

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS TOXICOGENÉTICOS DO RESVERATROL EM CÉLULAS DE
CÂNCER DE BEXIGA COM DIFERENTES *STATUS* DO GENE *TP53***

Tamires Cunha Almeida

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glenda Nicioli da Silva

Ouro Preto

2020

TAMIRES CUNHA ALMEIDA

**EFEITOS TOXICOGENÉTICOS DO RESVERATROL EM CÉLULAS DE
CÂNCER DE BEXIGA COM DIFERENTES *STATUS* DO GENE *TP53***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como parte das exigências para obtenção do grau de Doutor (a) em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Ouro Preto, na área de concentração Fármacos, Medicamentos e Vacinas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glenda Nicioli da Silva

Ouro Preto

2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

A447e Almeida, Tamires Cunha .
Efeitos toxicogenéticos do resveratrol em células de câncer de bexiga com diferentes status do gene TP53. [manuscrito] / Tamires Cunha Almeida. - 2020.
177 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva.
Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Ciências Farmacêuticas.

1. Bexiga- Câncer . 2. Genes supressores de tumor. 3. Polifenóis. I. Silva, Glenda Nicioli da. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 616-006.6

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

Sessão de defesa da 26ª tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas a Tamires Cunha Almeida com a defesa da tese intitulada: “Efeitos toxicogenéticos do resveratrol em células de câncer de bexiga com diferentes *status* do gene *TP53*”, avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

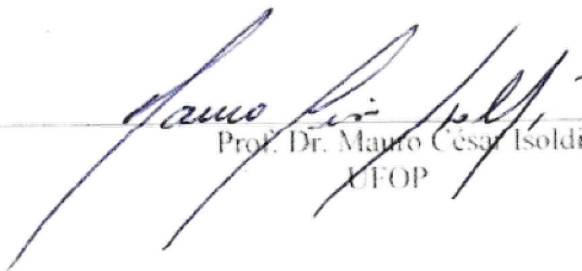
Ouro Preto, 23 de março de 2020.

PARTICIPADAÇÃO POR VIDEOCONFERÊNCIA

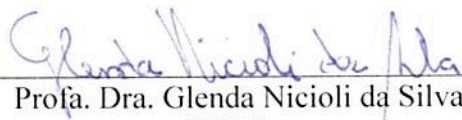
Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges
UFMG

PARTICIPADAÇÃO POR VIDEOCONFERÊNCIA

Prof. Dr. Carlos Renato Machado
UFMG


Prof. Dr. Mauro César Isoldi
UFOP


Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza
UFOP


Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva
UFOP

*O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.*

Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À minha orientadora Dr.^a Glenda Nicioli da Silva pela oportunidade de realização deste trabalho. Serei eternamente grata pela confiança depositada, pelo incentivo, pela paciência nos momentos difíceis, pelos ensinamentos e conselhos. Levarei comigo seu exemplo de profissionalismo e seu entusiasmo pela ciência.

Ao Prof. Alexandre Barbosa Reis e à Prof.^a Marta de Lana por cederem seus laboratórios para a execução de diversos experimentos.

Ao Prof. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares pela colaboração nos experimentos de citometria de fluxo.

À Prof.^a Camila Carrião Machado Garcia e à Me. Camila Chaves Coelho Guerra pela colaboração na execução do ensaio do cometa.

À Prof.^a Angélica Alves Lima e à Me. Bárbara Letícia Gonçalves de Assis pela colaboração na execução e análise dos experimentos de imunohistoquímica.

À Dr.^a Renata Tupinambá Branquinho pela colaboração para realização do ensaio do vermelho neutro. Além disso, agradeço também por sua amizade. Os desabafos na sua sala me permitiram seguir mais leve e confiante nessa caminhada.

À Universidade Federal de Ouro Preto e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo ensino de qualidade ao longo de todos esses anos.

Às agências de fomento CNPq e Fapemig pelo financiamento.

À CAPES pela concessão da bolsa.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À Deus pela vida, pelas bênçãos e por sempre iluminar meus caminhos.

Aos meus pais, Jesus João Almeida e Conceição Maria Cunha Almeida, que do andar de cima estão sempre me guiando. Sem o exemplo, amor e valores que me deram eu jamais chegaria aqui. Sou grata por ter tido a oportunidade de ser filha de vocês, que me ensinaram tanto na curta passagem que tiveram nessa vida. Obrigada meus anjos, vocês vivem em mim.

À Laís Roquete Lopes pela sua incrível amizade. Palavras são insuficientes para expressar o quanto você é importante para mim e o quanto me ajudou nessa caminhada. Obrigada por ouvir pacientemente todos os meus desabafos e vibrar a cada vitória. *You are my person.*

À Janaína Brandão Seibert pela amizade e companheirismo. Obrigada por estar sempre torcendo por mim e me incentivando a nunca desistir. Obrigada por me perdoar quando nem eu mesma fui capaz disso. Quando eu crescer quero ser igual a você.

A todos os colegas que o Laboratório de Pesquisas Clínicas me trouxe: Ana Paula Braga Lima, André Sacramento Melo, Bruna Rodrigues Barboza, Carlyne Oliveira Alves, Débora Radicchi, Gisele Lúcia Costa Pereira, João Vitor Marques Dias, Joyce Aparecida Rezende Parreiras, Luciana Bicalho Moreira Soares, Luciene Gonçalves da Paixão, Ludmila Corrêa Barbosa, Luisa Barbosa de Oliveira, Pedro Moregola Teixeira, Sávio Henrique de Souza Almeida e Tatiane Martins Barcelos Barros. Obrigada pela boa convivência e paciência durante todos esses anos.

Aos amigos Regislainy Gomes da Silva, Thiago Magalhães Gouvea e Luciana Miranda Silva por serem as melhores companhias nessa reta final tão difícil. Obrigada por ouvirem meus desabafos e por rirem junto dos problemas. Os melhores *dates* são com vocês.

Aos colegas do CiPharma: Adriana Cotta Cardoso Reis, Benila Maria Silveira, Matheus Marques Milagres, Simone Pinto Carneiro e Tatiane Roquete Amparo. Obrigada pelas conversas e conselhos. A convivência com vocês, mesmo que rápida, entre um experimento e outro, foram essenciais para deixar os dias melhores.

Ao meu professor Antônio Roberto de Barros, que além de me ensinar inglês, se tornou um grande amigo. Obrigada por sua amizade, carinho e incentivo de sempre.

À minha psicóloga Sandra Lage que com seu excelente profissionalismo me ajudou a passar pelos períodos turbulentos.

À minha família pelo carinho e orações.

Ao Prof. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira pelas conversas divertidas e pelas brincadeiras.

Aos funcionários da Escola de Farmácia e do CiPharma por transformarem o ambiente de trabalho em um local realmente agradável de estar.

À República Café com Prosa que foi meu lar durante os anos iniciais do doutorado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A atividade antitumoral do resveratrol, composto polifenólico encontrado principalmente nas uvas, tem sido estudada em diversos tipos de câncer. No câncer de bexiga, seus efeitos antiproliferativos já foram demonstrados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, entretanto pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antineoplásico e os possíveis mecanismos de ação molecular do resveratrol em células tumorais de bexiga com diferentes *status* do gene *TP53* (RT4 - *TP53* selvagem; 5637 e T24 - *TP53* mutado). Avaliou-se os efeitos do resveratrol em relação a citotoxicidade, alterações morfológicas, sobrevivência clonogênica, genotoxicidade, mutagenicidade, produção de espécies reativas de oxigênio, progressão do ciclo celular, taxas de apoptose/necrose, migração celular, metilação global, imunocitoquímica para p53 e PCNA e expressão dos genes *AKT*, *CDHI*, *CTNNBIP1*, *DNMT1*, *FGFR3*, *HAT*, *HDAC1*, *HOXB3*, *mTOR*, *MYC*, *PLK1*, *RASSF1A*, *SMAD4* e *SRC*. Os resultados mostraram que o resveratrol possui efeito citotóxico em todas as linhagens estudadas, sendo a linhagem *TP53* selvagem mais sensível à ação desse composto. Em relação aos efeitos a longo prazo, observou-se que o resveratrol causou redução do número de colônias em todas as linhagens, juntamente com redução da expressão do gene *PLK1*. Aumento significativo de danos primários ao DNA foi detectado em todas as linhagens e provavelmente ocorreu devido aos efeitos pró-oxidantes do resveratrol. Aumento significativo das taxas de apoptose foram encontradas na linhagem *TP53* selvagem ao mesmo tempo em que ocorreu redução da expressão dos genes *AKT*, *mTOR* e *SRC*. A redução da migração celular foi acompanhada pela redução da expressão do gene *SMAD4* e aumento da expressão de *CDHI*. Além disso, os efeitos antiproliferativos do composto na linhagem *TP53* selvagem foram acompanhados de modulação dos genes *HAT*, *HOXB3* e *DNMT1*. Nas linhagens mutadas para o gene *TP53* pode-se observar que o resveratrol leva a parada do ciclo celular na fase S, juntamente com redução da expressão do gene *PLK1*. Também foi observada inibição da migração celular acompanhada do aumento da expressão dos genes *CDHI* e *CTNNBIP1*. Adicionalmente, houve modulação de vias relacionadas a *HOXB3*, *RASSF1A* e *HAT* na linhagem T24. Concluindo, o resveratrol possui atividade antiproliferativa independente do *status* de *TP53* em células tumorais de bexiga, entretanto, os efeitos antineoplásicos observados devem-se a diferentes mecanismos de ação.

ABSTRACT

The antitumor activity of resveratrol, a polyphenolic compound found mainly in grapes, was verified in several cancers. The antiproliferative effects of resveratrol were also demonstrated in bladder cancer, however it is necessary to better understand its mechanism of action. In this context, the present study aimed to evaluate the antineoplastic potential and resveratrol molecular mechanisms of action in bladder tumor cells with different *TP53* gene status (wild type RT4 - *TP53*; 5637 and mutated T24 - *TP53*). The effects of resveratrol on cytotoxicity, morphological changes, clonogenic survival, genotoxicity, mutagenicity, reactive oxygen species production, cell cycle progression, apoptosis/necrosis rates, cell migration, immunocytochemistry for p53 and PCNA, global methylation and *AKT*, *CDH1*, *CTNNBIP1*, *DNMT1*, *FGFR3*, *HAT*, *HDAC1*, *HOXB3*, *mTOR*, *MYC*, *PLK1*, *RASSF1A*, *SMAD4* and *SRC* gene expression were evaluated. Resveratrol was cytotoxic in all cells lines studied and the *TP53* wild-type cells was more sensitive to the action of this compound. Regarding long-term effects, resveratrol caused a reduction in the number of colonies in all cell lines, along with a reduction in *PLK1* gene expression. Significant increase in primary DNA damage was detected in all cell lines and probably occurred due to pro-oxidant effects of resveratrol. Significant increase in apoptosis rates was found in the wild type *TP53* cells and this was accompanied by *AKT*, *mTOR* and *SRC* downregulation. Cell migration inhibition was accompanied by *SMAD4* downregulation and *CDH1* upregulation. In addition, modulation of *HAT*, *HOXB3* and *DNMT1* gene expression also contributed to antiproliferative effects of resveratrol in the wild type *TP53* cells. In the *TP53* mutated cells, cell cycle arrest at S phase with *PLK1* downregulation was observed. Cell migration inhibition was accompanied by *CDH1* and *CTNNBIP1* upregulation. Additionally, there was modulation of the *HOXB3*, *RASSF1A* and *HAT* gene expression in T24 cells, as well as nuclear PCNA reduction. In conclusion, resveratrol had antiproliferative activity in bladder tumor cells; however, the mechanisms of action are dependent on *TP53* status.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitros
μM	Micromolar
CNT	Controle não tratado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
MMS	Metil metano sulfonato
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
RES	Resveratrol
XTT	3-bis[2-etoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Tipos de tumores uroteliais de bexiga. **p. 5**
- Figura 2** Formula química estrutural do resveratrol. **p. 14**
- Figura 3** Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) das linhagens RT4, 5637 e T24 imediatamente (A) e 24 horas (B) após o tratamento. **p. 36**
- Figura 4** Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) das linhagens RT4, 5637 e T24 imediatamente (A) e 24 horas (B) após o tratamento com resveratrol. **p. 38**
- Figura 5** Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) das linhagens RT4, 5637 e T24 imediatamente (A) e 24 horas (B) após o tratamento com resveratrol. **p. 40**
- Figura 6** Morfologia celular das linhagens RT4, 5637 e T24 após o tratamento com diferentes concentrações de resveratrol. **p. 41**
- Figura 7** Porcentagem de colônias de células das linhagens RT4, 5637 e T24, aproximadamente 10 dias após o tratamento com resveratrol **p. 42**
- Figura 8** Danos primários ao DNA (intensidade da cauda do cometa) em células RT4, 5637 e T24 tratadas com resveratrol por 2 (A) ou 24 horas (B). **p. 43**
- Figura 9** Histogramas representativos da progressão do ciclo celular. **p. 44**
- Figura 10** Índices de apoptose e necrose nas células das linhagens RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. **p. 45**
- Figura 11** Fotografias e quantificação da migração celular nas linhagens RT4 (A e B), 5637 (C e D) e T24 (E e F) após tratamento com resveratrol. **p. 46**

Figura 12	Produção de espécies reativas de oxigênio em células das linhagens RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 47
Figura 13	Expressão da proteína p53 nas células das linhagens RT4, 5637 e T24. Aumento de 100x.	p. 49
Figura 14	(A) Quantificação dos níveis de PCNA nuclear em células das linhagens RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. (B) Expressão da proteína PCNA nas células das linhagens RT4, 5637 e T24.	p. 50
Figura 15	Níveis relativos de mRNA de <i>AKT</i> em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 51
Figura 16	Níveis relativos de mRNA de <i>CDHI</i> em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 52
Figura 17	Níveis relativos de mRNA de <i>CTNNBIP1</i> em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 52
Figura 18	Níveis relativos de mRNA de <i>DNMT1</i> em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 53
Figura 19	Níveis relativos de mRNA de <i>FGFR3</i> em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 54
Figura 20	Níveis relativos de mRNA de <i>HAT</i> em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 54
Figura 21	Níveis relativos de mRNA de <i>HDAC1</i> em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 55
Figura 22	Níveis relativos de mRNA de <i>HOXB3</i> em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 56
Figura 23	Níveis relativos de mRNA de <i>mTOR</i> em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 56

Figura 24	Níveis relativos de mRNA de <i>MYC</i> em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 57
Figura 25	Níveis relativos de mRNA de <i>PLK1</i> em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 58
Figura 26	Níveis relativos de mRNA de <i>RASSF1A</i> em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 58
Figura 27	Níveis relativos de mRNA de <i>SMAD4</i> em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 59
Figura 28	Níveis relativos de mRNA de <i>SRC</i> em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.	p. 60
Figura 29	Efeitos e mecanismo de ação do resveratrol na linhagem celular RT4 (<i>TP53</i> selvagem).	p. 62
Figura 30	Efeitos e mecanismo de ação do resveratrol nas linhagens celulares com mutação no gene <i>TP53</i>	p. 62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Metilação global do DNA em células das linhagens RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol **p. 48**
- Tabela 2** Frequência de células RT4, 5637 e T24 micronucleadas (%) após o tratamento com resveratrol **p. 48**
- Tabela 3** Índice de divisão nuclear para as células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol **p. 49**
- Tabela 4** Valores de *fold change* calculados para as células das linhagens RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol **p. 61**

LISTAS DE QUADROS

- Quadro 1** Estratificação de risco para câncer de bexiga não músculo invasivo **p. 7**
- Quadro 2** Mecanismo de ação do resveratrol em vários tipos tumorais **p. 15**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Câncer de Bexiga.....	4
2.2. Biologia Molecular do Câncer de Bexiga.....	8
2.3. Produtos Naturais e Câncer.....	12
2.4. Resveratrol.....	14
2.5. Resveratrol e Câncer de Bexiga.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Materiais.....	23
4.2. Linhagens Celulares.....	23
4.3. Resveratrol.....	23
4.4. Citotoxicidade e proliferação celular.....	24
4.4.1. Ensaio de XTT.....	24
4.4.2. Ensaio de absorção de vermelho neutro.....	24
4.4.3. Ensaio de exclusão de azul de tripan.....	25
4.5. Ensaio de sobrevivência clonogênica.....	26
4.6. Avaliação da morfologia.....	26
4.7. Teste do cometa.....	27
4.8. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese.....	27
4.9. Quantificação das espécies reativas de oxigênio.....	28
4.10. Progressão do ciclo celular.....	28
4.11. Ensaio de apoptose/necrose.....	29
4.12. Ensaio de migração celular.....	30
4.13. Quantificação da metilação global.....	30
4.14. Imunocitoquímica.....	31
4.15. Avaliação de expressão gênica.....	31
4.15.1. Extração de RNA.....	31
4.15.2. Análise da expressão de genes por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	32

4.16. Análise estatística	33
5. RESULTADOS	35
5.1. Citotoxicidade e Proliferação Celular	35
5.1.1. Ensaio de XTT	35
5.1.2. Ensaio de absorção de vermelho neutro	37
5.1.3. Ensaio de exclusão de azul de tripan.....	39
5.2. Avaliação da morfologia.....	41
5.3. Ensaio de sobrevivência clonogênica	41
5.4. Teste do cometa	42
5.5. Progressão do ciclo celular	43
5.6. Ensaio de apoptose/necrose	44
5.7. Ensaio de migração celular	45
5.8. Quantificação das espécies reativas de oxigênio	46
5.9. Quantificação da metilação global do DNA	47
5.10. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese	48
5.11. Imunocitoquímica	49
5.12. Avaliação de expressão gênica	50
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÃO.....	74
9. REFERÊNCIAS	77
10. ANEXOS	100
10.1. Artigo 1	100
10.2. Artigo 2	112
10.3. Artigo 3	135

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e as estimativas apontam que essa doença foi responsável por 9,6 milhões de óbitos em 2018 (BRAY *et al.*, 2018). Foi estimada, para o Brasil, para cada ano do biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer (INCA, 2018). O câncer de bexiga é o 10º tipo mais comum no mundo, incluindo homens e mulheres (BRAY *et al.*, 2018). No Brasil, é o sétimo tipo mais comum em homens e o 14º tipo mais comum em mulheres (INCA, 2018). O câncer de bexiga é um dos tumores mais caros, por paciente, para os sistemas de saúde devido às altas taxas de recorrência que exigem acompanhamento clínico e citopatológico prolongado (SVÁTEK *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, a busca por terapias mais eficazes e com menos efeitos colaterais, principalmente utilizando produtos naturais, tem se intensificado. Diversos compostos de origem vegetal, tais como óleos essenciais, flavonoides, compostos polifenólicos, dentre outros, mostraram efeitos antiproliferativos importantes (SÁVIO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2016; RETTIG *et al.*, 2008; AGGARWAL, 2008).

Dentre esses compostos, destaca-se o resveratrol, uma fitoalexina polifenólica encontrada na casca de uvas roxas e em outras plantas, produzida em resposta ao estresse ambiental, como a exposição a luz solar e metais pesados, alterações climáticas e infecção por microrganismos patogênicos (ATHAR *et al.*, 2009). O efeito antitumoral desse polifenol, *in vitro* e *in vivo*, vem sendo descrito em vários tipos tumorais (CAI *et al.*, 2015; TOMOIAIA *et al.*, 2015; JI *et al.*, 2015; MOHAPATRA *et al.*, 2015; SELVARAJ *et al.*, 2016; NIE *et al.*, 2015). Em modelos experimentais de câncer de bexiga, o resveratrol diminuiu a viabilidade celular e induziu a apoptose e parada do ciclo celular *in vitro* e reduziu o crescimento tumoral *in vivo* (BAI *et al.*, 2009; STOCCO *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2014). Além disso, Wang *et al.* (2017) mostram que o resveratrol é um potencial candidato para o tratamento de células tumorais de bexiga com resistência a doxorrubicina (WANG *et al.*, 2017).

Compostos como o resveratrol são de natureza pleiotrófica, ou seja, possuem efeitos em diversos alvos, não se compreendendo completamente seus mecanismos de ação. Diante disso, esse estudo se justifica no sentido de avaliar os efeitos antiproliferativos e toxicogênicos do resveratrol em diferentes linhagens de tumor de bexiga, na tentativa de elucidar melhor o comportamento desse composto em nível molecular.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Câncer de Bexiga

No mundo, o câncer de bexiga é a nona neoplasia mais comum em homens e a 17^a em mulheres (BRAY *et al.*, 2018). As maiores taxas de incidência ocorrem na Europa, sendo relativamente baixas nas Américas do Sul e Central, embora tenha ocorrido um aumento no número de casos em alguns países como Brasil e Cuba (ANTONI *et al.*, 2017).

Segundo dados de vigilância epidemiológica dos Estados Unidos, fornecidos pelo Comitê Americano de Câncer, nos últimos dez anos não houve alteração da taxa de mortalidade por causa do câncer de bexiga. Esse dado pode ser explicado, principalmente, pela falta de triagem ativa no diagnóstico, como existe, por exemplo, para o câncer de próstata e de mama, e pela inexistência de cura da doença em fase metastática (CHARLTON *et al.*, 2014).

O tipo mais comum de câncer de bexiga é o carcinoma de células uroteliais, que acomete as células epiteliais que revestem a bexiga. Outros tipos menos comuns são o carcinoma de células escamosas, o adenocarcinoma e o sarcoma. Esses tipos menos incidentes geralmente estão associados à irritação crônica por cálculos, cateter vesical permanente, infecção urinária ou infecção crônica por *Schistosoma haematobium* (MESSING, 2002).

Dentre os carcinomas uroteliais, 75% dos casos são superficiais e 25% músculo invasivos, podendo causar metástases para linfonodos e outros órgãos. O sistema de categorização da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Sociedade Internacional de Urologia Patológica (ISUP) divide os carcinomas uroteliais em baixo e alto grau, dependendo da atipia citológica e anormalidade arquitetônica (MOCH *et al.*, 2016). Nos tumores superficiais, o grau do tumor é mais importante para o prognóstico, enquanto que nos casos músculo invasivos, o estadiamento, baseado na profundidade da invasão tumoral, é o que vai contribuir mais no prognóstico (KAMAT *et al.*, 2016). De uma forma geral, os tumores que atingem o músculo são mais agressivos (FRITSCHÉ *et al.*, 2010), assim como os tumores de alto grau (EBLE *et al.*, 2004; SYLVESTER *et al.*, 2005) (Figura 1).

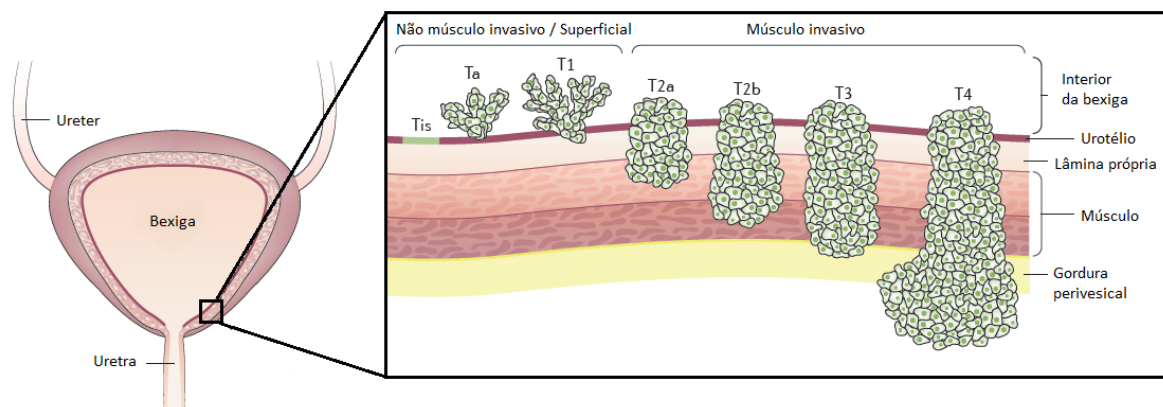


Figura 1: Tipos de tumores uroteliais de bexiga. Tis: tumor plano pouco diferenciado e confinado a mucosa; Ta e T1: tumores papilares superficiais confinados a mucosa ou que tenham invadido a lâmina própria, respectivamente. T2: tumores que invadem a camada muscular de forma superficial (T2a) ou de forma profunda (T2b). T3: tumores com invasão muscular e na camada de gordura perivesical, de forma microscópica (T3a) ou microscópica (T3b). T4: tumores que invadem próstata, útero, vagina e/ou intestino (T4a) ou paredes pélvicas e/ou abdominais (T4b). Adaptado de Sanli *et al.*, 2017.

Cerca de 80% dos casos de câncer de bexiga estão associados com a exposição ambiental. O tabagismo é a principal causa relacionada à incidência de câncer de bexiga, estando a duração e a intensidade diretamente relacionadas com o aumento do risco (FREEDMAN *et al.*, 2011). Outros fatores comuns incluem infecções crônicas do trato urinário, exposição ao arsênico e exposição ocupacional a substâncias cancerígenas nas indústrias de borracha, tintas e combustíveis fósseis (BRANDAU, BÖHLE, 2001; FENG *et al.*, 2002). Além disso, dietas pobres em frutas e vegetais também têm sido associadas com o aumento do risco de câncer de bexiga (SMITH *et al.*, 2016).

Os homens são mais acometidos que as mulheres, sendo a incidência no sexo masculino cerca de três vezes maior que no sexo feminino (razão 3,2:0,9). A incidência também aumenta com a idade. Os diagnósticos são normalmente feitos em indivíduos com mais de 65 anos, sendo rara sua detecção em pessoas com menos de 40 anos (FERLAY *et al.*, 2015).

O sintoma mais comum de câncer de bexiga é a presença de sangue, microscópico ou macroscópico, na urina (RAMIREZ *et al.*, 2016). Geralmente, quando o paciente apresenta hematuria e procura ajuda médica, o tumor está em etapas mais avançadas, com invasão muscular. Além disso, muitos pacientes com hematuria microscópica não são sempre adequadamente avaliados (ELIAS *et al.*, 2010). Uma explicação para isso pode ser porque mais de 60% dos pacientes com hematuria microscópica avaliados não apresentam explicação para esse achado clínico, desta forma, alguns médicos acreditam que há pouca

vantagem em avaliar, com exames mais invasivos e caros, esses pacientes (KHADRA *et al.*, 2000).

A avaliação de pacientes com suspeita de câncer de bexiga é realizada através de cistoscopia, um procedimento ambulatorial feito sob anestesia local (AARONSON *et al.*, 2009). Qualquer anormalidade encontrada, tais como lesões avermelhadas, papilares ou sólidas, requerem avaliação histológica. A histologia é realizada em tecidos obtidos por biópsia transuretral ou ressecção de toda a área. Além disso, a citologia de células na urina é realizada como medida auxiliar, uma vez que a presença de células com aparência maligna é indicativa da presença de lesões cancerosas na bexiga. Atualmente, não há marcadores tumorais presentes na urina com sensibilidade e especificidade para substituir a cistoscopia (BABJUK *et al.*, 2016; VAN DER AA *et al.*, 2010; PASSONI *et al.*, 2016).

Em geral, os cânceres de bexiga superficiais são frequentemente tratados com ressecção e terapia intravesical, enquanto os músculo invasivos são tratados com condutas mais agressivas, como a cistectomia parcial ou total, com ou sem quimioterapia (SANLI *et al.*, 2017).

Pacientes com câncer de bexiga superficial podem ser divididos em três grupos de risco (baixo, intermediário e alto) de acordo com o número de tumores, o tamanho do tumor, a taxa de recorrência, o estágio e o grau tumoral (CHANG *et al.*, 2016), conforme sintetizado no Quadro 1.

Quadro 1: Estratificação de risco para câncer de bexiga não músculo invasivo.

Risco	Características
Baixo	- Tumor único, baixo grau, confinado a mucosa (Ta) e com tamanho inferior a 3 cm.
Intermediário	- Tumor único, baixo grau, confinado a mucosa (Ta) e com tamanho superior a 3 cm. - Presença de vários tumores de baixo grau e confinados a mucosa (Ta). - Recorrência de tumor de baixo grau, confinado a mucosa (Ta) dentro de ano após ressecção transuretral inicial. - Tumores alto grau, confinados a mucosa (Ta) e com tamanho inferior a 3 cm.
Alto	- Tumores alto grau, confinados a mucosa (Ta) e com tamanho superior a 3 cm. - Tumores que atingem até a lamina própria (T1). - Tumores baixo grau, recorrentes e grandes (> 3 cm). - Qualquer tumor plano, pouco diferenciado e confinado a mucosa (Tis). - Falha da terapia com BCG. - Invasão linfovascular. - Comprometimento uretral e/ou prostático.

(Adaptado de Chang *et al.* 2010)

Pacientes classificados como de baixo risco são submetidos apenas a ressecção transuretral para remoção dos tumores. Após isso, são mantidos sob vigilância devido ao risco de recorrência, sendo feita uma cistoscopia após três meses da ressecção, mantendo esse acompanhamento por cinco anos (SANLI *et al.*, 2017). Pacientes com risco intermediário e alto são submetidos, além da ressecção, à terapia intravesical. Pode-se optar pela imunoterapia utilizando o Bacillus Calmette–Guérin, que é capaz de diminuir as taxas de recorrência e retardar a progressão do tumor (BÖHLE *et al.*, 2003; SYLVESTER *et al.*, 2010). Outra opção utilizada para esses pacientes é a administração intravesical de fármacos quimioterápicos, tais como mitomicina, doxorrubicina e epirrubicina, cujos resultados também mostram redução das taxas de recorrência (SYLVESTER *et al.*, 2004; PERLIS *et al.*, 2013).

A cistectomia radical, ou seja, a remoção cirúrgica da bexiga, é a terapia padrão ouro para pacientes diagnosticados com câncer de bexiga com invasão muscular (ALFRED WITJES *et al.*, 2017). Durante o procedimento de cistectomia é realizado também a ressecção de nódulos linfáticos, além da construção de um desvio urinário, utilizando parte do intestino (OMS, 2017). Apesar da cistectomia radical mostrar resultados oncológicos aparentemente bons, alguns pacientes, mesmo aqueles com doença aparentemente

confinada e linfonodos negativos, apresentam recorrência em órgãos adjacentes, sendo necessárias terapias conjuntas, tais como a utilização de quimioterapia sistêmica antes (quimioterapia neoadjuvante) ou após a cirurgia (quimioterapia adjuvante). Na quimioterapia neoadjuvante são utilizados protocolos com compostos de platina e na terapia adjuvante geralmente são utilizados protocolos com a associação de cisplatina e gencitabina (SANLI *et al.*, 2017).

Como a cirurgia de remoção completa da bexiga carrega implicações substanciais de qualidade de vida, outros protocolos têm sido propostos. Assim, alguns casos de câncer de bexiga músculo invasivos podem ser tratados através de ressecção de todo o tumor visível seguida de ablação por cautério, de forma tão profunda quanto possível, para destruição das partes invasivas do tumor (SOLSONA *et al.*, 2010). Além disso, a remoção de apenas parte da bexiga pode ser considerada viável em algumas condições (LYONS, SMITH, 2016).

Pacientes diagnosticados com câncer de bexiga metastático durante o tratamento inicial ou após a cistectomia radical são tratados com quimioterapia sistêmica. Os protocolos de primeira escolha são baseados em cisplatina e incluem as seguintes combinações: metotrexato, vinblastina, doxorubicina e cisplatina (protocolo MVAC); cisplatina, metotrexato e vinblastina; gencitabina e cisplatina; ou ainda gencitabina, cisplatina e paclitaxel. Os pacientes não elegíveis para terapia baseada em cisplatina, devido a sua alta toxicidade, podem ser tratados com carboplatina ou com taxanos, porém os resultados têm se mostrado inferiores, com menor taxa de sobrevida dos pacientes (BELLMUNT, PETRYLAK, 2012).

2.2. Biologia Molecular do Câncer de Bexiga

O limitado progresso no tratamento do câncer de bexiga tem incentivado pesquisas sobre as alterações moleculares neste tipo de câncer, em um esforço para identificar novas abordagens terapêuticas. Assim, vários genes comumente mutados no câncer de bexiga têm sido identificados, tais como *TP53*, *HRAS*, *RBI*, *TSC1*, *FGFR3* e *PIK3CA* (MARTIN-DOYLE, KWIATKOWSKI, 2015).

Em geral, tumores superficiais e de baixo grau possuem mutações nos genes *FGFR3*, *HRAS* e *PIK3CA*, enquanto que tumores invasivos possuem perda da função de

supressores tumorais, tais como *TP53* e *RBI* (ZHANG *et al.*, 2001; BAKKAR *et al.*, 2003; DOVEDI, DAVIES, 2009).

As funções do gene *FGFR3* (receptor de fator de crescimento de fibroblastos 3) estão relacionadas ao desenvolvimento embrionário e a regulação da proliferação celular, diferenciação celular, migração, angiogênese e tumorigênese no organismo adulto (DI MARTINO *et al.*, 2016). Mutações nesse gene têm sido encontradas em aproximadamente 80% dos cânceres de bexiga do tipo superficial (CAPPELLEN *et al.*, 1999; BILLEREY *et al.*, 2001; HERNANDEZ *et al.*, 2006). Essas mutações ativam as vias RAS-MAPK e PI3K, levando a proliferação celular descontrolada (DI MARTINO *et al.*, 2009; YOUSEF, GABRIL, 2017). Além disso, muitos tumores de bexiga apresentam superexpressão de *FGFR3*, mesmo na ausência de mutação (TOMLINSON *et al.*, 2007).

Mutações no gene *TP53* são encontradas em aproximadamente metade dos cânceres de bexiga, sendo essa frequência similar em todos os outros tipos de neoplasias humanas (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014). Esse gene é considerado o guardião do genoma, uma vez que ele responde a estímulos estressantes, induzindo parada do ciclo celular, apoptose, senescência e reparo de DNA. Assim, a perda de suas funções pode conduzir a proliferação contínua e ao aumento de danos no material genético. Vias relacionadas com o *TP53* estão comumente alteradas no câncer de bexiga invasivo e estão correlacionadas com pior prognóstico e resistência a algumas terapias (COOPER *et al.*, 1994; ZHU *et al.*, 2013).

O ciclo celular é a série de eventos que ocorrem entre a duplicação e a divisão celular e está intimamente associado ao crescimento, anabolismo e proliferação celular (MAC LACHLAN *et al.*, 1995). A proliferação celular descontrolada é um dos eventos principais no câncer (HANAHAN, WEINBERG, 2011). Portanto, alterações em genes relacionados com a progressão do ciclo celular estão intimamente ligados com o desenvolvimento de tumores. Por exemplo, os genes *CDC20*, *CCNA2* e *CCNB2* estão relacionados com o desenvolvimento do câncer de bexiga (HAN *et al.*, 2018). *CDC20* é necessário para o início da anáfase e a progressão do ciclo celular (WANG *et al.*, 2009), estando a alteração de sua expressão associada a pouca diferenciação e prognóstico desfavorável de tumores (CHOI *et al.*, 2013). *CCNA2* e *CCNB2* codificam ciclinas que atuam como reguladoras de quinases dependentes de ciclinas. Esses dois genes estão superexpressos no câncer de bexiga (LU *et al.*, 2010, LEE *et al.*, 2012) e correlacionados com pior prognóstico (BLAVERI *et al.*, 2005).

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína nuclear associada à atividade proliferativa. O PCNA auxilia a DNA polimerase, acelerando o processo da síntese da cadeia de DNA na fase S do ciclo celular (CHENG *et al.*, 2014). A expressão de PCNA em amostras teciduais de pacientes com carcinoma urotelial foi associada positivamente com grau, estadiamento e prognóstico do paciente (CHENG *et al.*, 1997).

A apoptose, processo de morte celular programada, é componente vital de vários processos, tais como renovação celular normal, desenvolvimento e funcionamento do sistema imune, desenvolvimento embrionário e morte celular induzida por compostos químicos. Desregulação das taxas de apoptose é um fator indutor de muitas condições, incluindo doenças neurodegenerativas, danos isquêmicos, distúrbios autoimunes e muitos tipos de câncer. Existe uma variedade de mecanismos moleculares que as células tumorais usam para suprimir a apoptose (ELMORE, 2007). *BCL2* é um oncogene que codifica uma proteína que bloqueia a apoptose. Estudos mostram que cerca de 80% dos tumores de bexiga são imunorreativos para a proteína Bcl2 (UCHIDA *et al.*, 2002, NAKOPOULOU *et al.*, 1998), sendo associado com maior grau do tumor e pior prognóstico (KING *et al.*, 1996; POLLACK *et al.*, 1997). Além disso, a superexpressão de *BCL2* em linhagens tumorais de câncer de bexiga está associada com resistência a cisplatina (KIM *et al.*, 2016). Outra proteína relacionada a apoptose e importante no câncer de bexiga é a survivina. A survivina age como uma proteína antiapoptótica ao inibir caspases, estando associada a recorrência e mortalidade do câncer de bexiga (KARAM *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008; SHARIAT *et al.*, 2009; SKAGIAS *et al.*, 2009). Um estudo utilizando 124 amostras entre tumores negativos e positivos para survivina mostrou que os tempos de sobrevivência médios foram de 18,4 versus 9,8 meses e as taxas de sobrevivência foram de 28% e 5%, respectivamente (ALS *et al.*, 2007).

Assim como em outros tipos de cânceres, a tumorigênese e a progressão do câncer da bexiga pode envolver genes de reparo (LAZARIS *et al.*, 2006). Alterações na expressão dos genes de reparo *MGMT* e *MLH1*, por exemplo, vem sendo estudadas em relação a sua influência no prognóstico de pacientes tratados ou não com quimioterapia ou imunoterapia (SANGUEDOLCE *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018).

O papel das alterações epigenéticas na regulação da expressão gênica e sua influência no câncer também tem sido estudado por muitos anos. No entanto, a importância desses eventos no câncer de bexiga avançou consideravelmente somente após as recentes expansões nas análises genômicas feitas a partir de 2011 pelo Instituto de Genômica de

Pequim e pelo Projeto Câncer Genoma Atlas (MARTIN-DOYLE, KWIATKOWSKI, 2015). Os processos de metilação do DNA e modificações em histonas são exemplos de eventos epigenéticos que podem contribuir para o desenvolvimento e progressão do câncer de bexiga (SHARMA *et al.*, 2010).

A metilação da região promotora de um gene impede diretamente sua expressão uma vez que o excesso de radicais metil impede seu reconhecimento pelos fatores de transcrição, resultando na inativação do gene (MOORE *et al.*, 2013). Células cancerígenas apresentam superexpressão dos genes responsáveis pela metilação do DNA (*DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*), o que resulta na hipermetilação de regiões promotoras e no possível silenciamento de genes supressores tumorais (JONES, BAYLIN, 2002). Regiões promotoras dos genes *IPF1*, *GALR1*, *TAL1*, *PENK*, e *TJP2* apresentam-se hipermetiladas no câncer de bexiga (WOLFF *et al.*, 2010). Outro gene que também se encontra hipermetilado no câncer de bexiga é o supressor tumoral *RASSF1A*. A hipermetilação da região promotora deste gene está fortemente associada a invasão tumoral e ao grau de diferenciação do câncer de bexiga (ZHAN *et al.*, 2017).

As histonas desacetilases e as histonas acetiltransferases são enzimas que influenciam a transcrição do DNA através do equilíbrio entre acetilação e desacetilação. A acetilação de histona reduz a condensação da cromatina, permitindo o acesso de fatores de transcrição e, portanto, a transcrição de DNA. Por outro lado, a desacetilação de histonas resulta em condensação da estrutura da cromatina, que está associada à repressão genética (CARROZZA *et al.*, 2003; MARKS *et al.*, 2001; MIN *et al.*, 2012). Neste contexto, compostos que modulem a expressão dos genes que codificam essas enzimas têm sido investigados para o tratamento do câncer (LAKSHMAIAH *et al.*, 2014; KHAN, LA THANGUE, 2012; WAPENAAR, DEKKER, 2016). No câncer de bexiga, estudos mostram um elevado número de mutações em genes relacionados com remodelação da cromatina, com 59% a 76% dos tumores com pelo menos uma mutação em *KDM6A*, *ARID1A*, *KMT2A*, *KMT2C*, *CREBBP*, *EP300* ou *SMARCA4* (GUO *et al.*, 2013; ROBERTSON *et al.*, 2017).

Predições da resposta a quimioterapia baseadas no *background* genético do tumor é uma nova área com possibilidade de resultados importantes na pesquisa do câncer. Entretanto é importante salientar que o acúmulo de alterações genéticas, e não apenas uma única mutação ou alteração, é que vai determinar ou contribuir para o prognóstico do câncer de bexiga (KIM, KIM, 2006).

2.3. Produtos Naturais e Câncer

Na busca por terapias mais eficazes contra o câncer, muitos compostos químicos são estudados com o objetivo de encontrar agentes antitumorais com alta especificidade, com poucos efeitos colaterais tóxicos e com pouca chance de desenvolvimento de resistência (MOUHID *et al.*, 2017). Nesse sentido, compostos derivados de plantas têm recebido atenção crescente devido à sua alta potência e baixa toxicidade em comparação com agentes quimioterápicos comuns (LIU, FENG, 2015) e com ações farmacológicas através de alvos moleculares específicos (GONZÁLEZ-VALLINAS *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2004).

Por milênios, as culturas mais tradicionais, como as dos povos indígenas, usaram a medicina baseada em plantas para tratar diversas doenças. Embora estudos recentes sugiram que hoje em dia a medicina popular seja menos utilizada (OYEBODE *et al.*, 2016), a utilização de produtos naturais como ponto de partida para o descobrimento e desenvolvimento de fármacos ainda é de grande valia. Das moléculas aprovadas para a quimioterapia contra o câncer entre 1940 e 2014, aproximadamente 49% são derivadas de produtos naturais (NEWMAN, CRAGG, 2016).

Em 1963, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso clínico de vincristina, um alcaloide extraído das folhas de *Catharanthus roseus*, para tratar o câncer. Este foi um dos primeiros agentes anticancerígenos derivados de plantas aprovados por esta agência (NEWMAN, CRAGG, 2016), sendo utilizado principalmente na oncologia pediátrica para o tratamento de leucemia linfoblástica (KATO, MANABE, 2018). Além disso, também é utilizado para tratar rabdomiossarcoma, neuroblastoma, linfomas e nefroblastoma (MOORE, PINKERTON, 2009; ALMAGRO *et al.*, 2015). Outro quimioterápico muito utilizado e derivado de planta é o paclitaxel. O composto, isolado da casca de *Taxus brevifolia*, é uma molécula complexa que se tornou um dos fármacos quimioterápicos mais ativos (WEAVER, 2014). A introdução do paclitaxel na prática clínica ampliou as opções terapêuticas nas últimas décadas e ótimos resultados no tratamento do câncer de mama, ovário e pulmão foram alcançados (BERNABEU *et al.*, 2017).

Em um estudo clínico de fase I/II foi demonstrada a eficácia do látex de *Euphorbia peplus* contra o câncer de pele do tipo não-melanoma (OGBOURNE, PARSONS, 2014), cujo componente mais ativo é o diterpeno macrocíclico mebutato de ingenol (RAMSAY *et al.*, 2011). Um gel contendo esse composto foi aprovado pelo FDA e pela EMA (*European*

Medicines Agency) para o tratamento da queratose actínica não hipertrófica e não hiperkeratótica, uma condição pré-cancerosa que se não tratada pode evoluir para melanoma (DOAN *et al.*, 2012; TZOGANI *et al.*, 2014). Outro composto derivado de planta em fase de estudo clínico é a curcumina. Atualmente existem 17 estudos clínicos avaliando a curcumina, principalmente estudos de terapia combinada com outras substâncias para o tratamento de vários tipos de câncer (SECA, PINTO, 2018). A curcumina pode modular uma variedade de alvos ou vias relacionadas ao câncer, podendo agir através de vários mecanismos de ação, tais como indução de catástrofe mitótica (GALI-MUHTASIB *et al.*, 2015), promoção da morte celular autofágica, um importante indutor de morte em células tumorais resistentes à apoptose (YANG *et al.*, 2017), parada do ciclo celular (DASIRAM *et al.*, 2017), inibição do fator de transcrição NF- κ B (UWAGAWA, YANAGA, 2015) e inibição dos passos cruciais para a angiogênese (FU *et al.*, 2015).

