de custos adicionais para figuras a cores, já que a impressão das mesmas (quando houver) será sempre feita em preto e branco.** A Revista Brasileira de Biociências não aceitará figuras submetidas no formato GIF ou comprimidas em arquivos do tipo RAR ou ZIP. Se as figuras no formato TIFF são um obstáculo para os autores, por seu tamanho muito elevado, os autores podem convertê-las para o formato JPEG, antes da sua submissão, resultando em uma significativa redução no tamanho. Entretanto, não se esqueça que a compressão no formato JPEG pode causar prejuízos na qualidade das imagens. Assim, é recomendado que os arquivos JPEG sejam salvos nas qualidades ‘Alta’ (High) ou ‘Máxima’ (Maximum). Não forneça imagens em arquivos Microsoft® PowerPoint (geralmente geradas com baixa resolução), nem embebidas em arquivos do Microsoft Word (DOC). **Arquivos contendo imagens em formato Adobe® PDF também não serão aceitos.** A submissão será arquivada se conter figuras em arquivos

DOC, PDF ou PPT. Cada figura deverá ser editada para minimizar as áreas de espaços em branco, otimizando o tamanho final da ilustração. Se a figura consiste de diversas partes separadas, é importante que uma simples figura seja submetida, contendo todas as partes da figura. Escalas das figuras deverão ser fornecidas com os valores apropriados e devem fazer parte da própria figura (inseridas com o uso de um editor de imagens, como o Adobe® Photoshop, por exemplo), sendo posicionadas no canto inferior esquerdo de cada figura. Ilustrações em preto e branco deverão ser fornecidas com aproximadamente 300 dpi de resolução, em formato TIFF ou JPG. Para fotografias (em preto e branco ou coloridas), fotomicrografias ou eletromicrografias, forneça imagens em TIFF ou JPG, com pelo menos, 300 dpi.

ATENÇÃO! Como na editoração final dos manuscritos o tamanho útil destinado a uma figura de largura de página (duas colunas) é de 170 mm, para uma resolução de 300 dpi, a largura mínima das figuras deve ser 2000 pixels. Para figuras de uma coluna (82 mm de largura), a largura mínima das figuras (para 300 dpi), deve ser pelo menos 1000 pixels.

Submissões de figuras fora destas características acima (larguras mínimas em pixels) **serão imediatamente arquivadas**. As imagens que não contêm cor devem ser salvas como ‘grayscale’, sem qualquer tipo de camada (‘layer’), como as geradas no Adobe® Photoshop, por exemplo (estes arquivos ocupam até 10 vezes mais espaço que os arquivos TIFF e JPG). Os tipos de fontes nos textos das figuras deverão ser Arial ou Helvetica. Textos deverão ser legíveis. Abreviaturas nas figuras (sempre em minúsculas) devem ser citadas nas legendas e fazer parte da própria figura, inseridas com o uso de um editor de imagens (Adobe® Photoshop, por exemplo). Não use abreviaturas, escalas ou sinais (setas, asteriscos), sobre as figuras, como “caixas de texto” do Microsoft® Word. Recomenda-se a criação de uma única estampa, contendo várias figuras reunidas, numa largura máxima de 170 milímetros (duas colunas) e altura máxima de 257 mm (página inteira). A letra indicadora de cada figura deve estar posicionada no canto inferior direito. Inclua “A” e “B” (sempre em maiúsculas, não “a”, “b”) para distingui-las colocando, na legenda, Fig. 1A, Fig. 1B, e assim por diante. Não envie figuras com legendas inseridas na base das mesmas. As legendas das figuras deverão ser enviadas no final do documento principal, imediatamente após as Referências. Não use bordas de qualquer tipo ao redor das figuras. Se houver composição de figuras (Figs 1A, 1B, etc.), use cerca de 1 mm (12 pixels para uma figura com largura de 2000 pixels) de espaço em branco entre cada figura. É responsabilidade dos autores obter a permissão para reproduzir figuras ou tabelas que tenham sido previamente publicadas.

Para cada figura, deverão ser fornecidas as seguintes informações: número da figura (em ordem numérica, usando algarismos arábicos (Figura 1, por exemplo; não abrevie) e a legenda detalhada, com até 300 caracteres (incluindo espaços).

Tabelas. Cada tabela deverá ser numerada sequencialmente, com números arábicos (Tabela 1, 2, 3, etc; não abrevie). O título das tabelas deverá estar acima das mesmas. Tabelas deverão ser formatadas usando as ferramentas de criação de tabelas (‘Tabela’) do Microsoft® Word. Colunas e linhas da tabela devem ser visíveis, optando-se por usar linhas pretas que serão removidas no processo de edição final. Não utilize padrões, tons de cinza, nem qualquer tipo de cor nas tabelas. Dados mais extensos podem ser enviados como arquivos suplementares, mas que não estarão disponíveis no próprio artigo, mas como links para consulta pelo público.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista.
2. Os arquivos de texto dos documentos principal e suplementares estão em formato Microsoft Word (.DOC) ou RTF. **Declaro, também, que o documento principal da submissão foi criado com o uso do modelo disponível em http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/public/modelo_principal.doc e que segue este modelo no que diz respeito à formatação de fontes (uso de negrito e itálico) e parágrafos.**
3. Todos os endereços de páginas na Internet (URLs), incluídos no texto (Ex.: <http://www.ibict.br>), estão ativos e prontos para clicar.
4. O texto está em espaço duplo, usa Times New Roman, tamanho 12, e emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL).
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para os Autores.
6. As figuras e tabelas não estão incluídas no texto do documento principal, mas em documentos suplementares, enviados separadamente. As figuras tem largura mínima de 970 pixels, para editoração em uma coluna, ou 2000 pixels, para editoração em duas colunas (largura de página), e qualidade compatível para publicação. **Declaro, também, que as figuras ou gráficos estão em formato JPG ou TIF.**
7. As legendas das figuras e tabelas estão no final do documento principal, logo após as Referências .
8. Estou enviando, na forma de documento suplementar, lista de 4 (quatro) potenciais avaliadores, contendo nome completo e e-mail para contato, especialistas na área do meu manuscrito. Afirmo, também, que os avaliadores não são da mesma Instituição de origem dos autores do manuscrito.
9. Estou ciente que, no caso de submissão de documentos suplementares contendo figuras coloridas, as figuras, se impressas pela Revista Brasileira de Biociências, serão em uma versão em preto e branco, com a informação de que a versão colorida das figuras estará disponível on-line.
10. Estou ciente que, caso a submissão não satisfaça alguns dos itens anteriores, **a mesma será arquivada**, estando a sua avaliação impedida.
11. Como autor responsável pela manuscrito, afirmo que todos os autores da "lista de autores" estão plenamente cientes da realização desta submissão e concordam com o conteúdo do manuscrito. **Declaro, também, que fornecerei documento eletrônico contendo a concordância e a assinatura de todos os autores, caso o manuscrito seja aceito para publicação.**
12. O(s) autor(es) concorda(m) que, se submetido em língua que não o português (inglês, por exemplo), a versão final do manuscrito (aceita) deverá passar por nova revisão da língua, às custas do(s) autor(es). **O revisor será o indicado pela Revista Brasileira de Biociências e o pagamento será feito diretamente ao revisor.**

Declaração de Direito Autoral

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

a. Autores mantêm os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a Creative Commons Attribution License que permitindo o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria do trabalho e publicação inicial nesta revista.

b. Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.

c. Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer ponto antes ou durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado (Veja O Efeito do Acesso Livre).

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.