Em relação ao câncer de bexiga, um estudo clínico avaliou a aplicação intravesical do extrato aquoso de *Viscum album* em pacientes com tumores superficiais após ressecção tumoral. Os resultados mostraram que o extrato preveniu a recorrência do câncer de bexiga, além de sua boa tolerabilidade pelos pacientes (ROSE *et al.*, 2015). A isoflavona genisteína, encontrada principalmente na soja, também foi avaliada em um estudo clínico com pacientes com câncer de bexiga. Os pesquisadores encontraram redução dos níveis de p-EGFR (receptor fator de crescimento epidermal) em biopsias do tecido tumoral, assim como demonstraram a segurança do uso do composto. As toxicidades observadas foram principalmente gastrointestinais ou metabólicas leves a moderadas (MESSING *et al.*, 2012).

Ainda em fases mais iniciais de estudos, diversos outros compostos têm mostrado resultados interessantes no câncer de bexiga (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; SU *et al.*, 2016; SAGARA *et al.*, 2010; SHI *et al.*, 2017). Por exemplo, o alil isotiocianato, composto encontrado principalmente na mostarda, tem sido muito estudado para o tratamento do câncer de bexiga devido a sua alta biodisponibilidade na urina, ou seja, quando uma dose oral dessa substância é administrada, quase sua totalidade é eliminada por excreção renal passando pela bexiga. Enquanto permanece na bexiga, as células cancerígenas são expostas à substância, que é capaz de induzir bloqueio do ciclo celular e apoptose (MUNDAY *et al.*, 2008; SÁVIO *et al.*, 2014). Outro composto natural que vem demonstrando resultados interessantes no câncer de bexiga é o resveratrol. Ele é capaz de induzir apoptose e

bloqueio do ciclo celular em culturas de tumor de bexiga (BAI *et al.*, 2009), além de reduzir o crescimento tumoral *in vivo* (WU *et al.*, 2014).

2.4. Resveratrol

O resveratrol é um composto polifenólico encontrado em diversos produtos naturais, tais como uvas, amoras, mirtilos, framboesas e amendoins, em diferentes concentrações. Uma fonte bastante conhecida de resveratrol é o vinho tinto, no qual podemos encontrar concentrações de resveratrol variando de 8,63 a 24,84 μM , dependendo do tipo da uva, do local de cultivo e do método de preparação (WANG *et al.*, 2002). O resveratrol existe como isômeros *cis* e *trans*, sendo o *trans*-resveratrol o isômero mais estável se protegido contra pH elevado e luz (LASTRA, VILLEGAS, 2007).

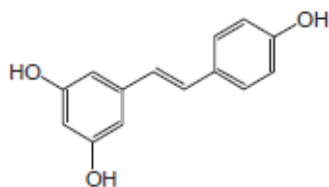


Figura 2: Formula química estrutural do resveratrol (PANGENI *et al.*, 2014)

O impulso inicial para pesquisas sobre o resveratrol foi a partir da observação da baixa incidência de doenças cardiovasculares na população francesa, mesmo com uma dieta com alto teor de gordura, o que foi associado com o alto consumo de vinho tinto. Esse fenômeno ficou conhecido como paradoxo francês, e a partir dele, foram descobertas as funções cardioprotetoras do resveratrol (RENAUD, LORGERIL, 1992).

Após a descoberta de seus efeitos benéficos ao sistema cardiovascular, outras inúmeras atividades biológicas do resveratrol foram descritas. Dentre os efeitos mais investigados desse composto estão suas atividades anti-inflamatória (JANG *et al.*, 1999), antiviral (CAMPAGNA, RIVAS, 2010), antioxidante (FAUCONNEAU *et al.*, 1997), antibacteriana (TEGOS *et al.*, 2002), fungicida (JUNG *et al.*, 2005), inibidora de agregação plaquetária (PACE-ASCIAK *et al.*, 1995), hepatoprotetora (SENER *et al.*, 2006; KASDALLAH-GRISSA *et al.*, 2006), antienvhecimento (MARCHAL *et al.*, 2013), antidiabética (SHARMA *et al.*, 2011), imunomoduladora (PETRO, 2011), neuroprotetora (SARUBBO *et al.*, 2018) e antitumoral (SAVOURET, QUESNE, 2002).

As propriedades antitumorais do resveratrol foram demonstradas pela primeira vez, em 1997, por Jang e colaboradores. Os resultados encontrados por esses autores mostraram que o resveratrol possui atividade nos três estágios do processo de carcinogênese (JANG *et al.*, 1997). Posteriormente, outros estudos complementaram as informações sobre os efeitos do resveratrol na carcinogênese. De maneira resumida, o resveratrol age inibindo a iniciação através da regulação das atividades de enzimas metabolizadoras de fase I e II (CHEN *et al.*, 2004; CIOLINO, YEH, 1999), inibindo a mutagênese (KIM *et al.*, 2002) e as espécies reativas de oxigênio (SHARMA *et al.*, 1994). Na etapa de promoção, ele age através da indução da parada do ciclo celular (WOLTER *et al.*, 2001; FERRY-DUMAZET *et al.*, 2002) e apoptose (DORRIE *et al.*, 2001; TINHOFER *et al.*, 2001). Finalmente, o resveratrol inibe os eventos de progressão tumoral inibindo a angiogênese, a invasão tumoral e as metástases (BAI *et al.*, 2010; VERGARA *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2008; WENG *et al.*, 2010).

Neste sentido, ao longo dos anos, diversos estudos vêm relatando as atividades antiproliferativas do resveratrol em vários tipos tumorais, tais como colo do útero, colorretal, pulmão, próstata e mama, dentre outros, através de uma ampla gama de mecanismos de ação, como indução de apoptose, inibição de invasão e migração celular, inibição da angiogênese, parada do ciclo celular e outras, conforme sintetizado no Quadro 2.

Quadro 2: Mecanismo de ação do resveratrol em vários tipos tumorais

Tipo de câncer	Mecanismo de ação do resveratrol	Referências
Cabeça e pescoço	Indução de apoptose através da ativação da caspase-3, da alteração da via Bax/Bcl-2 e ativação de AMPK.	CAI <i>et al.</i> , 2015
	Inibição da invasão e migração celular.	LIN <i>et al.</i> , 2015; SHAN <i>et al.</i> , 2014
	Inibição do crescimento e ativação de vias de morte celular.	SHROTRIYA <i>et al.</i> , 2015; BAEK <i>et al.</i> , 2016.
Colo do útero	Indução de apoptose.	ZHANG <i>et al.</i> , 2014
	Inibição da proliferação celular.	LI <i>et al.</i> , 2015; TOMOAIYA <i>et al.</i> , 2015

	Indução de autofagia.	GARCÍA-ZEPEDA <i>et al.</i> , 2013
	Inibição da metaloproteinase-9 (MMP-9) que está relacionada com migração celular e metástases.	KIM <i>et al.</i> , 2012
Colorretal	Inibição da invasão e migração celular.	JI <i>et al.</i> , 2015
	Diminuição do tamanho de tumores em camundongos.	SAUD <i>et al.</i> , 2014
	Inibição da proliferação e parada do ciclo celular nas fases G0/G1 e G2/M.	ALI, BRAUN, 2014
	Indução de danos ao DNA.	COLIN <i>et al.</i> , 2014; SCHROETER, MARKO, 2014
	Indução de apoptose.	YANG <i>et al.</i> , 2015
	Diminuição da angiogênese.	WONG, FISCUS, 2015
Esôfago	Indução de apoptose através da via Bax/Bcl2.	ZHOU <i>et al.</i> , 2003
	Inibição do crescimento e parada do ciclo celular na fase sub-G1.	TANG <i>et al.</i> , 2013
	Supressão da proliferação celular.	FAN <i>et al.</i> , 2014
Estômago	Inibição da proliferação celular.	HOLIAN <i>et al.</i> , 2002; JING <i>et al.</i> , 2016
	Indução de apoptose, diminuição da expressão de survivina e parada do ciclo celular na fase G0/G1.	LIU, ZHANG, 2014
	Diminuição da capacidade clonogênica e indução de senescência.	YANG <i>et al.</i> , 2013
	Indução da expressão de p53.	SHIN <i>et al.</i> , 2012
Fígado	Indução de apoptose.	PENG <i>et al.</i> , 2015; YANG <i>et al.</i> , 2013; DU <i>et al.</i> , 2012
	Diminuição da expressão de survivina.	OU <i>et al.</i> , 2014

	Inibição de histonas desacetilases.	VENTURELLI <i>et al.</i> , 2013
	Diminuição da angiogênese.	YU <i>et al.</i> , 2010
Leucemias	Indução de apoptose e parada do ciclo celular na fase S.	TSAN <i>et al.</i> , 2002
	Indução de apoptose.	ZUNINO, STORMS, 2015; WU <i>et al.</i> , 2015
Mama	Indução de apoptose.	MOHAPATRA <i>et al.</i> , 2015; SINGH <i>et al.</i> , 2014
	Inibição da proliferação celular.	WANG <i>et al.</i> , 2015; KHAN <i>et al.</i> , 2014
	Indução de autofagia e inibição de Akt.	ALAYEV <i>et al.</i> , 2015
Ósseo	Indução de apoptose e inibição de metaloproteinases.	DAI <i>et al.</i> , 2015
	Inibição de Akt.	CHEN <i>et al.</i> , 2015
Ovário	Supressão do crescimento tumoral.	LEE <i>et al.</i> , 2009; ZHONG <i>et al.</i> , 2015
	Indução de apoptose e inibição de Akt.	GWAK <i>et al.</i> , 2015
	Indução da expressão de E-caderina e apoptose.	KIM <i>et al.</i> , 2016
	Indução de apoptose e autofagia.	LANG <i>et al.</i> , 2015
Pele	Modulação da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular.	REAGAN-SHAW <i>et al.</i> , 2004
	Indução de apoptose.	KALRA <i>et al.</i> , 2008; HEIDUSCHKA <i>et al.</i> , 2014; HABIBIE <i>et al.</i> , 2014; HAO <i>et al.</i> , 2013
	Redução do tamanho do tumor.	AZIZ <i>et al.</i> , 2005, CHEN <i>et al.</i> , 2012
	Parada do ciclo celular na fase G2/M.	YU <i>et al.</i> , 2016

Próstata	Inibição da proliferação celular.	LEE <i>et al.</i> , 2014; MITANI <i>et al.</i> , 2014; DHAR <i>et al.</i> , 2015; KUMAR <i>et al.</i> , 2015
	Indução de autofagia.	SELVARAJ <i>et al.</i> , 2016
Pulmão	Inibição tumoral através da regulação de diversos RNAs longos não codificantes (lncRNAs).	YANG <i>et al.</i> , 2015
	Indução de apoptose.	LUCAS, KOLODZIEJ, 2015; MA <i>et al.</i> , 2015
	Redução da viabilidade celular e da capacidade clonogênica.	NIE <i>et al.</i> , 2015
Renal	Inibição da proliferação celular e diminuição da expressão do fator de crescimento vascular endotelial.	YANG <i>et al.</i> , 2011
Tireoide	Indução de apoptose.	TRUONG <i>et al.</i> , 2011; YU <i>et al.</i> , 2013
	Aumento da expressão de p53.	SHIH <i>et al.</i> , 2002
Útero e endométrio	Indução de apoptose.	SEXTON <i>et al.</i> , 2006
	Parada do ciclo celular na fase S.	BHAT, PEZZUTO, 2001

Além dos diversos estudos sobre o resveratrol realizados *in vitro* e em animais, existem estudos clínicos demonstrando o efeito do resveratrol em pacientes com câncer. Patel e colaboradores (2010) demonstraram que a ingestão de resveratrol (0,5-1,0 grama) diariamente por 8 dias reduziu a proliferação celular, evidenciada pela redução da expressão de Ki-67 em biopsias de pacientes com câncer coloretal, quando comparadas com pacientes que não ingeriram resveratrol. Além disso, os autores mostraram boa tolerabilidade dos pacientes ao resveratrol. Howells e colaboradores (2011) também demonstraram bons resultados em pacientes com câncer coloretal. Pacientes diagnosticados com câncer coloretal e metástases hepáticas receberam 5 gramas/dia de resveratrol micronizado durante 14 dias. Foi observado um aumento de caspase-3 em biopsias do tecido tumoral hepático, além de poucos efeitos adversos. Um outro estudo mostrou que a ingestão de 5-50 mg de resveratrol 2 vezes ao dia durante 12 semanas por mulheres com

risco de câncer de mama aumentado levou a redução da metilação do gene supressor tumoral *RASSF1A* (ZHU *et al.*, 2012).

2.5. Resveratrol e Câncer de Bexiga

O primeiro estudo avaliando os efeitos do resveratrol no câncer de bexiga foi publicado em 2009. Nesse estudo, Bai e colaboradores (2009) mostraram que o resveratrol induz apoptose em células de câncer de bexiga através da modulação de proteínas da família Bcl-2 e ativação das caspases 9 e 3. O resveratrol também levou a parada do ciclo na fase G1 por ativação da proteína p21 e redução de ciclina D1. Além disso, o tratamento com resveratrol diminuiu a expressão do fator de crescimento endotelial vascular e do fator de crescimento de fibroblasto, o que contribuiu para a inibição do crescimento tumoral no modelo *in vivo* de câncer de bexiga xenográfico.

Depois disso, outros autores confirmaram o potencial do resveratrol no tratamento do câncer de bexiga, mostrando a capacidade desse composto em reduzir a viabilidade celular, induzir parada do ciclo celular, induzir apoptose e inibir migração e invasão celular (LIN *et al.*, 2012; STOCCO *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2014; BAI *et al.*, 2017).

O efeito do resveratrol em células de câncer de bexiga com resistência a doxorubicina também foi demonstrado (WANG *et al.*, 2017), assim como seu potencial em ser utilizado em combinação com outros fármacos, como por exemplo com rapamicina, especialmente para tumores de bexiga com mutações na via PI3K/mTOR (ALAYEV *et al.*, 2016).

Além disso, Zhou e colaboradores (2014) demonstraram que células de bexiga não tumorais são mais resistentes aos efeitos citotóxicos do resveratrol do que células tumorais, indicando seletividade do composto.

Embora vários estudos venham mostrando os efeitos do resveratrol no câncer de bexiga, muito ainda precisa ser feito no sentido de entender seu mecanismo de ação molecular, uma vez que se trata de uma doença muito complexa e de uma substância com múltiplas ações.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o potencial antineoplásico e os possíveis mecanismos de ação molecular do resveratrol em células tumorais de bexiga com diferentes *status* do gene *TP53* (RT4 - tumor grau 1, com gene *TP53* selvagem; 5637, tumor grau 2, com gene *TP53* mutado; e T24 – tumor grau 3 e *TP53* mutado).

3.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do resveratrol quanto aos seus efeitos:

- Citotóxicos e antiproliferativos;
- Sobre a morfologia celular;
- Genotóxicos e mutagênicos;
- Na produção de espécies reativas de oxigênio;
- Sobre a progressão do ciclo celular;
- Sobre as taxas de apoptose e necrose;
- Sobre a migração celular;
- Sobre a metilação global do DNA;
- Sobre a expressão das proteínas p53 e PCNA;
- Na modulação da expressão dos genes: *AKT*, *CDH1*, *CTNNBIP1*, *DNMT1*, *FGFR3*, *HAT*, *HDAC*, *HOXB3*, *mTOR*, *MYC*, *PLK1*, *RASSF1A*, *SMAD4* e *SRC*.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

Resveratrol ($\geq 99\%$), meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), meio de cultura RPMI, meio de cultura branco (DMEM sem vermelho de fenol), penicilina G, streptomomicina, tripsina, iodeto de propídeo e corante vermelho neutro foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). Soro Fetal Bovino foi adquirido da Cultilab Ltda. (Campinas, Brasil). Anfotericina B foi adquirida de Cristália (Itapira, Brasil). O kit Cell Proliferation II (XTT) foi adquirido da Roche Diagnostics (Mannheim, Alemanha). Solução corante de Giemsa foi adquirida da Dinâmica (Diadema, Brasil). O kit miRNeasy Mini foi adquirido da Qiagen (Hilden, Alemanha). O kit High Capacity e os *primers* foram adquiridos da Applied Biosystems (Foster, Estados Unidos). O kit FITC AnnexinV/Dead Cell Apoptosis foi adquirido da Invitrogen (Carlsbad, Estados Unidos).

4.2. Linhagens Celulares

Células de carcinoma urotelial humano da linhagem RT4 (tumor de baixo grau, com gene *TP53* selvagem), linhagem 5637 (tumor de alto grau, com duas mutações no gene *TP53*, uma no códon 72 [Arg > Pro] e uma no códon 280 [Arg > Thr]) e linhagem T24 (tumor de alto grau, com mutação no gene *TP53* [deleção da tirosina 126]) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As linhagens RT4 e T24 foram mantidas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina G, 100 U/mL streptomomicina e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B. A linhagem 5637 foi mantida em meio RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina G, 100 U/mL streptomomicina e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B. Todas as linhagens foram mantidas a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂.

4.3. Resveratrol

O resveratrol foi solubilizado, a uma concentração de 500 μM , em meio de cultura com 2% de DMSO, no momento do uso. Em todos os experimentos utilizou-se a mesma concentração de DMSO como controle.

4.4. Citotoxicidade e proliferação celular

Para os ensaios de citotoxicidade e proliferação celular, para todos os métodos utilizados, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço para T24 e 5637, e $1,5 \times 10^4$ células/poço para RT4). Depois de 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações de resveratrol (12,5; 25; 50; 100; 150 e 200 μM) por 24 horas. As concentrações utilizadas e o tempo de tratamento foram definidos com base nos estudos de Bai e colaboradores (2009) e Lin e colaboradores (2012). Células não tratadas foram utilizadas como controle (CNT). Posteriormente cada experimento foi conduzido conforme detalhado abaixo.

4.4.1. Ensaio de XTT

O ensaio de XTT foi conduzido conforme descrito por Sávio e colaboradores (2014). Para avaliação da citotoxicidade, após o tratamento, as células foram lavadas com solução de Hanks (KCL 0,4 g; KH_2PO_4 0,06 g; Na_2HPO_4 0,04g; NaHCO_3 0,35 g; NaCl 8 g; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 1 g; H_2O 1000 ml) e em seguida preparadas para a leitura. Nesse processo foi adicionado meio de cultura branco (DMEM sem vermelho de fenol) nos poços e posteriormente a solução de XTT em cada poço. Após, aproximadamente, 90 minutos, a absorbância foi medida em 492 e 690 nm.

Para os experimentos de proliferação celular, após o tratamento, as células foram lavadas com solução de Hanks. Na sequência, meio de cultura novo foi adicionado e as células foram incubadas por mais 24 horas. Após esse período, as células foram preparadas para leitura da mesma forma que no experimento de citotoxicidade.

Os valores de leitura das absorbâncias são proporcionais à quantidade de células viáveis. Todos os testes foram conduzidos em triplicata. O cálculo utilizado para apresentação dos resultados foi:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{média das absorbâncias}}{\text{média das absorbâncias do controle}} \times 100$$

4.4.2. Ensaio de absorção de vermelho neutro

O ensaio de absorção de vermelho neutro foi conduzido conforme descrito pela OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*) (2019), com pequenas modificações. Para avaliação da citotoxicidade, após o tratamento, o meio de cultura foi retirado, adicionou-se 200 µL de solução de vermelho neutro (50 µg/mL) e as células foram incubadas por 3 horas. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS (sem cálcio e sem magnésio) e fixadas com glutaraldeído 5%. Posteriormente, foi adicionada a solução removedora (50% etanol 96%, 49% água ultrapura, 1% ácido acético glacial) e a placa foi agitada horizontalmente por 10 minutos. A absorbância foi medida em 570 nm.

Para os experimentos de proliferação celular, após o tratamento, as células foram lavadas com solução de Hanks, meio de cultura novo foi adicionado e as células foram incubadas por mais 24 horas. Após esse período, as células foram preparadas para leitura da mesma forma que no experimento de citotoxicidade.

Os valores de leitura das absorbâncias são proporcionais à quantidade de células viáveis. Todos os testes foram conduzidos em triplicata. O cálculo utilizado para apresentação dos resultados foi:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{média das absorbâncias}}{\text{média das absorbâncias do controle}} \times 100$$

4.4.3. Ensaio de exclusão de azul de tripan

O ensaio de exclusão de azul de tripan foi conduzido conforme descrito por Sávio e colaboradores (2015). Para avaliação da citotoxicidade, após o tratamento, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com solução de Hanks e removidas usando tripsina. A suspensão celular foi transferida para tubos tipo eppendorf e centrifugadas a 2000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram novamente ressuspensas em 50 µL de meio de cultura. A solução de azul de tripan foi adicionada a suspensão celular (5 µL de azul de tripan em 10 µL da suspensão de células) e a mistura foi incubada por 5 minutos. As células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer.

Para os experimentos de proliferação celular, após o tratamento, as células foram lavadas com solução de Hanks, meio de cultura novo foi adicionado e as células foram

incubadas por mais 24 horas. Após esse período, as células foram preparadas da mesma forma que no experimento de citotoxicidade.

Todos os testes foram conduzidos em triplicata. O cálculo utilizado para apresentação dos resultados foi:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{média do número de células viáveis}}{\text{média do número de células viáveis do controle}} \times 100$$

4.5. Ensaio de sobrevivência clonogênica

Para avaliar a capacidade clonogênica, 1×10^6 células foram plaqueadas em frascos de cultura de 25 cm^3 . Após 24 horas, as células foram tratadas com resveratrol nas concentrações 25, 50, 100 e $150 \mu\text{M}$ por 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle (CNT). Após o tratamento, as células foram lavadas com solução de Hanks, tripsinizadas, e aproximadamente 1000 células foram plaqueadas em frascos de cultura de $12,5 \text{ cm}^3$ e cresceram durante aproximadamente 10 dias em estufa de CO_2 para formação de colônias. As células foram coradas com Giemsa e o número de colônias com 50 ou mais células foram contadas (SÁVIO *et al.*, 2014). Os testes foram conduzidos em triplicata. O cálculo utilizado para apresentação dos resultados foi:

$$\% \text{ de colônias} = \frac{\text{média do n}^\circ \text{ de colônias}}{\text{média do n}^\circ \text{ de colônias do controle}} \times 100$$

4.6. Avaliação da morfologia

Para avaliar a capacidade do resveratrol em causar alterações na morfologia das células, 2×10^5 células foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com resveratrol nas concentrações 50, 100 e $150 \mu\text{M}$ por 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle (CNT). Após o tratamento, as células foram observadas em microscópio invertido com contraste de fase, no aumento de 200x. As alterações foram fotografadas utilizando uma câmera digital com o auxílio de adaptador de câmera para microscópio (DA SILVA *et al.*, 2012).

4.7. Teste do cometa

Para avaliar os possíveis efeitos genotóxicos do resveratrol foi feito o teste do cometa seguindo o protocolo descrito por Singh e colaboradores (1988) com pequenas modificações. Inicialmente, 2×10^5 células foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com resveratrol nas concentrações 50, 100 e 150 μM por 2 e 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle (CNT) e células tratadas com metil metano sulfonato (80 μM) foram utilizadas como controle positivo. Após o tratamento, as células foram coletadas e ressuspensas em agarose de baixo ponto de fusão (0,5% em PBS). Esta mistura foi colocada sobre uma lâmina pré-revestida com agarose padrão (1,0% em PBS) e coberta com uma lamínula. Após solidificação de agarose a 4°C, a lamínula foi suavemente removida. As lâminas foram então imersas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO e 1% Triton X-100; pH 10) por 24 horas a 4°C. Subsequentemente, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH, 1 mM EDTA; pH > 13) por 20 minutos para permitir o desenrolar do DNA em locais alcali-lábeis. A eletroforese foi realizada no mesmo tampão alcalino a 4°C, durante 20 minutos, a 25 V e 300 mA. Depois de eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5), lavadas com etanol gelado e secas a temperatura ambiente. O DNA foi corado com brometo de etídio (20 mg/mL) imediatamente antes da análise. Um total de 100 nucleoides selecionados aleatoriamente foram analisados com aumento de 40 \times em microscópio de fluorescência. As fotografias foram analisadas utilizando o software ImageJ/OpenComet e o parâmetro intensidade da cauda (% DNA na cauda) foi usado para calcular a quantidade de DNA degradado.

4.8. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese

Para avaliar os possíveis efeitos mutagênicos do resveratrol foi realizado o ensaio do micronúcleo baseado na técnica descrita por Fenech (2000). Inicialmente, 1×10^6 células foram plaqueadas em placa de Petri (100 mm \times 20 mm). Após 24 horas, as células foram tratadas com resveratrol nas concentrações de 50, 100 e 150 μM por 4 horas. Doxorrubicina foi usado como controle positivo na concentração de 0,4 g/mL por 2 horas. Em seguida, foi adicionado 15 μL de solução de citocalasina B em DMSO a 2 mg/mL e as células foram incubadas novamente por 24 (T24 e 5637) ou 44 (RT4)

horas. No final da etapa de incubação, as células foram coletadas e centrifugadas a 800 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 5 mL de solução hipotônica gelada (KCl 0,075 M). Após a fixação das células com metanol/ácido acético (3:1), as lâminas foram coradas com solução de Giemsa a 5% e analisadas no microscópio óptico com aumento de 1000x.

Para determinação da frequência de células micronucleadas foram analisadas 1000 células binucleadas em cada lâmina. Para determinação do índice de divisão nuclear (IDN) foram analisadas 500 células em cada lâmina. O IDN foi calculado como descrito por Fenech (2000):

$$\text{IDN} = \frac{\text{M1} + 2 \times \text{M2} + 3 \times \text{M3} + 4 \times \text{M4}}{\text{N}}$$

Onde M1-M4 é o número de células com 1-4 núcleos e N é o número total de células viáveis.

4.9. Quantificação das espécies reativas de oxigênio

A produção de espécies reativas de oxigênio foi quantificada usando diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) como marcador fluorescente (RODENAK-KLADNIEW *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2012). Inicialmente, 7×10^4 células foram plaqueadas em placas de 96 poços específicas para leitor de placa com fluorescência. Após 24 horas, as células foram tratadas com resveratrol nas concentrações 50, 100 e 150 μM por 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle (CNT). Após o tratamento, as células foram lavadas com solução de Hanks e incubadas com uma solução de DCFH-DA a 10 μM , preparada em meio de cultura sem vermelho de fenol, por 30 minutos a 37°C e protegidas da luz. Após a marcação, as células foram lavadas e meio de cultura sem vermelho de fenol foi adicionado. A leitura de fluorescência foi feita em leitor de placa com fluorescência usando os comprimentos de ondas de 485 nm para excitação e 535 nm para emissão.

4.10. Progressão do ciclo celular

Para avaliar a cinética do ciclo celular 2×10^5 células foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações de resveratrol (50, 100 e 150 μM) por 24 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas com soluções de Hanks, removidas utilizando tripsina e centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos. O sedimento formado foi fixado com etanol 70% e mantido a -20°C por pelo menos 12 horas (BRASSESCO *et al.*, 2013).

No momento da leitura a solução fixadora foi removida após centrifugação a 1100 rpm por 10 minutos, as células foram lavadas com solução de Hanks, novamente centrifugadas e ressuspensas em 200 μL de solução de marcação (0,0914 g de cloreto de magnésio; 0,0774 g de citrato de sódio; 0,04766 g de hepes; 10 μL de triton-X, 0,5 mL de iodeto de propídeo, 9,490 mL de água, adaptado de GALBRAITH *et al.*, 1983). As células foram mantidas em gelo e protegidas da luz por pelo menos 30 minutos antes da leitura. A percentagem de células nas fases G0/G1, S e G2/M foi medida utilizando citômetro de fluxo (BD FACSCalibur) e posteriormente analisadas utilizando o software FlowJo. Foram analisados 30.000 eventos e as análises conduzidas em triplicata.

4.11. Ensaio de apoptose/necrose

Para avaliar a taxa de apoptose celular foi utilizado o kit FITC AnnexinV/Dead Cell Apoptosis (Invitrogen). Foram plaqueadas 2×10^5 células em placas de 12 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações de resveratrol (50, 100 e 150 μM) por 24 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas com solução de Hanks, removidas utilizando tripsina e centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos. Outra lavagem foi feita com solução de Hanks e as células foram novamente centrifugadas (1000 rpm, 10 minutos). Posteriormente foi feita a marcação com iodeto de propídeo e anexina V seguindo o indicado pelo protocolo do kit. A percentagem de células não marcadas ou marcadas por iodeto de propídeo e/ou anexina V foi medida utilizando citômetro de fluxo (BD FACSCalibur) e posteriormente analisadas utilizando o software FlowJo. Células não marcadas foram classificadas com vivas, células marcadas apenas com anexina foram classificadas como apoptose recente, células marcadas com anexina e iodeto de propídeo foram classificadas como apoptose tardia e células marcadas apenas como iodeto de propídeo foram classificadas como necrose. Foram analisados 50.000 eventos e as análises conduzidas em triplicata.

4.12. Ensaio de migração celular

Para avaliação da migração celular foi utilizado o ensaio de cicatrização de feridas como descrito por Gándara e colaboradores (2014) com pequenas modificações. Inicialmente, 5×10^5 células foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 24 horas, a monocamada de células foi raspada com o auxílio de uma ponteira de 200 μL esterilizada para criar uma ferida. As células foram lavadas, fotografadas e posteriormente tratadas com 150 μM resveratrol por 24 horas. Células não tratadas foram usadas como controle (CNT). Ao fim do tratamento, a migração celular foi fotografada. A quantificação de motilidade celular foi realizada usando o software ImageJ medindo-se a distância entre a frente invasora das células em 3 campos selecionados aleatoriamente.

4.13. Quantificação da metilação global

Para avaliar a quantidade de DNA metilado após o tratamento com resveratrol, 1×10^6 células foram plaqueadas em frascos de cultura de 25 cm^3 . Após 24 horas, as células foram tratadas com 150 de resveratrol por 24 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas e o DNA foi extraído utilizando o kit Wizard[®] Genomic (Promega). A quantidade de DNA metilado foi determinada utilizando o kit Imprint[®] Methylated DNA Quantification (Sigma-Aldrich). Em resumo, 100 ng de DNA foram diluídos em 30 μL de solução de ligação de DNA e adicionados em cada poço da placa de 96 poços. Após incubação, o anticorpo de captura foi adicionado e a placa foi incubada novamente. Em seguida, a placa foi lavada e o anticorpo de detecção foi adicionado. Após nova incubação, a placa foi lavada e a solução reveladora foi adicionada. A mudança de coloração foi monitorada e finalmente, a absorbância foi medida a 450 nm. Os valores de absorbância foram proporcionais a quantidade de DNA metilado. Foi utilizado o cálculo direto para determinar a porcentagem de DNA metilado. O cálculo utilizado para apresentação dos resultados foi:

$$\% \text{ de DNA metilado} = \frac{\text{absorbância das células tratadas}}{\text{absorbância das células não tratadas}} \times 100$$

4.14. Imunocitoquímica

Para avaliação do efeito do resveratrol sobre as proteínas p53 e PCNA, as células foram processadas pela técnica de IHC, utilizando anticorpos monoclonais e o sistema EnVision Dakocytomation (EnVision® + system-HRP AEC, K4004, DAKO).

Foram plaqueadas 2×10^4 células em lâminas do tipo “Chamber Slides”. Após 24 horas, as células foram tratadas com resveratrol nas concentrações 50, 100 e 150 μM por 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle (CNT). Após o tratamento, as células foram incubadas com anticorpo primário, durante a noite, em câmara úmida a temperatura de 4 a 8° C. A concentração dos anticorpos foi definida por testes de diluição. Os anticorpos foram diluídos em Tris-HCl 0,05M contendo Tween 0,1% (antibody diluent; S3022, DAKO). Como controle negativo foi utilizado um coquetel de imunoglobulinas de camundongos – IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM (Universal Negative Control Reagent; IS750, DAKO). Após a incubação com o anticorpo primário, foram realizadas 3 lavagens em solução de TBST (5 minutos cada) e as lâminas incubadas com anticorpo secundário ligado à enzima peroxidase (goat anti IgG mouse conjugado com polímero marcado com peroxidase), por 60 minutos, à temperatura ambiente. Após a revelação com o substrato cromógeno (3-amino-9-ethylcarbazole e H_2O_2), as lâminas foram lavadas 3 vezes (5 minutos cada) em água destilada. Em seguida, as lâminas foram imersas durante 6 minutos em Hematoxilina de Mayer (DAKO), lavadas novamente com água destilada e, finalmente, mergulhadas em uma solução de hidróxido de amônio 37 mM (LabSynth) por 10 vezes e montadas com meio aquoso (Faramount Mounting Medium, S3025, DAKO). As lamínulas, previamente limpas com detergente extran e álcool 70%, foram fixadas à lâmina. As lâminas foram fotografadas com o programa de captura de imagem Leica Application Suite. A análise quantitativa de PCNA foi realizada utilizando o software ImageJ.

4.15. Avaliação de expressão gênica

4.15.1. Extração de RNA

Para avaliação da expressão gênica, 1×10^6 células foram plaqueadas em frascos de cultura de 25 cm³. Após 24 horas, as células foram tratadas com resveratrol nas concentrações 50, 100 e 150 μ M por 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle (CNT). Após o tratamento, as células foram lavadas com solução de Hanks, tripsinizadas, coletadas em microtubos e armazenadas a -80°C até o momento da extração.

A extração de RNA foi realizada utilizando-se o kit miRNeasy Mini (Qiagen®). Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o especificado no protocolo do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop.

4.15.2. Análise da expressão de genes por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A síntese de cDNA foi feita utilizando-se o kit High Capacity (Applied Biosystems), segundo instruções do fabricante. A reação foi feita com 12,5 μ L de H₂O DNase RNase free, 6 μ L de tampão RT 10X, 6 μ L de random primer 10X, 2,5 μ L de dNTP 25X, 3 μ L de MultiScribe RT (50U/ μ L) e 1 μ g de RNA), usando as seguintes condições 25 °C por 10 minutos e 37 °C por 60 minutos.

Os níveis de expressão dos genes *AKT* (Hs01086102), *CDH1* (Hs00170423), *CTNNBIP1* (Hs00172016), *DNMT1* (Hs00945875), *FGFR3* (Hs00179829), *HAT* (Hs00186320), *HDAC1* (Hs02621185), *HOXB3* (Hs01587922), *mTOR* (Hs00234508), *MYC* (Hs01570247), *PLK1* (Hs00983229), *RASSF1A* (Hs00200394), *SMAD4* (Hs00929647) e *SRC* (Hs01082246) foram analisados utilizando o sistema TaqMan® (Applied Biosystems). O gene de referência utilizado foi o *GAPDH* (Hs99999905_m1). A reação foi feita com 2 μ L da amostra de cDNA, 5 μ L de Master Mix TaqMan 2x e 0.5 μ L do primer (20x), usando as seguintes condições: 94 °C por 10 minutos seguido por 40 ciclos a 94 °C por 30 segundos e 60 °C por 1 minuto, no sistema Applied Biosystems 7500 RealTime PCR. Os dados de fluorescência foram coletados durante cada etapa de anelamento/extensão.

As análises foram feitas pelo método do CT Comparativo ($\Delta\Delta$ CT), que se fundamenta na fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, na qual o $\Delta\Delta$ CT = média do Δ CT (grupo tratado) - média do Δ CT (grupo calibrador). O Δ CT é a diferença entre o CT do gene de interesse e o CT do gene endógeno. O grupo calibrador é uma mistura de cDNA do grupo CNT.

Os valores de *fold change* e *fold regulation* foram calculados como descrito por Livak e Schmittgen (2001). *Fold regulation* representa os resultados de *fold change* de uma maneira biologicamente significativa. Valores de *fold change* maiores que 1 indicam regulação positiva e o valor do *fold regulation* é igual o valor de *fold change*. Valores de *fold change* menores que 1 indicam regulação negativa e o valor de *fold regulation* é o inverso negativo do valor de *fold change*.

4.16. Análise estatística

O software GraphPad Prism 6 foi utilizado nas análises estatísticas dos resultados. Como os dados apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. Adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Citotoxicidade e Proliferação Celular

A citotoxicidade e a inibição da proliferação celular causadas por diferentes concentrações de resveratrol nas linhagens celulares RT4, 5637 e T24 foram avaliadas imediatamente e 24 horas após o tratamento, respectivamente. Três metodologias com princípios distintos (ensaio de XTT, absorção de vermelho neutro e exclusão de azul de tripan) foram utilizadas para a avaliação da viabilidade celular.

5.1.1. Ensaio de XTT

Os resultados de citotoxicidade pela metodologia do XTT são apresentados na Figura 3-A. Pode-se observar que o resveratrol causou redução significativa do número de células viáveis apenas na linhagem T24, nas duas maiores concentrações avaliadas (150 e 200 μM), sendo o $\text{CI}_{50} = 179,26 \mu\text{M}$. Na Figura 3-B temos os resultados do experimento de proliferação celular. Pode-se observar que todas as concentrações de resveratrol avaliadas causaram redução significativa do número de células viáveis nas linhagens RT4 e T24. Na linhagem 5637, o resveratrol reduziu a viabilidade celular a partir da concentração de 50 μM . Os valores de CI_{50} calculados foram 30,29 μM para a linhagem RT4, 171,48 μM para a linhagem 5637 e 10,16 μM para a linhagem T24.

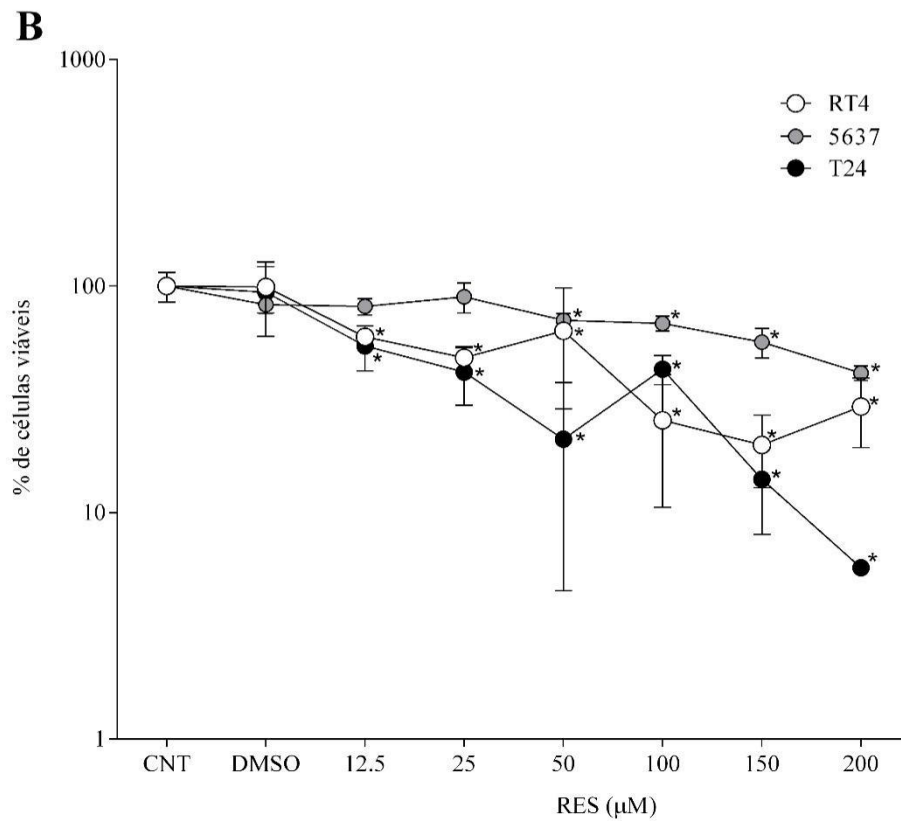
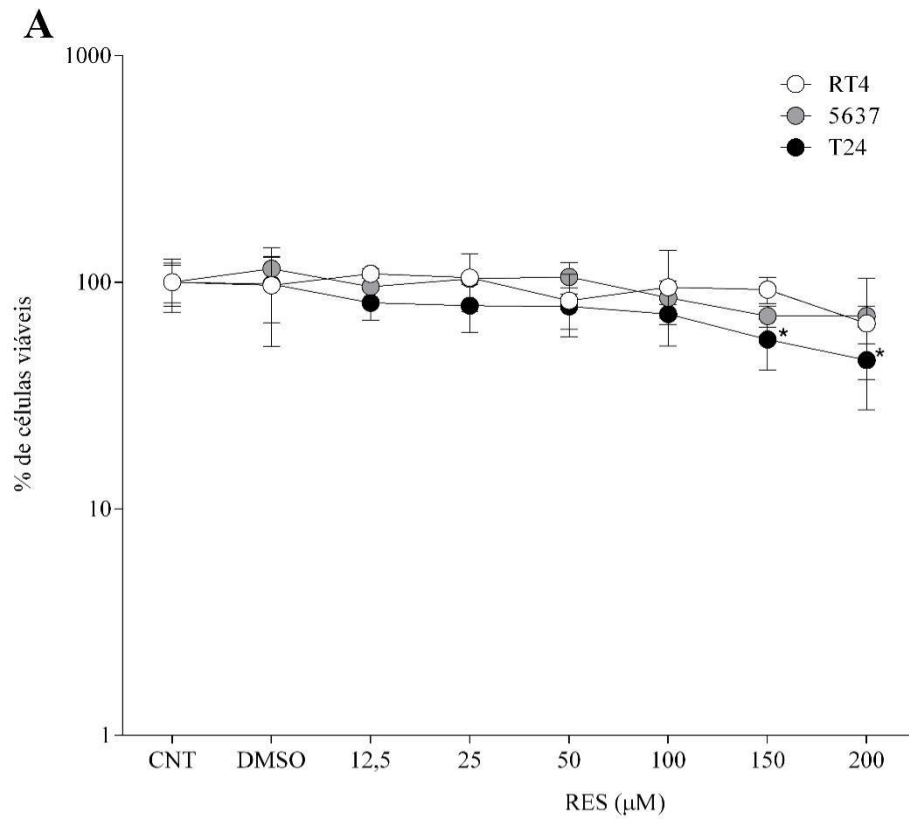


Figura 3: Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) das linhagens RT4, 5637 e T24 imediatamente (A) e 24 horas (B) após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

5.1.2. Ensaio de absorção de vermelho neutro

Na Figura 4-A são apresentados os resultados de citotoxicidade pela metodologia do vermelho neutro. Pode-se observar que houve redução significativa do número de células viáveis na linhagem RT4 a partir da concentração de 50 μM de resveratrol, enquanto que nas linhagens T24 e 5637 esse efeito foi notado a partir da concentração de 100 μM . Os valores de CI_{50} para as linhagens celulares RT4, 5637 e T24 foram 97,11 μM , 220,08 μM e 198,38 μM , respectivamente.

Na Figura 4-B são apresentados os resultados do experimento de proliferação celular. Pode-se observar que todas as concentrações de resveratrol avaliadas, exceto a menor (12,5 μM), causaram redução significativa do número de células viáveis em todas as linhagens estudadas. Os valores de CI_{50} calculados foram 76,60 μM para a linhagem RT4, 132,59 μM para a linhagem 5637 e 50,52 μM para a linhagem T24.

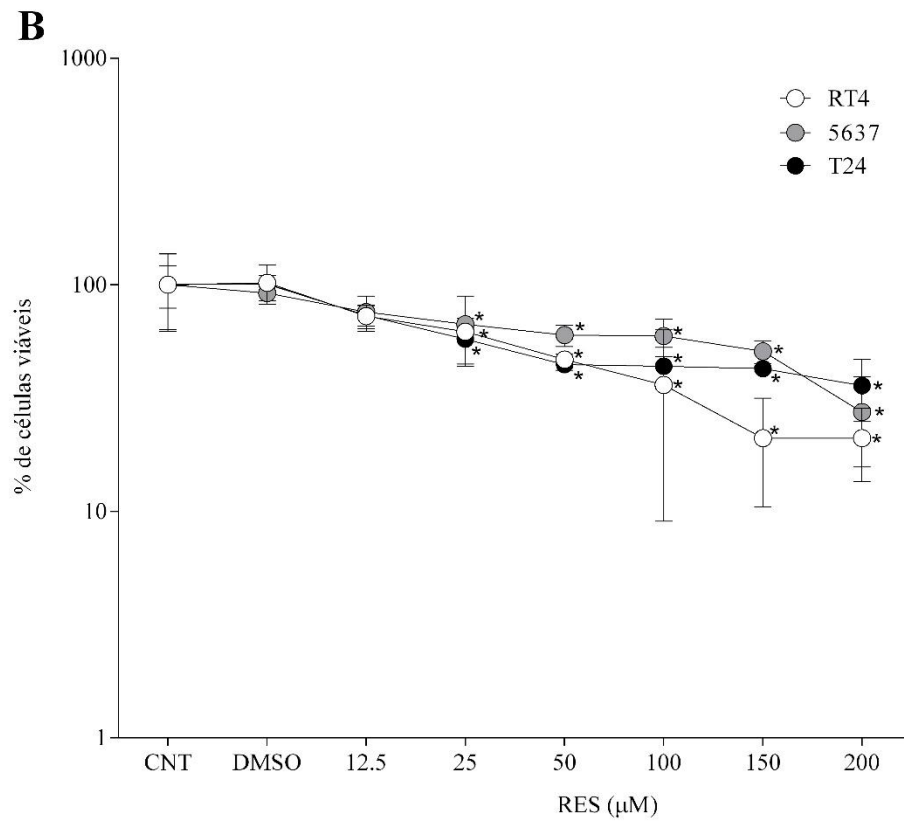
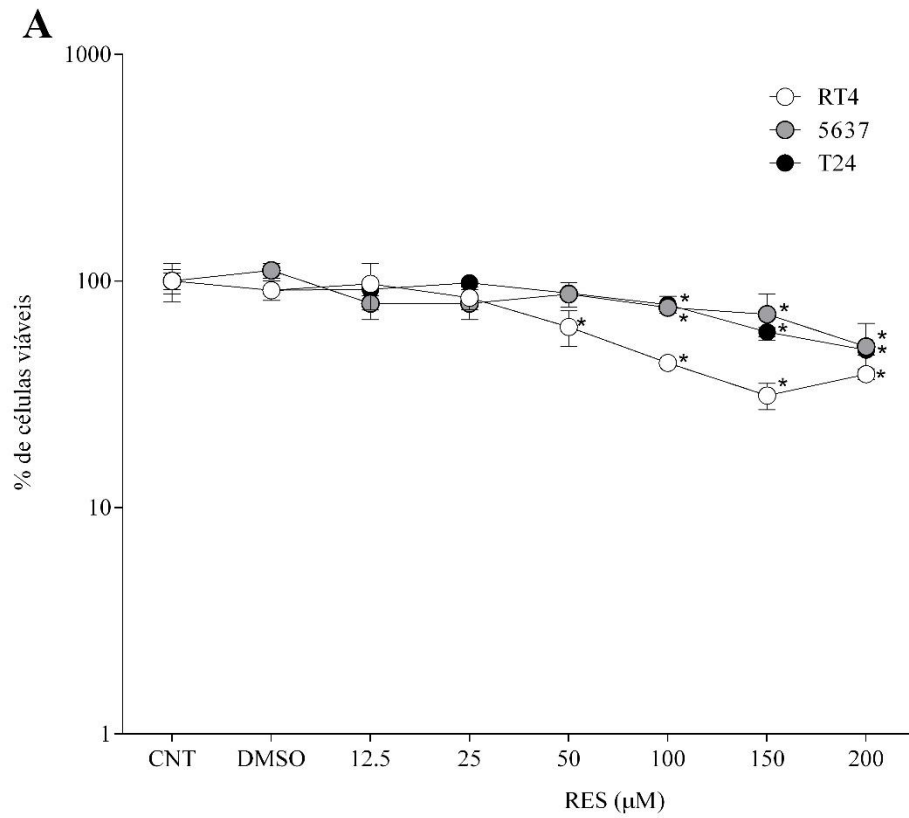


Figura 4: Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) das linhagens RT4, 5637 e T24 imediatamente (A) e 24 horas (B) após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

5.1.3. Ensaio de exclusão de azul de tripan

Os resultados de citotoxicidade pelo método de exclusão de azul de tripan são apresentados na Figura 5-A. Pode-se observar que houve redução significativa do número de células viáveis na linhagem RT4 a partir da concentração de 50 μM de resveratrol, enquanto que na linhagem 5637 esse efeito foi observado a partir da concentração de 100 μM . Na linhagem T24 apenas na maior concentração avaliada (200 μM) houve redução significativa da viabilidade celular. Os valores calculados de CI_{50} foram 83,58 μM para a linhagem RT4, 148,58 μM para a linhagem 5637 e 163,16 μM para a linhagem T24.

Na Figura 5-B são apresentados os resultados do experimento de proliferação celular. Pode-se observar que houve redução significativa da proliferação celular nas linhagens RT4 e 5637 a partir da concentração de 50 μM de resveratrol, enquanto que na linhagem T24 a redução da proliferação celular foi observada a partir da concentração de 25 μM . Os valores calculados de CI_{50} foram 62,57 μM para a linhagem RT4, 93,61 μM para a linhagem 5637 e 31,84 μM para a linhagem T24.

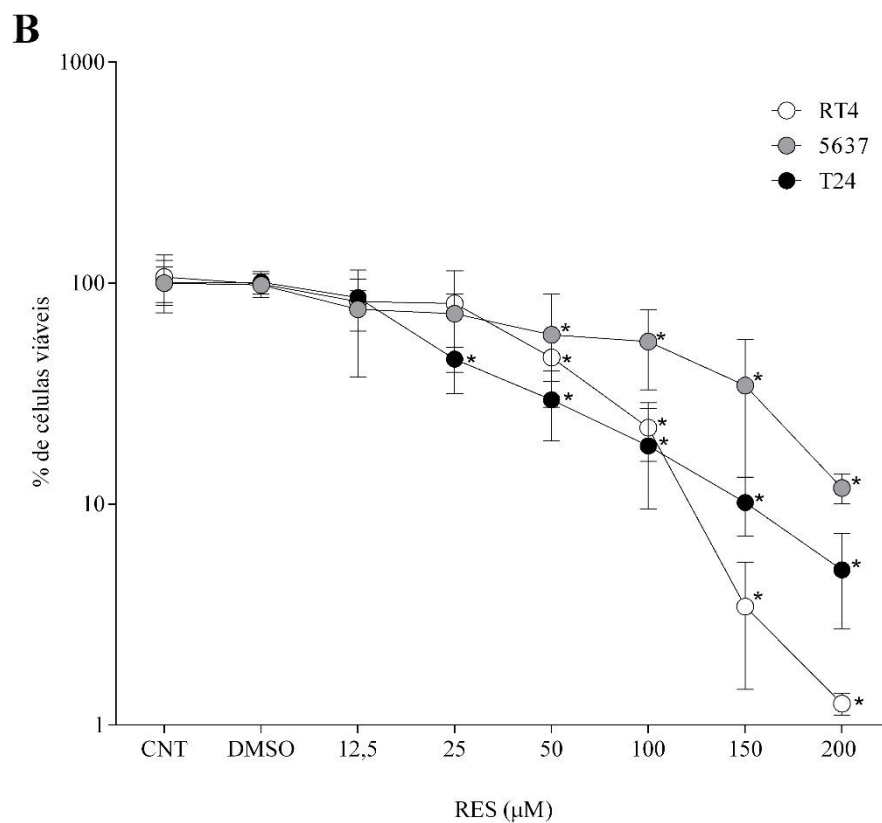
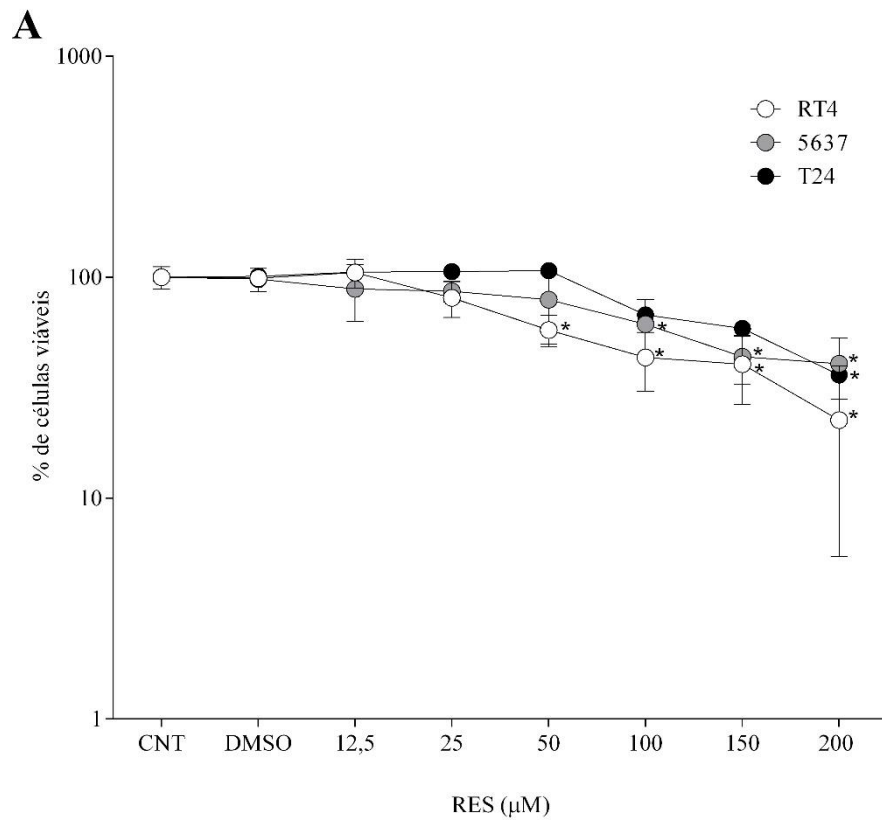


Figura 5: Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) das linhagens RT4, 5637 e T24 imediatamente (A) e 24 horas (B) após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

5.2. Avaliação da morfologia

As fotografias em contraste de fase das células das linhagens RT4, 5637 e T24 são apresentadas na Figura 6. Pode-se observar a presença de células T24 e 5637 alongadas após o tratamento com resveratrol. Além disso, um número menor de células foi observado em todas as culturas celulares tratadas com resveratrol quando comparadas com seus respectivos controles.

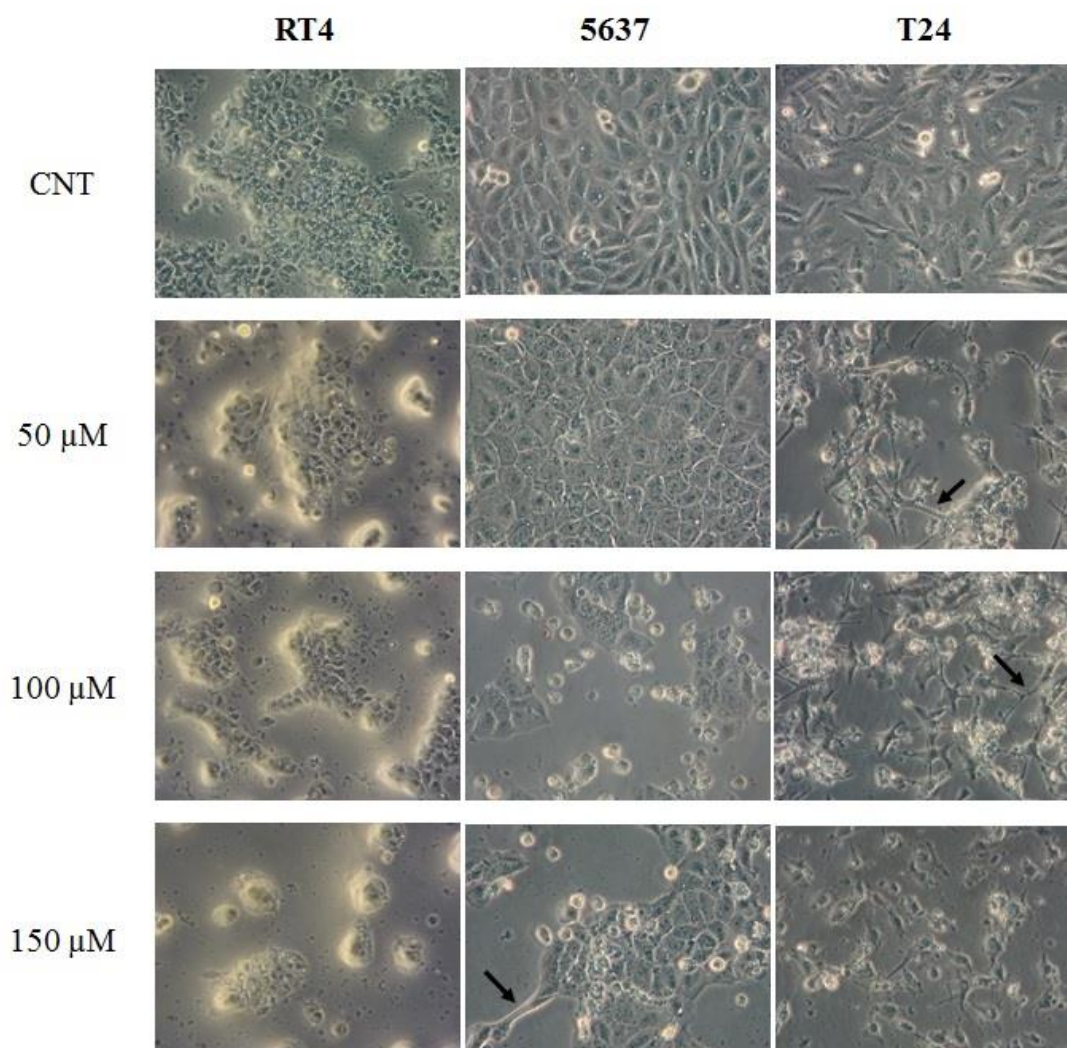


Figura 6: Morfologia celular das linhagens RT4, 5637 e T24 após o tratamento com diferentes concentrações de resveratrol. Redução do número de células após o tratamento com resveratrol em todas as linhagens. Setas: células alongadas. Microscópio óptico com contraste de fase, aumento de 200x. CNT: controle não tratado.

5.3. Ensaio de sobrevivência clonogênica

Os resultados do teste de sobrevivência clonogênica estão apresentados na Figura 7. Pode-se observar que nas linhagens T24 e 5637 houve redução significativa do número de colônias formadas nas células tratadas com 50, 100 e 150 μM de resveratrol. Na linhagem RT4, a redução do número de colônias foi significativa apenas nas células tratadas com a maior concentração avaliada (150 μM).

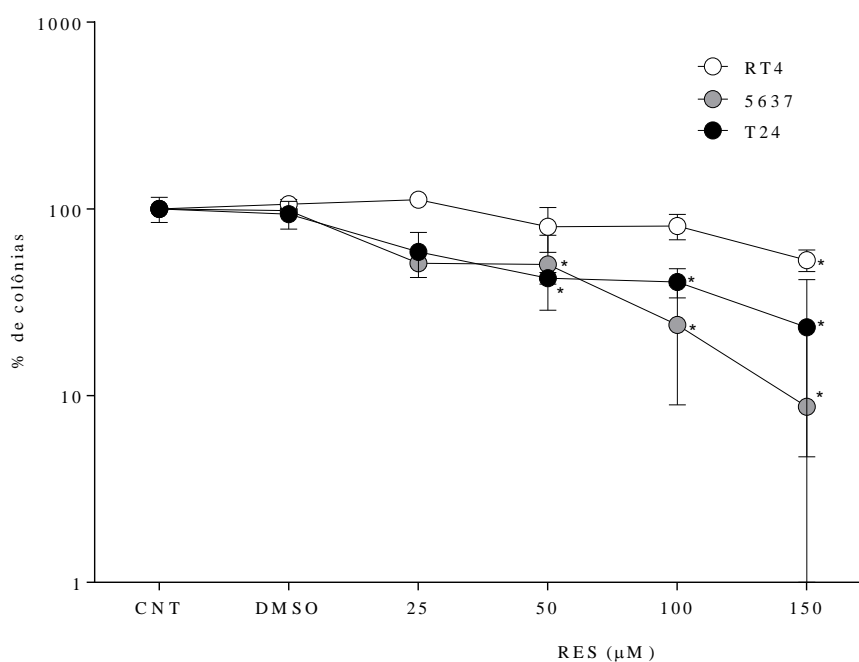


Figura 7: Porcentagem de colônias de células das linhagens RT4, 5637 e T24, aproximadamente 10 dias após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

5.4. Teste do cometa

Os resultados do teste do cometa são apresentados na Figura 8. Pode-se observar que o tratamento com resveratrol em todas as concentrações estudadas gerou danos primários ao DNA nas linhagens RT4, 5637 e T24, tanto em 2 horas quanto em 24 horas de tratamento.

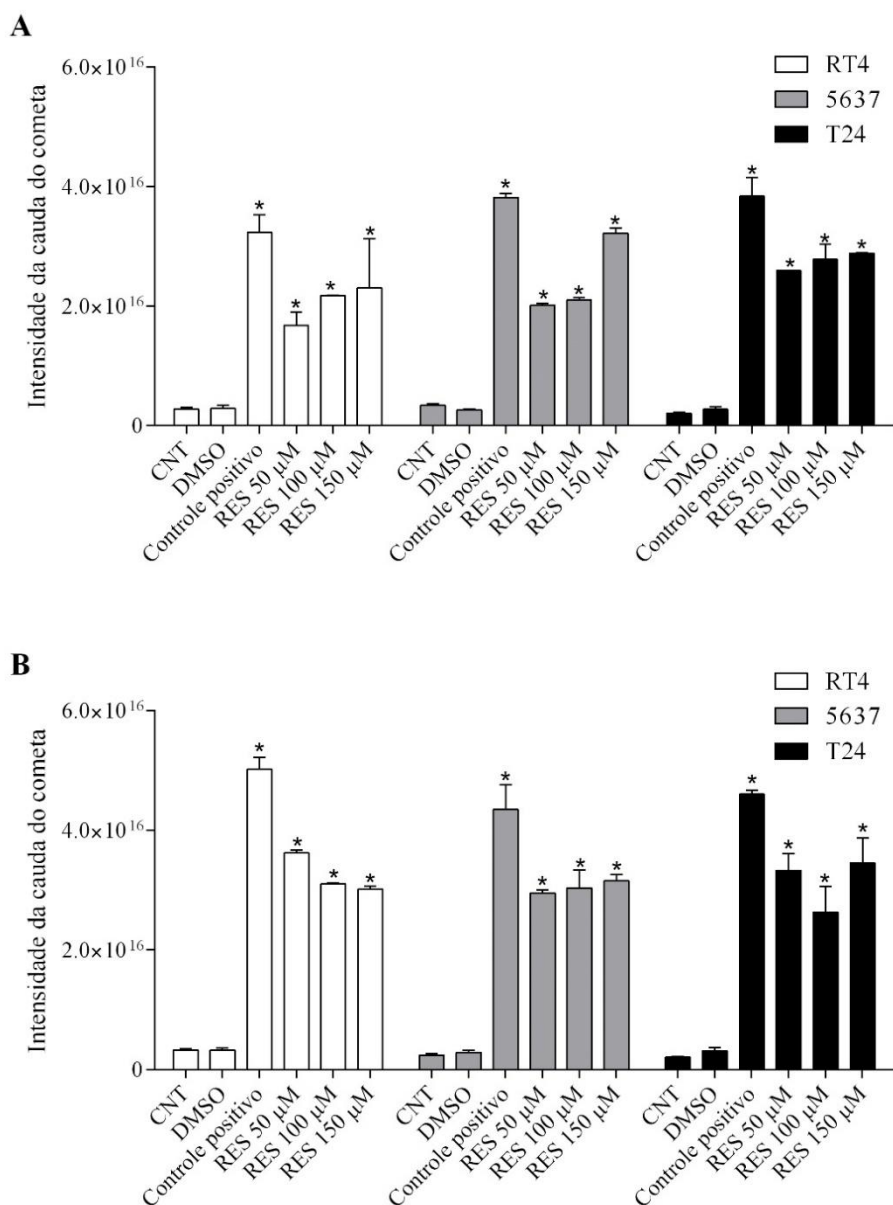


Figura 8: Danos primários ao DNA (intensidade da cauda do cometa) em células RT4, 5637 e T24 tratadas com resveratrol por 2 (A) ou 24 horas (B). CNT: controle não tratado, DMSO: controle DMSO, Controle positivo: metil metano sulfonato 80 μ M, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

5.5. Progressão do ciclo celular

Na Figura 9 são apresentados os resultados da análise do ciclo celular após o tratamento com diferentes concentrações de resveratrol. Nas células da linhagem RT4 foi observado que o tratamento com resveratrol causou um aumento significativo do

número de células em sub-G1, acompanhado por uma redução do número de células em G0/G1 e em G2/M. Na linhagem 5637 houve um aumento significativo do número de células na fase S com uma redução significativa na fase G2/M. O mesmo efeito pode ser observado para as células da linhagem T24, na quais também ocorreu um aumento significativo do número de células em sub-G1 após o tratamento com 150 μ M de resveratrol.

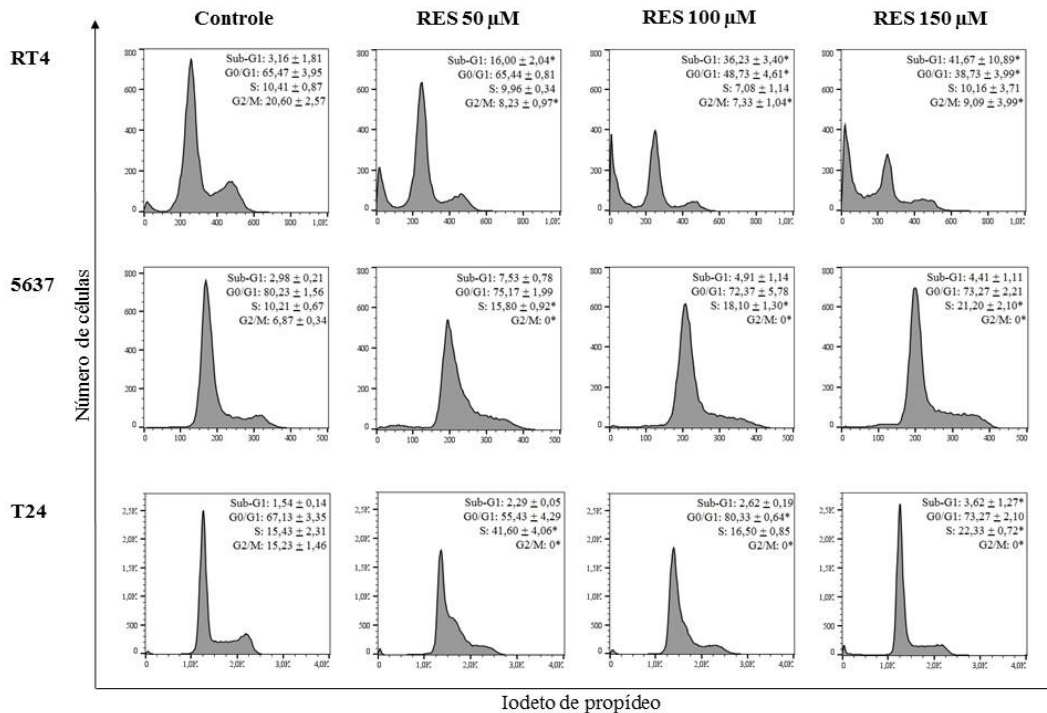


Figura 9: Histogramas representativos da progressão do ciclo celular. CNT: Controle não tratado. RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

5.6. Ensaio de apoptose/necrose

Na Figura 10 são apresentados os gráficos representativos dos experimentos de apoptose para cada concentração avaliada de cada linhagem estudada. Pode-se observar que na linhagem RT4 o tratamento com resveratrol induziu apoptose nas duas maiores concentrações avaliadas, enquanto que na linhagem T24 o tratamento com resveratrol induziu necrose nas duas maiores concentrações avaliadas. Nas células da linhagem 5637, nenhuma alteração significativa foi observada após o tratamento com resveratrol.

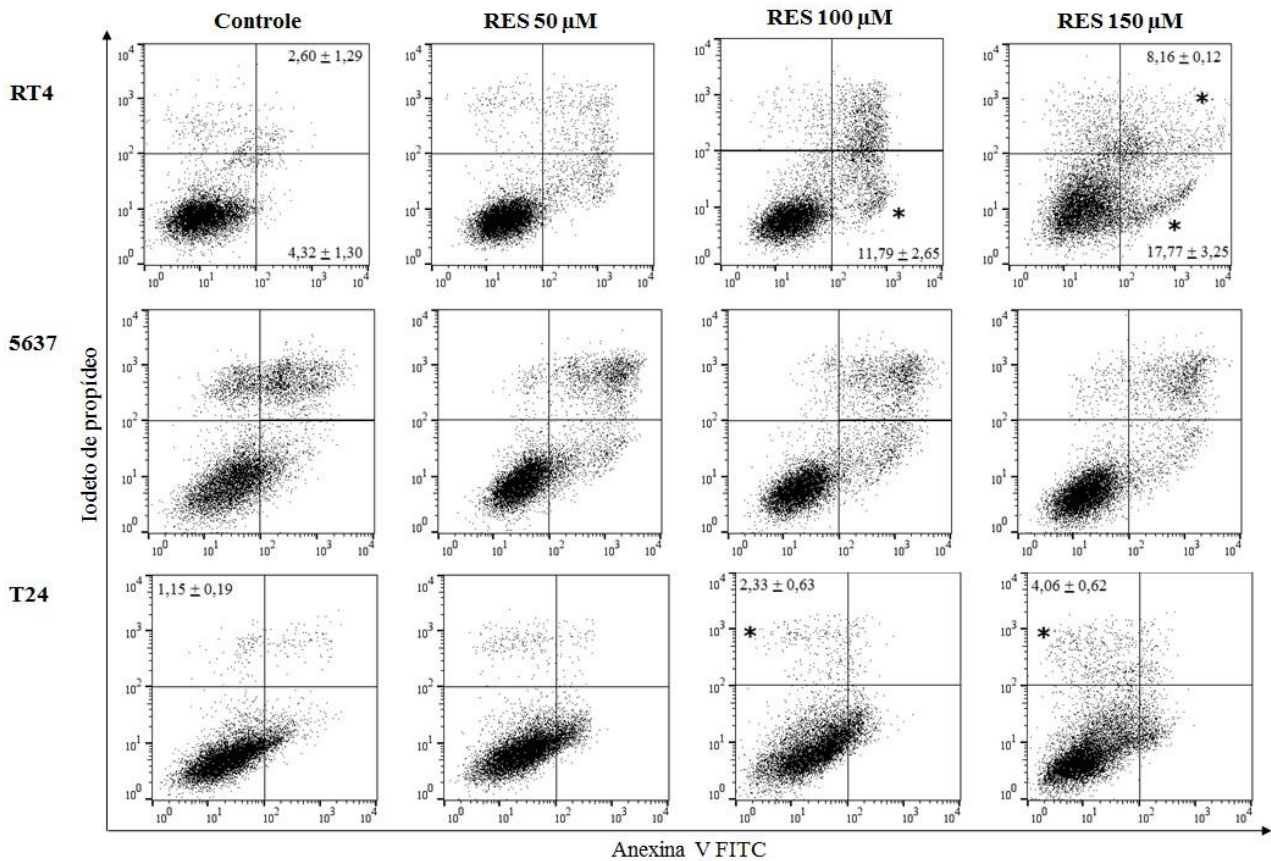


Figura 10: Índices de apoptose e necrose nas células das linhagens RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

5.7. Ensaio de migração celular

Na Figura 11 são apresentados os resultados de migração celular. Pode-se observar que o tratamento com resveratrol inibiu a migração celular em todas as linhagens celulares estudadas. Na linhagem RT4 ocorreu 14,63 % de migração nas células do grupo controle enquanto que nas células tratadas houve um aumento da ferida em 14,34 %. Nas linhagens 5637 e T24 observamos 100% de migração nas células do grupo controle não tratado enquanto que nas células tratadas houve um aumento da ferida em 2,03 a 19,38 % respectivamente. O aumento da ferida observado nas células tratadas ocorreu provavelmente devido a morte celular.

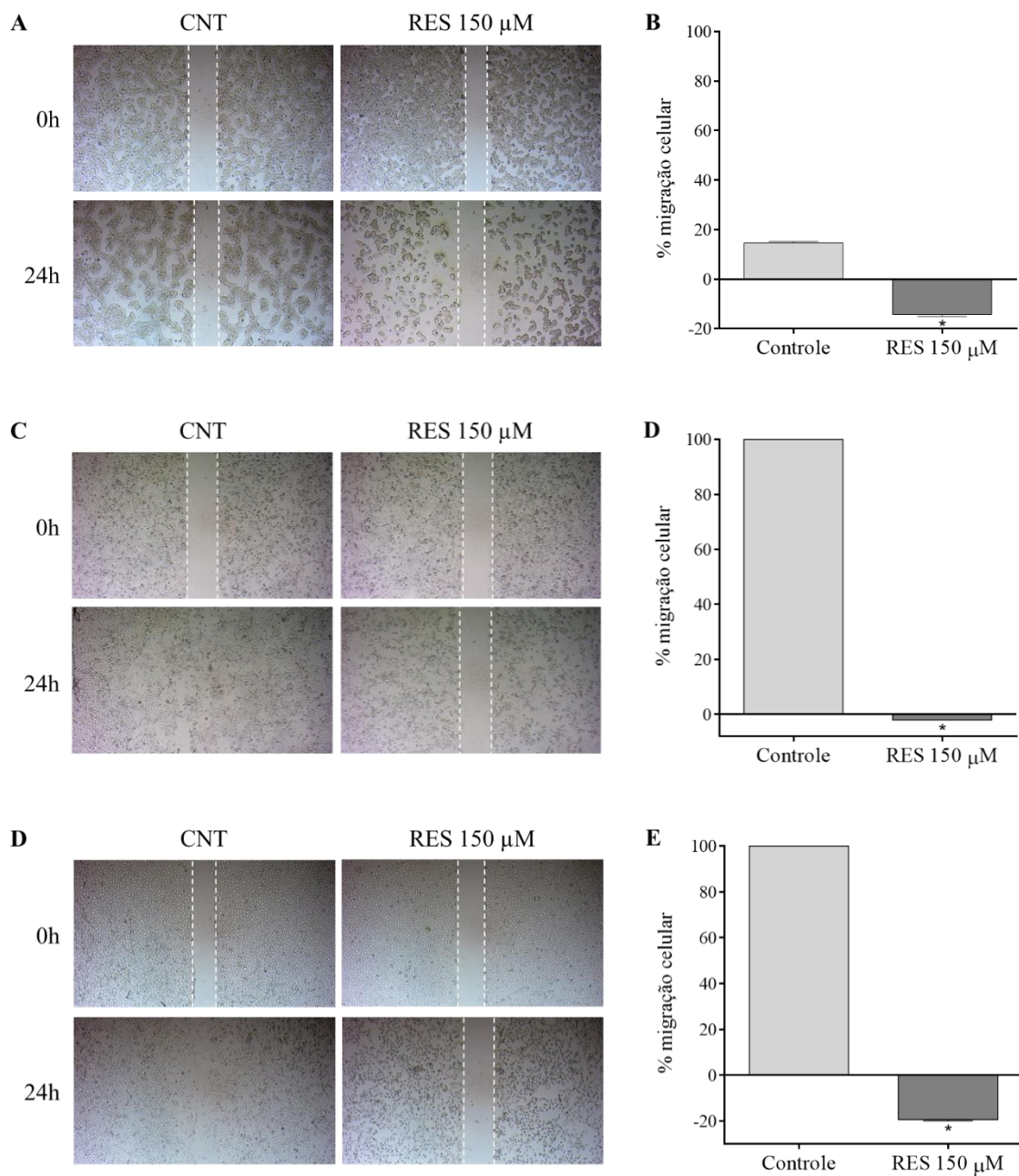


Figura 11: Fotografias e quantificação da migração celular nas linhagens RT4 (A e B), 5637 (C e D) e T24 (E e F) após tratamento com resveratrol. CNT: Controle não tratado, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

5.8. Quantificação das espécies reativas de oxigênio

Os resultados da quantificação de espécies reativas de oxigênio são mostrados na Figura 12. Nas células da linhagem RT4 houve um aumento significativo da produção de espécies reativas de oxigênio após o tratamento com resveratrol em todas as

concentrações avaliadas. Nas linhagens 5637 e T24 o aumento na produção de espécies reativas foi significativo após o tratamento com 100 e 150 μM de resveratrol.

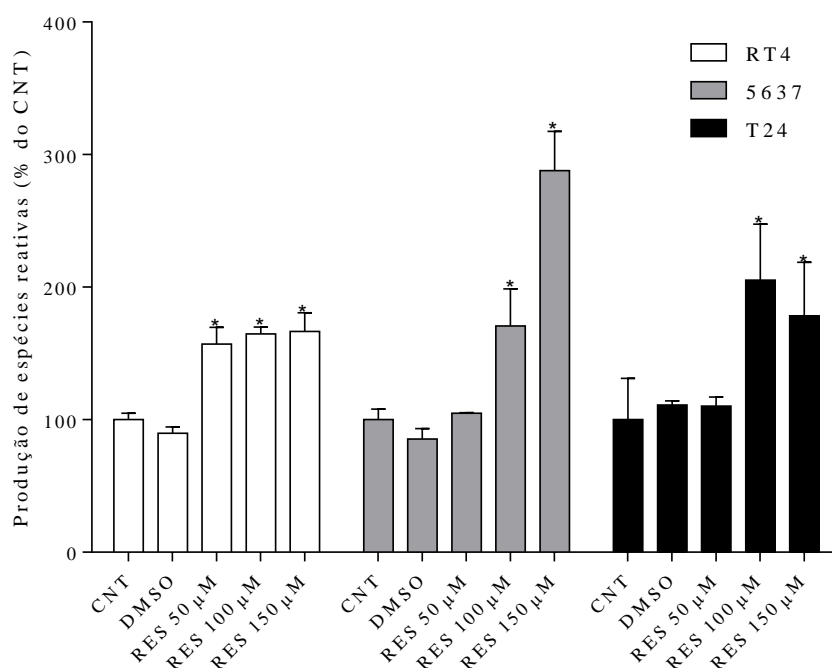


Figura 12: Produção de espécies reativas de oxigênio em células das linhagens RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado. DMSO: controle DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

5.9. Quantificação da metilação global do DNA

Os resultados da quantificação da metilação global do DNA são apresentados na Tabela 1. Não houve alteração significativa da metilação global após o tratamento com resveratrol. A porcentagem média de metilação do DNA em relação ao controle não tratado foi 90,88 % para as células RT4, 122,43% para as células 5637 e 115,57% para as células T24.

Tabela 1: Metilação global do DNA em células das linhagens RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.

	DNA metilado		
	(% em relação ao CNT)		
	CNT	DMSO	RES 150 µM
RT4	100	94,52 ± 0,15	90,88 ± 0,05
5637	100	99,35 ± 0,05	122,43 ± 0,03
T24	100	98,32 ± 0,17	115,57 ± 0,04

CNT: controle não tratado. DMSO: controle de DMSO. RES: resveratrol

5.10. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese

Os resultados do teste do micronúcleo são apresentados na Tabela 2. Pode-se observar que o tratamento com resveratrol não gerou danos mutagênicos em nenhuma das linhagens celulares estudadas.

Tabela 2: Frequência de células RT4, 5637 e T24 micronucleadas (‰) após o tratamento com resveratrol

	CNT	DMSO	Controle positivo	RES 50 µM	RES 100 µM	RES 150 µM
RT4	0	0	0,011 ± 0,002*	0	0	0
5637	0,003 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,013 ± 0,001*	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,001 ± 0,001
T24	0,004 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,014 ± 0,004*	0,004 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,001

CNT: controle não tratado, DMSO: controle DMSO, Controle positivo: Doxorrubicina: 0,4 g/mL, RES: resveratrol. * p < 0,05 em relação ao CNT.

Os valores de IDH são apresentados na Tabela 3. Pode-se observar que houve redução do IDN em todas as linhagens tumorais após o tratamento com resveratrol.

Tabela 3: Índice de divisão nuclear para as células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol.

	Controle	DMSO	RES 50 μ M	RES 100 μ M	RES 150 μ M
RT4	1,824 \pm 0,034	1,778 \pm 0,038	1,727 \pm 0,058	1,645 \pm 0,052*	1,415 \pm 0,036*
5637	1,805 \pm 0,015	1,837 \pm 0,016	1,815 \pm 0,013	1,744 \pm 0,006*	1,737 \pm 0,012*
T24	1,887 \pm 0,005	1,925 \pm 0,019	1,774 \pm 0,012*	1,695 \pm 0,003*	1,629 \pm 0,007*

CNT: controle não tratado, DMSO: controle DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

5.11. Imunocitoquímica

Na Figura 13 pode-se observar os diferentes perfis de expressão da proteína p53, marcada em vermelho, nas linhagens tumorais estudadas. Observa-se uma marcação mais intensa nas linhagens 5637 e T24, e praticamente nenhuma marcação em RT4. Não foram observadas alterações na expressão da proteína após o tratamento com resveratrol (dados não apresentados).

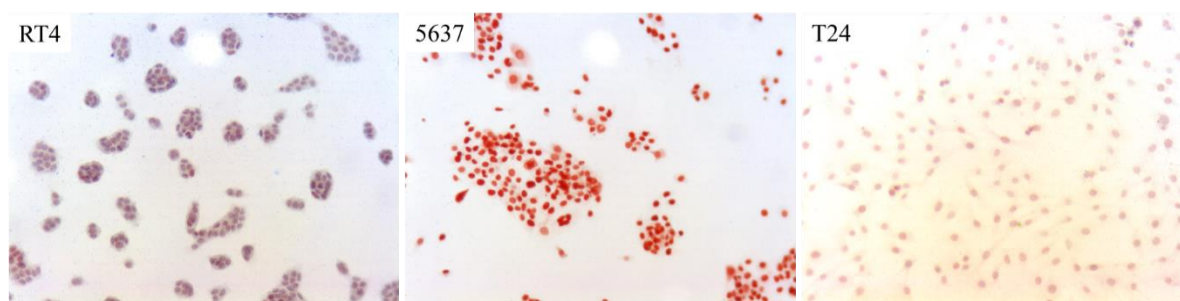


Figura 13: Expressão da proteína p53 nas células das linhagens RT4, 5637 e T24. A proteína p53 está marcada em vermelho. Aumento de 100x.

Na Figura 14-A são apresentados os resultados da análise quantitativa realizada para a proteína PCNA. O tratamento com resveratrol causou uma redução significativa dos níveis de PCNA nuclear nas células das linhagens T24. Nas linhagens RT4 e 5637 não houve modulação dos níveis dessa proteína após o tratamento. Na Figura 14-B é possível observar a presença de PCNA citoplasmático em todas as linhagens celulares.

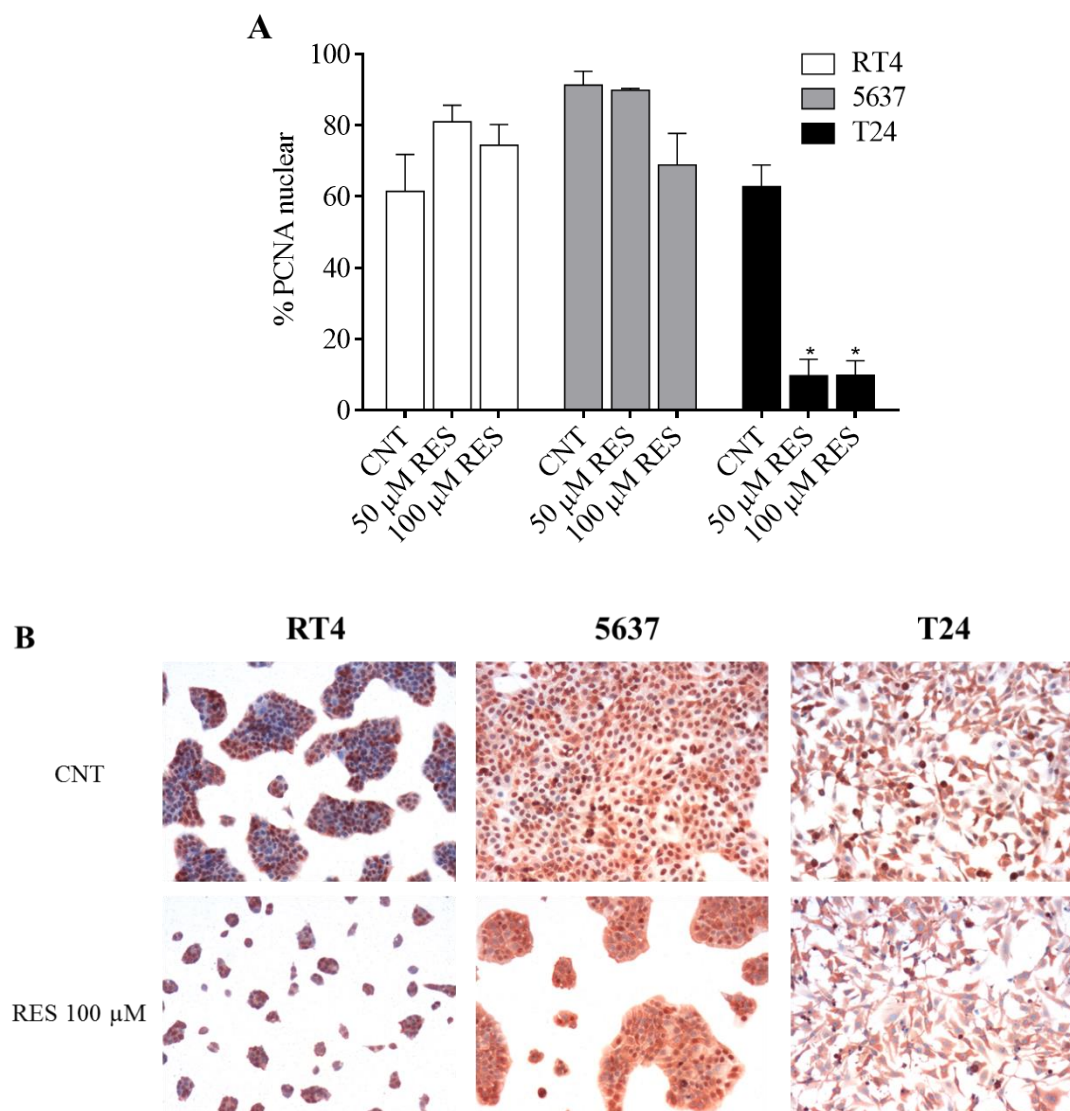


Figura 14: (A) Quantificação dos níveis de PCNA nuclear em células das linhagens RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. (B) Expressão da proteína PCNA nas células das linhagens RT4, 5637 e T24. A proteína PCNA está marcada em vermelho. CNT: controle não tratado, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

5.12. Avaliação de expressão gênica

Avaliou-se a influência do tratamento com resveratrol na expressão de 11 genes relacionados aos processos de tumorigênese, sendo eles: *AKT*, *CDH1*, *CTNNBIP1*, *FGFR3*, *HOXB3*, *mTOR*, *MYC*, *PLK1*, *RASSF1A*, *SMAD4* e *SRC*. Além disso, avaliou-se também a modulação do resveratrol na expressão de três genes relacionados aos processos epigenéticos de metilação do DNA (*DNMT1*) e acetilação de histonas (*HDAC1* e *HAT*). Os resultados de expressão gênica após o tratamento com resveratrol são mostrados nas Figuras 15-28.

Na Figura 15 são apresentados os resultados da expressão do gene *AKT* após o tratamento com resveratrol. Pode-se observar que o tratamento com resveratrol nas concentrações de 100 e 150 μM causou redução significativa da expressão do gene *AKT* nas células da linhagem RT4. Nas linhagens 5637 e T24, o tratamento com resveratrol não causou nenhuma alteração na expressão desse gene.

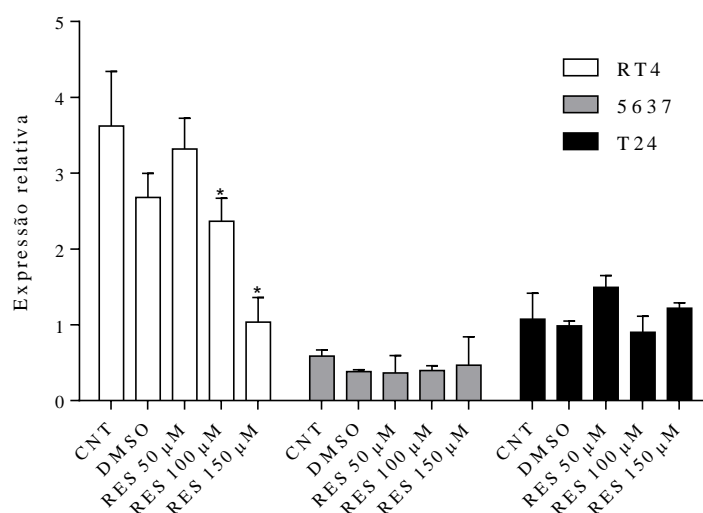


Figura 15: Níveis relativos de mRNA de *AKT* em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

Na Figura 16 são apresentados os resultados da expressão do gene *CDH1* após o tratamento com resveratrol. Pode-se observar que o tratamento com resveratrol na maior concentração avaliada (150 μM) causou aumento da expressão desse gene nas células das linhagens RT4 e T24. Nas células da linhagem 5637 o aumento da expressão de *CDH1* foi observado a partir de 100 μM .

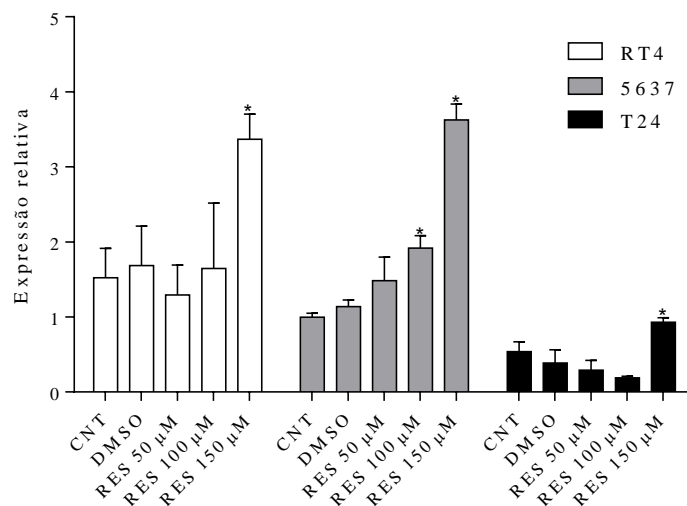


Figura 16: Níveis relativos de mRNA de *CDHI* em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

Na Figura 17 são apresentados os resultados da expressão do gene *CTNNBIP1* após o tratamento com resveratrol. Nas células da linhagem 5637 houve aumento da expressão desse gene em todas as concentrações estudadas enquanto que nas células T24 o aumento foi significativo na maior concentração. Na linhagem RT4 não houve modulação da expressão desse gene após o tratamento com resveratrol.

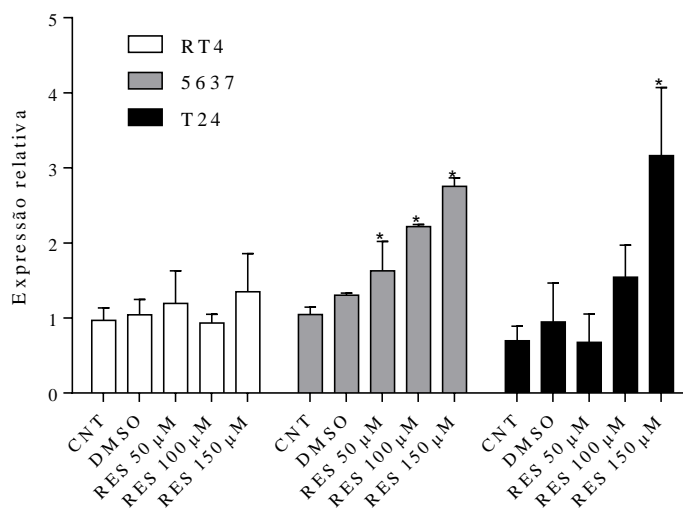


Figura 17: Níveis relativos de mRNA de *CTNNBIP1* em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

Na Figura 18 são apresentados os resultados da expressão do gene *DNMT1* após o tratamento com resveratrol. Nas células da linhagem RT4, o tratamento com resveratrol nas concentrações de 100 e 150 μM causou redução significativa da expressão desse gene. Nas linhagens 5637 e T24, o tratamento com resveratrol não causou nenhuma alteração na expressão desse gene.

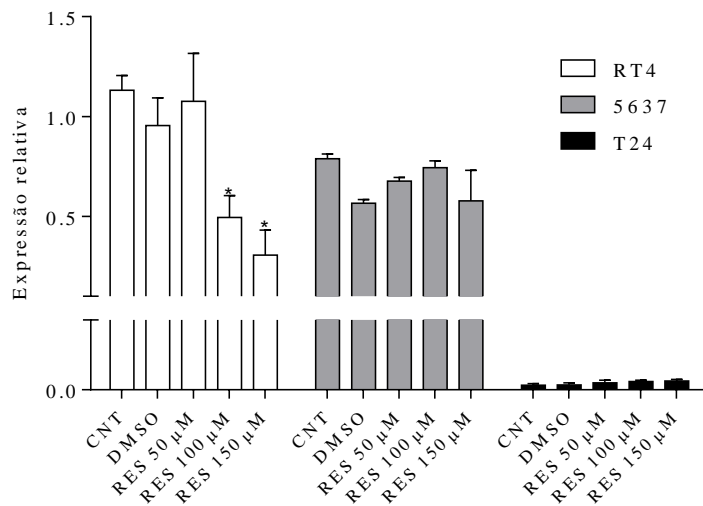


Figura 18: Níveis relativos de mRNA de *DNMT1* em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

Os resultados da expressão do gene *FGFR3* após o tratamento com resveratrol são apresentados na Figura 19. O tratamento com resveratrol nas concentrações de 100 e 150 μM causou aumento significativo da expressão desse gene nas células T24. Nas linhagens RT4 e 5637, o tratamento com resveratrol não causou nenhuma alteração na expressão desse gene.

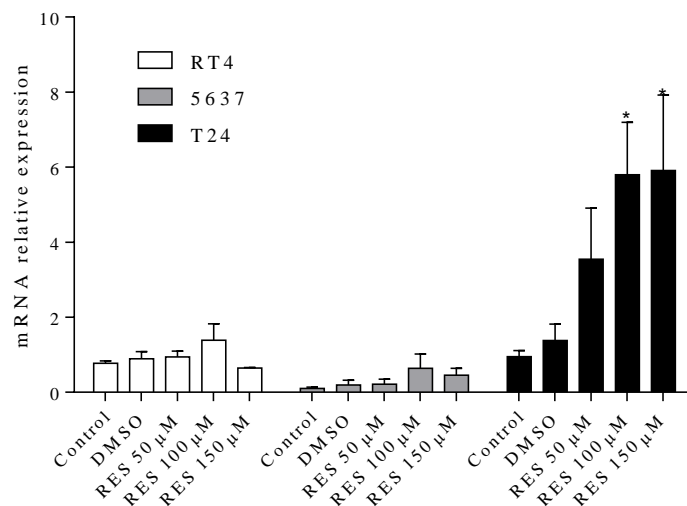


Figura 19: Níveis relativos de mRNA de *FGFR3* em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

Na Figura 20 são apresentados os resultados da expressão do gene *HAT* após o tratamento com resveratrol. Nas células da linhagem T24, o tratamento com resveratrol, em todas as concentrações avaliadas, causou redução da expressão do gene *HAT*, enquanto que nas células da linhagem RT4 apenas a maior concentração de resveratrol gerou esse mesmo efeito. Não houve modificação da expressão desse gene após o tratamento nas células da linhagem 5637.

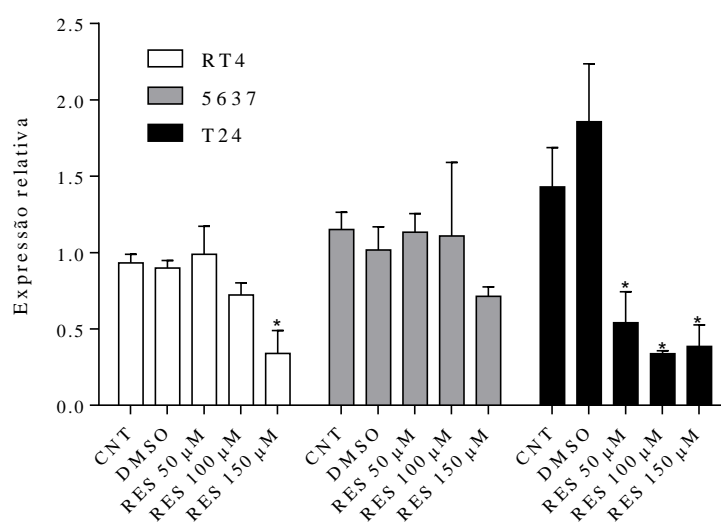


Figura 20: Níveis relativos de mRNA de *HAT* em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

Na Figura 21 são apresentados os resultados da expressão do gene *HDAC1* após o tratamento com resveratrol. Não houve modificação da expressão desse gene após o tratamento em nenhuma das linhagens estudadas.

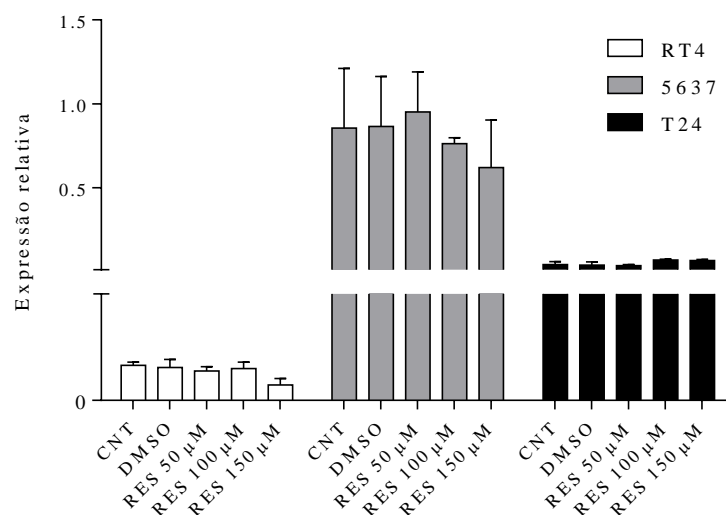


Figura 21: Níveis relativos de mRNA de *HDAC1* em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol.

Na Figura 22 são apresentados os resultados da expressão do gene *HOXB3* após o tratamento com resveratrol. Na linhagem T24, a maior concentração avaliada de resveratrol (150 μM) causou redução significativa da expressão desse gene. Na linhagem RT4, o tratamento com resveratrol nas concentrações de 100 e 150 μM causou redução significativa da expressão de *HOXB3*. Não houve alteração significativa da expressão desse gene nas células da linhagem 5637.

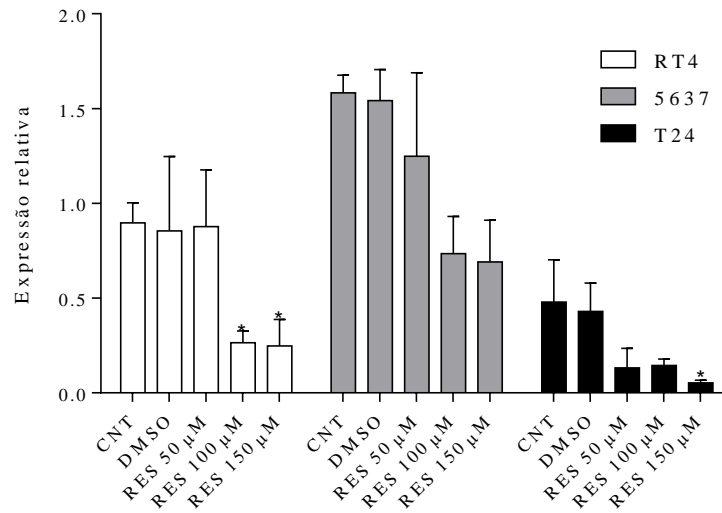


Figura 22: Níveis relativos de mRNA de *HOXB3* em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

Na Figura 23 são apresentados os resultados da expressão do gene *mTOR* após o tratamento com resveratrol. A maior concentração avaliada de resveratrol (150 μM) causou redução significativa da expressão desse gene nas células da linhagem RT4. Nas linhagens 5637 e T24, o tratamento não causou nenhuma alteração na expressão desse gene.

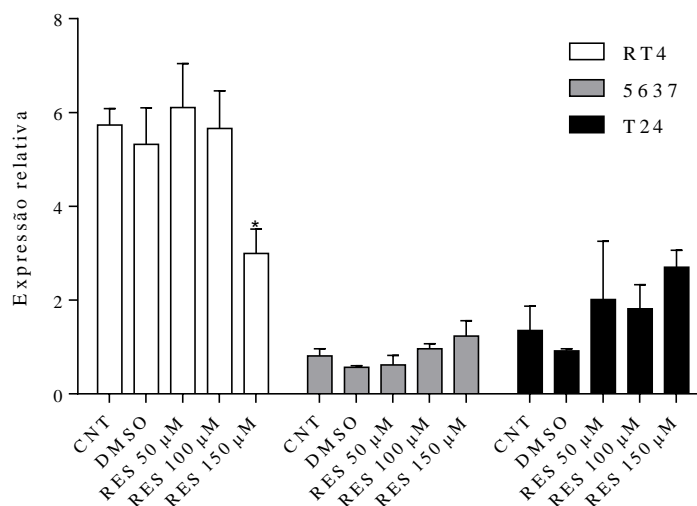


Figura 23: Níveis relativos de mRNA de *mTOR* em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

Na Figura 24 são apresentados os resultados da expressão do gene *MYC* após o tratamento com resveratrol. Pode-se observar que o tratamento não causou nenhuma alteração da expressão deste gene nas linhagens estudadas.

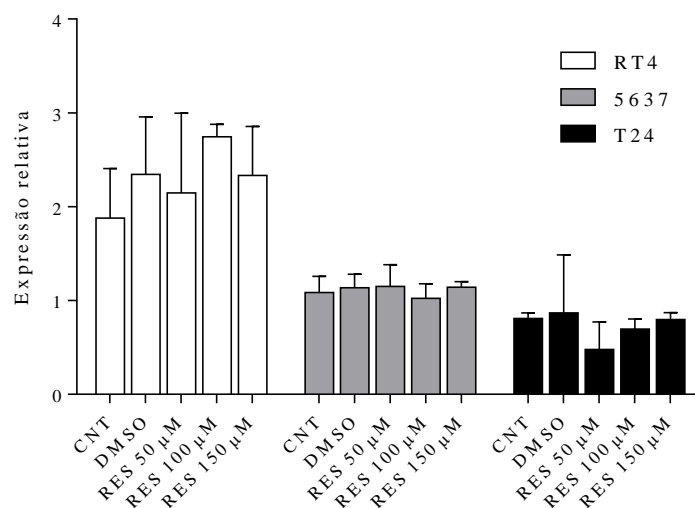


Figura 24: Níveis relativos de mRNA de *MYC* em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

Na Figura 25 pode-se observar os resultados da expressão do gene *PLK1* após o tratamento com resveratrol. Nas três linhagens estudadas, o tratamento com resveratrol nas concentrações de 100 e 150 μM causou uma redução significativa da expressão desse gene.

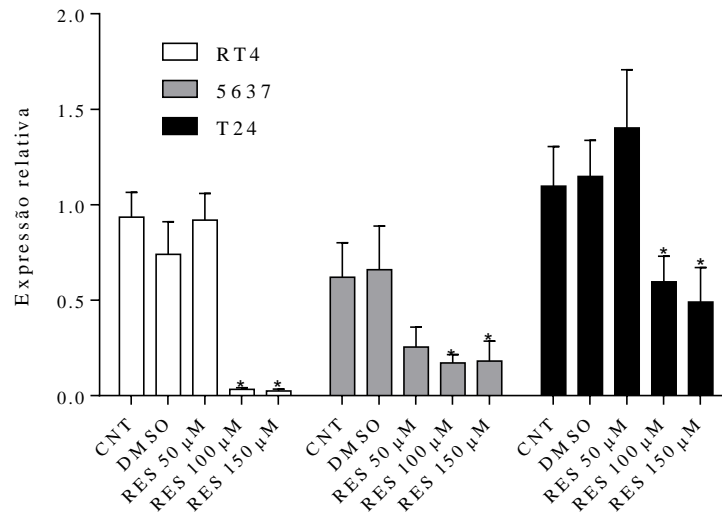


Figura 25: Níveis relativos de mRNA de *PLK1* em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

Na Figura 26 são apresentados os resultados da expressão do gene *RASSF1A* após o tratamento com resveratrol. A maior concentração avaliada de resveratrol causou aumento significativo da expressão desse gene na linhagem T24. Nas linhagens RT4 e 5637 o tratamento não causou nenhuma alteração na expressão desse gene.

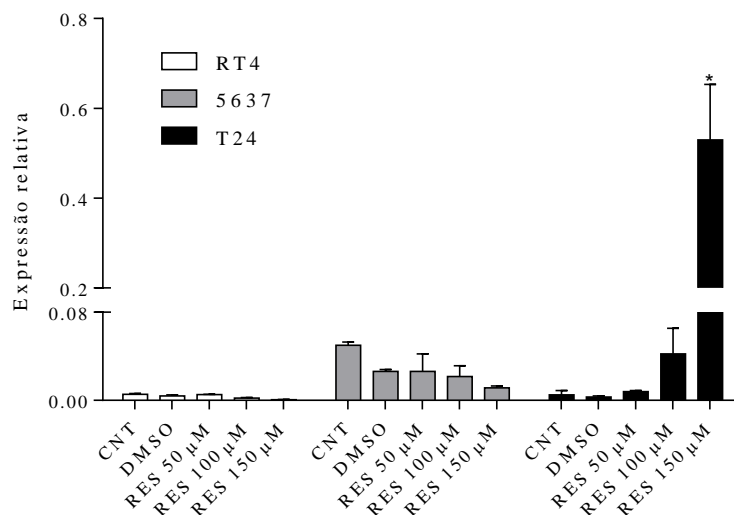


Figura 26: Níveis relativos de mRNA de *RASSF1A* em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

Na Figura 27 são apresentados os resultados da expressão do gene *SMAD4*. Na linhagem RT4 houve redução da expressão desse gene após o tratamento com resveratrol em todas as concentrações avaliadas. Nas células das linhagens 5637 e T24 não houve modulação da expressão desse gene pelo resveratrol.

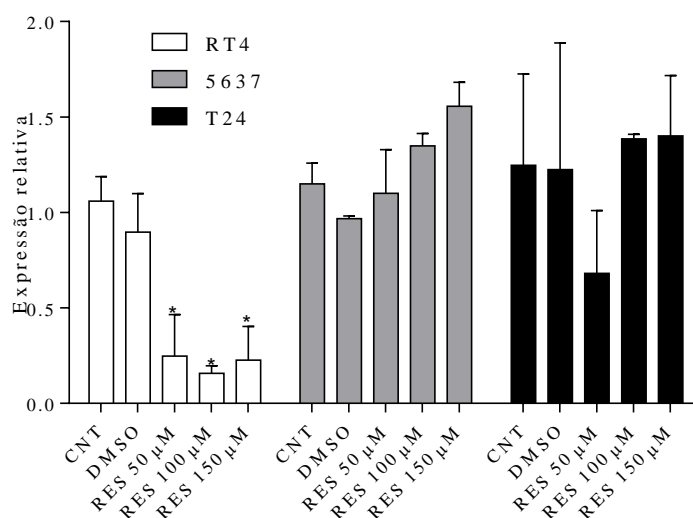


Figura 27: Níveis relativos de mRNA de *SMAD4* em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

Na Figura 28 são apresentados os resultados da expressão do gene *SRC* após o tratamento com resveratrol. Nas células da linhagem RT4, o tratamento com resveratrol na maior concentração avaliada (150 μ M) causou uma redução significativa da expressão desse gene. Nas linhagens 5637 e T24, o tratamento não causou nenhuma alteração na expressão desse gene.

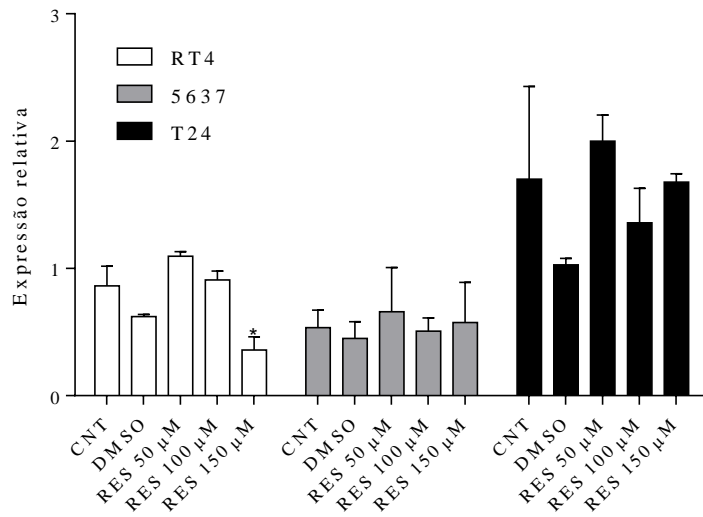


Figura 28: Níveis relativos de mRNA de *SRC* em células RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol. CNT: controle não tratado, DMSO: controle de DMSO, RES: resveratrol. * $p < 0,05$ em relação ao CNT.

Os valores de *fold change* são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de *fold change* calculados para as células das linhagens RT4, 5637 e T24 após o tratamento com resveratrol

Concentrações (μ M)	RT4			5637			T24		
	50	100	150	50	100	150	50	100	150
<i>AKT</i>	0,95	0,68	0,30	0,66	0,68	0,76	1,46	0,91	1,21
<i>CDHI</i>	1,25	1,32	2,49	1,48	1,92	3,65	0,59	0,36	1,83
<i>CTNNB1P1</i>	1,28	0,98	1,48	1,58	2,13	2,65	0,92	2,32	4,81
<i>DNMT1</i>	0,96	0,44	0,28	1,09	0,94	0,92	1,72	1,94	1,90
<i>FGFR3</i>	1,21	1,77	0,67	2,21	5,99	4,49	3,64	6,11	6,11
<i>HAT</i>	1,86	1,38	0,67	1,16	0,99	0,94	0,39	0,24	0,27
<i>HDAC</i>	0,86	0,91	0,46	1,22	0,98	1,08	1,28	2,20	2,02
<i>HOXB3</i>	0,98	0,30	0,29	1,01	0,97	0,56	0,58	0,33	0,14
<i>mTOR</i>	1,07	0,99	0,53	0,76	1,23	1,61	1,50	1,40	2,14
<i>MYC</i>	1,76	2,35	1,87	1,06	0,97	1,07	0,58	0,86	0,98
<i>PLK1</i>	1,00	0,04	0,03	0,40	0,29	0,28	1,31	0,54	0,48
<i>RASSF1A</i>	0,97	0,98	0,93	0,59	0,44	0,36	2,06	13,39	106,3
<i>SMAD4</i>	0,22	0,15	0,23	0,96	1,18	1,36	0,86	1,21	1,77
<i>SRC</i>	1,30	1,01	0,42	1,21	1,03	1,17	1,32	0,87	1,10

Nas Figuras 29 e 30 são apresentados os efeitos e mecanismos de ação do resveratrol nas linhagens tumorais selvagem e mutadas para o gene *TP53*, respectivamente.

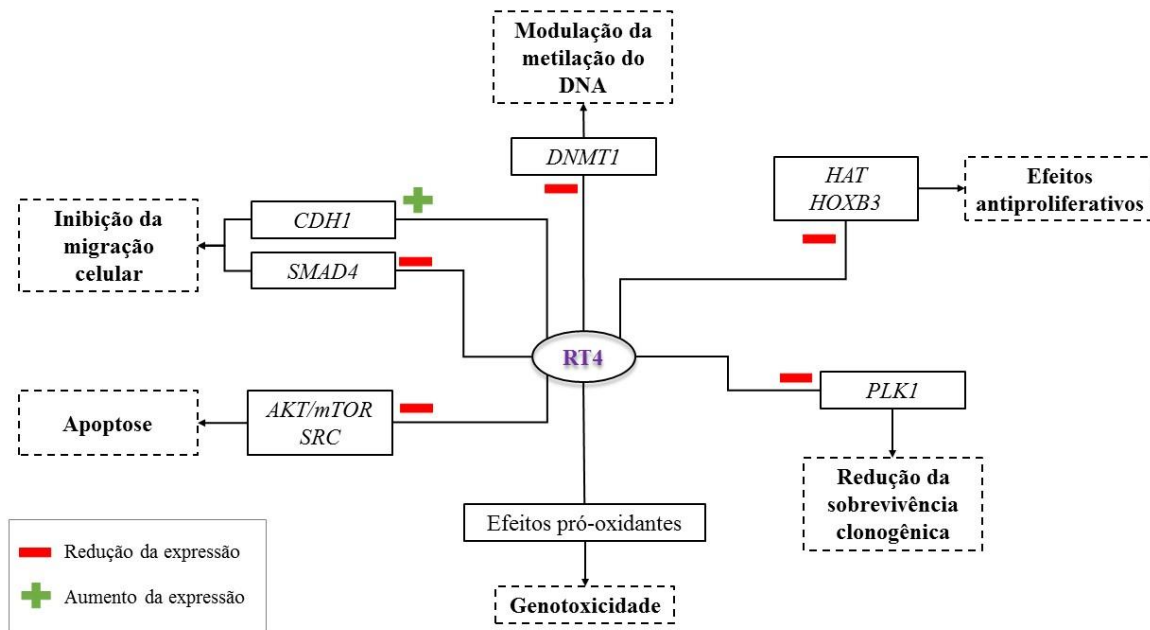


Figura 29: Efeitos e mecanismo de ação do resveratrol na linhagem celular RT4 (*TP53* selvagem).

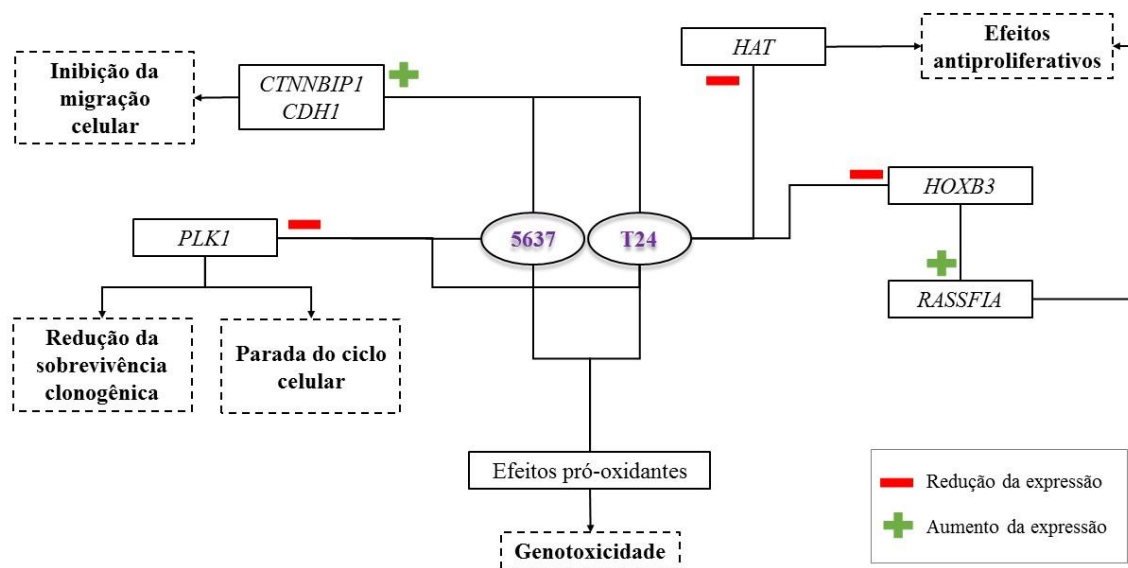


Figura 30: Efeitos e mecanismo de ação do resveratrol nas linhagens celulares com mutação no gene *TP53*.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Mutações no gene supressor tumoral *TP53* são muito comuns no câncer de bexiga (NISHIYAMA *et al.*, 2008) e influenciam o prognóstico e a resposta a quimioterapia (WELLER, 1998). Dessa forma, os efeitos do resveratrol em linhagens celulares de carcinoma urotelial com diferentes *status* do gene *TP53* foram avaliados. A linhagem 5637 apresenta duas mutações no gene *TP53*, uma no códon 72 (Arg > Pro) e uma no códon 280 (Arg > Thr), levando a alterações no domínio central da proteína p53, que impede sua ligação ao DNA. Na linhagem T24, o gene *TP53* possui deleção da tirosina 126, levando a mutação no domínio de transativação. Esse tipo de mutação não altera a ligação da proteína p53 ao DNA, preservando em parte as atividades de *TP53* (CORDON-CARDO *et al.*, 1994). Uma característica da proteína p53 mutada é que ela geralmente se torna estável e se acumula em níveis muito altos nas células (MULLER, VOUSDEN, 2013; FREED-PASTOR, PRIVES, 2012). Isto pode ser confirmado neste estudo pela imunocitoquímica para p53, na qual pode-se observar um acúmulo de p53 nas linhagens mutadas e praticamente nenhuma marcação na linhagem selvagem.

Existe uma ampla variedade de testes para analisar a viabilidade de células. A escolha de qual teste utilizar vai depender da limitação de cada ensaio, da facilidade e velocidade de uso, além dos recursos e equipamentos disponíveis no laboratório (MASSON-MEYERS *et al.*, 2016). Neste estudo, três métodos foram utilizados para avaliar os danos citotóxicos do resveratrol. O método de XTT baseia-se na capacidade das enzimas mitocondriais desidrogenases, presentes nas células viáveis, em reduzir o sal XTT (3-bis[2-etoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) em um produto formazan laranja, solúvel em água (ROEHM *et al.*, 1991). O método do vermelho neutro utiliza a capacidade do composto vermelho neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina), um corante vital solúvel em água, em passar pela membrana plasmática e tornar-se concentrado nos lisossomos de células viáveis (TRIGLIA *et al.*, 1991). O ensaio de exclusão do azul de tripan baseia-se na integridade da membrana celular, uma vez que as células com membranas íntegras são impermeáveis a esse corante polar (TRAN *et al.*, 2011).

Danos citotóxicos causados pelo resveratrol foram detectados em todas as linhagens estudadas. Além disso, é possível observar que a metodologia de vermelho neutro foi mais sensível para detectar a morte celular nas condições avaliadas. Vários

autores têm confirmado a maior sensibilidade do vermelho neutro em relação a métodos baseados na redução de sais de tetrazolium (ALI *et al.*, 2018; GOMEZ-PEREZ *et al.*, 2017; REPETTO *et al.*, 2008) e exclusão do azul de tripan (LEIGH *et al.*, 2018). Aparentemente, a quantidade de corante vermelho neutro absorvida pelos lisossomos é maior do que a quantidade de sal de tetrazolium reduzida pelas mitocôndrias (BORENFREUND *et al.*, 1988). Em relação ao método de exclusão do azul de tripan, quando utilizado para um grande número de amostras, pode fornecer resultados com menor precisão devido ao longo tempo de execução e de análise no microscópio (KIM *et al.*, 2011). É importante ressaltar que além das limitações de cada metodologia utilizada para avaliar a citotoxicidade, as diferenças encontradas podem refletir diferenças na suscetibilidade de cada alvo avaliado no teste, ou seja, maior suscetibilidade da membrana celular, do lisossomo ou do metabolismo mitocondrial ao resveratrol (MASSON-MEYER *et al.*, 2016, ZWOLAK, 2016).

Considerando que a metodologia do vermelho neutro foi mais sensível para avaliação da citotoxicidade, podemos sugerir que a linhagem com o gene *TP53* selvagem é mais sensível aos efeitos do resveratrol do que as linhagens mutadas. Mutações em *TP53* estão frequentemente ligadas à resistência a medicamentos padrão, tais como cisplatina, doxorubicina e gencitabina (HIENTZ *et al.*, 2017). Como a proteína p53 atua como indutor de apoptose, as mutações em *TP53* podem proteger, pelo menos parcialmente, dessa via de morte celular. Além disso, as funções de p53 se estendem a várias formas não apoptóticas de morte celular e outros processos, como reparo do DNA, autofagia e senescência (KRUISWIJK *et al.*, 2015), que são conhecidos por afetar as respostas aos medicamentos antineoplásicos (HE *et al.*, 2017). De Oliveira e colaboradores, ao avaliarem os efeitos da silibinina em células de tumor de bexiga, também observaram que a linhagem *TP53* selvagem foi mais sensível ao tratamento comparada com a linhagem mutada (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Ao comparar os resultados de citotoxicidade e proliferação celular obtidos pelo mesmo método pode-se observar que os valores de CI_{50} dos experimentos de proliferação celular são menores que os valores de CI_{50} dos experimentos de citotoxicidade. Isso significa que após 24 horas do fim do tratamento mais danos são detectados, sugerindo que o resveratrol possa causar um dano no potencial reprodutivo das células.

Para confirmar a hipótese de dano na capacidade reprodutiva das células, o experimento de sobrevivência clonogênica foi realizado. Este teste determina a

capacidade de uma célula se proliferar indefinidamente, retendo a sua capacidade de reprodução após ser exposta a uma substância (MUNSHI *et al.*, 2005). Ele permite avaliar os efeitos a longo prazo de um composto, sendo o mais indicado para medir morte em células tumorais (TANNOCK, LEE, 2001). Em todas as linhagens estudadas, o tratamento com resveratrol causou redução do número de colônias formadas, confirmando seu potencial antitumoral nesses tipos celulares. A redução do número de colônias nas linhagens celulares foi acompanhada de redução da expressão do gene *PLK1* (25- e 33,3-fold downregulation para RT4 nas concentrações 100 e 150 μ M, respectivamente; 3,45- e 3,57-fold downregulation para 5637 nas concentrações 100 e 150 μ M, respectivamente; 1,85- e 2,08-fold downregulation para T24 nas concentrações 100 e 150 μ M, respectivamente). Brassesco e colaboradores demonstraram que inibidores de *PLK1* levam a inibição da proliferação celular e redução da formação de colônias nas mesmas linhagens tumorais de câncer de bexiga (BRASSESCO *et al.*, 2013).

A genotoxicidade do resveratrol foi previamente evidenciada em carcinoma escamoso de cabeça e pescoço, hepatoma e câncer de próstata (SCIFO *et al.*, 2004; MICHELS *et al.*, 2006; TYAGI *et al.*, 2011). Foi possível demonstrar este efeito nas células de câncer de bexiga através do aumento dos danos primários no DNA pelo teste do cometa. Assim, a redução da proliferação celular causada pelo resveratrol provavelmente ocorreu devido à indução de danos ao DNA. Por outro lado, não foram detectados efeitos mutagênicos no teste do micronúcleo. Estes resultados sugerem que o resveratrol, embora genotóxico, não é aneugênico ou clastogênico para células *TP53* mutadas ou selvagens. Lee e colaboradores (2008) também não encontraram efeitos mutagênicos em células de leucemia promielocítica após tratamento com resveratrol.

Foi possível observar que o tratamento com resveratrol levou a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio nas linhagens tumorais estudadas. Este efeito pode estar diretamente relacionado com o aumento dos danos primários ao DNA observados no teste do cometa. Pode parecer contraditório que o resveratrol, um composto amplamente conhecido por seu efeito anti-oxidante, possa causar um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e gerar estresse oxidativo. Entretanto, é importante notar que o resveratrol é um polifenol, um composto que pode agir tanto como antioxidante quanto como pró-oxidante, dependendo de sua concentração, do seu potencial redox, da presença de ions metálicos e do pH do meio (BIASUTTO *et al.*, 2008). Vários estudos têm confirmado que altas concentrações de resveratrol induzem

produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (SHANKAR *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2008; LOW *et al.*, 2010). Além disso, é bem estabelecido que a maioria dos tumores têm baixa vascularização que restringe a quantidade de nutrientes adequada, levando à deficiência de oxigênio, que, por sua vez, leva à redução do pH das células tumorais. Em um ambiente ácido, a protonação de resíduos de guanina no DNA pode causar rotação dessa base para fora da hélice. Este efeito pode expor o DNA e torná-lo facilmente acessível a agentes como o resveratrol, resultando em danos (MUQBIL *et al.*, 2012).

Ao avaliar as alterações morfológicas causadas pelo tratamento com resveratrol, pode-se observar a presença de células alongadas nas linhagens 5637 e T24. Além disso, em todas as linhagens houve redução do número de células após o tratamento com resveratrol, o que é consistente com os experimentos de citotoxicidade. As alterações morfológicas encontradas e a baixa densidade celular são sugestivas de parada do ciclo celular e apoptose (DA SILVA *et al.*, 2012).

Na linhagem RT4 foi observada redução do IDN após quatro horas de tratamento com resveratrol, sugerindo efeito citostático (FENECH, 2000). Entretanto, após 24 horas de tratamento, aumento do conteúdo sub-G1, indicativo de morte celular (CHEN *et al.*, 2018; JAFARGHOLIZADEH *et al.*, 2018) foi observado. Danos ao DNA levam a ativação da proteína p53, o que pode levar a parada transitória do ciclo celular na tentativa de reparo do DNA (KIM *et al.*, 2009; GUO, CUI, 2015). Entretanto, dependendo da extensão dos danos, p53 leva à indução de morte celular, principalmente por apoptose (VILLUNGER *et al.*, 2003; CHIPUK *et al.*, 2004).

O indicativo de morte celular apontado pelo aumento do conteúdo sub-G1 na linhagem RT4 foi confirmado pela detecção de apoptose. Esse tipo de morte celular é comum em células *TP53* selvagens, uma vez que a ativação desse gene aumenta a expressão de proteínas pró-apoptóticas (ODA *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2003). Nesse estudo, o tipo de morte celular encontrado na linhagem *TP53* selvagem pode ser explicado pela redução da expressão dos genes *AKT* e *mTOR* (1,47- e 3,33-*fold downregulation* para *AKT* em 100 e 150 μ M, respectivamente; 1,89- *fold downregulation* para *mTOR* em 150 μ M), uma vez que altos níveis das proteínas dessa via previnem a apoptose em células tumorais de bexiga (OKA *et al.*, 2006). Além disso, a redução da expressão do oncogene *SRC* também pode estar contribuindo para a apoptose nessa linhagem (2,38-*fold downregulation* em 150 μ M). Esse gene age favorecendo vários tipos tumorais através do estímulo a proliferação celular (IRBY,

YEATMAN, 2010). Kong e colaboradores demonstraram que a redução dos níveis da proteína Src em células de câncer de bexiga leva a apoptose através da inibição da fosforilação da proteína anti-apoptótica FAK (KONG *et al.*, 2015).

O gene *HOXB3* exerce seus efeitos oncogênicos através do aumento da proliferação e transformação celular (FU *et al.*, 2017; KROSL *et al.*, 1998). Portanto, a redução da expressão do gene *HOXB3* é outro mecanismo através do qual o resveratrol exerce seus efeitos antiproliferativos nas células *TP53* selvagem (3,33- e 4,45-*fold downregulation* em 100 e 150 μ M, respectivamente).

A redução da migração celular observada nas células *TP53* selvagem após o tratamento com resveratrol foi acompanhada pela redução da expressão do gene *SMAD4* (4,55-, 6,67- e 4,35-*fold downregulation* em 50, 100 e 150 μ M, respectivamente). A relação entre a via de sinalização Nodal/ALK/Smad4 e migração celular em células RT4 já foi descrita previamente. O oncogene *NODAL* age regulando a migração e a invasão celular através da via ALK/Smad. A supressão da expressão de *NODAL* inibe a expressão de *SMAD4*, resultando em inibição da migração e invasão celular (LI *et al.*, 2018). Yang e colaboradores (2016) também encontraram redução da expressão de *SMAD4* após tratamento com resveratrol em células de rabdomiossarcoma alveolar.

A redução da migração celular nas células *TP53* selvagem após o tratamento com resveratrol também foi acompanhada pelo aumento da expressão do gene *CDH1* (2,49-*fold upregulation* em 150 μ M). Este gene codifica a proteína caderina 1, uma glicoproteína de membrana que medeia a adesão célula-célula (WIERSTRA, 2011). Perda ou redução da expressão de caderina é relatada em uma variedade de cânceres, incluindo o de bexiga (BREYER *et al.*, 2016; RIEGER-CHRIST *et al.*, 2001). Além de seu papel na migração celular, em tumores de baixo grau, sugere-se que a baixa expressão dessa proteína seja um determinante importante de recorrência (HUSSEIN *et al.*, 2017).

O resveratrol também age nas células *TP53* selvagem através da modulação de eventos epigenéticos. A metilação do DNA é um componente importante para diversos processos celulares normais, entretanto inúmeros genes tornam-se anormalmente metilados durante a tumorigênese (ZWERGEL *et al.* 2016). Fang e colaboradores demonstraram que o acúmulo nuclear da enzima DNMT1, e consequente hipermetilação do DNA, dá-se através da via Akt/mTOR. A ativação dessa via leva a ativação da proteína GSK3 β que impede a degradação de DNMT1 (FANG *et al.*, 2015). Esse mecanismo pode estar sendo bloqueado nas células RT4 após o tratamento com

resveratrol, uma vez que houve redução da expressão dos genes *DNMT1* (2,27- e 3,57-*fold downregulation* em 100 e 150 μ M, respectivamente) e *AKT/mTOR*, contribuindo para a restauração da metilação normal nessa linhagem. É importante ressaltar que embora não tenha ocorrido redução da metilação global, a redução da expressão de *DNMT1* pode contribuir para a desmetilação de genes supressores tumorais. Qiu e colaboradores (2017) demonstraram que o tratamento com o flavonóide kaempferol não alterou o conteúdo de 5-metilcitosina, um biomarcador de metilação global do DNA, em um modelo de xenoinxerto de câncer de bexiga, mas modulou a metilação do DNA em posições específicas.

O mecanismo epigenético de acetilação de histonas também é modulado pelo resveratrol na linhagem *TP53* selvagem. No câncer de bexiga são encontrados altos níveis de *HAT*, gene que codifica a enzima responsável pela acetilação de histonas, sugerindo que esse processo esteja relacionado com a carcinogênese da bexiga (IIZUKA *et al.*, 2009). Desta forma, a redução dos níveis de *HAT* (1,49-*fold downregulation* em 150 μ M) na linhagem RT4 após o tratamento com resveratrol contribui com os efeitos antiproliferativos deste composto.

Nas linhagens mutadas para o gene *TP53*, o tratamento com resveratrol causou aumento do número de células na fase S, seguido de redução do número de células na fase G2/M, mostrando parada do ciclo na fase S. A redução do IDN, parâmetro citostático e diretamente relacionado a replicação de DNA (ISTIFLI *et al.*, 2019), confirma este resultado. Essa parada do ciclo celular pode ser causada pela redução da expressão do gene *PLK1*, uma vez que sua proteína é importante para a progressão da fase S do ciclo celular (SHEN *et al.*, 2013).

A inibição da migração celular após o tratamento com resveratrol nas linhagens *TP53* mutadas foi acompanhada pelo aumento da expressão do gene *CTNNB1P1* (1,58-, 2,13- e 2,65-*fold upregulation* para a linhagem 5637 em 50, 100 e 150 μ M, respectivamente; 4,81-*fold upregulation* para a linhagem T24 em 150 μ M). A proteína codificada por esse gene é um regulador negativo da via de sinalização Wnt/ β -catenina, cuja participação na regulação da proliferação e migração celular no câncer de bexiga foi demonstrada previamente (YUAN *et al.*, 2017, CHEN *et al.*, 2018). A inibição da migração celular nas células *TP53* mutadas também foi acompanhada pelo aumento da expressão de *CDH1* após o tratamento com resveratrol (1,92- e 3,65-*fold upregulation* para a linhagem 5637 em 100 e 150 μ M, respectivamente; 1,83-*fold upregulation* para a linhagem T24 em 150 μ M). Perda da expressão de *CDH1* é uma das características

observadas na transição epitelial-mesenquimal, processo frequentemente observado na carcinogênese no qual uma célula epitelial perde polaridade e adesão célula-célula, além de ganhar propriedades migratórias e invasivas (SCHNEIDER, KOLLIGS, 2015).

Em relação ao tipo de morte celular causada pelo resveratrol, pode-se observar que existe influência do tipo da mutação em *TP53*. Nas células T24 houve um aumento do número de células necróticas. Esse tipo de morte celular pode acontecer por vias independentes de p53. Shin e colaboradores demonstraram que o tratamento com doxorrubicina leva a quebras no DNA, o que gera um aumento dos níveis da proteína PARP, mesmo na presença de um inibidor de p53. Altos níveis dessa proteína resultam em ativação exacerbada da mitocôndria levando a necrose (SHIN *et al.*, 2015). Nas células 5637 não foi possível detectar apoptose ou necrose. Assim, outro mecanismo de morte celular, como a senescência, pode estar envolvido na redução da viabilidade celular nessa linhagem após o tratamento com resveratrol. A senescência celular é um estado de parada permanente do ciclo celular que pode ser desencadeada por uma variedade estímulos, incluindo danos no DNA e estresse oxidativo (EWALD *et al.*, 2010). Vários autores já demonstraram a capacidade do resveratrol em causar senescência (GAO *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2013).

Alguns genes foram modulados pelo tratamento com resveratrol na linhagem T24 e não na linhagem 5637, confirmando a influência do tipo de mutação em *TP53* na resposta a esse composto. Modulação de vias relacionadas a *RASSF1A/HOXB3* e sobre o gene *HAT* foram encontradas apenas na linhagem T24.

O gene *RASSF1A* é um supressor tumoral que desempenha funções de inibição da proliferação celular (ZHAN *et al.*, 2017). A inibição desse gene ocorre na maioria dos cânceres, dentre eles o de bexiga, e acontece através da hipermetilação de sua região promotora (BAYLIN, HERMAN, 2010). Palakurthy e colaboradores mostraram que o silenciamento de *RASSF1A* ocorre através do oncogene *HOXB3*, que é capaz de induzir a expressão de *DNMT3B*, um dos genes que codificam as enzimas responsáveis pela metilação do DNA. Assim, a superexpressão de *DNMT3B* causada por *HOXB3* leva a hipermetilação da região promotora de *RASSF1A* (PALAKURTHY *et al.*, 2009). Neste contexto, o resveratrol pode estar reduzindo a expressão de *DNMT3B*, o que reflete na redução da expressão de *HOXB3* (7,14-fold downregulation em 150 µM) e no aumento da expressão de *RASSF1A* (106,3-fold upregulation em 150 µM). A restauração da expressão de *RASSF1A* contribui para os efeitos antiproliferativos do resveratrol nas células T24.

Outro mecanismo que contribui para os efeitos antiproliferativos do resveratrol na linhagem T24 é a redução da expressão de *HAT* (2,56-, 4,17- e 3,70-*fold downregulation* em 50, 100 e 150 μ M, respectivamente), gene responsável pela acetilação de histonas. Esse evento epigenético pode levar a uma menor condensação DNA e, portanto, ativa a transcrição gênica (STRAHL, ALLIS, 2000). Se os genes transcritos são oncogenes, a hiperacetilação pode ajudar na progressão do câncer (WAPENAAR, DEKKER, 2016), sendo interessante sua diminuição.

Nas células T24 também foi possível observar que o tratamento com resveratrol causou redução dos níveis de PCNA nuclear. Essa proteína é importante para diversos processos celulares que ocorrem no núcleo, tais como replicação, transcrição e progressão do ciclo celular (MAGA, HUBSCHER, 2003). Outros autores demonstraram os efeitos antiproliferativos do resveratrol através da redução de PCNA (LEE *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2014). Além disso, é interessante notar que uma considerável quantidade de PCNA foi detectada no citoplasma de todas as linhagens celulares estudadas. Naryzhny e Lee (2010) mostraram que em células cancerígenas a PCNA está associada com diversas proteínas citoplasmáticas, incluindo enzimas envolvidas da via da glicólise e oncoproteínas.

Houve um aumento significativo da expressão de *FGFR3* nas células T24 após o tratamento com resveratrol (6,11-*fold upregulation* em 100 e 150 μ M). Embora esse gene esteja fortemente relacionado a tumorigênese, devido à regulação de diversos processos tais como sobrevivência celular, proliferação, metástase e angiogênese (FENG *et al.*, 2015), esse aumento da expressão de *FGFR3* não é suficiente para estimular a proliferação celular, uma vez que o resveratrol induz morte nessa linhagem.

A expressão do oncogene *MYC* está relacionada à transcrição de genes envolvidos em processos como angiogênese, metástase e migração celular (WALZ *et al.*, 2014). Wang e colaboradores encontraram diminuição das taxas de migração celular em células de câncer de mama, o que foi acompanhado por uma redução nos níveis de proteína c-myc (WANG *et al.*, 2017). Por outro lado, não foi detectado nenhuma alteração na expressão do *MYC*, sugerindo que esse gene não está envolvido na inibição da migração celular pelo resveratrol nas células tumorais da bexiga avaliadas neste estudo.

O gene *HDAC* codifica a proteína que faz a remoção de grupos acetil no processo de desacetilação de histona (YUAN, MARMORSTEIN, 2013). Embora esse processo seja importante do controle da transcrição, neste estudo não foi observado

nenhuma alteração da expressão desse gene após o tratamento com resveratrol em nenhuma das linhagens estudadas.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sobre os efeitos citotóxicos e toxicogenômicos do resveratrol em três linhagens tumorais de bexiga (RT4 - *TP53* selvagem; 5637 e T24 - *TP53* mutado) permitiram as seguintes conclusões:

- O tratamento com resveratrol é citotóxico para todas as linhagens estudadas, sendo a linhagem *TP53* selvagem mais sensível a essa ação do composto.
- Redução do número de colônias no ensaio de sobrevivência clonogênica foi detectado em todas as linhagens após o tratamento com resveratrol, e foi acompanhado da diminuição da expressão do gene *PLK1*.
- Foi detectado o efeito pró-oxidante do resveratrol em todas as linhagens celulares estudadas. Este efeito parece estar diretamente relacionado com o aumento dos danos primários ao DNA observados no teste do cometa.
- Na linhagem *TP53* selvagem houve aumento significativo das taxas de apoptose após o tratamento com resveratrol, sendo este efeito relacionado a redução da expressão dos genes *AKT*, *mTOR* e *SRC*. A redução da migração celular nessa linhagem foi acompanhada pelo aumento da expressão do gene *CDH1* e redução da expressão do gene *SMAD4*. Além disso, a modulação dos genes *HAT*, *HOXB3* e *DNMT1* após o tratamento com resveratrol também contribuem para os efeitos antiproliferativos do composto nessa linhagem.
- Nas linhagens mutadas para o gene *TP53* pode-se observar que o resveratrol causou parada do ciclo celular na fase S, acompanhado pela redução da expressão do gene *PLK1*. Além disso, pode observar que o resveratrol causou inibição da migração celular nessas linhagens, provavelmente pelo aumento da expressão dos genes *CTNNB1P1* e *CDH1*.
- Algumas respostas foram observadas após o tratamento com resveratrol na linhagem T24 e não na linhagem 5637, mostrando que o tipo de mutação em *TP53* influencia no efeito do composto. Na linhagem T24, modulação de vias relacionadas aos genes *HOXB3*, *RASSF1A* e *HAT* contribuem para os efeitos antiproliferativos do resveratrol, assim como a redução dos níveis da proteína PCNA.

Finalmente, podemos concluir que o resveratrol possui atividade antiproliferativa independente do *status* de *TP53* em células tumorais de bexiga, entretanto, os efeitos antineoplásicos observados devem-se a diferentes mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

AARONSON, D. S.; WALSH, T. J.; SMITH, J. F.; DAVIES, B. J.; HSIEH, M. H.; KONETY, B. R. Meta-analysis: does lidocaine gel before flexible cystoscopy provide pain relief? **BJU International**, v.104, p.506–509, 2009.

AGGARWAL, B. B. Prostate cancer and curcumin: add spice to your life. **Cancer Biology and Therapy**, v.7, p.1436–40, 2008.

ALAYEV, A.; BERGER, S. M.; KRAMER, M. Y.; SCHWARTZ, N. S.; HOLZ, M. K. The combination of rapamycin and resveratrol blocks autophagy and induces apoptosis in breast cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.116, p.450–457, 2015.

ALAYEV, A.; SALAMON, R. S.; SCHWARTZ, N. S.; BERMAN, A. Y.; WIENER, S. L.; HOLZ, M. K. Combination of Rapamycin and Resveratrol for Treatment of Bladder Cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v.9999, p.1–11, 2016.

ALFRED WITJES, J.; LEBRET, T.; COMPÉRAT, E. M.; COWAN, N. C.; DE SANTIS, M.; BRUINS, H. M.; HERNÁNDEZ, V.; ESPINÓS, E. L.; DUNN, J.; ROUANNE, M.; NEUZILLET, Y.; VESKIMÄE, E.; VAN DER HEIJDEN, A. G.; GAKIS, G.; RIBAL, M. J. Updated 2016 EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. **European Urology**, v.71, p.462–475, 2017.

ALI, D.; TRIPATHI, A.; ALI, H. A.; SHAHI, Y.; MISHRA, K. K.; ALARIFI, S.; ALKAHTANE, A. A.; MANOHARDAS, S. ROS-dependent Bax/Bcl2 and caspase 3 pathway-mediated apoptosis induced by zineb in human keratinocyte cells. **OncoTargets and Therapy**, v. 11, p.489–497, 2018

ALI, I.; BRAUN, D. P. Resveratrol enhances mitomycin C-mediated suppression of human colorectal cancer cell proliferation by up-regulation of p21WAF1/CIP1. **Anticancer Research**, v.34, p.5439–46, 2014.

ALMAGRO, L.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, F.; PEDREÑO, M. A. Indole alkaloids from *Catharanthus roseus*: Bioproduction and their effect on human health. **Molecules**, v.20, p.2973–3000, 2015.

ALS, A. B.; DYRSKJOT, L.; VON DER MAASE, H.; KOED, K.; MANSILLA, F.; TOLDBOD, H. E.; JENSEN, J. L.; ULHOI, B. P.; SENGELOV, L.; JENSEN, K. M.; ORNTOFT, T. F. Emmprin and survivin predict response and survival following cisplatin-containing chemotherapy in patients with advanced bladder cancer. **Clinical Cancer Research**, v.13, p.4407–4414, 2007.

ANTONI, S.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ZNAOR, A.; JEMAL, A.; BRAY, F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. **European Urology**, v.71, p.96–108, 2017.

ATHAR, M.; BACK, J. H.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R.; KIM, A. L. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.486, p.95–102, 2009.

AZIZ, M. H.; AFAQ, F.; AHMAD, N. Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in survivin. **Photochemistry and Photobiology**, v.81, p.25–31, 2005.

BABJUK, M.; BÖHLE, A.; BURGER, M.; CAPOUN, O.; COHEN, D.; COMPÉRAT, E. M.; HERNÁNDEZ, V.; KAASINEN, E.; PALOU, J.; ROUPRÊT, M.; VAN RHIJN, B. W.; SHARIAT, S. F.; SOUKUP, V.; SYLVESTER, R. J.; ZIGEUNER, R. EAU guidelines on non-muscleinvasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2016. **European Urology**, 71, 447–461, 2016.

- BAEK, S. H.; KO, J. H.; LEE, H.; JUNG, J.; KONG, M.; LEE, J. W.; LEE, J.; CHINNATHAMBI, A.; ZAYED, M. E.; ALHARBI, S. A.; LEE, S. G.; SHIM, B. S.; SETHI, G.; KIM, S. H.; YANG, W. M.; UM, J. Y.; AHN, K. S. Resveratrol inhibits STAT3 signaling pathway through the induction of SOCS-1: Role in apoptosis induction and radiosensitization in head and neck tumor cells. **Phytomedicine**, v.23, p.566-577, 2016.
- BAI, Y.; MAO, Q.; QIN, J.; ZHENG, X.; WANG, Y.; YANG, K.; SHEN, H.; XIE, L. P. Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest human T24 bladder cancer cells *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo*. **Cancer Science**, v.101, p.488-93, 2010.
- BAI, Y.; YANG, H.; ZHANG, G.; HU, L.; LEI, Y.; QIN, Y.; YANG, Y.; WANG, Q.; LI, R.; MAO, Q. Inhibitory effects of resveratrol on the adhesion, migration and invasion of human bladder cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, v.15, p.885-889, 2017.
- BAKKAR, A. A.; WALLERAND, H.; RADVANYI, F.; LAHAYE, J. B.; PISSARD, S.; LECERF, L.; KOUYOUMDJIAN, J. C.; ABOU, C. C.; PAIRON, J. C.; JAURAND, M. C.; THIERY, J. P.; CHOPIN, D. K.; DE MEDINA, S. G. *FGFR3* and *TP53* gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. **Cancer Research**, v.63, p.8108–12, 2003.
- BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. **Trends in Genetics**, v.16, p.168–174, 2000.
- BELLMUNT, J.; PETRYLAK, D. P. New therapeutic challenges in advanced bladder cancer. **Seminars in Oncology**, v.39, p.598–607, 2012.
- BERNABEU, E.; CAGEL, M.; LAGOMARSINO, E.; MORETTON, M.; CHIAPPETTA, D. A. Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead. **International Journal of Pharmaceutics**, v.526, p.474–495, 2017.
- BHAT, K. P.; PEZZUTO, J. M. Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells. **Cancer Research**, v.61, p.6137-44, 2001.
- BIASUTTO, L.; MATTAREI, A.; MAROTTA, E.; BRADASCHIA, A.; SASSI, N.; GARBISA, S.; ZORATTI, M.; PARADISI, C. Development of mitochondria-targeted derivatives of resveratrol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, p.5594-5597, 2008
- BILLEREY, C.; CHOPIN, D.; AUBRIOT-LORTON, M. H.; RICOL, D.; MEDINA, S. G. D.; RHIJIN, B. V.; BRALET, M.; LEFRERE-BELDA, M.; LAHAYE, J.; ABOU, C. C.; BONAVENTURE, J.; ZAFRANI, E. S.; KWAST, T.; THIERY, J. P.; RADVANYI, F. Frequent *FGFR3* mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. **The American Journal of Pathology**, v.158, p.1955–9, 2001.
- BLAVERI, E.; SIMKO, J. P.; KORKOLA, J. E.; BREWER, J. L.; BAEHNER, F.; MEHTA, K.; DEVRIES, S.; KOPPIE, T.; PEJAVAR, S.; CARROLL, P.; WALDMAN, F. M. Bladder cancer outcome and subtype classification by gene expression. **Clinical Cancer Research**, v.11, p.4044-4055, 2005.
- BÖHLE, A.; JOCHAM, D.; BOCK, P. R. Intravesical bacillus Calmette–Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. **The Journal of Urology**, v.169, p.90–95, 2003.
- BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays - The Neutral Red (NR) And Tetrazolium MTT Tests. **Toxicology in Vitro**, v.2, p. 1-6, 1988.
- BRANDAU, S.; BÖHLE, A. Bladder cancer. I. Molecular and genetic basis of carcinogenesis. **European Urology**, v.39, p.491-7, 2001.

- BRASDESCO, M. S.; PEZUK, J. A.; MORALES, A. G.; DE OLIVEIRA, J. C.; ROBERTO, G. M.; DA SILVA, G. N.; FRANCISCO DE OLIVEIRA, H.; SCRIDELI, C. A.; TONE, L. G. *In vitro* targeting of Polo-like kinase 1 in bladder carcinoma: comparative effects of four potent inhibitors. **Cancer Biology and Therapy**, v.14, p.648–657, 2013.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.68, p.394-424, 2018.
- BREYER, J.; GIERTH, M.; SHALEKENOV, S.; AZIZ, A.; SCHÄFER, J.; BURGER, M.; DENZINGER, S.; HOFSTÄDTER, F.; GIEDL, C.; OTTO, W. Epithelial-mesenchymal transformation markers E-cadherin and survivin predict progression of stage pTa urothelial bladder carcinoma. **World Journal of Urology**, v.34, p.709-716, 2016.
- CAI, H.; SCOTT, E.; KHOLGHI, A.; ANDREADI, C.; RUFINI, A.; KARMOKAR, A.; BRITTON, R. G.; HORNER-GLISTER, E.; GREAVES, P.; JAWAD, D.; JAMES, M.; HOWELLS, L.; OGNIBENE, T.; MALFATTI, M.; GOLDRING, C.; KITTERINGHAM, N.; WALSH, J.; VISKADURAKI, M.; WEST, K.; MILLER, A.; HEMINGWAY, D.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J.; BROWN, K. Cancer chemoprevention: Evidence of a nonlinear dose response for the protective effects of resveratrol in humans and mice. **Science Translational Medicine**, v.7, p.298, 2015.
- CAI, Y.; ZHAO, L.; QIN, Y.; ZHANG, M.; HE, Y. Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cell line C666-1 through AMPK activation. **Pharmazie**, v.70, p.399-403, 2015.
- CAMPAGNA, M.; RIVAS, C. Antiviral activity of resveratrol. **Biochemical Society Transactions**, v.38, p.50-53, 2010.
- CAPPELLEN, D.; DE OLIVEIRA, C.; RICOL, D.; DE MEDINA, S.; BOURDIN, J.; SASTRE-GARAU, X.; CHOPIN, D.; THIERY, J. P.; RADVANYI, F. Frequent activating mutations of *FGFR3* in human bladder and cervix carcinomas. **Nature Genetics**, v.23, p.18-20, 1999.
- CARROZZA, M. J.; UTLEY, R. T.; WORKMAN, J. L.; COTE, J. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. **Trends in Genetics**, v.19, p.321–329, 2003.
- CHANG, S. S.; BOORJIAN, S. A.; CHOU, R.; CLARK, P. E.; DANESHMAND, S.; KONETY, B. R.; PRUTHI, R.; QUALE, D. Z.; RITCH, C. R.; SEIGNE, J. D.; SKINNER, E. C.; SMITH, N. D. Diagnosis and treatment of nonmuscle invasive bladder cancer: AUA/SUO guideline. **The Journal of Urology**, v.196, p.1021–1029, 2016.
- CHARLTON, M. E.; ADAMO, M. P.; SUN, L.; DEORAH, S. Bladder cancer collaborative stage variables and their data quality, usage, and clinical implications: a review of SEER data, 2004–2010. **Cancer**, v.120, p.3815–3825, 2014.
- CHEN, C.; CHEN, Y.; HSIEH, Y.; WENG, C.; YEH, J.; YANG, S.; LIN, C.; YANG, J. Glabridin induces apoptosis and cell cycle arrest in oral cancer cells through the JNK1/2 signaling pathway. **Environmental Toxicology**, v.33, p.679–685, 2018.
- CHEN, M. C.; CHANG, W. W.; KUAN, Y. D.; LIN, S. T.; HSU, H. C.; LEE, C. H. Resveratrol inhibits LPS-induced epithelial-mesenchymal transition in mouse melanoma model. **Innate Immunity**, v.18, p.685-93, 2012.
- CHEN, S.; ZHOU, N.; ZHANG, Z.; LI, W.; ZHU, W. Resveratrol induces cell apoptosis in adipocytes via AMPK activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.457, p.608-13, 2015.

CHEN, Y. B.; TU, J. J.; KAO, J.; ZHOU, X. K.; CHEN, Y. T. Survivin as a useful adjunct marker for the grading of papillary urothelial carcinoma. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.132, p.224–231, 2008.

CHEN, Z. H.; HURH, Y. J.; NA, H. K.; KIM, J. H.; CHUN, Y. J.; KIM, D. H.; KANG, K. S.; CHO, M. H.; SURH, Y. J. Resveratrol inhibits TCDD-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1 and catechol estrogen-mediated oxidative DNA damage in cultured human mammary epithelial cells. **Carcinogenesis**, v.25, p.2005–2013, 2004.

CHEN, Z.; ZHOU, L.; WANG, L.; KAZOBINKA, G.; ZHANG, X.; HAN, X.; LI, B.; HOU, T. HBO1 promotes cell proliferation in bladder cancer via activation of Wnt/ β -catenin signaling. **Molecular Carcinogenesis**, v.57, p.12-21, 2018.

CHENG, H. L.; CHOW, N. H.; TZAI, T. S.; TONG, Y. C.; LIN, J. S.; CHAN, S. H.; YANG, W. H.; CHANG, C. C.; LIN, Y. M. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. **Anticancer Research**, v.17, p.2789–2793, 1997.

CHENG, L.; DAVISON, D. D.; ADAMS, J.; LOPEZ-BELTRAN, A.; WANG, L.; MONTIRONI, R.; ZHANG S. Biomarkers in bladder cancer: Translational and clinical implications. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.89, p.73–111, 2014.

CHIPUK, J.E.; KUWANA, T.; BOUCHIER-HAYES, L.; DROIN, N.M.; NEWMAYER, D.D.; SCHULER, M.; GREEN, D.R. Direct activation of bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. **Science**, v.303, p.1010-1014, 2004.

CHOI, J. W.; KIM, Y.; LEE, J. H.; KIM, Y. S. High expression of spindle assembly checkpoint proteins CDC20 and MAD2 is associated with poor prognosis in urothelial bladder cancer. **Virchows Archiv**, v.463, p.681-687, 2013.

CIOLINO, H. P.; YEH, G. C. Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome P-450 1A1 enzyme activity and CYP1A1 expression by resveratrol. **Molecular Pharmacology**, v.56, p.760–767, 1999.

COLIN, D. J.; LIMAGNE, E.; RAGOT, K.; LIZARD, G.; GHIRINGHELLI, F.; SOLARY, É.; CHAUFFERT, B.; LATRUFFE, N.; DELMAS, D. The role of reactive oxygen species and subsequent DNA-damage response in the emergence of resistance towards resveratrol in colon cancer models. **Cell Death and Disease**, v.5, p.1533, 2014.

COOPER, M. J.; HALUSCHAK, J. J.; JOHNSON, D.; SCHWARTZ, S.; MORRISON, L. J.; LIPPA, M.; HATZIVASSILIOU, G.; TAN, J. p53 mutations in bladder carcinoma cell lines. **Oncology Research**, v.6, p.569–579, 1994.

CORDON-CARDO, C.; DALBAGNI, G.; SAEZ, G. T.; OLIVA, M. R.; ZHANG, Z. F.; ROSAI, J.; REUTER, V. E.; PELLICER, A. p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. **International Journal of Cancer**, v.56, p.347-353, 1994.

DA SILVA, G. N.; CAMARGO, E. A., SALVADORI, D. M. F. Toxicogenomic activity of gemcitabine in two *TP53*-mutated bladder cancer cell lines: special focus on cell cycle-related genes. **Molecular Biology Reports**, v.39, p.10373–10382, 2012.

DAI, Z.; LEI, P.; XIE, J.; HU, Y. Antitumor effect of resveratrol on chondrosarcoma cells via phosphoinositide 3-kinase/AKT and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. **Molecular Medicine Reports**, v.12, p.3151-5, 2015.

DASIRAM, J. D.; GANESAN, R.; KANNAN, J.; KOTTEESWARAN, V.; SIVALINGAM, N. Curcumin inhibits growth potential by G1 cell cycle arrest and induces apoptosis in p53-mutated COLO 320DM human colon adenocarcinoma cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.86, p.373–380, 2017.

- DE OLIVEIRA, D. T.; SÁVIO, A. L. V.; DE CASTRO-MARCONDES, J. P.; BARROS, T. M.; BARBOSA, L. C.; SALVADORI, D. M. F.; DA SILVA, G. N. Cytotoxic and toxicogenomic effects of silibinin in bladder cancer cells with different *TP53* status. **Journal of Biosciences**, v.42, p.91–101, 2017.
- DHAR, S.; KUMAR, A.; LI, K.; TZIVION, G.; LEVENSON, A. S. Resveratrol regulates PTEN/Akt pathway through inhibition of MTA1/HDAC unit of the NuRD complex in prostate cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1853, p.265-75, 2015.
- DI MARTINO, E.; L'HÔTE, C. G.; KENNEDY, W.; TOMLINSON, D. C.; KNOWLES, M. A. Mutant fibroblast growth factor receptor 3 induces intracellular signaling and cellular transformation in a cell type- and mutation-specific manner. **Oncogene**, v.28, p.4306-16, 2009.
- DI MARTINO, E.; TOMLINSON, D. C.; WILLIAMS, S. V.; KNOWLES, M. A. A place for precision medicine in bladder cancer: targeting the FGFRs. **Future Oncology**. v.12, p.2243-63, 2016.
- DOAN, H. Q.; GULATI, N.; LEVIS, W. R. Ingenol mebutate: Potential for further development of cancer immunotherapy. **Journal of Drugs in Dermatology**, v.11, p.1156–1157, 2012.
- DORRIE, J.; GERAUER, H.; WACHTER, Y.; ZUNINO, S. J. Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. **Cancer Research**, v.61, p.4731–4739, 2001.
- DOVEDI, S. J.; DAVIES, B. R. Emerging targeted therapies for bladder cancer: a disease waiting for a drug. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.28, p.355–67, 2009.
- DU, Q.; SHEN, K. P.; HU, B.; DENG, S. Effects of resveratrol on apoptosis and ROS production in Hepa 1-6 hepatocarcinoma cells. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, v.35, p.443-48, 2012.
- EBLE, J. N.; SAUTER, G.; EPSTEIN, J. I.; SESTERHENN, I. A. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. [Lyon], IARC Press, 2004.
- ELIAS, K.; SVATEK, R. S.; GUPTA, S.; HO, R.; LOTAN, Y. High-risk patients with hematuria are not evaluated according to guideline recommendations. **Cancer**, v.116, p.2954–2959, 2010.
- ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v.35, p.495–516, 2007.
- EWALD, J. A.; DESOTELLE, J. A.; WILDING, G.; JARRARD, D. F. Therapy-induced senescence in cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.102, p.1536–1546, 2010.
- FAN, G. H., WANG, Z. M., YANG, X., XU, L. P., QIN, Q., ZHANG, C., MA, J. X., CHENG, H. Y., AND SUN, X. C. Resveratrol inhibits oesophageal adenocarcinoma cell proliferation via AMP-activated protein kinase signaling. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.15, p.677-82, 2014.
- FANG, Q. L.; YIN, Y. R.; XIE, C. R.; ZHANG, S.; ZHAO, W. X.; PAN, C.; WANG, X. M.; YIN, Z. Y. Mechanistic and biological significance of DNA methyltransferase 1 upregulated by growth factors in human hepatocellular carcinoma. **International Journal of Oncology**, v.46, p.782-790, 2015
- FAUCONNEAU, B.; WAFFO-TEGUO, P.; HUGUET, F.; BARRIER, L.; DECENDIT, A.; MERILLON, J. M. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests. **Life Sciences**, v.61, p.2103–2110, 1997.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81–95, 2000.
- FENG, S.; ZHOU, L.; NICE, E. C.; HUANG, C. Fibroblast growth factor receptors: multifactorial-contributors to tumor initiation and progression. **Histology and Histopathology**, v.30, p.13-31, 2015.

FENG, Z.; HU, W.; ROM, W. N.; BELAND, F. A.; TANG, M. S. 4-aminobiphenyl is a major etiological agent of human bladder cancer: evidence from its DNA binding spectrum in human p53 gene. **Carcinogenesis**, v.23, p.1721-7, 2002.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v.136, p.359-386, 2015.

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

FREEDMAN, N. D.; SILVERMAN, D. T.; HOLLENBECK, A. R.; SCHATZKIN, A.; ABNET, C. C. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. **Journal of the American Medical Association**, v.306, p.737-745, 2011.

FREED-PASTOR, W. A.; PRIVES, C. Mutant p53: one name, many proteins. **Genes and Development**, v.26, p.1268-1286, 2012.

FRITSCH, H. M.; BURGER, M.; SVATEK, R. S.; JELDRES, C.; KARAKIEWICZ, P. I.; NOVARA, G.; SKINNER, E.; DENZINGER, S.; FRADET, Y.; ISBARN, H.; BASTIAN, P. J.; VOLKMER, B. G.; MONTORSI, F.; KASSOUF, W.; TILKI, D.; OTTO, W.; CAPITANIO, U.; IZAWA, J. I.; FICARRA, V.; LERNER, S.; SAGALOWSKY, A. I.; SCHOENBERG, M.; KAMAT, A.; DINNEY, C. P.; LOTAN, Y.; SHARIAT, S. F. Characteristics and outcomes of patients with clinical T1 grade 3 urothelial carcinoma treated with radical cystectomy: results from an international cohort. **European Urology**, v.57, p.300-309, 2010.

FU, H.; FU, L.; XIE, C.; ZUO, W. S.; LIU, Y. S.; ZHENG, M. Z.; YU, J. M. miR-375 inhibits cancer stem cell phenotype and tamoxifen resistance by degrading HOXB3 in human ER-positive breast cancer. **Oncology Reports**, v.37, p.1093-1099, 2017.

FU, Z.; CHEN, X.; GUAN, S.; YAN, Y.; LIN, H.; HUA, Z. C. Curcumin inhibits angiogenesis and improves defective hematopoiesis induced by tumor-derived VEGF in tumor model through modulating VEGF-VEGFR2 signaling pathway. **Oncotarget**, v.6, p.19469-19482, 2015.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. **American Association for the Advancement of Science**, v.220, p.1049-1051, 1983.

GALI-MUHTASIB, H.; HMADI, R.; KAREH, M.; TOHME, R.; DARWICHE, N. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: Beyond apoptosis. **Apoptosis**, v.20, p.1531-1562, 2015.

GÁNDARA, L.; SANDES, E.; DI, VENOSA, G.; PRACK, Mc CORMICK B.; RODRIGUEZ, L.; MAMONE, L.; BATLLE, A.; EIJÁN, A. M.; CASAS, A. The natural flavonoid silybin improves the response to Photodynamic Therapy of bladder cancer cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.133, p.55-64, 2014.

GAO, Z.; XU, M. S.; BARNETT, T. L.; XU, C. W. Resveratrol induces cellular senescence with attenuated mono-ubiquitination of histone H2B in glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.407, p.271-276, 2011.

GARCÍA-ZEPEDA, S. P.; GARCÍA-VILLA, E.; DÍAZ-CHÁVEZ, J.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; GARIGLIO, P. Resveratrol induces cell death in cervical cancer cells through apoptosis and autophagy. **European Journal of Cancer Prevention**, v.22, p.577-84, 2013.

GOMEZ PEREZ, M.; FOURCADE, L.; MATEESCU, M. A.; PAQUIN, J. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. **Analytical Biochemistry**, v.535, p.43-46, 2017.

GONZÁLEZ-VALLINAS, M.; GONZÁLEZ-CASTEJON, M.; RODRÍGUEZ-CASADO, A.; RAMÍREZ DE MOLINA, A. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. **Nutrition Reviews**, v.71, p.585-599, 2013.

GUO, G.; CUI, Y. New perspective on targeting the tumor suppressor p53 pathway in the tumor microenvironment to enhance the efficacy of immunotherapy. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v.3, p.9, 2015

GUO, G.; SUN, X.; CHEN, C.; WU, S.; HUANG, P.; LI, Z.; DEAN, M.; HUANG, Y.; JIA, W.; ZHOU, Q.; TANG, A.; YANG, Z.; LI, X.; SONG, P.; ZHAO, X.; YE, R.; ZHANG, S.; LIN, Z.; QI, M.; WAN, S.; XIE, L.; FAN, F.; NICKERSON, M. L.; ZOU, X.; HU, X.; XING, L.; LV, Z.; MEI, H.; GAO, S.; LIANG, C.; GAO, Z.; LU, J.; YU, Y.; LIU, C.; LI, L.; FANG, X.; JIANG, Z.; YANG, J.; LI, C.; ZHAO, X.; CHEN, J.; ZHANG, F.; LAI, Y.; LIN, Z.; ZHOU, F.; CHEN, H.; CHAN, H. C.; TSANG, S.; THEODORESCU, D.; LI, Y.; ZHANG, X.; WANG, J.; YANG, H.; GUI, Y.; WANG, J.; CAI, Z. Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. **Nature Genetics**, v.45, p.1459-1463, 2013.

GWAK, H.; HAEGEMAN, G.; TSANG, B. K.; SONG, Y. S. Cancer-specific interruption of glucose metabolism by resveratrol is mediated through inhibition of Akt/GLUT1 axis in ovarian cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, v.54, p.1529-40, 2015.

HABIBIE, H.; YOKOYAMA, S.; ABDELHAMED, S.; AWALE, S.; SAKURAI, H.; HAYAKAWA, Y.; SAIKI, I. Survivin suppression through STAT3/β-catenin is essential for resveratrol-induced melanoma apoptosis. **International Journal of Oncology**, v.45, p.895-901, 2014.

HAN, Y.; JIN, G. X.; ZHOU, H.; LIU, B. Identification of key genes associated with bladder cancer using gene expression profiles. **Oncology Letters**, v.15, p.297-303, 2018.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v.144, p. 646-674, 2011.

HAO, Y. Q.; HUANG, W. X.; FENG, H. X.; ZHANG, G. H.; NING, X. H.; LI, H. G.; HAO, C. G.; LI, Z. H. Study of apoptosis related factors regulatory mechanism of resveratrol to human skin squamous cell carcinoma A431 xenograft in nude mice. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v.93, p.464-68, 2013.

HE, C.; LI, L.; GUAN, X.; XIONG, L.; MIAO, X. Mutant p53 gain of function and chemoresistance: the role of mutant p53 in response to clinical chemotherapy. **Chemotherapy**, v.62, p.43-53, 2017.

HEIDUSCHKA, G.; LILL, C.; SEEMANN, R.; BRUNNER, M.; SCHMID, R.; HOUBEN, R.; BIGENZAHN, J.; THURNHER, D. The effect of resveratrol in combination with irradiation and chemotherapy: study using Merkel cell carcinoma cell lines. **Strahlentherapie und Onkologie**, v.190, p.75-80, 2014.

HERNANDEZ, S.; LOPEZ-KNOWLES, E.; LLORETA, J.; KOGEVINAS, M.; AMORÓS, A.; TARDÓN, A.; CARRATO, A.; SERRA, C.; MALATS, N.; REAL, F. X. Prospective study of *FGFR3* mutations as a prognostic factor in non-muscle-invasive urothelial bladder carcinomas. **Journal of Clinical Oncology**, v.24, p.3664-71, 2006.

HIENTZ, K.; MOHR, A.; BHAKTA-GUHA, D.; EFFERTH, T. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. **Oncotarget**, v.8, p.8921-8946, 2017.

HOLIAN, O.; WAHID, S.; ATTEN, M. J.; ATTAR, B. M. Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.282, p.809-16, 2002.

HOWELLS, L. M.; BERRY, D. P.; ELLIOTT, P. J.; JACOBSON, E. W.; HOFFMANN, E.; HEGARTY, B.; BROWN, K.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases--safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. **Cancer Prevention Research**, v.4, p.1419-1425, 2011.

HUSSEIN, S.; MOSAAD, H.; RASHED, H. E.; AHMED, S.; RAGAB, A.; ISMAIL, E. I. Molecular factors regulating E-cadherin expression in urothelial bladder cancer and their correlations with the clinicopathological features. **Molecular Biology Reports**, v.44, p.365-377, 2017.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014. Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018. Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2018.

ISTIFLI, E. S.; HÜSUNET, M. T.; ILA, H. B. Cell Division, Cytotoxicity, and the Assays Used in the Detection of Cytotoxicity. In: *Cytotoxicity: Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds*. 1 ed. [London], IntechOpen, 2019.

JAFARGHOLIZADEH, N.; ZARGAR, S. J.; AFTABI, Y. The cucurbitacins D, E, and I from *Ecballium elaterium* (L.) upregulate the *LC3* gene and induce cell-cycle arrest in human gastric cancer cell line AGS. **Iranian Journal of Basic Medical Science**, v.21, p.253-259, 2018.

JANG, D. S.; KANG, B. S.; RYU, S. Y.; CHANG, I. M.; MIN, K. R.; KIM, Y. Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. **Biochemical Pharmacology**, v.57, p.705-712, 1999.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W. W.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; MEHTA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. **Science**, v.275, p.218-220, 1997.

JI, Q.; LIU, X.; HAN, Z.; ZHOU, L.; SUI, H.; YAN, L.; JIANG, H.; REN, J.; CAI, J.; LI, Q. Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- β 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression. **BMC Cancer**, v.15, p.97, 2015.

JING, X.; CHENG, W.; WANG, S.; LI, P.; HE, L. Resveratrol induces cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via the PTEN regulated PI3K/Akt signaling pathway. **Oncology Reports**, v.5, p.472-8, 2016.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p.415-28, 2002.

JUNG, H. J.; HWANG, I. A.; SUNG, W. S. KANG, H.; KANG, B. S.; SEU, Y. B.; LEE, D. G. Fungicidal Effect of Resveratrol on Human Infectious Fungi. **Archives of Pharmacal Research**, v.2, p.557-560, 2005.

KALRA, N.; ROY, P.; PRASAD, S.; SHUKLA, Y. Resveratrol induces apoptosis involving mitochondrial pathways in mouse skin tumorigenesis. **Life Sciences**, v.82, p.348-58, 2008.

KAMAT, A. M.; HAHN, N. M.; EFSTATHIOU, J. A.; LERNER, SE. P.; MALMSTRÖM, P.; CHOI, W.; GUO, C. C.; LOTAN, Y.; KASSOUF, W. Bladder cancer. **Lancet**, v.388, p.2796-810, 2016.

- KARAM, J. A.; LOTAN, Y.; ASHFAQ, R.; SAGALOWSKY, A. I.; SHARIAT, S. F. Survivin expression in patients with non-muscle-invasive urothelial cell carcinoma of the bladder. **Urology**, v.70, p.482–486, 2007.
- KASDALLAH-GRISSA, A.; MORNAGUI, B.; AOUANI, E.; HAMMAMI, M.; GHARBI, N.; KAMOUN, A.; EL-FAZAA, S. Protective effect of resveratrol in rats. **Alcohol and Alcoholism**, v.41, p.236–239, 2006.
- KATO, M.; MANABE, A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatrics International**, v.60, p.4–12, 2018.
- KHADRA, M. H.; PICKARD, R. S.; CHARLTON, M.; POWELL, P. H.; NEAL, D. E. A prospective analysis of 1930 patients with hematuria to evaluate current diagnostic practice. **The Journal of Urology**, v.163, p.524–7, 2000.
- KHAN, A.; ALJARBOU, A. N.; ALDEBASI, Y. H.; FAISAL, S. M.; KHAN, M. A. Resveratrol suppresses the proliferation of breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase signaling pathway. **Cancer Epidemiology**, v.38, p.765-72, 2014.
- KHAN, O.; LA THANGUE, N. B. *HDAC* inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. **Immunology and Cell Biology**, v.90, p.85–94, 2012.
- KIM, C.; BAEK, S. H.; UM, J. Y.; SHIM, B. S.; AHN, K. S. Resveratrol attenuates constitutive STAT3 and STAT5 activation through induction of PTP ϵ and SHP-2 tyrosine phosphatases and potentiates sorafenib-induced apoptosis in renal cell carcinoma. **BMC Nephrology**, v.17, p.1-13, 2016.
- KIM, E.; GIESE, A.; DEPPERT, W. Wild-type p53 in cancer cells: When a guardian turns into a blackguard. **Biochemical Pharmacology**, v.77, p.11-20, 2009.
- KIM, H. J.; CHANG, E. J.; BAE, S. J.; SHIM, S. M.; PARK, H. D.; RHEE, C. H.; PARK, J. H.; CHOI, S. W. Cytotoxic and antimutagenic stilbenes from seeds of *Paeonia lactiflora*. **Archives of Pharmacal Research**, v.25, p.293–299, 2002.
- KIM, I. Y.; KIM, S. J. Role of bone morphogenetic proteins in transitional cell carcinoma cells. **Cancer Letters**, v.241, p.118-123, 2006.
- KIM, J. S.; NAM, M. H.; AN, S. S.; LIM, C. S.; HUR, D. S.; CHUNG, C.; CHANG, J. K. Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v.25, p.90-94, 2011.
- KIM, S. H.; CHO, K. H.; KIM, Y. N.; JEONG, B. Y.; PARK, C. G.; HUR, G. M.; LEE, H. Y. Resveratrol attenuates norepinephrine-induced ovarian cancer invasiveness through downregulating hTERT expression. **Archives of Pharmacal Research**, v.39, p.240-48, 2016.
- KIM, S. H.; HO, J. N.; JIN, H.; LEE, S. C.; LEE, S. E.; HONG, S. K.; LEE, J. W.; LEE, E. S.; BYUN, S. S. Upregulated expression of BCL2, MCM7, and CCNE1 indicate cisplatin-resistance in the set of two human bladder cancer cell lines: T24 cisplatin sensitive and T24R2 cisplatin resistant bladder cancer cell lines. **Investigative and Clinical Urology**, v.57, p.63-72, 2016.
- KIM, Y. S.; SULL, J. W.; SUNG, H. J. Suppressing effect of resveratrol on the migration and invasion of human metastatic lung and cervical cancer cells. **Molecular Biology Reports**, v.39, p.8709-16, 2012.
- KING, E. D.; MATTESON, J.; JACOBS, S. C.; KYPRIANOU, N. Incidence of apoptosis, cell proliferation and bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: association with tumor progression. **Journal of Urology**, v.155, p.316–320, 1996.

KONG, D.; CHEN, F.; SIMA, N. I. Inhibition of focal adhesion kinase induces apoptosis in bladder cancer cells via Src and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.10, p.1725-1731, 2015.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature Reviews Genetics**, v.11, p.597–610, 2010.

KROSL, J.; BABAN, S.; KROSL, G.; ROZENFELD, S.; LARGMAN, C.; SAUVAGEAU, G. Cellular proliferation and transformation induced by HOXB4 and HOXB3 proteins involves cooperation with PBX1. **Oncogene**, v.16, p.3403-3412, 1998.

KRUISWIJK, F.; LABUSCHAGNE, C. F.; VOUSDEN, K. H. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.16, p.393-405, 2015.

KUMAR, A.; DHAR, S.; RIMANDO, A. M.; LAGE, J. M.; LEWIN, J. R.; ZHANG, X.; LEVENSON, A. S. Epigenetic potential of resveratrol and analogs in preclinical models of prostate cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1348, p.1-9, 2015.

LAKSHMAIAH, K. C.; JACOB, L. A.; APARNA, S.; LOKANATHA, D.; SALDANHA, S. C. Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v.10, p.469–478, 2014.

LANG, F.; QIN, Z.; LI, F.; ZHANG, H.; FANG, Z.; HAO, E. Apoptotic Cell Death Induced by Resveratrol Is Partially Mediated by the Autophagy Pathway in Human Ovarian Cancer Cells. **Plos One**, v.10, p.129196/1-129196/17, 2015.

LASTRA, C. A.; VILLEGAS, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. **Biochemical Society Transactions**, v.35, p.1156-1160, 2007.

LAZARIS, A. C.; ZAROGIANNOS, A.; KAVANTZAS, N.; ZERVAS, A.; GIANNOPOULOS, A.; NAKOPOULOU, L. MLH1 mismatch repair gene product is associated with apoptotic potential of urothelial bladder carcinomas. **Anticancer Research**, v.26, p.1535–1542, 2006.

LEE, K. W.; BODE, A. M.; DONG, Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. **Nature Reviews Cancer**, v.11, p.211–218, 2011.

LEE, M. H.; CHOI, B. Y.; KUNDU, J. K.; SHIN, Y. K.; NA, H. K.; SURH, Y. J. Resveratrol suppresses growth of human ovarian cancer cells in culture and in a murine xenograft model: eukaryotic elongation factor 1A2 as a potential target. **Cancer Research**, v.69, p.7449-58, 2009.

LEE, M. H.; KUNDU, J. K.; KEUM, Y. S.; CHO, Y. Y.; SURH, Y. J.; CHOI, B. Y. Resveratrol Inhibits IL-6-Induced Transcriptional Activity of AR and STAT3 in Human Prostate Cancer LNCaP-FGC Cells. **Biomolecules and Therapeutics**, v.22, p.426-30, 2014.

LEE, M.H.; CHOI, B.Y.; KUNDU, J.K.; SHIN, Y.K.; NA, H.K.; SURH, Y.J. Resveratrol suppresses growth of human ovarian cancer cells in culture and in a murine xenograft model: Eukaryotic elongation factor 1A2 as a potential target. **Cancer Research**, v.69, p.7449–7458, 2009.

LEE, S. J.; LEE, E. J.; KIM, S. K.; JEONG, P.; CHO, Y. H.; YUN, S. J.; KIM, S.; KIM, G. Y.; CHOI, Y. H.; CHA, E. J.; KIM, W.; MOON, S. Identification of pro-inflammatory cytokines associated with Moon muscle invasive bladder cancer; the roles of IL-5, IL-20, and IL-28A. **Plos One**, v.7, p.40267, 2012.

LEE, S. K.; ZHANG, W.; SANDERSON, B. J. Selective growth inhibition of human leukemia and human lymphoblastoid cells by resveratrol via cell cycle arrest and apoptosis induction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.7572-7577, 2008.

- LEIGH, N. J.; TRAN, P. L.; O'CONNOR, R. J.; GONIEWICZ, M. L. Cytotoxic effects of heated tobacco products (HTP) on human bronchial epithelial cells. **Tobacco Control**, v.27, p.26-29, 2018.
- LI, F.; ZHANG, J.; ARFUSO, F.; CHINNATHAMBI, A.; ZAYED, M. E.; ALHARBI, S.A.; KUMAR, A. P.; AHN, K. S.; SETHI, G. NF- κ B in cancer therapy. **Archives of Toxicology**, v.89, p.711–731, 2015.
- LI, Y.; ZHONG, W.; ZHU, M.; HU, S.; SU, X. Nodal regulates bladder cancer cell migration and invasion via the ALK/Smad signaling pathway. **OncoTargets and Therapy**, v.11, p.6589–6597, 2018.
- LIN, F. Y.; HSIEH, Y. H.; YANG, S. F.; CHEN, C. T.; TANG, C. H.; CHOU, M. Y.; CHUANG, Y. T.; LIN, C. W.; CHEN, M. K. Resveratrol suppresses TPA-induced matrix metalloproteinase-9 expression through the inhibition of MAPK pathways in oral cancer cells. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v.44, p.699-706, 2015.
- LIN, X.; WU, G.; HUO, W.; ZHANG, Y.; JIN, F. Resveratrol induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction in bladder carcinoma cells. **International Journal of Urology**, v.19, p.757–764, 2012.
- LIU, B.; ZHOU, Z.; ZHOU, W.; LIU, J.; ZHANG, Q.; XIA, J.; LIU, J.; CHEN, N.; LI, M.; ZHU, R. Resveratrol inhibits proliferation in human colorectal carcinoma cells by inducing G1/S-phase cell cycle arrest and apoptosis through caspase/cyclin-CDK pathways. **Molecular Medicine Reports**, v.10, p.1697–1702, 2014.
- LIU, F. T.; NEWLAND, A. C.; JIA, L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.310, p.956–962, 2003.
- LIU, M. L.; ZHANG, S. J. Effects of resveratrol on the protein expression of survivin and cell apoptosis in human gastric cancer cells. **Journal of the Balkan Union of Oncology**, v.19, p.713-7, 2014.
- LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.3479S–3485S, 2004.
- LIU, Y.; FENG, N. Nanocarriers for the delivery of active ingredients and fractions extracted from natural products used in traditional Chinese medicine (TCM). **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 221, p.60–76, 2015.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods**, v.25, p.402–408, 2001.
- LOW, I.C.C.; CHEN, Z.X.; PERVAIZ, S. Bcl-2 modulates resveratrol-induced ROS production by regulating mitochondrial respiration in tumor cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.13, p.807-819, 2010.
- LU, Y.; LIU, P.; WEN, W.; GRUBBS, C. J.; TOWNSEND, R. R.; MALONE, J. P.; LUBET, R. A.; YOU, M. Cross-species comparison of orthologous gene expression in human bladder cancer and carcinogen-induced rodent models. **American Journal of Translational Research**, v.3, p.8-27, 2010.
- LUCAS, I. K.; KOLODZIEJ, H. Trans-Resveratrol Induces Apoptosis through ROS-Triggered Mitochondria-Dependent Pathways in A549 Human Lung Adenocarcinoma Epithelial Cells. **Planta Medica**, v.81, p.1038-44, 2015.
- LUO, H.; YANG, A.; SCHULTE, B. A.; WARGOVICH, M. J.; WANG, G. Y. Resveratrol induces premature senescence in lung cancer cells via ROS-mediated DNA damage. **Plos One**, v.8, p.1-11, 2013.

- LYONS, M. D.; SMITH, A. B. Surgical bladder preserving techniques in the management of muscle invasive bladder cancer. **Urologic Oncology**, v.34, p.262–270, 2016.
- MA, L.; LI, W.; WANG, R.; NAN, Y.; WANG, Q.; LIU, W.; JIN, F. Resveratrol enhanced anticancer effects of cisplatin on non-small cell lung cancer cell lines by inducing mitochondrial dysfunction and cell apoptosis. **International Journal of Oncology**, v.47, p.1460-68, 2015.
- MACLACHLAN, T. K.; SANG, N.; GIORDANO, A. Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: Implications in cell cycle control and cancer. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v.5, p.127-156, 1995.
- MAGA, G.; HUBSCHER, U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A dancer with many partners. **Journal of Cell Science**, v.116, p.3051–3060, 2003.
- MARCHAL, J.; PIFFERI, F.; AUJARD, F. Resveratrol in mammals: effects on aging biomarkers, age-related diseases, and life span. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1290, p.67–73, 2013.
- MARKS, P.; RIFKIND, R. A.; RICHON, V. M.; BRESLOW, R.; MILLER, T.; KELLY, W. K. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. **Nature Reviews Cancer**, v.1, p.194–202, 2001.
- MARTIN-DOYLE, W.; KWIATKOWSKI, D. J. Molecular Biology of Bladder Cancer. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v.29, p.191–203, 2015.
- MASSON-MEYERS, D.S.; BUMAH, V.V.; ENWEMEKA, C.S. A comparison of four methods for determining viability in human dermal fibroblasts irradiated with blue light. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.79, p.15-22, 2016.
- MEDINA-AGUILAR, R.; MARCHAT, L. A.; OCAMPO, E. A.; GARIGLIO, P.; MENA, J. G.; SEPÚLVEDA, N. V.; CASTILLO, M. M.; LÓPEZ-CAMARILLO, C. Resveratrol inhibits cell cycle progression by targeting Aurora kinase A and Polo-like kinase 1 in breast cancer cells. **Oncology Reports**, v.35, p.3696-3704, 2016
- MESSING, E. M. Urothelial tumors of the urinary tract. In: Campbell's urology. 8 ed. [Philadelphia], Saunders, 2002.
- MESSING, E.; GEE, J. R.; SALTZSTEIN, D. R.; KIM, K.; DISANT'AGNESE, A.; KOLESAR, J.; HARRIS, L.; FAERBER, A.; HAVIGHURST, T.; YOUNG, J. M.; EFROS, M.; GETZENBERG, R. H.; WHEELER, M. A.; TANGREA, J.; PARNES, H.; HOUSE, M.; BUSBY, J. E.; HOHL, R.; BAILEY, H. A phase 2 cancer chemoprevention biomarker trial of isoflavone G-2535 (genistein) in presurgical bladder cancer patients. **Cancer Prevention Research**, v.5, p.621-30, 2012.
- MICHELS, G.; WÄTJEN, W.; WEBER, N.; NIERING, P.; CHOVOLOU, Y.; KAMPKÖTTER, A.; PROKSCH, P.; KAHL, R. Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells. **Toxicology**, v.225, p.173–182, 2006.
- MIN, S. K.; KOH, Y. H.; PARK, Y.; KIM, H. J.; SEO, J.; PARK, H. R.; CHO, S. J.; KIM I. S. Expression of *HAT1* and *HDAC1, 2, 3* in diffuse large B-Cell lymphomas, peripheral T-Cell lymphomas, and NK/T-Cell lymphomas. **The Korean Journal of Pathology**, v.46, p.142–150, 2012.
- MITANI, T.; HARADA, N.; TANIMORI, S.; NAKANO, Y.; INUI, H.; YAMAJI, R. Resveratrol inhibits hypoxia-inducible factor-1 α -mediated androgen receptor signaling and represses tumor progression in castration-resistant prostate cancer. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.60, p.276-82, 2014.

- MOCH, H.; HUMPHREY, P. A.; ULBRIGHT, T. M.; REUTER, V. E. Tumours of the urinary tract. In: World Health Organization classification of tumours of the urinary system and male genital organs. 4 ed [Lyon], IARC Press, 2016.
- MOHAPATRA, P.; SATAPATHY, S. R.; SIDDHARTH, S.; DAS, D.; NAYAK, A.; KUNDU, C. N. Resveratrol and curcumin synergistically induces apoptosis in cigarette smoke condensate transformed breast epithelial cells through a p21(Waf1/Cip1) mediated inhibition of Hh-Gli signaling. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.66, p.75-84, 2015.
- MOORE, A.; PINKERTON, R. Vincristine: Can its therapeutic index be enhanced? **Pediatric Blood and Cancer**, v.53, p.1180–1187, 2009.
- MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA Methylation and Its Basic Function. **Neuropsychopharmacology Reviews**, v.38, p.23–38, 2013.
- MOUHID, L.; CORZO-MARTÍNEZ, M.; TORRES, C.; VÁZQUEZ, L.; REGLERO, G.; FORNARI, T.; MOLINA, A. R. Improving *In Vivo* Efficacy of Bioactive Molecules: An Overview of Potentially Antitumor Phytochemicals and Currently Available Lipid-Based Delivery Systems. **Journal of Oncology**, v. 2017, p.1-34, 2017.
- MULLER, P. A.; VOUSDEN, K. H. p53 mutations in cancer. **Nature Cell Biology**, v.15, p.2–8, 2013.
- MUNDAY, R.; MHAWECH-FAUCEGLIA, P.; MUNDAY, C.M.; PAONESSA, J. D.; TANG, L.; MUNDAY, J. S.; LISTER, C.; WILSON, P.; FAHEY, J. W.; DAVIS, W.; ZHANG, Y. Inhibition of urinary bladder carcinogenesis by broccoli sprouts. **Cancer Research**, 68, 1593–1600, 2008.
- MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R. E. Clonogenic, cell survival assay. **Methods in Molecular Medicine**, v.110, p.21–28, 2005.
- MUQBIL, I.; BECK, F. W.; BAO, B.; SARKAR, F. H.; MOHAMMAD, R. M.; HADI, S. M.; AZMI, A. S. Old wine in a new bottle: The Warburg effect and anticancer mechanisms of resveratrol. **Current Pharmaceutical Design**, v.18, p.1645–1654, 2012.
- NAKOPOULOU, L.; VOURLAKOU, C.; ZERVAS, A.; TZONOU, A.; GAKIOPOULOU, H.; DIMOPOULOS, M. A. The prevalence of bcl-2, p53, and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. **Human Pathology**, v.29, p.146–154, 1998.
- NARYZHNY, S.N.; LEE, H. Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer. **FEBS Letters**, v.584, p.4292–4298, 2010.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v.79, p.629–661, 2016.
- NIE, P.; HU, W.; ZHANG, T.; YANG, Y.; HOU, B.; ZOU, Z. Synergistic induction of erlotinib-mediated apoptosis by resveratrol in human non-small-cell lung cancer cells by down-regulating survivin and up-regulating PUMA. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.35, p.2255-71, 2015.
- NISHIYAMA, H.; WATANABE, J.; OGAWA, O. p53 and chemosensitivity in bladder cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, v.13, p.282-286, 2008.
- ODA, E.; OHKI, R.; MURASAWA, H.; NEMOTO, J.; SHIBUE, T.; YAMASHITA, T.; TOKINO, T.; TANIGUCHI, T.; TANAKA, N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. **Science**, v.288, p.1053–1058, 2000.
- OECD. Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2019.

- OGBOURNE, S. M.; PARSONS, P. G. The value of nature's natural product library for the discovery of new chemical entities: The discovery of ingenol mebutate. **Fitoterapia**, v.98, p.36–44, 2014.
- OKA, N.; TANIMOTO, S.; TAUE, R.; NAKATSUJI, H.; KISHIMOTO, T.; IZAKI, H.; FUKUMORI, T.; TAKAHASHI, M.; NISHITANI, M.; KANAYAMA, H. O. Role of phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in bladder cancer cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. **Cancer Science**, v.97, p.1093-1098, 2006.
- OU, X.; CHEN, Y.; CHENG, X.; ZHANG, X.; HE, Q. Potentiation of resveratrol-induced apoptosis by matrine in human hepatoma HepG2 cells. **Oncology Reports**, v.32, p.2803-9, 2014.
- OYEBODE, O.; KANDALA, N. B.; CHILTON, P. J.; LILFORD, R. J. Use of traditional medicine in middle-income countries: A WHO-SAGE study. **Health Policy and Planning**, v.31, p.984–991, 2016.
- PACE-ASCIAC, C. R.; HAHN, S.; DIAMANDIS, E. P.; SOLEAS, G.; GOLDBERG, D. M. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. **Clinica Chimica Acta**, v.235, p.207-219, 1995.
- PALAKURTHY, R. K.; WAJAPYEE, N.; SANTRA, M. K.; GAZIN, C.; LIN, L.; GOBEIL, S.; GREEN, M. R. Epigenetic Silencing of the *RASSF1A* Tumor Suppressor Gene through *HOXB3*-Mediated Induction of *DNMT3B* Expression. **Molecular Cell**, v.36, p.219–230, 2009.
- PANGENI, R.; SAHNI, J. K.; ALI, J.; SHARMA, S.; BABOOTA, S. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.11, p.1285-1298, 2014.
- PANTAZOPOULOS, D.; IOAKIM-LIOSSI, A.; KARAKITSOS, P.; ARONI, K.; KAKOLIRIS, S.; KANAVAROS, P.; KYRKOU, K. A. DNA content and proliferation activity in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. **Anticancer Research**, v.17, p.781–786, 1997.
- PASSONI, N. M.; SHARIAT, S. F.; BAGRODIA, A.; FRANCIS, F.; RACHAKONDA, V.; XYLINAS, E.; KAPUR, P.; SAGALOWSKY, A. I.; LOTAN, Y. Concordance in biomarker status between bladder tumors at time of transurethral resection and subsequent radical cystectomy: results of a 5-year prospective study. **Bladder Cancer**, v.2, p.91–99, 2016.
- PATEL, K.R.; BROWN, V.A.; JONES, D.J.; BRITTON, R.G.; HEMINGWAY, D.; MILLER, A.S.; WEST, K.P.; BOOTH, T.D.; PERLOFF, M.; CROWELL, J.A.; BRENNER, D. E.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J.; BROWN, K. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. **Cancer Research**, v.70, p.7392–7399, 2010.
- PENG, D. Y.; SONG, H.; LIU, L. B. Resveratrol-downregulated phosphorylated liver kinase B1 is involved in senescence of acute myeloid leukemia stem cells. **Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences**, v.35, p.485-89, 2015.
- PERLIS, N.; ZLOTTA, A. R.; BEYENE, J.; FINELLI, A.; FLESHNER, N. E.; KULKARNI, G. S. Immediate post-transurethral resection of bladder tumor intravesical chemotherapy prevents non-muscle-invasive bladder cancer recurrences: an updated meta-analysis on 2548 patients and quality-of-evidence review. **European Urology**, v.64, p.421–430, 2013.
- PETRO, T. M. Regulatory role of resveratrol on Th17 in autoimmune disease. **International Immunopharmacology**, v.11, p.310-8, 2011.
- POLLACK, A.; WU, C. S.; CZERNIAK, B.; ZAGARS, G. K.; BENEDICT, W. F.; MCDONNELL, T. J. Abnormal bcl-2 and pRb expression are independent correlates of radiation response in muscle-invasive bladder cancer. **Clinical Cancer Research**, v.3, p.1823–1829, 1997.

- QIU, W.; LIN, J.; ZHU, Y.; ZHANG, J.; ZENG, L.; SU, M.; TIAN, Y. Kaempferol modulates DNA methylation and downregulates DNMT3B in bladder cancer. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.41, p.1325-1335, 2017.
- RAMIREZ, D.; GUPTA, A.; CANTER, D.; HARROW, B.; DOBBS, R. W.; KUCHEROV, V.; MUELLER, E.; STREPPER, N.; UHLMAN, M. A.; SVATEK, R. S.; MESSING, E. M.; LOTAN, Y. Microscopic haematuria at time of diagnosis is associated with lower disease stage in patients with newly diagnosed bladder cancer. **BJU International**, v.117, p.783–786, 2016.
- RAMSAY, J. R.; SUHRBIER, A.; AYLWARD, J. H.; OGBOURNE, S.; COZZI, S. J.; POULSEN, M. G.; BAUMANN, K. C.; WELBURN, P.; REDLICH, G. L.; PARSONS, P. G. The sap from *Euphorbia peplus* is effective against human nonmelanoma skin cancers. **British Journal of Dermatology**, v.164, p.633–636, 2011.
- REAGAN-SHAW, S.; AFAQ, F.; AZIZ, M. H.; AHMAD, N. Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1 hairless mouse skin. **Oncogene**, v.23, p5151-60, 2004.
- RENAUD, S.; LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **The Lancet**, v.339, p.1523-1526, 1992.
- REPETTO, G.; PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v.3, p.1125-1131, 2008.
- RETTIG, M. B.; HEBER, D.; AN, J.; SEERAM, N. P.; RAO, J. Y.; LIU, H.; KLATTE, T.; BELLDEGRUN, A.; MORO, A.; HENNING, S. M.; MO, D.; ARONSON, W. J.; PANTUCK, A. Pomegranate extract inhibits androgen-independent prostate cancer growth through a nuclear factor-KB-dependent mechanism. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.7, p.2662–71, 2008.
- RIEGER-CHRIST, K. M.; CAIN, J. W.; BRAASCH, J. W.; DUGAN, J. M.; SILVERMAN, M. L.; BOUYOUNES, B.; LIBERTINO, J. A.; SUMMERHAYES, I. C. Expression of classic cadherins type I in urothelial neoplastic progression. **Human Pathology**, v.32, p.18-23, 2001.
- ROBERTSON, A. G.; KIM, J.; AL-AHMADIE, H.; BELLMUNT, J.; GUO, G.; CHERNIACK, A. D.; HINOUE, T.; LAIRD, P. W.; HOADLEY, K. A.; AKBANI, R.; CASTRO, M. A. A.; GIBB, E. A.; KANCHI, R. S.; GORDENIN, D. A.; SHUKLA, S. A.; SANCHEZ-VEGA, F.; HANSEL, D. E.; CZERNIAK, B. A.; REUTER, V. E.; SU, X.; DE SA, C. B.; CHAGAS, V. S.; MUNGALL, K. L.; SADEGHI, S.; PEDAMALLU, C. S.; LU, Y.; KLIMCZAK, L. J.; ZHANG, J.; CHOO, C.; OJESINA, A. I.; BULLMAN, S.; LERAAS, K. M.; LICHTENBERG, T. M.; WU, C. J.; SCHULTZ, N.; GETZ, G.; MEYERSON, M.; MILLS, G. B.; MCCONKEY, D. J.; TCGA RESEARCH NETWORK, WEINSTEIN, J. N.; KWIATKOWSKI, D. J.; LERNER, S. P. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. **Cell**, v.171, p.540-556, 2017.
- RODENAK-KLADNIEW, B.; CASTRO, A.; STÄRKEL, P.; DE SAEGER, C.; GARCÍA DE BRAVO, M.; CRESPO, R. Linalool induces cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells through oxidative stress generation and modulation of Ras/MAPK and Akt/mTOR pathways. **Life Sciences**, v.199, p.48-59, 2018.
- ROEHM, N. W.; RODGERS, G. H.; HATFIELD, S. M. GLASEBROOK, A. L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. **Journal of Immunological Methods**, v.142, p.257–265, 1991.
- ROSE, A.; EL-LEITHY, T.; VOM DORP, F.; ZAKARIA, A.; EISENHARDT, A.; TSCHIRDEWAHN, S.; RÜBBEN, H. Mistletoe Plant Extract in Patients with Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: Results of a Phase Ib/IIa Single Group Dose Escalation Study. **Journal of Urology**, v.194, p.939-43, 2015.

- SAGARA, Y.; MIYATA, Y.; NOMATA, K.; HAYASHI, T.; KANETAKE, H. GREEN tea polyphenol suppresses tumor invasion and angiogenesis in N-butyl(-4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced bladder cancer. **Cancer Epidemiology**, v.34, p.350–4, 2010.
- SANGUEDOLCE, F.; CORMIO, A.; MASSENIO, P.; PEDICILLO, M. C.; CAGIANO, S.; FORTUNATO, F.; CALÒ, B.; DI FINO, G.; CARRIERI, G.; BUFO, P.; CORMIO, L. Altered expression of HER-2 and the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 predicts the outcome of T1 high-grade bladder cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.144, p.637-644, 2018.
- SANLI, O.; DOBRUCH, J.; KNOWLES, M. A.; BURGER, M.; ALEMOZAFFAR, M.; NIELSEN, M. E.; LOTAN, Y. Bladder cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v.3, n.17022, p.1-19, 2017.
- SARUBBO, F.; ESTEBAN, S.; MIRALLES, A.; MORANTA, D. Effects of Resveratrol and other Polyphenols on Sirt1: Relevance to Brain Function During Aging. **Current Neuropharmacology**, v.16, p.126-136, 2018.
- SAUD, S.M.; LI, W.; MORRIS, N. L.; MATTER, M. S.; COLBURN, N. H.; KIM, Y. S.; YOUNG, M. R. Resveratrol prevents tumorigenesis in mouse model of Kras activated sporadic colorectal cancer by suppressing oncogenic Kras expression. **Carcinogenesis**, v.35, p.2778–2786, 2014.
- SÁVIO, A. L. V.; SILVA, G. N.; CAMARGO, E. A.; SALVADORI, D. M. F. Cell cycle kinetics, apoptosis rates, DNA damage and *TP53* gene expression in bladder cancer cells treated with allyl isothiocyanate (mustard essential oil). **Mutation Research**, 762, 40–46, 2014.
- SÁVIO, A. L.; DA SILVA, G. N.; SALVADORI, D. M. Inhibition of bladder cancer cell proliferation by allyl isothiocyanate (mustard essential oil). **Mutation Research**, v. 771, p.29-35, 2015.
- SAVOURET, J. F.; QUESNE, M. Resveratrol and cancer: a review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.56, p.84-7, 2002
- SCHNEIDER, M. R.; KOLLIGS, F. T. E-cadherin's role in development, tissue homeostasis and disease: insights from mouse models: tissue-specific inactivation of the adhesion protein E-cadherin in mice reveals its functions in health and disease. **Bioessays**, v.37, p.294–304, 2014.
- SCHROETER, A.; MARKO, D. Resveratrol modulates the topoisomerase inhibitory potential of doxorubicin in human colon carcinoma cells. **Molecules**, v.19, p.20054-72, 2014.
- SCIFO, C.; CARDILE, V.; RUSSO, A.; CONSOLI, R.; VANCHERI, C.; CAPASSO, F.; VANELLA, A.; RENIS, M. Resveratrol and propolis as necrosis or apoptosis inducers in human prostate carcinoma cells. **Oncology Research**, v.14, p.415–426, 2004.
- SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. **International Journal of Melucular Science**, v.19, p.1-22, 2018.
- SELVARAJ, S.; SUN, Y.; SUKUMARAN, P.; SINGH, B. B. Resveratrol activates autophagic cell death in prostate cancer cells via downregulation of STIM1 and the mTOR pathway. **Molecular Carcinogenesis**, v.55, p.818-31, 2016.
- SENER, G.; TOKLU, H. Z.; SEHIRLI, O.; VELIOGLU-OGUNC, A.; CETINEL, S.; GEDIC, N. Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. **Hepatology Research**, v.35, p.62–68, 2006.
- SEXTON, E.; VAN THEMSCHE, C.; LEBLANC, K.; PARENT, S.; LEMOINE, P.; ASSELIN, E. Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells. **Molecular Cancer**, v.5, p.45, 2006.

- SHAN, Z.; YANG, G.; XIANG, W.; PEI-JUN, W.; BIN, Z. Effects of resveratrol on oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells *in vitro*. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.140, p.371-4, 2014.
- SHANKAR, S.; SIDDIQUI, I.; SRIVASTAVA, R.K. Molecular mechanisms of resveratrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene) and its interaction with TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in androgen-insensitive prostate cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.304, p.273-285, 2007.
- SHARIAT, S. F.; KARAKIEWICZ, P. I.; GODOY, G.; KARAM, J. A.; ASHFAQ, R.; FRADET, Y.; ISBARN, H.; MONTORSI, F.; JELDRES, C.; BASTIAN, P. J.; NIELSEN, M. E.; MÜLLER, S. C.; SAGALOWSKY, A. I.; LOTAN, Y. Survivin as a prognostic marker for urothelial carcinoma of the bladder: a multicenter external validation study. **Clinical Cancer Research**, v.15, p.7012-7019, 2009.
- SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v.31, p.27-36, 2010.
- SHARMA, S.; MISRA, C. S.; ARUMUGAM, S.; ROY, S.; SHAH, V.; DAVIS, J. A.; SHIRUMALLA, R. K.; RAY, A. Antidiabetic activity of resveratrol, a known SIRT1 activator in a genetic model for type-2 diabetes. **Phytotherapy Research**, v.25, p.67-73, 2011.
- SHARMA, S.; STUTZMAN, J. D.; KELLOFF, G. J.; STEELE, V. E. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. **Cancer Research**, v.54, p.5848-5855, 1994.
- SHEN, M.; CAI, Y.; YANG, Y.; YAN, X.; LIU, X.; ZHOU, T. Centrosomal protein FOR20 is essential for S-phase progression by recruiting Plk1 to centrosomes. **Cell Research**, v.23, p.1284-1295, 2013.
- SHI, J.; ZHANG, X.; SHI, T.; LI, H. Antitumor effects of curcumin in human bladder cancer *in vitro*. **Oncology Letters**, v.14, p.1157-1161, 2017.
- SHIH, A.; DAVIS, F. B.; LIN, H. Y.; DAVIS, P. J. Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK- and p53-dependent mechanism. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.87, p.1223-32, 2002.
- SHIN, H.; KWON, H.; LEE, J.; GUI, X.; ACHEK, A.; KIM, J.; CHOI, S. Doxorubicin-induced necrosis is mediated by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) but is independent of p53. **Scientific Reports**, v.5, p.1-17, 2015.
- SHIN, K. O.; PARK, N. Y.; SEO, C. H.; HONG, S. P.; OH, K. W.; HONG, J. T.; HAN, S. K.; LEE, Y. M. Inhibition of sphingolipid metabolism enhances resveratrol chemotherapy in human gastric cancer cells. **Biomolecules and Therapeutics**, v.20, p.470-6, 2012.
- SHROTRIYA, S.; AGARWAL, R.; SCLAFANI, R. A. A perspective on chemoprevention by resveratrol in head and neck squamous cell carcinoma. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.815, p.333-48, 2015.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p.184-191, 1988.
- SKAGIAS, L.; POLITI, E.; KARAMERIS, A.; SAMBAZIOTIS, D.; ARCHONDAKIS, A.; NTINIS, A.; MOREAS, I.; VASOU, O.; KOUTSELINI, H.; PATSOURIS, E. Survivin expression as a strong indicator of recurrence in urothelial bladder cancer. Predictive value of nuclear versus cytoplasmic staining. **Anticancer Research**, v.29, p.4163-4167, 2009.
- SMITH, N. D.; PRASAD, S. M.; PATEL, A. R.; WEINER, A. B.; PARISER, J. J.; RAZMARIA, A.; MAENE, C.; SCHUBLE, T.; PIERCE, B.; STEINBERG, G. D. Bladder cancer mortality in the United

States: a geographic and temporal analysis of socioeconomic and environmental factors. **The Journal of Urology**, v.195, p.290–296, 2016.

SOLSONA, E.; IBORRA, I.; COLLADO, A.; RUBIO-BRIONES, J.; CASANOVA, J.; CALATRAVA, A. Feasibility of radical transurethral resection as monotherapy for selected patients with muscle invasive bladder cancer. **The Journal of Urology**, v.184, p.475–480, 2010.

STOCCO, B.; TOLEDO, K.; SALVADOR, M.; PAULO, M.; KOYAMA, N.; TOLOI, M. R. T. Dose-dependent effect of Resveratrol on bladder cancer cells: Chemoprevention and oxidative stress. **Maturitas**, v.72, p.72–78, 2002.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v.403, p.41–45, 2000.

SU, Q.; PENG, M.; ZHANG, Y.; XU, W.; DARKO, K. O.; TAO, T.; HUANG, Y.; TAO, X.; YANG X. Quercetin induces bladder cancer cells apoptosis by activation of AMPK signaling pathway. **American Journal of Cancer Research**, v.6, p.498–508, 2016.

SUN, W.; WANG, W.; KIM, J.; KENG, P.; YANG, S.; ZHANG, H.; LIU, C.; OKUNIEFF, P.; ZHANG, L. Anti-cancer effect of resveratrol is associated with induction of apoptosis via a mitochondrial pathway alignment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.614, p.179–186, 2008.

SVÁTEK, R. S.; HOLLENBECK, B. K.; HOLMÄNG, S.; LEE, R.; KIM, S. P.; STENZL, A.; LOTAN, Y. The economics of bladder cancer: costs and considerations of caring for this disease. **European Urology**, v.66, p.253–62, 2014.

SYLVESTER, R. J.; BRAUSI, M. A.; KIRKELS, W. J.; HOELTL, W.; CALAIS DA SILVA, F.; POWELL, P. H.; PRESCOTT, S.; KIRKALI, Z.; VAN DE BEEK, C.; GORLIA, T.; DE REIJKJE, T. M.; EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Group. Long-term efficacy results of EORTC genito-urinary group randomized phase 3 study 30911 comparing intravesical instillations of epirubicin, Bacillus Calmette–Guérin, and Bacillus Calmette–Guérin plus isoniazid in patients with intermediate- and high-risk. **European Urology**, v.57, p.766–773, 2010.

SYLVESTER, R. J.; OOSTERLINCK, W.; VAN DER MEIJDEN, A. P. M. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. **The Journal of Urology**, v.171, p.2186–2190, 2004.

SYLVESTER, R. J.; VAN DER MEIJDEN, A.; WITJES, J. A.; JAKSE, G.; NONOMURA, N.; CHENG, C.; TORRES, A.; WATSON, R.; KURTH, K. H. High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. **Urology**, v.66, p.90–107, 2005.

TANG, Q.; LI, G.; WEI, X.; ZHANG, J.; CHIU, J. F.; HASENMAYER, D.; ZHANG, D.; ZHANG, H. Resveratrol-induced apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Letters**, v.336, p.325–37, 2013.

TANNOCK, I. F.; LEE, C. Evidence against apoptosis as a major mechanism for reproductive cell death following treatment of cell lines with anti-cancer drugs. **British Journal of Cancer**, v.84, p.100–105, 2001.

TEGOS, G.; STERMITZ, F. R.; LOMOVSKAYA, O.; LEWIS, K. Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of Plant Antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p. 3133–3141, 2002.

THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive Molecular Characterization of Urothelial Bladder Carcinoma. **Nature**, v.507, p.315–322, 2014.

TINHOFER, I.; BERNHARD, D.; SENFTER, M.; ANETHER, G.; LOEFFLER, M.; KROEMER, G.; KOFLER, R.; CSORDAS, A.; GREIL, R. Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2. **The FASEB Journal**, v.15, p.1613–1615, 2001.

TOMLINSON, D.C.; BALDO, O.; HARNDEN, P.; KNOWLES, M. A. *FGFR3* protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. **The Journal of Pathology**, v.213, p.91–98, 2007.

TOMOAI, G.; HOROVITZ, O.; MOCANU, A.; NITA, A.; AVRAM, A.; RACZ, C. P.; SORITAU, O.; CENARIU, M.; TOMOAI-COTISEL, M. Effects of doxorubicin mediated by gold nanoparticles and resveratrol in two human cervical tumor cell lines. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.135, p.726-34, 2015.

TRAN, S.L.; PUHAR, A.; NGO-CAMUS, M.; RAMARAO, N. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of *Bacillus cereus*. **PLoS One**, v.6, p.e22876, 2011.

TRIGLIA, D.; SHERARD BRAA, S.; YONAN, C.; NAUGHTON, G.K. Cytotoxicity testing using neutral red and MTT assays on a three-dimensional human skin substrate. **Toxicology in Vitro**, v.5, p.573-578, 1991.

TRUONG, M.; COOK, M. R.; PINCHOT, S. N.; KUNNIMALAIYAAN, M.; CHEN, H. Resveratrol induces Notch2-mediated apoptosis and suppression of neuroendocrine markers in medullary thyroid cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v.18, p.1506-11, 2011.

TSAN, M. F.; WHITE, J. E.; MAHESHWARI, J. G.; CHIKKAPPA, G. Anti-leukemia effect of resveratrol. **Leukemia and Lymphoma**, v.43, p.983-87, 2002.

TYAGI, A.; GU, M.; TAKAHATA, T.; FREDERICK, B.; AGARWAL, C.; SIRIWARDANA, S.; AGARWAL, R.; SCLAFANI, R.A. Resveratrol selectively induces DNA damage, independent of Smad4 expression, in its efficacy against human head and neck squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v.17, p.5402–5411, 2011.

TZOGANI, K.; NAGERCOIL, N.; HEMMINGS, R. J.; SAMIR, B.; GARDETTE, J.; DEMOLIS, P.; SALMONSON, T.; PIGNATTI, F. The European Medicines Agency approval of ingenol mebutate (Picato) for the cutaneous treatment of non-hyperkeratotic, non-hypertrophic actinic keratosis in adults: Summary of the scientific assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). **European Journal of Dermatology**, v.24, p.457–463, 2014.

UCHIDA, T.; MINEI, S.; GAO, J. P.; WANG, C.; SATOH, T.; BABA, S. Clinical significance of p53, MDM2 and bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder. **Oncology Reports**, v.9, p.253–259, 2002.

UWAGAWA, T.; YANAGA, K. Effect of NF- κ B inhibition on chemoresistance in biliary–pancreatic cancer. **Surgery Today**, v.45, p.1481–1488, 2015.

VAN DER AA, M. N.; STEYERBERG, E. W.; BANGMA, C.; VAN RHIJN, B. W.; ZWARTHOF, E. C.; VAN DER KWAST, T. H. Cystoscopy revisited as the gold standard for detecting bladder cancer recurrence: diagnostic review bias in the randomized, prospective CEFUB trial. **The Journal of Urology**, v.183, p.76–80, 2010.

VENTURELLI, S.; BERGER, A.; BÖCKER, A.; BUSCH, C.; WEILAND, T.; NOOR, S.; LEISCHNER, C.; SCHLEICHER, S.; MAYER, M.; WEISS, T. S.; BISCHOFF, S. C.; LAUER, U. M.; BITZER, M. Resveratrol as a pan-HDAC inhibitor alters the acetylation status of histone [corrected] proteins in human-derived hepatoblastoma cells. **Plos One**, v.8, p.73097, 2013.

- VERGARA, D.; VALENTE, C. M.; TINELLI, A.; SICILIANO, C.; LORUSSO, V.; ACIERNO, R.; GIOVINAZZO, G.; SANTINO, A.; STORELLI, C.; MAFFIA, M. Resveratrol inhibits the epidermal growth factor-induced epithelial mesenchymal transition in MCF-7 cells. **Cancer Letters**, v.310, p.1–8, 2011.
- VILLUNGER, A.; MICHALAK, E.M.; COULTAS, L.; MULLAUER, F.; BOCK, G.; AUSSERLECHNER, M.J.; ADAMS, J.M.; STRASSER, A. P53- and drug-induced apoptotic responses mediated by bh3-only proteins puma and noxa. **Science**, v.302, p.1036-1038, 2003.
- WALZ, S.; LORENZIN, F.; MORTON, J.; WIESE, K. E.; VON EYSS, B.; HEROLD, S.; RYCAK, L.; DUMAY-ODELOT, H.; KARIM, S.; BARTKUHN, M.; ROELS, F.; WÜSTEFELD, T.; FISCHER, M.; TEICHMANN, M.; ZENDER, L.; WEI, C. L.; SANSOM, O.; WOLF, E.; EILERS, M. Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. **Nature**, v.511, p.483-487, 2014.
- WANG, S.; CHEN, R.; MOROTT, J.; REPKA, M. A.; WANG, Y.; CHEN, M. mPEG-b-PCL/TPGS mixed micelles for delivery of resveratrol in overcoming resistant breast cancer. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.12, p.361-73, 2015.
- WANG, S.; MENG, Q.; XIE, Q.; ZHANG, M. Effect and mechanism of resveratrol on drug resistance in human bladder cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, v.15, p.1179-1187, 2017.
- WANG, W.; ZHANG, L.; CHEN, T.; GUO, W.; BAO, X.; WANG, D.; REN, B.; WANG, H.; LI, Y.; WANG, Y.; CHEN, S.; TANG, B.; YANG, Q.; CHEN, C. Anticancer Effects of Resveratrol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles on Human Breast Cancer Cells. **Molecules**, v.22, p.e1814, 2017.
- WANG, Y.; CATANA, F.; YANG, Y.; RODERICK, R.; VAN BREEMEN, R. B. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grapes juice, cranberry juice, and in wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.431-5, 2002.
- WANG, Y.; JI, P.; LIU, J.; BROADDUS, R. R.; XUE, F.; ZHANG, W. Centrosome-associated regulators of the G2/M checkpoint as targets for cancer therapy. **Molecular Cancer**, v.8, p.1-13, 2009.
- WAPENAAR, H.; DEKKER, F. J. Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes. **Clinical Epigenetics**, v.8, p.1-11, 2016
- WEAVER, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.25, p.2677–2681, 2014.
- WELLER, M. Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53. **Cell and Tissue Research**, v.292, p.435–445, 1998.
- WENG, C. J.; WU, C. F.; HUANG, H. W.; WU, C. H.; HO, C. T.; YEN, G. C. Evaluation of anti-invasion effect of resveratrol and related methoxy analogues on human hepatocarcinoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.2886–2894, 2010.
- WIERSTRA, I. The transcription factor FOXM1c binds to and transactivates the promoter of the tumor suppressor gene E-cadherin. **Cell Cycle**, v.10, p.760–766, 2011.
- WOLFF, E. M.; CHIHARA, Y.; PAN, F.; WEISENBERGER, D. J.; SIEGMUND, K. D.; SUGANO, K.; KAWASHIMA, K.; LAIRD, P. W.; JONES, P. A.; LIANG, G. Unique DNA methylation patterns distinguish noninvasive and invasive urothelial cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue. **Cancer Research**, v.70, p.8169-8178, 2010.

- WOLTER, F.; AKOGLU, B.; CLAUSNITZER, A.; STEIN, J. Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. **The Journal of Nutrition**, v.131, p.2197–2203, 2001.
- WONG, J. C.; FISCUS, R. R. Resveratrol at anti-angiogenesis/anticancer concentrations suppresses protein kinase G signaling and decreases IAPs expression in HUVECs. **Anticancer Research**, v.35, p.273-81, 2015.
- WU, M. L.; LI, H.; YU, L. J.; CHEN, X. Y.; KONG, Q. Y.; SONG, X.; SHU, X. H.; LIU, J. Short-term resveratrol exposure causes *in vitro* and *in vivo* growth inhibition and apoptosis of bladder cancer cells. **Plos One**, v.9, 2014.
- WU, X. P.; XIONG, M.; XU, C. S.; DUAN, L. N.; DONG, Y. Q.; LUO, Y.; NIU, T. H.; LU, C. R. Resveratrol induces apoptosis of human chronic myelogenous leukemia cells in vitro through p38 and JNK-regulated H2AX phosphorylation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.36, p.353-61, 2015.
- YANG, C.; MA, X.; WANG, Z.; ZENG, X.; HU, Z.; YE, Z.; SHEN, G. Curcumin induces apoptosis and protective autophagy in castration-resistant prostate cancer cells through iron chelation. **Drug Design, Development and Therapy**, v.11, p.431–439, 2017.
- YANG, H.; YUAN, Y.; LUO, C.; HE, H.; ZHOU, Y. Inhibitory Effects of Resveratrol on the Human Alveolar Rhabdomyosarcoma Cell Line PLA-802 through Inhibition of the TGF- β 1/Smad Signaling Pathway. **Pharmacology**, v.9, p.835-841, 2016.
- YANG, H.; ZHENG, Y.; LI, T. W.; PENG, H.; FERNANDEZ-RAMOS, D.; MARTÍNEZ-CHANTAR, M. L.; ROJAS, A. L.; MATO, J. M.; LU, S. C. Methionine adenosyltransferase 2B, HuR, and sirtuin 1 protein cross-talk impacts on the effect of resveratrol on apoptosis and growth in liver cancer cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, p.23161-70, 2013.
- YANG, J.; LIU, J.; LYU, X.; FEI, S. Resveratrol inhibits cell proliferation and up-regulates MICA/B expression in human colon cancer stem cells. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi**, v.31, p.889-93, 2015.
- YANG, Q.; WANG, B.; ZANG, W.; WANG, X.; LIU, Z.; LI, W.; JIA, J. Resveratrol inhibits the growth of gastric cancer by inducing G1 phase arrest and senescence in a Sirt1-dependent manner. **Plos One**, v.8, p. 1-9, 2013.
- YANG, Q.; XU, E.; DAI, J.; LIU, B.; HAN, Z.; WU, J.; ZHANG, S.; PENG, B.; ZHANG, Y.; JIANG, Y. A novel long noncoding RNA AK001796 acts as an oncogene and is involved in cell growth inhibition by resveratrol in lung cancer. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.285, p.79-88, 2015.
- YANG, R.; ZHANG, H.; ZHU, L. Inhibitory effect of resveratrol on the expression of the VEGF gene and proliferation in renal cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, v.4, p. 981-83, 2011.
- YOUSEF, P. G.; GABRIL, M. Y. An update on the molecular pathology of urinary bladder tumors. **Pathology - Research and Practice**, v.214, p.1-6, 2018.
- YU, H. B.; ZHANG, H. F.; ZHANG, X.; LI, D. Y.; XUE, H. Z.; PAN, C. E.; ZHAO, S. H. Resveratrol inhibits VEGF expression of human hepatocellular carcinoma cells through a NF-kappa B-mediated mechanism. **Hepatogastroenterology**, v.57, p.1241-46, 2010.
- YU, H.; PAN, C.; ZHAO, S.; WANG, Z.; ZHANG, H.; WU, W. Resveratrol inhibits tumor necrosis factor-alpha-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and invasion of human hepatocellular carcinoma cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.62, p.366–372, 2008.

YU, X. D.; YANG, J. L.; ZHANG, W. L.; LIU, D. X. Resveratrol inhibits oral squamous cell carcinoma through induction of apoptosis and G2/M phase cell cycle arrest. **Tumor Biology**, v.37, p.2871-77, 2016.

YU, X. M.; JASKULA-SZTUL, R.; AHMED, K.; HARRISON, A. D.; KUNNIMALAIYAAN, M.; CHEN, H. Resveratrol induces differentiation markers expression in anaplastic thyroid carcinoma via activation of Notch1 signaling and suppresses cell growth. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.12, p.1276-87, 2013.

YUAN, H.; YU, S.; CUI, Y.; MEN, C.; YANG, D.; GAO, Z.; ZHU, Z.; WU, J. Knockdown of mediator subunit Med19 suppresses bladder cancer cell proliferation and migration by downregulating Wnt/ β -catenin signalling pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.21, p.3254-3263, 2017.

ZHAN, L.; ZHANG, B.; TAN, Y.; YANG, C.; HUANG, C.; WU, Q.; ZHANG, Y.; CHEN, X.; ZHOU, M.; SHU, A. Quantitative assessment of the relationship between *RASSF1A* gene promoter methylation and bladder cancer (PRISMA). **Medicine**, v.96, p.1-9, 2017.

ZHANG L. L.; KONG, Q. Y.; CHEN, X. Y.; WU, M. L.; LIU, J. Biological significance and therapeutic implication of resveratrol-inhibited Wnt, Notch and STAT3 signaling in cervical cancer cells. **Genes Cancer**, v.5, p.154-64, 2014.

ZHANG, J.; ZHU, Y.; WANG, Y.; FU, Q.; XIE, H.; LIU, Z.; FU, H.; CAO, Y.; XU, J.; DAI, B. Prognostic and Predictive Value of O⁶-methylguanine Methyltransferase for Chemotherapy in Patients with Muscle-Invasive Bladder Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v.25, p.342-348, 2018.

ZHANG, Z. T.; PAK, J.; HUANG, H. Y.; SHAPIRO, E.; SUN, T. T.; PELLICER, A.; WU, X. R. Role of Ha-ras activation in superficial papillary pathway of urothelial tumor formation. **Oncogene**, v.20, p.1973-80, 2001.

ZHONG, L. X.; LI, H.; WU, M. L.; LIU, X. Y.; ZHONG, M. J.; CHEN, X. Y.; LIU, J.; ZHANG, Y. Inhibition of STAT3 signaling as critical molecular event in resveratrol-suppressed ovarian cancer cells. **Journal of Ovarian Research**, v.8, p.25, 2015.

ZHOU, C.; DING, J.; WU, Y. Resveratrol induces apoptosis of bladder cancer cells via miR-21 regulation of the Akt/Bcl-2 signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, v.9, p.1467-1473, 2014.

ZHOU, H. B.; YAN, Y.; SUN, Y. N.; ZHU, J. R. Resveratrol induces apoptosis in human esophageal carcinoma cells. **World Journal of Gastroenterology**, v.9, p.408-11, 2003.

ZHU, H. B.; YANG, K.; XIE, Y. Q.; LIN, Y. W.; MAO, Q. Q.; XIE, L. P. Silencing of mutant p53 by siRNA induces cell cycle arrest and apoptosis in human bladder cancer cells. **World Journal of Surgical Oncology**, v.11, p.22, 2013.

ZHU, W.; QIN, W.; ZHANG, K.; ROTTINGHAUS, G. E.; CHEN, Y. C.; KLIETHERMES, B.; SAUTER, E. R. Trans-resveratrol alters mammary promoter hypermethylation in women at increased risk for breast cancer. **Nutrition and Cancer**, v.64, p.393-400, 2012.

ZUNINO, S. J.; STORMS, D. H. Physiological levels of resveratrol metabolites are ineffective as anti-leukemia agents against Jurkat leukemia cells. **Nutrition and Cancer**, v.67, p.266-74, 2015.

ZWERGEL, C.; VALENTE, S.; MAI, A. DNA methyltransferases inhibitors from natural sources. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.16, p.680-696, 2016.

ZWOLAK, I. Comparison of three different cell viability assays for evaluation of vanadyl sulphate cytotoxicity in a Chinese hamster ovary K1 cell line. **Toxicology and Industrial Health**, v.32, p.1013-1025, 2016.

10. ANEXOS

10.1. Artigo 1

Environmental and Molecular Mutagenesis (2019)

Research Article

Antiproliferative and Toxicogenomic Effects of Resveratrol in Bladder Cancer Cells With Different TP53 Status

Tamires Cunha Almeida,¹ Camila Chaves Coelho Guerra,² Bárbara Letícia Goñalves De Assis,¹ Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares,³ Camila Carriao Machado Garcia,^{2,4} Angélica Alves Lima,^{1,5} and Glenda Nicioli da Silva^{1,4,5*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (CIPHARMA), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

²Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

³Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

⁴Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (CBIOL), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

⁵Departamento de Análises Clínicas (DEACL), Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

The antitumor activity of resveratrol, a polyphenolic compound found mainly in grapes, has been studied in several types of cancer. In bladder cancer, its antiproliferative effects have already been demonstrated; however, its mechanism of action is not completely understood. The aim of this study was to evaluate resveratrol antitumor activity (12.5, 25, 50, 100, 150, 200, and 250 μ M) and its possible mechanisms of action in bladder tumor cells with different TP53 gene status (RT4, grade 1, TP53 wild type; 5637-grade 2 and T24-grade 3, TP53 mutated). Cell proliferation, clonogenic survival, morphological changes, cell cycle progression, apoptosis rates, genotoxicity, global methylation, immunocytochemistry for p53 and PCNA and relative expression profiles of the AKT, mTOR, RASSF1A, HOXB3, SRC, PLK1, and DNMT1 were evaluated. Resveratrol decreased cell proliferation

and induced DNA damage in all cell lines. Regarding the long-term effects, resveratrol reduced the number of colonies in all cell lines; however, TP53 wild type cells were more resistant. Increased rates of apoptosis were found in the TP53 wild type cells and this was accompanied by AKT, mTOR, and SRC downregulation. In addition, the resveratrol antiproliferative effects in wild type TP53 cells were accompanied by modulation of the DNMT1 gene. In the TP53 mutated cells, cell cycle arrest at S phase with PLK1 downregulation was observed. Additionally, there was modulation of the HOXB3/RASSF1A pathway and nuclear PCNA reduction in the highest-grade cells. In conclusion, resveratrol has antiproliferative activity in bladder tumor cells; however, the mechanisms of action are dependent on TP53 status. Environ. Mol. Mutagen. 00:000–000, 2019. © 2019 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: bladder cancer; resveratrol; TP53 gene

INTRODUCTION

Bladder cancer is the twelfth most common cancer worldwide including men and women (Bray et al. 2018). The most common type of bladder cancer is the urothelial carcinoma. Approximately 75% of patients present with non-muscle-invasive disease, confined to the bladder mucosa or submucosa. These patients are usually managed with resection and intravesical treatment. The other 25% present with muscle-invasive disease and are treated with partial or total cystectomy and systemic chemotherapy (Antoni et al. 2017; Chang et al. 2017).

In recent years, the search for more effective therapies, especially the identification of compounds with antineoplastic

Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Grant number: CNPq-441836/2014-3.

Grant sponsor: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Grant number: Finance Code 001.

Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; Grant number: CBB-APQ-01497-14.

Grant sponsor: Universidade Federal de Ouro Preto; Grant numbers: 23109.003267/2017-01; 23109.003268/2017-47.

*Correspondence to: Glenda Nicioli da Silva, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, 35.400-000. Tel.: +55 31 35591036. E-mail: nicioli@ufop.edu.br

Received 15 March 2019; Revised 2 May 2019; Accepted 10 May 2019

DOI: 10.1002/em.22297

Published online 00 Month 2019 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

© 2019 Wiley Periodicals, Inc.

potential isolated from natural products, has received special attention. Resveratrol is a polyphenolic compound found in grapes, berries, and peanuts (Wang et al. 2013). Antioxidant and antigenotoxic effects of resveratrol have already been described (Abraham et al. 2016), however, under certain conditions, some authors have shown this compound can be genotoxic and cause tumor cell death (Scifo et al. 2004; Michels et al. 2006; Tyagi et al. 2011). Furthermore, the antitumor potential of this natural product has been described in many tumor types (Ji et al. 2015; Mohapatra et al. 2015; Nie et al. 2015; Selvaraj et al. 2016). Regarding bladder cancer, it has already been demonstrated that resveratrol decreases cell viability, induces apoptosis, inhibits cell migration and induces cell cycle arrest *in vitro* (Stocco et al. 2002; Lin et al. 2012; Bai et al. 2017). Resveratrol is also able to reduce tumor growth *in vivo* (Bai et al. 2009, Wu et al. 2014). Furthermore, Zhou et al. (2014) showed that nontumor cells were more resistant to resveratrol treatment than tumor cells.

TP53 mutations are the most common alterations in bladder cancer cells (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). These mutations commonly occur in muscle-invasive bladder cancer and are correlated with poor prognosis and recurrence (Zhang et al. 2015; Solomon and Hansel 2016). The *TP53* gene is considered the guardian of the genome, because it responds to stress signals inducing cell cycle arrest, apoptosis, senescence, and DNA repair (Kastenhuber and Lowe 2017).

Therefore, given the evidence of antineoplastic potential of resveratrol in bladder cancer, the selectivity of resveratrol for tumor cells and considering the importance of *TP53* mutations to bladder cancer prognosis, this study aimed to investigate the mechanism of action of resveratrol in bladder cancer cell lines with different *TP53* gene statuses.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Resveratrol (>99%), Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), penicillin G, streptomycin, trypsin, and propidium iodide were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Fetal bovine serum was purchased from Cultilab Ltda. (Campinas, Brazil). Amphotericin B was purchased from Cristália (Itapira, Brazil). Cell Proliferation Kit II (XTT) was purchased from Roche Diagnostics® (Mannheim, Germany). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Neon (Suzano, Brazil). Giemsa solution was purchased from Dinâmica (Diadema, Brazil).

Cell Lines

The cell lines RT4, 5637, and T24 from human bladder carcinoma were obtained from the Cell Bank of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. The 5637 and T24 cells harbor *TP53* mutations and were established from high-grade bladder tumors. The 5637 cells contain two *TP53* mutations, one at codon 72 (Arg > Pro) and another at codon 280 (Arg > Thr) (Cooper et al. 1994; Rieger et al. 1995). T24 cells contain a *TP53* allele encoding an in-frame deletion of tyrosine 126 (Cooper et al. 1994). The RT4 cells were established from a low-grade papillary bladder

tumor with wild type *TP53* gene. The RT4 and T24 cell lines were maintained in DMEM and the 5637 cells were maintained in RPMI medium. Both media were supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin G, 100 U/mL streptomycin, and 2.5 µg/mL amphotericin B. Cells were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂.

Resveratrol

Resveratrol was solubilized at a concentration of 500 µM in culture medium with 2% DMSO immediately before its use. The same concentration of DMSO was also used as controls.

Cytotoxicity and Cell Proliferation

Cytotoxicity and cell proliferation rates were assessed using the Cell Proliferation Kit II (XTT). Cells were plated in 96-well plates (1 × 10⁴ cells/well for T24 and 5637, and 1.5 × 10⁴ cells/well for RT4). After 24 h, the cells were treated with different concentrations of resveratrol (12.5, 25, 50, 100, 150, 200, and 250 µM) for 24 h (Stocco et al. 2002; Bai et al. 2009). For evaluating cytotoxicity, after treatment the culture medium was removed and the cells were washed with Hanks' solution. XTT test solution, diluted in culture medium without phenol red, was added to each well and the absorbance was measured at 492 and 690 nm after 90 min. For evaluating cell proliferation, after treatment the cells were washed with Hanks' solution, fresh culture medium was added, and the cells were incubated for 24 h. After this, the cells were prepared using the same method as in the cytotoxicity experiment. Absorbance results are proportional to the percentage of viable cells (Sávio et al. 2014). Both tests were conducted in triplicate.

Clonogenic Survival

Clonogenic assay was used to evaluate the long-term effects of resveratrol and was performed as previously described by De Oliveira et al. (2017). Cells were plated at a density of 1 × 10⁶ cells/25 cm³ culture flask. Twenty-four hours later, they were treated with resveratrol at concentrations of 25, 50, 100, and 150 µM for 24 h. Cultures were rinsed with Hank's solution, trypsinized, approximately 1000 cells were plated into 25 cm³ culture flasks and allowed to grow for 15 days to form colonies. The cells were stained with Giemsa and the number of colonies with 50 or more cells was counted. The experiments were performed in triplicate.

Comet Assay

Initially, 2 × 10⁵ cells were seeded into 12-well plates. Twenty-four hours later, cells were treated with resveratrol at concentrations of 50, 100, and 150 µM for 2 and 24 h. Methyl methane sulfonate (80 µM) was used as a positive control. The procedure of Singh et al. (1988) was used with minor modifications. The cells were collected and resuspended in low-melting-point agarose (0.5% in PBS). This mixture was layered onto slides precoated with standard agarose (1.0% in PBS) and covered with a coverslip. After agarose solidification at 4°C, the coverslip was gently removed. The slides were immersed into lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, and 1% Triton X-100, pH 10) for 24 h, at 4°C. Subsequently, an incubation step in alkaline buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA; pH > 13) was carried out for 20 min, to allow DNA to unwind and alkali-labile site expression. Electrophoresis was conducted in the same alkaline buffer at 4°C, for 20 min, at 25 V and 300 mA. After electrophoresis, the slides were neutralized with neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5), washed with ice-cold ethanol and stored at room temperature. DNA was stained with ethidium bromide (20 mg/mL) immediately before analysis. A total of 100 randomly selected nucleoids per treatment were analyzed under 40× magnification with a fluorescence microscope. Tail intensity (% DNA in tail) was used to estimate DNA damage and measured using ImageJ/OpenComet software.

Cell Morphological Analysis

To evaluate possible morphological changes in cells after treatment, 2×10^5 cells were seeded into 12-well plates. After 24 h, the cells were treated with resveratrol at concentrations of 50, 100, and 150 μM for 24 h. The cells were then observed under a phase-contrast microscope at 200 \times magnification and the alterations were photographed (Da Silva et al. 2012).

Immunocytochemistry

To evaluate the effect of resveratrol on p53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) proteins, cells were processed by the immunocytochemistry technique using monoclonal antibodies and the EnVision Dakocytomation system (EnVision[®] + system-HRP AEC, K4004, DAKO), as previously described by Amimia et al. (2014) with some modifications. Cells were seeded at a density of 2×10^4 cells/well on chamber slides. After 24 h, the cells were treated with resveratrol at concentrations of 50 and 100 μM for 24 h. After treatment, the cells were incubated with primary antibody overnight in a humid chamber at 4 to 8°C. Antibodies were diluted in 0.05 M Tris-HCl containing 0.1% Tween (antibody diluent; S3022, DAKO). As a negative control, a pool of immunoglobulins from mice—IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, and IgM (Universal Negative Control Reagent; IS750, DAKO) were used. After incubation with the primary antibody and washing steps, slides were incubated with peroxidase-linked secondary antibody (goat anti-mouse IgG conjugated with peroxidase-labeled polymer) for 60 min at room temperature. After addition of the chromogenic substrate (3-amino-9-ethylcarbazole and H₂O₂), the slides were washed in distilled water. Then, the slides were immersed in Mayer's Hematoxylin (DAKO), rinsed with distilled water, immersed in a solution of 37 mM ammonium hydroxide (LabSynth) and prepared with aqueous medium (Faramount Mounting Medium, S3025, DAKO). The slides were photographed with Leica Application Suite image capture program. The quantitative PCNA analyses were performed using ImageJ software.

Cell Cycle Progression

For cell cycle kinetics, 2×10^5 cells were seeded into 12-well plates. After 24 h, cells were treated with resveratrol at concentrations of 50, 100, and 150 μM for 24 h. After the treatment, cells were detached using trypsin and centrifuged at 1000 rpm for 10 min. The sediment was fixed with 70% ethanol and maintained at -20°C for 12 h (Brassesso et al. 2013). Subsequently, the cells were washed, resuspended in 200 μL of labeling solution (0.0914 g of magnesium chloride; 0.0774 g of sodium citrate; 0.04766 g of Hepes; 10 μL of Triton-X, 0.5 mL of propidium iodide, and 9490 mL of water, adapted from Galbraith et al. 1983), placed on ice and protected from light for at least 30 min. The percentages of cells in the G0/G1, S and G2/M phases were measured using flow cytometry (BD FACSCalibur) and analyzed using FlowJo[®] software. Data from 30,000 cells were collected in each file and the experiments were conducted in triplicate.

Apoptosis Assay

Apoptosis rates were evaluated using the FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis kit (Invitrogen). As previously described by Sávio et al. (2014), cells were seeded at a density of 2×10^5 /plate in 12-well plates. After 24 h, the cells were treated with different concentrations of resveratrol (50, 100, and 150 μM) for 24 h. After treatment, the cells were detached using trypsin and centrifuged at 1000 rpm for 10 min. Cells were rinsed with Hank's solution and centrifuged (1000 rpm, 10 min). Subsequently, cells were labeled with propidium iodide and annexin V, following the kit instructions. The percentage of unlabeled or labeled cells by propidium iodide and/or annexin V was measured using a flow cytometer (BD FACSCalibur) and analyzed using FlowJo software. Cellular status was defined as follows: unstained cells were classified as "alive"; cells stained only by annexin V were classified as "early apoptotic"; cells stained

by both annexin V and propidium iodide were classified as "late apoptotic"; and cells stained only by propidium iodide were classified as "necrotic." Data from 50,000 cells were collected in each data file and the analyses conducted in triplicate.

Quantification of DNA Methylation

Cells were plated at a density of 1×10^6 cells/25 cm³ culture flask. Twenty-four hours later, they were treated with 150 μM of resveratrol for 24 h. The cells were collected and the DNA was isolated using the Wizard[®] Genomic Kit (Promega), according to the manufacturer's instructions. The content of methylated DNA was determined using the Imprint[®] Methylated DNA Quantification Kit (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions. It used direct calculation to determine the percentage of DNA methylation after treatment considering the untreated control as 100%. Briefly, 100 ng of DNA were diluted in 30 μL of DNA binding solution, added in each well of a 96-well plate and incubated. After incubation, the capture antibody was added and the plate was again incubated. Following this, the plate was washed and the detection antibody was added. After new incubation, the plate was washed and the developing solution was added. The color change was monitored. Finally, the absorbance was measured at 450 nm. Absorbance results were proportional to the amount of methylated DNA.

AKT, mTOR, SRC, PLK1, HOXB3, RASSF1A, and DNMT1 Gene Expression

The analysis of genetic expression was conducted as described previously by De Oliveira et al. (2017) with minor modifications. Cells were seeded into plates at a density of 1×10^6 cells/25 cm³ culture flask. Twenty-four hours later, cells were treated with resveratrol (50, 100, and 150 μM) for 24 h. Afterward, cells were washed with Hanks' solution and collected for RNA extraction. Total RNA was isolated using the miRNeasy Mini kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations and purities were determined using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific[®], Fairlawn, NJ). The cDNA synthesis was carried out using the High Capacity kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's instructions. *AKT* (Hs01086102), *mTOR* (Hs00234508), *PLK1* (Hs00983229), *SRC* (Hs01082246), *RASSF1A* (Hs00200394), *HOXB3* (Hs01587922), and *DNMT1* (Hs00945875) gene expressions were assayed using the TaqMan system (Applied Biosystems). GAPDH was used as a housekeeping gene. For every PCR sample, a negative (no template) control was processed as a routine control. Relative gene expression data were analyzed using the 2^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} method and the fold change and fold regulation values were calculated as described by Livak and Schmittgen (2001). Fold regulation represents fold change results in a biologically meaningful way. Fold change values greater than one indicate a positive- or an up-regulation, and the fold regulation is equal to the fold change. Fold change values less than one indicate a negative or down-regulation, and the fold regulation is the negative inverse of the fold change.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism[®] 5. The data were analyzed using the one-way ANOVA, and *post hoc* analysis by Tukey's test. The results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Cytotoxicity and Cell Proliferation

The treatment with resveratrol was significantly cytotoxic in T24 cells at the concentrations of 150 and 200 μM (Fig. 1A). A statistically significant reduction in cell

4 Almeida et al.

viability was not observed in RT4 and 5637 cells after the treatment. Cell proliferation decrease after treatment with resveratrol was detected for RT4 and T24 cells for all tested concentrations, and for 5637 cells from 50 μ M (Fig. 1B).

Clonogenic Survival

The clonogenic survival assay showed significant decrease in 5637 and T24 cell colonies after resveratrol treatment at all tested concentrations. In RT4 cells, the decrease was significant only at the highest tested concentration (150 μ M) (Fig. 2). The IC_{50} values were estimated to be 161.8 μ M for RT4 cells, 36.7 μ M for 5637 cells, and 46.1 μ M for T24 cells.

Comet Assay

All concentrations of resveratrol increased primary DNA damage in RT4, 5637, and T24 cells, in both analyzed times (Fig. 3).

Cell Morphological Analysis

For all cell lines, the phase-contrast photomicrographs showed a lower number of cells after the treatment with resveratrol compared with the untreated control. Additionally, elongated 5637 and T24 cells were observed after treatment (Fig. 4).

Immunocytochemistry

The presence of p53 protein was observed in 5637 and T24 cells when qualitative analyses were performed (Fig. 5). No changes in p53 expression were observed after treatment with resveratrol (data not shown).

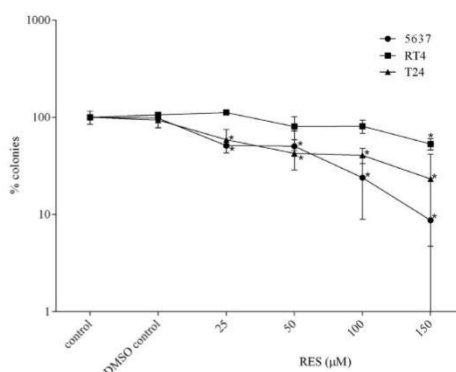


Fig. 2. Percentages of RT4, 5637, and T24 cell colonies (logarithmic scale) after 24-h treatment with resveratrol. Control: untreated cells. DMSO: vehicle control. * $P < 0.05$ compared with control. Each point represents the mean value obtained from three independent experiments.

Quantitative analyses were performed for PCNA protein. Resveratrol treatment caused a reduction in nuclear PCNA expression in T24 cells. No modulation was detected in RT4 and 5637 cells after treatment with resveratrol (Fig. 6A). We also observed that there was cytoplasmic PCNA expression in all cell lines (Fig. 6B).

Cell Cycle Progression

In RT4 cells, resveratrol treatment caused an increase in sub-G1 content, accompanied by a reduction of cell number

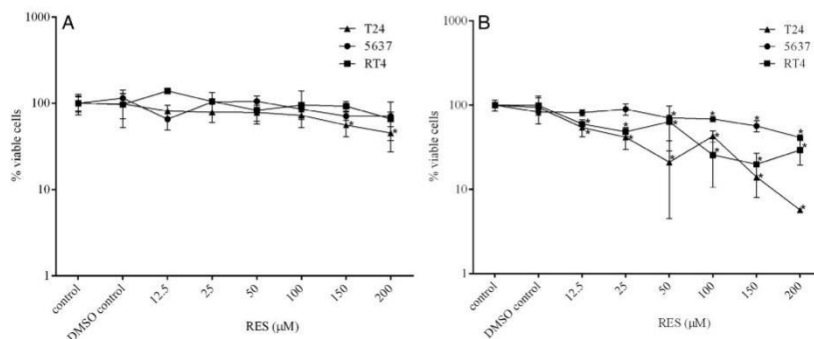


Fig. 1. Percentages of viable cells (logarithmic scale) in RT4, 5637, and T24 cell lines immediately (A) and 24 h (B) after 24-h treatment with resveratrol. Control: untreated cells. DMSO: vehicle control. * $P < 0.05$ compared with control. Each point represents the mean value obtained from three independent experiments.

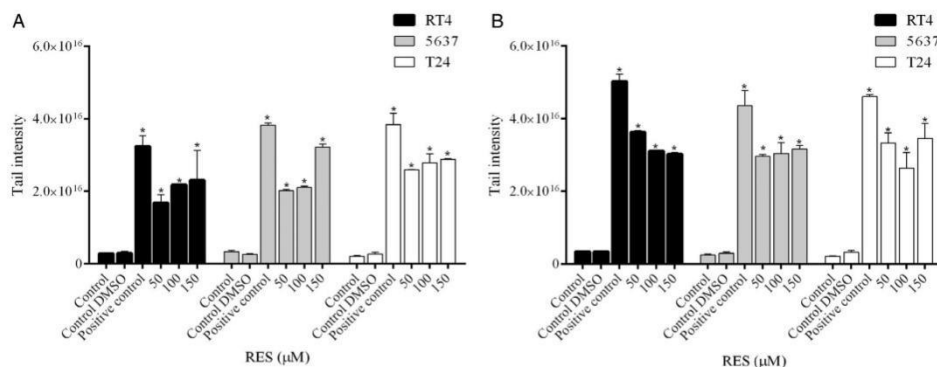


Fig. 3. DNA damage (tail intensity) in RT4, 5637, and T24 cells treated with resveratrol for 2 (A) or 24 h (B). Control: untreated cells. DMSO: vehicle control. Positive control: methyl methane sulfonate 80 μM . * $P < 0.05$ compared with control.

in G0/G1 and G2/M phases. In 5637 and T24 cells, there was an increase of cell number in S phase with a concomitant decrease of cells in G2/M phase after treatment with resveratrol. In T24 cells, it is also possible to observe a statistically significant increase in the sub-G1 content after treatment with the highest concentration tested (Fig. 7).

Apoptosis Assay

Increased early (100 and 150 μM) and late apoptosis (150 μM) rates were observed in RT4 cells after treatment with resveratrol. For T24 cells, an increased necrosis rate was detected after treatment with resveratrol at 100 and 150 μM . There was no significant change in apoptosis or necrosis rates in 5637 cells after treatment (Fig. 8).

Quantification of DNA Methylation

There was no significant alteration in global DNA methylation after treatment with resveratrol (Table I). The mean percentage of methylated DNA was 90.88% for RT4 cells, 122.43% for 5637 cells, and 115.57% for T24 cells.

AKT, mTOR, SRC, PLK1, HOXB3, RASSF1A, and DNMT1 Gene Expression

In RT4 cells, *AKT*, *DNMT1*, and *PLK1* genes were downregulated after treatment with 100 and 150 μM of resveratrol while *mTOR* and *SRC* genes were downregulated only after treatment with the highest concentration of resveratrol (150 μM). In T24 cells, *HOXB3* (150 μM) and *PLK1* (100 and 150 μM) genes were downregulated while *RASSF1A* (150 μM) was upregulated after treatment. In 5637 cells, only *PLK1* was downregulated after treatment

with 150 μM of resveratrol (Fig. 9). The fold change values are shown in Table II.

DISCUSSION

Mutations in the *TP53* tumor suppressor gene are very common in bladder cancer and influence the prognosis and response to chemotherapy (Solomon and Hansel 2016). As the selectivity of resveratrol for tumor cells compared to normal cells has already been demonstrated (Zhou et al. 2014), we investigated the effects of resveratrol in bladder carcinoma cells lines with different statuses of the *TP53* gene. The 5637 cells contain two *TP53* mutations, one at codon 72 (Arg > Pro) and another at codon 280 (Arg > Thr), which cause alterations in p53 core domain and prevent its binding to DNA (Cordon-Cardo et al. 1994; Rieger et al. 1995). T24 cells contain a *TP53* allele encoding an in-frame deletion of tyrosine 126, which leads to N-terminal transactivation domain alterations and produces proteins that preserve some *TP53* activities (Cooper et al. 1994; Cordon-Cardo et al. 1994). Mutant p53 proteins are resistant to degradation and thus have prolonged half-lives, causing their accumulation in cells (Muller and Vouden 2013), as was observed in p53 immunocytochemistry for 5637 and T24 cells.

Cytotoxic effects after treatment with resveratrol were observed only in T24 cells; however, there was a reduction in cell proliferation in both *TP53* mutated cells 24 h after treatment, suggesting loss of reproductive integrity. Thus, the clonogenic survival assay was performed to confirm the hypothesis of damage in the reproductive capacity. This assay is the most relevant endpoint for measuring cell death

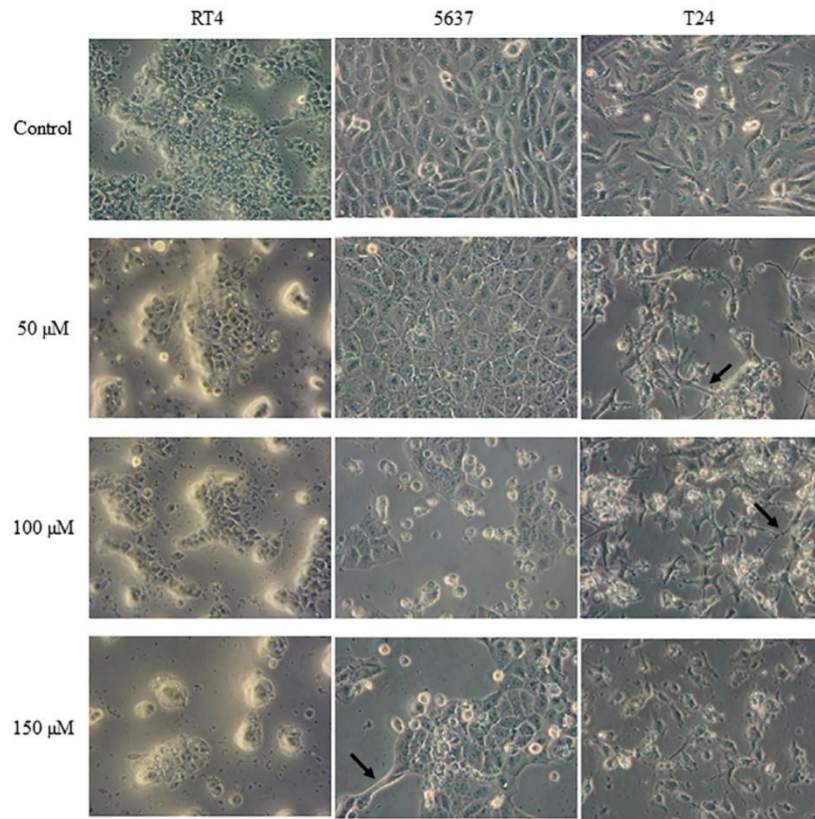


Fig. 4. Photomicrography of RT4, 5637, and T24 cells before and after 24-h resveratrol treatment. The arrows show the elongated cells. Phase-contrast microscope, x200.



Fig. 5. p53 expression (red) in RT4, 5637, and T24 untreated cells. Magnification x100 (colored only in the online version).

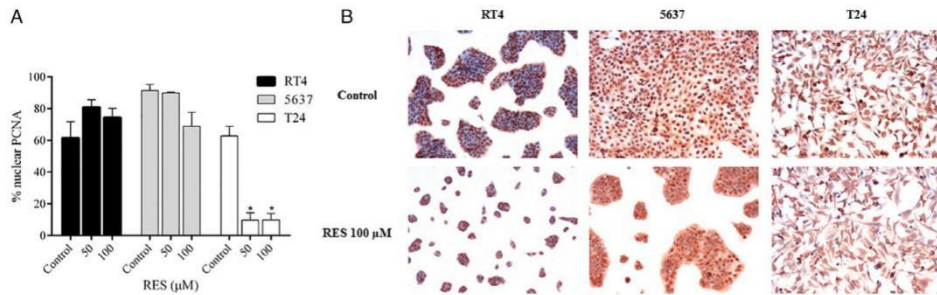


Fig. 6. PCNA expression in RT4, 5637, and T24 cells after 24-h treatment with resveratrol. Control: untreated cells. * $P < 0.05$ compared with control (colored only in the online version).

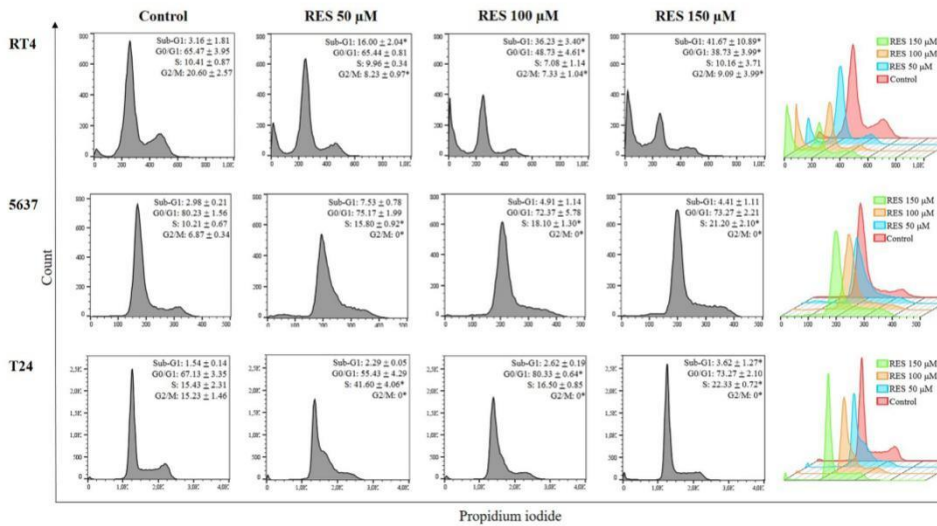


Fig. 7. Cell cycle analysis of RT4, 5637, and T24 cells treated with resveratrol for 24 h. Control: untreated cells. * $P < 0.05$ compared with control (colored only in the online version).

in tumor cell lines (Tannock and Lee 2001). It determines the ability of a cell to proliferate indefinitely, retaining its reproductive capacity after being exposed to a substance (Munshi et al. 2005). In *TP53* mutated cells a reduction in the number of colonies was observed after treatment with resveratrol and this was accompanied by downregulation of the *PLK1* gene. Brassesco et al. (2013) showed that treatment of bladder tumor cells with *PLK1* inhibitors resulted in cell proliferation inhibition and prevented clonogenicity.

The genotoxic potential of resveratrol was previously demonstrated in head and neck squamous carcinoma, hepatoma, and prostate carcinoma cells (Scifo et al. 2004; Michels et al. 2006; Tyagi et al. 2011). We confirmed this effect and demonstrated that resveratrol treatment induced an increase in DNA damage in *TP53* mutant cells. Thus, the reduction in cell proliferation caused by resveratrol is likely to occur because of DNA damage induction. Azmi et al. (2005, 2006) showed that DNA damages caused by

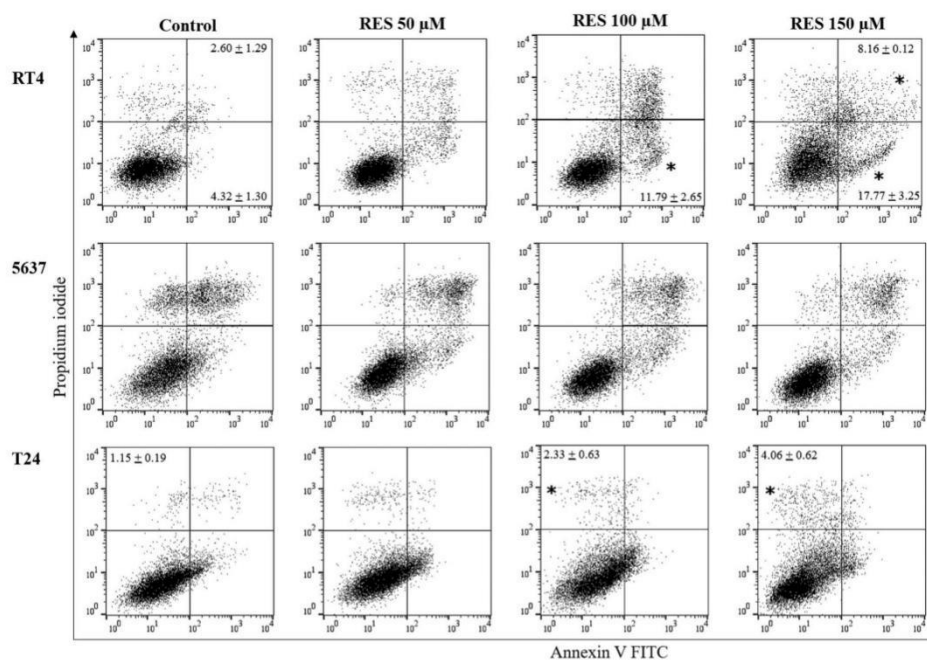


Fig. 8. Apoptosis and necrosis rates in RT4, 5637, and T24 cells treated with resveratrol for 24 h. Control: untreated cells. * $P < 0.05$ compared with control.

TABLE I. Global Methylated DNA in RT4, 5637, and T24 cells after 24-h treatment with resveratrol

	Methylated DNA (% of control)		
	Control	DMSO control	Resveratrol 150 μM
RT4	100	94.52 ± 0.15	90.88 ± 0.05
5637	100	99.35 ± 0.05	122.43 ± 0.03
T24	100	98.32 ± 0.17	115.57 ± 0.04

Control: untreated cells. DMSO control: vehicle control.

resveratrol is due to oxidative effects. Although resveratrol is widely known for its antioxidant effects, it is known that every antioxidant is in fact a redox (reduction–oxidation) agent and thus might become a pro-oxidant to induce DNA damage under special conditions (De La Lastra and Villegas 2007). It has been well established that most solid tumors have low vasculature that restricts proper nutrient supply leading to deficiency of oxygen, which, in turn, leads to reduction in tumor cell pH. In an acidic environment, protonation on N7 of guanine residues in DNA may

cause rotation of the base out of the helix. This effect would expose DNA bound copper and make it easily accessible to agents such as resveratrol, resulting in oxidative DNA damage (Muqbil et al. 2012).

The morphological alterations found in *TP53* mutated cells and the low cell density after resveratrol treatment are suggestive of cell cycle arrest (Da Silva et al. 2012). We demonstrated that treatment with resveratrol caused an increase in the number of cells in S phase accompanied by a reduction in the number of cells in G2/M phase, suggesting S phase arrest. This modulation may occur because of *PLK1* downregulation, because its encoded protein is important to S phase progression (Shen et al. 2013). The fold downregulation in the highest concentration of resveratrol was 3.57 for 5637 cells and 2.08 for T24 cells.

It was observed that the type of *TP53* mutation influenced the kind of cell death caused by resveratrol. In T24 cells, there was an increase in necrosis rates after treatment with resveratrol. This death pathway may occur independently of p53. Shin et al. (2015) demonstrated that doxorubicin treatment induces DNA breaks and increases

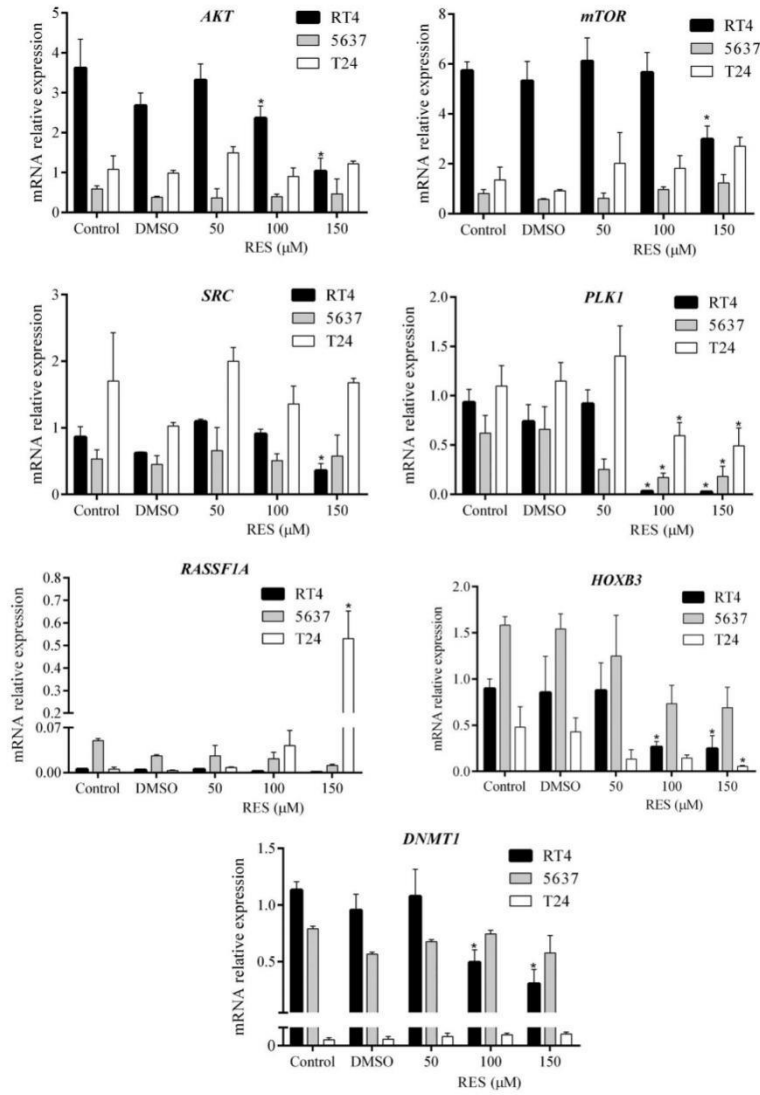


Fig. 9. Relative expression of *AKT*, *mTOR*, *SRC*, *PLK1*, *HOXB3*, *RASSF1A* and *DNMT1* genes in RT4, 5637 and T24 cells treated with resveratrol for 24 h. Control: untreated cells. DMSO: vehicle control. Each column represents the mean value \pm standard deviation obtained from three independent treatments. * $P < 0.05$ compared with control.

TABLE II. Fold Changes Values Calculated for RT4, 5637, and T24 cells after 24-h treatment with resveratrol

		Concentrations (μ M)											
		50	100	150	50	100	150	50	100	150			
Cell lines	Genes				<i>PLK1</i>			<i>mTOR</i>			<i>RASSF1A</i>		
	<i>AKT</i>												
	Fold change values												
	RT4	0.95	0.68	0.30	1.00	0.04	0.03	1.07	0.99	0.53	0.97	0.98	0.93
5637	0.66	0.68	0.76	0.40	0.29	0.28	0.76	1.23	1.61	0.59	0.44	0.36	
T24	1.46	0.91	1.21	1.31	0.54	0.48	1.50	1.40	2.14	2.06	13.39	106.38	
Cell lines	Genes				<i>DNMT1</i>			<i>HOXB3</i>					
	<i>SRC</i>												
	Fold change values												
	RT4	1.30	1.01	0.42	0.96	0.44	0.28	0.98	0.30	0.29			
5637	1.21	1.03	1.17	1.09	0.94	0.92	1.01	0.97	0.56				
T24	1.32	0.87	1.10	1.72	1.94	1.90	0.58	0.33	0.14				

PARP levels, even with a p53 inhibitor. High PARP levels result in exacerbated activation of the mitochondria leading to necrosis. In 5637 cells, it was not possible to detect apoptosis or necrosis, thus another cell death mechanism may be occurring in this cell line. Many authors demonstrated the ability of resveratrol to induce senescence (Gao et al. 2011; Luo et al. 2013), which is a permanent cell cycle arrest that can be triggered by a variety of stimuli, including DNA damage and oxidative stress (Ewald et al. 2010).

Some pathways were modulated by resveratrol only in T24 cells, confirming the influence of the *TP53* mutation type on resveratrol effect. In T24 cells, there was *HOXB3* downregulation (1.72-, 3.03-, and 7.14-fold downregulation for 50, 100, and 150 μ M, respectively) and *RASSF1A* upregulation (2.06-, 13.39-, and 106.38-fold upregulation for 50, 100, and 150 μ M, respectively) after resveratrol treatment. *RASSF1A* is a tumor suppressor gene that is inhibited through hypermethylation of its promoter region in many cancers, including bladder cancer (Baylin and Herman 2000). Palakurthy et al. (2009) showed that *RASSF1A* silencing occurs through the *HOXB3* oncogene, which is able to induce *DNMT3B* expression, one of the genes that encode the enzymes responsible for DNA methylation. Overexpression of *DNMT3B* caused by *HOXB3* leads to hypermethylation of the *RASSF1A* promoter region.

In T24 cells a reduction in nuclear PCNA was also observed after treatment with resveratrol. This protein is important for many cellular processes carried out in the nucleus, such as DNA replication, transcription, and cell cycle progression (Maga and Hubscher 2003). Other authors demonstrated the antiproliferative effects of resveratrol through PCNA downregulation (Lee et al. 2009; Liu et al. 2014). Interestingly, a considerable amount of PCNA was also found in the cytoplasm of all cell lines. Naryzhny and Lee (2010) showed in cancer cells that PCNA is associated with several cytoplasmic proteins, including enzymes that are involved in the glycolysis pathway and oncoproteins, such as elongation factor, malate dehydrogenase, and peptidyl-prolyl isomerase.

In wild type *TP53* cells, an increase of DNA damage was also observed after treatment with resveratrol and this may have contributed to the reduction of the cellular proliferation observed in this cell line. Furthermore, the treatment with resveratrol caused a reduction in the number of colonies and was accompanied by downregulation of the *PLK1* gene, as in *TP53* mutated cells. Although this effect has been observed in all cell lines, wild type *TP53* cells were more resistant to treatment. Resveratrol's effect in reduction of colonies was 4.4 times higher in 5637 and 3.5 times higher in T24 than in RT4 cells. The influence of *TP53* mutations in cellular responses to chemotherapy depends on a complex signaling cascade. However it is known that a predominance of functions related to DNA repair might provide a survival advantage to some types of cancer cells with active *TP53* (Kim et al. 2009).

There was no cell cycle arrest after treatment with resveratrol in wild type *TP53* cells; however, an increase in sub-G1 could be observed, suggesting cell death (Chen et al. 2018), which was confirmed by apoptosis assay. Apoptosis is a common cell death pathway in cells with the wild type *TP53* gene, because activation of this gene leads to increased expression of pro-apoptosis proteins (Liu et al. 2003). The increased apoptosis rates in wild type *TP53* cells can be correlated with *AKT/mTOR* downregulation. The fold downregulation in the highest concentration of resveratrol was 3.33 for *AKT* and 1.88 for *mTOR*. High levels of proteins of this pathway prevent apoptosis in bladder cancer cells (Oka et al. 2006). Furthermore, *SRC* downregulation after treatment with resveratrol (2.38-fold downregulation for 150 μ M) might contribute to apoptosis in wild type *TP53* cells. Kong et al. (2015) demonstrated that reduction of Src protein in bladder cancer cells results in apoptosis through phosphorylation inhibition of anti-apoptotic FAK protein.

Although there was no change in global methylation levels in wild type *TP53* cells, there was *DNMT1* downregulation (2.27- and 3.57-fold downregulation for 100 and 150 μ M,

respectively), which may be contributing to demethylation of tumor suppressor genes. Qiu et al. (2017) demonstrated that treatment with the flavonoid kaempferol did not vary the content of 5-methylcytosine, a biomarker for global DNA methylation, in a bladder cancer xenografts model, but modulated DNA methylation in specific positions.

In conclusion, resveratrol has antiproliferative activity independent of *TP53* status in bladder tumor cells; however, the antineoplastic effects are due to different mechanisms of action.

STATEMENT OF AUTHOR CONTRIBUTIONS

All of the authors reviewed and approved the final manuscript. T.C.A. conducted all of the experiments, interpreted the data, and wrote the manuscript. C.C.C.G. performed the comet assay. B.L.G.A. performed the immunocytochemistry. R.D.O.A.C. performed the flow cytometry experiments. C.C.M.G. suggested the experimental design and interpreted the data of comet assay. A.A.L. suggested the experimental design and interpreted the data of immunocytochemistry. G.N.S. was the advisor, contributed to the experimental design, and data interpretation as well as critically read the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (grant number CBB-APQ-01497-14), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant number CNPq-441836/2014-3), Universidade Federal de Ouro Preto (grant numbers 23109.003267/2017-01 and 23109.003268/2017-47), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Finance Code 001). English language editing was done by Global Science Editing Ltd, London.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Abraham SK, Khandelwal N, Hintzsche H, Stopper H. 2016. Antigenotoxic effects of resveratrol: Assessment of *in vitro* and *in vivo* response. *Mutagenesis* 31:27–33.
- Amirmia M, Bahaie-Ghazani A, Fakhrou A, Khodaeiani E, Alikhah H, Naghavi-behzad M, Zarrintan A. 2014. Immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 in skin tumors. *J Dermatolog Treat* 25:380–387.
- Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. 2017. Bladder cancer incidence and mortality: A global overview and recent trends. *Eur Urol* 71:96–108.
- Azmi AS, Bhat SH, Hadi SM. 2005. Resveratrol-cu(II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: Implications for anticancer properties. *FEBS Lett* 579:3131–3135.
- Azmi AS, Bhat SH, Hanif S, Hadi SM. 2006. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: A putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Lett* 580:533–538.
- Bai Y, Mao Q, Qin J, Zheng X, Wang Y, Yang K, Shen H, Xie LP. 2009. Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest human T24 bladder cancer cells *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo*. *Cancer Sci* 101:488–493.
- Bai Y, Yang H, Zhang G, Hu L, Lei Y, Qin Y, Yang Y, Wang Q, Li R, Mao Q. 2017. Inhibitory effects of resveratrol on the adhesion, migration and invasion of human bladder cancer cells. *Mol Med Rep* 15:885–889.
- Baylin SB, Herman JG. 2000. DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16:168–174.
- Brassasco MS, Pezuk JA, Morales AG, De Oliveira JC, Roberto GM, Da Silva GN, Francisco De Oliveira H, Scrideli CA, Tone LG. 2013. *In vitro* targeting of polo-like kinase 1 in bladder carcinoma: Comparative effects of four potent inhibitors. *Cancer Biol Ther* 14:648–657.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394–424.
- Chang SS, Bochner BH, Chou R, Dreicer R, Kamat AM, Lerner SP, Lotan Y, Meeks JJ, Michalski JM, Morgan TM, et al. 2017. Treatment of non-metastatic muscle-invasive bladder cancer: American Urological Association/American Society of Clinical Oncology/American Society for Radiation Oncology/Society of Urologic Oncology clinical practice guideline summary. *J Oncol Pract* 13:621–625.
- Chen C, Chen Y, Hsieh Y, Weng C, Yeh J, Yang S, Lin C, Yang J. 2018. Galbridin induces apoptosis and cell cycle arrest in oral cancer cells through the JNK1/2 signaling pathway. *Environ Toxicol* 33:679–685.
- Cooper MJ, Haluschak JJ, Johnson D, Schwartz S, Morrison LJ, Lippa M, Hatzivassiliou G, Tan J. 1994. p53 mutations in bladder carcinoma cell lines. *Oncol Res* 6:569–579.
- Cordon-Cardo C, Dalbagni G, Saez GT, Oliva MR, Zhang ZF, Rosai J, Reuter VE, Pellicer A. 1994. p53 mutations in human bladder cancer: Genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer* 56:347–353.
- Da Silva GN, Camargo EA, Salvadori DMF. 2012. Toxicogenomic activity of gemcitabine in two *TP53*-mutated bladder cancer cell lines: Special focus on cell cycle-related genes. *Mol Biol Rep* 39:10373–10382.
- De La Lastra CA, Villegas I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: Mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 35:1156–1160.
- De Oliveira DT, Sávio AL, Marcondes JP, Barros TM, Barbosa LC, Salvadori DM, DA Silva GN. 2017. Cytotoxic and toxicogenomic effects of silibinin in bladder cancer cells with different *TP53* status. *J Biosci* 42:91–101.
- Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. 2010. Therapy-induced senescence in cancer. *J Nat Cancer Inst* 102:1536–1546.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220:1049–1051.
- Gao Z, Xu MS, Barnett TL, Xu CW. 2011. Resveratrol induces cellular senescence with attenuated mono-ubiquitination of histone H2B in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 407:271–276.

12 Almeida et al.

- Ji Q, Liu X, Han Z, Zhou L, Sui H, Yan L, Jiang H, Ren J, Cai J, Li Q. 2015. Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- β 1/Smads signaling pathway mediated snail/E-cadherin expression. *BMC Cancer* 15:97.
- Kastenhuber ER, Lowe SW. 2017. Putting p53 in context. *Cell* 170:1062–1078.
- Kim E, Giese A, Deppert W. 2009. Wild-type p53 in cancer cells: When a guardian turns into a blackguard. *Biochem Pharmacol* 77:11–20.
- Kong D, Chen F, Sima NI. 2015. Inhibition of focal adhesion kinase induces apoptosis in bladder cancer cells via Src and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Exp Ther Med* 10:1725–1731.
- Lee MH, Choi BY, Kundu JK, Shin YK, Na HK, Surh YJ. 2009. Resveratrol suppresses growth of human ovarian cancer cells in culture and in a murine xenograft model: Eukaryotic elongation factor 1A2 as a potential target. *Cancer Res* 69:7449–7458.
- Lin X, Wu G, Huo W, Zhang Y, Jin F. 2012. Resveratrol induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction in bladder carcinoma cells. *Int J Urol* 19:757–764.
- Liu FT, Newland AC, Jia L. 2003. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 310:956–962.
- Liu B, Zhou Z, Zhou W, Liu J, Zhang Q, Xia J, Liu J, Chen N, Li M, Zhu R. 2014. Resveratrol inhibits proliferation in human colorectal carcinoma cells by inducing G1/S-phase cell cycle arrest and apoptosis through caspase/cyclin-CDK pathways. *Mol Med Rep* 10:1697–1702.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402–408.
- Luo H, Yang A, Schulte BA, Wargovich MJ, Wang GY. 2013. Resveratrol induces premature senescence in lung cancer cells via ROS-mediated DNA damage. *Plos One* 8:1–11.
- Maga G, Hubscher U. 2003. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A dancer with many partners. *J Cell Sci* 116:3051–3060.
- Michels G, Wätjen W, Weber N, Niering P, Chovolou Y, Kampkötter A, Proksch P, Kahl R. 2006. Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells. *Toxicology* 225:173–182.
- Mohapatra P, Satapathy SR, Siddharth S, Das D, Nayak A, Kundu CN. 2015. Resveratrol and curcumin synergistically induces apoptosis in cigarette smoke condensate transformed breast epithelial cells through a p21 (Waf1/Cip1) mediated inhibition of Hh-Gli signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 66:75–84.
- Muller PA, Vousden KH. 2013. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 15:2–8.
- Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. 2005. Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med* 110:21–28.
- Muqbil I, Beck FW, Bao B, Sarkar FH, Mohammad RM, Hadi SM, Azmi AS. 2012. Old wine in a new bottle: The Warburg effect and anticancer mechanisms of resveratrol. *Curr Pharm Des* 18:1645–1654.
- Naryzhny SN, Lee H. 2010. Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer. *FEBS Letters* 584:4292–4298.
- Nie P, Hu W, Zhang T, Yang Y, Hou B, Zou Z. 2015. Synergistic induction of erlotinib-mediated apoptosis by resveratrol in human non-small-cell lung cancer cells by down-regulating survivin and up-regulating PUMA. *Cell Physiol Biochem* 35:2255–2257.
- Oka N, Tanimoto S, Tauc R, Nakatsuji H, Kishimoto T, Izaki H, Fukumori T, Takahashi M, Nishitani M, Kanayama HO. 2006. Role of phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in bladder cancer cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Sci* 97:1093–1098.
- Palakurthy RK, Wajapeyee N, Santra MK, Gazin C, Lin L, Gobeil S, Green MR. 2009. Epigenetic silencing of the *RASSF1A* tumor suppressor gene through *HOXB3*-mediated induction of *DNMT3B* expression. *Mol Cell* 36:219–230.
- Qiu W, Lin J, Zhu Y, Zhang J, Zeng L, Su M, Tian Y. 2017. Kaempferol modulates DNA methylation and downregulates DNMT3B in bladder cancer. *Cell Physiol Biochem* 41:1325–1335.
- Rieger KM, Little AF, Swart JM, Kastrinakis WV, Fitzgerald JM, Hess DT, Libertino JA, Summerhayes IC. 1995. Human bladder carcinoma cell lines as indicators of oncogenic change relevant to urothelial neoplastic progression. *Br J Cancer* 72:683–690.
- Sávio AL, da Silva GN, de Camargo EA, Salvadori DM. 2014. Cell cycle kinetics, apoptosis rates, DNA damage and *TP53* gene expression in bladder cancer cells treated with allyl isothiocyanate (mustard essential oil). *Mutat Res* 762:40–46.
- Scifo C, Cardile V, Russo A, Consoli R, Vancheri C, Capasso F, Vanella A, Renis M. 2004. Resveratrol and propolis as necrosis or apoptosis inducers in human prostate carcinoma cells. *Oncol Res* 14:415–426.
- Selvaraj S, Sun Y, Sukumaran P, Singh BB. 2016. Resveratrol activates autophagic cell death in prostate cancer cells via downregulation of STIM1 and the mTOR pathway. *Mol Carcinog* 55:818–831.
- Shen M, Cai Y, Yang Y, Yan X, Liu X, Zhou T. 2013. Centrosomal protein FOR20 is essential for S-phase progression by recruiting Plk1 to centrosomes. *Cell Res* 23:1284–1295.
- Shin H, Kwon H, Lee J, Gui X, Achek A, Kim J, Choi S. 2015. Doxorubicin-induced necrosis is mediated by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) but is independent of p53. *Sci Rep* 5:1–17.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191.
- Solomon JP, Hansel DE. 2016. The emerging molecular landscape of urothelial carcinoma. *Surg Pathol Clin* 9:391–404.
- Stocco B, Toledo K, Salvador M, Paulo M, Koyama N, Toloi MRT. 2002. Dose-dependent effect of resveratrol on bladder cancer cells: Chemoprevention and oxidative stress. *Maturitas* 72:72–78.
- Tannock IF, Lee C. 2001. Evidence against apoptosis as a major mechanism for reproductive cell death following treatment of cell lines with anti-cancer drugs. *Br J Cancer* 84:100–105.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. 2014. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 507:315–322.
- Tyagi A, Gu M, Takahata T, Frederick B, Agarwal C, Siriwardana S, Agarwal R, Sclafani RA. 2011. Resveratrol selectively induces DNA damage, independent of Smad4 expression, in its efficacy against human head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 17:5402–5411.
- Wang DG, Liu WY, Chen GT. 2013. A simple method for the isolation and purification of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *J Pharm Anal* 3:241–247.
- Wu ML, Li H, Yu LJ, Chen XY, Kong QY, Song X, Shu XH, Liu J. 2014. Short-term resveratrol exposure causes *in vitro* and *in vivo* growth inhibition and apoptosis of bladder cancer cells. *Plos One* 9:89806.
- Zhang X, Han C, He J. 2015. Research progress of oncogene and tumor suppressor gene in bladder cancer. *Panminerva Med* 57:191–200.
- Zhou C, Ding J, Wu Y. 2014. Resveratrol induces apoptosis of bladder cancer cells via miR-21 regulation of the Akt/Bcl-2 signaling pathway. *Mol Med Rep* 9:1467–1473.

Accepted by—
G. Umbuzeiro

10.2. Artigo 2

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences - Decision on Manuscript ID BJPS-2018-0401.R2

ELIZABETH FERREIRA <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Ter, 08/01/2019 10:36

Para: tamires-cunha@hotmail.com <tamires-cunha@hotmail.com>

08-Jan-2019

Dear Miss Almeida:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Polymeric micelles containing resveratrol: development, characterization, cytotoxicity on tumor cells and antimicrobial activity" in its current form for publication in the Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. ELIZABETH FERREIRA
Editor-in-Chief, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences
hajudan@usp.br

Associate Editor
Comments to the Author:
(There are no comments.)

Comments to author:
Reviewer: 1

Comments to the Author
The authors have performed many corrections to their work. In the present form, the article is recommended for publication.



Polymeric micelles containing resveratrol: development, characterization, cytotoxicity on tumor cells and antimicrobial activity

Journal:	<i>Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences</i>
Manuscript ID:	BJPS-2018-0401
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	05-Jun-2018
Complete List of Authors:	Almeida, Tamires; Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia Seibert, Janaina; Universidade Federal de Ouro Preto Almeida, Sávio; Universidade Federal de Ouro Preto Amparo, Tatiane; Universidade Federal de Ouro Preto Teixeira, Luiz Fernando; Universidade Federal de Ouro Preto Barichello, José Mário; Universidade Federal de Pelotas Santos, Orlando; Universidade Federal de Ouro Preto Da Silva, Glenda; Universidade Federal de Ouro Preto
Keyword:	polymeric micelles, F127®, resveratrol, cytotoxic activity, antimicrobial activity

SCHOLARONE™
Manuscripts



<https://mc04.manuscriptcentral.com/bjps-scielo>

1
2
3 **Polymeric micelles containing resveratrol: development, characterization,**
4 **cytotoxicity on tumor cells and antimicrobial activity**
5
6

7 Tamires Cunha Almeida^{1*}, Janaina Brandão Seibert², Sávio Henrique de Souza
8 Almeida¹, Tatiane Roquete Amparo², Luiz Fernando de Medeiros Teixeira³, Jose Mario
9 Barichello⁴, Orlando David Henrique dos Santos² and Glenda Nicioli da Silva¹
10
11

12
13
14 ¹ Laboratório de Pesquisas Clínicas, Departamento de Análises Clínicas, Universidade
15 Federal de Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, 35400-000, Ouro Preto, Minas
16 Gerais, Brazil.
17

18
19 ² Laboratório de Fitotecnologia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de
20 Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, 35400-000 Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.
21

22 ³ Laboratório de Microbiologia, Departamento de Análises Clínicas, Universidade
23 Federal de Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, 35400-000, Ouro Preto, Minas
24 Gerais, Brazil.
25

26
27 ⁴ Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas
28 e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Campus Capão do Leão S/N,
29 96900-010, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.
30

31
32 * corresponding author: Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Morro do
33 Cruzeiro, 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, +55 37 991533051, +55 31
34 35591036, tamires-cunha@hotmail.com
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

The use of resveratrol, a polyphenolic compound found mainly in grapes, is limited by its low solubility in water and low bioavailability. Polymeric micelles can be an approach to solve this problem since they can encapsulate hydrophobic substances. Thus, we developed and characterized micellar formulations containing resveratrol and evaluated their cytotoxic and antimicrobial effects. The formulations were prepared by the cold dispersion method with different concentrations of F127 (5 or 10% w/w) and different concentrations of resveratrol (500 or 5000 μM). The formulations were characterized (size, polydispersity index, encapsulation rate and in vitro release) and its cytotoxic effect was evaluated on a bladder cancer cell line and its antimicrobial effect was evaluated in *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans*. One of the formulations (MS+RES-3) was a monodisperse solution and with a high encapsulation rate, thus it was chosen to the cytotoxicity and antimicrobial assays. MS+RES-3 was able to preserve the antimicrobial activity of resveratrol and presented cytotoxic effects. This is the first study that evaluated antimicrobial potential and cytotoxicity on bladder cancer cells of micellar formulation containing resveratrol and the results showed that micellar nanostructures could ensure the maintenance of the biological activity of resveratrol, favoring its applicability.

Keywords: polymeric micelles, F127®, resveratrol, cytotoxic activity, antimicrobial activity.

Running title: Polymeric micelles containing resveratrol

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

INTRODUCTION

Resveratrol (trans-3, 4', 5-trihydroxystilbene) is a polyphenolic compound found naturally in grapes, blueberries, raspberries and peanuts (Wang *et al.*, 2013). Because of its high concentration in grape skin, significant amounts of resveratrol are present in wine, and it has been proposed to explain the apparent ability of consumption of red wine to reduce the risk of cardiovascular disease (Lippi *et al.*, 2010). Resveratrol also has been reported to have antimicrobial (Lee *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015) and antitumor activities (Selvaraj *et al.*, 2016; Nie *et al.*, 2015).

For over a decade, it has been realized that resveratrol has poor water solubility, low bioavailability due to poor absorption (Subramanian *et al.*, 2010) and rapid metabolism (Baur, Sinclair, 2006), physicochemical and pharmacokinetic properties that make resveratrol difficult to use. To overcome those limitations, several nanosystems have been designed for treatment of cancer and infections (Santos *et al.*, 2011; Figueiró *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2017; Donsi, Ferrari, 2016).

Polymeric micelles have been actively studied as a drug carrier system, in particular for enhancing the solubility of hydrophobic drugs, a particular characteristic of many antitumor and antimicrobial agents. Furthermore, incorporation of substances in the micelles hydrophobic core protect them from inactivation in the body, preventing the drug capture by the mononuclear phagocytic system and increasing the drug circulation time (Kabanov *et al.*, 2009; Yokoyama, 2010).

Pluronics[®] are triblock copolymers of propylene oxide (PO) and ethylene oxide (EO) that can spontaneously self-assemble to form micelles (Kabanov *et al.*, 2002). These copolymers are included in US Federal Drug Administration list generally regarded as safe and biocompatible agents (Oerlemans *et al.*, 2010). Furthermore, they are known to solubilize hydrophobic compounds in the micellar state and have been proven to be effective solubilizers of polyphenols, such as resveratrol (Wang *et al.*, 2017). Among various types of Pluronics[®], Pluronic[®] F127 (F127) has gained considerable attention due to its wide range of biomedical applications (Akash, Rehman, 2015).

Therefore, in this work it has been developed and characterized micellar solutions of Pluronic[®] F127 (F127) containing resveratrol as a formulation for treatment of microbial (bacterial and fungus) infection and cancer. The micellar formulation demonstrated bacteriostatic effects against *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*, and

1
2
3 furthermore demonstrated cytotoxicity on T24 bladder cancer cells. Therefore, this
4 formulation may be a good strategy for the use of resveratrol in biological systems.
5
6

7 8 **MATERIAL AND METHODS**

9 **Preparation of micellar solutions by cold dispersion method**

10 A weighed amount of Pluronic® F127 (5 or 10% wt/wt) was added to a becker
11 containing ultrapure water and kept under moderate magnetic stirring in an ice bath
12 until complete dispersion of the polymer. The solution was kept in refrigerator for 24
13 hours to allow the complete dissolution of the polymer. Subsequently, the resveratrol
14 was added and dispersed under vigorous stirring at room temperature. After preparation,
15 all formulations were filtered on a 0.45 µm filter to eliminate the non-encapsulated
16 resveratrol. The theoretical resveratrol concentration added to the micellar solutions
17 were 500 and 5000 µM. Micelles without resveratrol were also prepared and used as
18 controls.
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **Determination of mean size and zeta potential of the micelles**

28 The particle size and zeta potential values of micelles were determined by
29 Zetasizer (Malvern, model Zetasizer Nano series - Nano ZS) at 25°C. The mean particle
30 size was measured based on photo correlation spectroscopy technique. The zeta
31 potential was determined based on electrophoretic mobility measurements. The
32 experiments were conducted in triplicate.
33
34
35
36
37
38
39

40 **Quantification of resveratrol**

41 Resveratrol was quantified by HPLC/UV method as previously described by
42 Trela and Waterhouse 1996. The equipment used was the Waters e2695 coupled to a
43 UV/Vis Waters 2485 detector. The UV/Vis detector was set at 306 nm. Separation was
44 done on a C18 column (Phenomenex, Luna 5µ, 100Å, 150 x 4.6 mm) at 25°C, by using
45 methanol and ultrapure water (50:50) as mobile phase at a flow rate of 0.8 mL/min. The
46 injection volume was 5.0 µL and the run time for resveratrol was approximately 8
47 minutes.
48
49
50
51
52

53 **Encapsulation efficiency**

54 The amount of resveratrol present on micelles was determined by HPLC/UV
55 method previous described. The formulation was filtrated on 0.45 µm filter to remove
56
57
58
59
60

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bjps-scielo>

1
2
3 non-encapsulated resveratrol and diluted on methanol/water (50:50). The encapsulation
4 efficiency was calculated by the following equation:
5
6

$$7 \quad \text{Encapsulation efficiency} = \frac{\text{resveratrol concentration on micelles}}{\text{initial concentration of resveratrol}} \times 100$$

8 9 10 11 12 13 ***In vitro* resveratrol release assay**

14
15 The *in vitro* release assay of resveratrol encapsulated micelles was performed by
16 dialysis membrane diffusion method at 37 °C for 48 h, maintaining constant
17 temperature and agitation in a horizontally stirred incubator. The donor medium was
18 composed of 1 mL of formulation containing about 0.5 µM resveratrol, and the receptor
19 medium was composed of phosphate buffered saline with 1% tween 80 at sink
20 conditions (Fonseca, 2016). At scheduled times, 1 mL of the receptor medium was
21 collected and the same volume was replaced. The fraction collected was quantified
22 directly, without dilution, by HPLC/UV method previous described.
23
24
25
26
27
28
29

30 31 **Cytotoxicity on tumor cells**

32 The human urothelial carcinoma cell line T24 (from a high grade tumor) was
33 purchased from the Cell Bank of the Federal University of Rio de Janeiro (Rio de
34 Janeiro, Brazil). Cells were maintained in culture medium Dulbecco's Modified Eagle
35 (DMEM) supplemented with 10% bovine fetal serum, 100 U/ml penicillin G, 100 U/ml
36 streptomycin and 2,5 µg/mL amphotericin B in an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.
37
38

39 Cytotoxicity was assessed using the Cell Proliferation Kit II (XTT, ROCHE).
40 Briefly, 1×10⁴ T24 cells were seeded into 96-well culture plates. After 24 hours, the
41 cells were treated with different concentrations of the micellar solutions containing
42 resveratrol (50, 100, 150, 200 and 250 µM) or with free resveratrol during 24 hours.
43 Cells treated with micellar solutions without resveratrol were used as controls. 24 hours
44 after incubation, the cells were washed with Hank's solution (0.4 g KCl, 0.06 g
45 KH₂PO₄, 0.04 g Na₂HPO₄, 0.35 g NaHCO₃, 1 g glucose and 8 g NaCl in 1 L·H₂O).
46 After washing, 12 µL of XTT test solution (1 mL XTT labeling solution/20 µL of
47 electron-coupling reagent) were added to each well, and the absorbance was measured
48 at 492 and 690 nm after 90 minutes. Absorbance results are proportional to the
49 percentage of viable cells. Tests were conducted in triplicate. The results of absorbance
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 were analyzed by One-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey test
4 using the software GraphPad Prism 6.0. A value of $p < 0.05$ was considered statistically
5 significant.
6
7

8 9 **Antimicrobial activity**

10
11 *In vitro* assays were performed using three microorganisms, representing
12 respectively each microbial class (gram positive and gram negative bacteria and yeast):
13 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Candida*
14 *albicans* (ATCC 14408). Bacteria were cultivated in Müeller-Hinton medium by 24
15 h/37° C and yeast was cultivated in Sabouraud medium by 48 h/37° C. All inoculums
16 were prepared by using direct colony suspension method in saline (0.9% NaCl) with
17 colonies selected from a 24 h or 48 h agar plate, before each assay. The suspension was
18 adjusted to achieve a turbidity equivalent to a 0.5 McFarland standard (1×10^8
19 CFU/mL) (CLSI, 2012). Antimicrobial effect of resveratrol and its formulations were
20 evaluated by the microdilution method. In 96 well plates, serial dilutions of 1:2 were
21 made to obtain free and formulated resveratrol in the same concentrations from 250 to
22 0.12 µM. The inoculums (1×10^8 CFU/mL) were diluted 1:100 in Müeller-Hinton broth
23 and were added in each well to obtain a final assay with 5×10^5 CFU/mL (CLSI, 2012).
24 For negative control were added only Müeller-Hinton broth and inoculum. Tetracycline
25 (100.0 µg/mL) or Cetoconazol (100.0 µg/mL) was used as positive control. Formulation
26 without resveratrol was used as formulation control and the control of the broth was
27 made without inoculum. The plates were incubated for 24 h or 48 h at 37°C. After the
28 incubation period, triphenyl tetrazolium chloride TTC (0.25 mg/mL) were added and
29 the plates were again incubated for three hours. The absorbance at 650 nm was
30 determined in an ELISA plate reader (Molecular Devices®). The results of absorbance
31 were analyzed by One-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey test
32 using the software GraphPad Prism 6.0. A value of $p < 0.05$ was considered statistically
33 significant.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 **RESULTS AND DISCUSSION**

51
52 Many studies have demonstrated the *in vitro* antimicrobial and cytotoxic
53 properties for resveratrol (Nie *et al.*, 2015; Selvaraj *et al.*, 2016; Ji *et al.*, 2015; Taylor *et*
54 *al.*, 2014; Hwang, Lim, 2015). However, there are no reports in the literature on the
55 activity of RES micellar systems against bacteria and yeast. Similarly, there are very
56
57
58
59
60

1
2
3 few studies about polymeric micelles containing RES for the cancer treatment (Chan *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2017), and none about this type of formulation on bladder cancer
4
5
6 cells.

7
8 The clinical use of some effective compounds can be impaired by its poor water
9
10 solubility. Thus, the nanotechnology applied in pharmaceutical formulations has been
11
12 used to overcome this problem. Polymeric micelles increase the solubility of
13
14 hydrophobic molecules because of their unique structural composition, which is
15
16 characterized by a hydrophobic core sterically stabilized by a hydrophilic crown (Xu *et al.*, 2013).

17
18 Many approaches have been investigated for micelle preparation. Two main
19
20 strategies may be envisaged to form adequately sized drug-loaded micelles. The direct
21
22 dissolution is a method that involves dissolving both the polymer and the drug in an
23
24 aqueous solvent. Other strategy, implying the use of organic solvents, is relevant when
25
26 both the copolymer and the drug are not readily soluble in water. The copolymer and the
27
28 drug are first dissolved in a common solvent which is then removed (Gaucher *et al.*,
29
30 2005). In this study, the micelles were prepared by using the first quoted method
31
32 because it is preferred when the polymeric materials are only moderately hydrophobic
33
34 in nature, as in the case of Pluronics® (Gaucher *et al.*, 2010), furthermore there are not
35
36 the risk of residual organic solvent, which could be toxic.

37
38 Polymeric micelles have a critical micelle concentration (CMC) that is the
39
40 lowest concentration limit for polymers to produce a micelle structure (Chiappetta,
41
42 Sosnik, 2007). When diluted below CMC, polymer micelles are gradually disintegrated
43
44 into unimers and this can affect the efficacy of the formulation. For this reason, it was
45
46 chosen to use the amounts of F127 (5 and 10% w/w) that even after dilutions have
47
48 concentrations greater than its CMC (2.8×10^{-6} M) (Owen *et al.*, 2012). The
49
50 composition of each formulation is shown in the Table I. Additionally, F127 has the
51
52 characteristic of forming hydrogels at high concentrations (> 20% w/w) (Kabanov *et al.*,
53
54 2002), however thermosensitive *in situ* hydrogel was not our aim.

55
56 The ability of the polymeric micelles to increase the aqueous solubility of drugs
57
58 is due to its hydrophobic core that provides a suitable microenvironment to
59
60 accommodate hydrophobic substances (Stammet *et al.*, 2010). In this way, the solubility
of resveratrol in F127 micellar solutions (5000 μ M) was about 30 times greater than its
solubility in water, which is about 131 μ M (Alvarez-Lorenzo *et al.*, 2011), probably due
to the incorporation of the drug in the core of the micelles.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The mean diameter and zeta potential of each formulation are summarized in Table II. The size of micelles is a parameter very important to drug delivery standpoint. The size variation, inside the nanoscale range, affects the blood circulation time and the bioavailability of the micelles (Kabanov *et al.*, 2002). Considering several variants, such as renal clearance, penetration on small capillaries, capture by phagocyte system and circulation time, the preferred size range for drug delivery using nanoscale particles is from approximately 10 to 100 nm (Kabanov, Alakhov, 2002), as size observed for the formulations MS+RES-2 and MS+RES-3. Furthermore, all formulations containing resveratrol could be classified as monodisperses ($PI \leq 0.3$), while the formulations without resveratrol were polydispersed ($PI > 0.3$).

The micelles containing resveratrol exhibited size much larger than the micelles without resveratrol, indicative that the F127 micelles encapsulated resveratrol. Interestingly, the size increase was not directly proportional to amount of resveratrol added, that is, MS+RES-1 containing 500 μ M of resveratrol is greater than MS+RES-2 and MS+RES-3 containing 5000 μ M of resveratrol. We suggest that this effect occurred not because of amount of resveratrol, but because of aggregation of two or more micelles, once the formulation MS+RES-1 showed lowest value, in module, of zeta potential (-15,71 mV) and greater zeta potential values are required to stabilize nanoparticles by electric repulsion in liquid medium effectively (Liu *et al.*, 2012).

The Table III shows the results of resveratrol quantified in the formulations. The formulations showed among 95.9 and 96.8 % of encapsulation efficiency. It was not possible to determinate the encapsulation efficiency of MS+RES-2 due to instability of formulation one week after preparation. Based on the above discussion and considering the results of parameters mean particle size, polydispersion index, zeta potential and encapsulation efficiency, the formulation MS+RES-3 was chosen to continue the study.

The *in vitro* release of resveratrol from MS+RES-3 was evaluated by the dialysis method. As showed in Figure 1, there was a very low release of RES from the formulation MS+RES-3. In 24 hours, only 0.45% of the resveratrol encapsulated in the micelles was released and in 48 hours, only 0.91% of resveratrol was released. The release of hydrophobic drugs from structured nanoparticles in the form of core-corona is very dependent on the hydrophobic properties of the nucleus (Fournier *et al.*, 2002). In the case of micelles formed by copolymers, the release rate is strongly influenced by the interaction forces occurring between the drug and the nucleus of the micelles (Liu *et al.*, 2004). Therefore, the high encapsulation rates, which are possibly determined by the

1
2
3 strong interaction between resveratrol and the nucleus of F127 micelles, corroborate
4 with the low release *in vitro*, showed for formulation MS+RES-3.
5

6 We evaluated the cytotoxic effects of MS+RES-3 on bladder cancer cells. As
7 showed in Figure 2, cytotoxicity was observed in the T24 cell line after treatment with
8 the MS+RES-3 and free resveratrol at 150, 200 and 250 μM . Furthermore, the IC_{50} for
9 MS+RES-3 (151.5 μM) was smaller than the IC_{50} for free RES (178.73 μM). Thus, we
10 can affirm that the micellar formulation was able to preserve and to improve the
11 cytotoxic activity of resveratrol. Studies have showed that polymeric micelles based on
12 Pluronics[®] can undergo internalization in cells and the general mechanism for entrance
13 is endocytose (Batrakova *et al.*, 2008). On the other hand, some experiments indicate
14 that encapsulated compounds may be released from the micelle and enter cells
15 separately (Chen *et al.*, 2008). Based on these findings and the *in vitro* release results,
16 which showed low release of RES during the same period used in the treatment of
17 tumor cells, we suggest that the significant reduction of viability in the T24 cells was
18 due to the internalization of the micelles by these cells.
19

20 The effect of formulations on *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* was
21 demonstrated by incubating these microorganisms with various concentrations of free
22 and formulated resveratrol according to Figure 3. For *S. aureus* it was found that
23 MS+RES-3 and free resveratrol were able to reduce the number of viable
24 microorganism at all tested concentration. For *E. coli*, MS+RES-3 and free resveratrol
25 reduce the number of viable microorganism from 62.5 μM and 7.81 μM , respectively.
26 For *C. albicans*, only the highest concentration of free resveratrol and MS+RES-3
27 caused reduction of viable microorganism.
28

29 Free and formulated resveratrol demonstrated lower values of viability inhibition
30 to inhibit *S. aureus* growth (0.12 μM) than to inhibit *E. coli* (7.81 μM and 62.5 μM ,
31 respectively) and *C. albicans* (250 μM) growth. Most of cell wall of gram positive
32 bacteria consists only of a peptidoglycan layer and it can be easily penetrated (Donsi,
33 Ferrari, 2016). The cell wall structure of gram negative bacteria is characterized by an
34 outer membrane constituted essentially with lipopolysaccharides, which confers greater
35 resistance (Bezić *et al.*, 2003). The main component of the cell wall of fungi is chitin
36 and ergosterol that modulates the fluidity of the membrane and prevents its alterations
37 (Thevissen *et al.*, 2003). Thus, generally, drugs have bigger effect against the gram
38 positive bacteria.
39

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The formulation MS+RES-3 showed a slight improvement in the antimicrobial activity of resveratrol to *S. aureus*, but not to the other microorganisms tested, in which it was only able to maintain the activity. This finding could be due to differences in their cell membrane constituents and structure that provide different types of interaction by resveratrol and formulation (Bhawana *et al.*, 2011).

Despite MS+RES-3 formulation does not present statistical increase of antimicrobial activity, it is still an alternative for resveratrol use. Nanostructured systems provide antimicrobial advantages such as overcoming physical barriers and reaching difficult sites of action (Rossi *et al.*, 2017). In relation to its use in tumor cells, besides the improvement that the formulation caused in the cytotoxic activity of resveratrol, with reduction of the IC₅₀, this kind of formulation is able to facilitate the delivery of drugs to cancer cells through the effect of increased permeability and retention. The aberrant fenestration on the blood vessels surrounding tumor tissues causes enhanced permeability of molecules of certain size to the tumor microenvironment, and poor lymphatic drainage in the tumor area allows retention of the extravasated nanocarriers (Fang *et al.*, 2011). Furthermore, some micellar formulations have already been conducted for clinical trials (Lee *et al.*, 2008; Valle *et al.*, 2010; Plummer *et al.*, 2011), showing that they are possible formulations for clinical practice.

To our knowledge, this is the first study that evaluated antimicrobial potential and cytotoxicity on bladder cancer cells of micellar formulation containing resveratrol, suggesting that converting this active to nano-scale particles can feasible better its use, since we showed improvement in solubility of resveratrol and good parameters of size, PI and zeta potential.

CONCLUSION

Resveratrol and micellar formulation demonstrated bacteriostatic effects against *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*, and furthermore demonstrated cytotoxicity on T24 bladder cancer cells. These results showed that micellar nanostructures could ensure the maintenance of the biological activity of resveratrol, besides favoring its applicability in biological systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bjps-scielo>

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (CBB-APQ-01497-14 and PPM-00282-11) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-441836/2014-3).

REFERENCES

Akash MS, Rehman K. Recent progress in biomedical applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives. *J Control Release*. 2015;209:120-38.

Alvarez-Lorenzo C, Sosnik A, Concheiro A. PEO-PPO block copolymers for passive micellar targeting and overcoming multidrug resistance in cancer therapy. *Curr Drug Targets*. 2011;12:1112-1130.

Batrakova EV, Li S, Vinogradov SV, Alakhov VY, Miller DW, Kabanov AV. Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299:483-493.

Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:493-506.

Bezić N, Skočibušić M, Dunkić V, Randonić A. Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. *Phytother Res*. 2003;17:1037-1040.

Bhawana, Basniwal RK, Buttar HS, Jain VK, Jain N. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization and antimicrobial study. *J Agr Food Chem*. 2011;59:2056-2061.

Chan MM. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem Pharmacol*. 2001;63:99-104.

Chen H, Kim S, Li L, Wang S, Park K, Cheng J. Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Förster resonance energy transfer imaging. *P Natl Acad Sci-Biol*. 2008;105:6596-6601.

Chiappetta DA, Sosnik A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;66:303-317.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 2th ed. 2012;32:1-88.

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bjps-scielo>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Donsi F, Ferrari G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *J Biotechnol.* 2016;233:106-120.

Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63:136-151.

Figueiró F, Bemardi A, Frozza RL, Terroso T, Zanotto-Filho A, Jandrey EH, et al. Resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules treatment reduces *in vitro* and *in vivo* glioma growth. *J Biomed Nanotechnol.* 2013;9:516-526.

Fonseca DP. Obtenção, caracterização e avaliação das atividades antioxidante e antitumoral *in vitro* de nanopartículas de albumina contendo resveratrol [dissertation]. Universidade Estadual do Centro-Oeste; 2016.

Fournier E, Dufresne MH, Smith DC, Ranger M, Leroux JC. A novel one-step drug-loading procedure for water-soluble amphiphilic nanocarriers. *Pharm Res.* 2004;21:962-968.

Gaucher G, Dufresne M, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux J. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release.* 2005;109:169-188.

Gaucher G, Satturwar P, Jones M, Furtos A, Leroux J. Polymeric micelles for oral drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;76:147-158.

Hwang D, Lim Y. Resveratrol antibacterial activity against *Escherichia coli* is mediated by Z-ring formation inhibition via suppression of FtsZ expression. *Sci Rep.* 2015;5:10029.

Ji Q, Liu X, Han Z, Zhou L, Sui H, Yan L, et al. Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- β 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression. *BMC Cancer.* 2015;15:97.

Kabanov AV, Alakhov VY. Pluronic® block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. *Crit Rev Ther Drug.* 2002;19:1-73.

Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release.* 2002;82:189-212.

Lee J, Lee DG. Novel antifungal mechanism of resveratrol: apoptosis inducer in *Candida albicans*. *Curr Microbiol.* 2015;70:383-389.

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bjps-scielo>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Lee K, Lee JH, Ryu SY, Cho MH, Lee J. Stilbenes reduce *Staphylococcus aureus* hemolysis, biofilm formation and virulence. *Foodborne Pathog Dis.* 2014;11:710-717.

Lee KS, Chung HC, Im SA, Park YH, Kim CS, Kim SB, et al. Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Tr.* 2008;108:241-250.

Lippi G, Franchini M, Favalaro EJ, Targher G. Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox". *Semin Thromb Hemost.* 2010;36:59-70.

Liu J, Xiao Y, Allen C. Polymer-drug compatibility: a guide to the development of delivery systems for the anticancer agent, ellipticine. *J Pharm Sci.* 2004;93:132-43.

Liu X, Jiang Z, Han J. Increasing solubility of poorly water soluble drug resveratrol by surfactants and cyclodextrins. *Adv Mat Res.* 2012;418-420:2231-2234.

Nie P, Hu W, Zhang T, Yang Y, Hou B, Zou Z. Synergistic induction of erlotinib-mediated apoptosis by resveratrol in human non-small-cell lung cancer cells by down-regulating survivin and up-regulating PUMA. *Cell Physiol Biochem.* 2015;35:2255-2257.

Oerlemans C, Bult W, Bos M, Storm G, Nijsen JF, Hennink WE. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm Res.* 2010;27:2569-2589.

Owen SC, Chan DPY, Shoicheta MS. Polymeric micelle stability. *Nano Today.* 2012;7:53-65.

Plummer R, Wilson RH, Calvert H, Boddy AV, Griffin M, Sludden J, et al. A Phase I clinical study of cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumours. *Brit J Cancer.* 2011;104:593-598.

Rossi GG, Guterres KB, Bonez PC, Gundel SS, Aggert VA, Siqueira FS, et al. Antibiofilm activity of nanoemulsions of *Cymbopogon flexuosus* against rapidly growing mycobacteria. *Microb Pathogenesis.* 2017;113:335-341.

Santos AC, Veiga F, Ribeiro AJ. New delivery systems to improve the bioavailability of resveratrol. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011;8:973-990.

Selvaraj S, Sun Y, Sukumaran P, Singh BB. Resveratrol activates autophagic cell death in prostate cancer cells via downregulation of STIM1 and the mTOR pathway. *Mol Carcinog.* 2016;55:818-831.

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bjps-scielo>

1
2
3 Stammet M; Kwon GS, Rao DA. Drug loading in Pluronic[®] micelles made by solvent
4 casting and equilibrium methods using resveratrol as a model drug. *J Control Release*.
5 2010;148:21–56.
6

7
8 Subramanian L, Youssef S, Bhattacharya S, Kenealey J, Polans AS, van Ginkel PR.
9 Resveratrol: challenges in translation to the clinic – a critical discussion. *Clin Cancer*
10 *Res*. 2010;16:5942-5948.
11

12
13 Taylor EJM, Yu Y, Champer J, Kim, J. Resveratrol demonstrates antimicrobial effects
14 against *Propionibacterium acnes* in vitro. *Dermatol Ther*. 2014;4:249-257.
15

16
17 Thevissen K, Ferket KKA, François IEJA, Cammue BPA. Interactions of antifungal
18 plant defensins with fungal membrane components. *Peptides*. 2003;24:1705-1712.
19

20
21 Trela BC, Waterhouse AL. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *J*
22 *Agric Food Chem*. 1996;44:1253-1257.
23

24
25 Valle J, Armstrong A, Newman C, Alakhov V, Pietrzynski G, Brewer J, et al. A phase
26 II study of SP1049C, doxorubicin in P-glycoprotein-targeting pluronics, in patients with
27 advanced adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Invest New*
28 *Drugs*. 2010;29:1029–1037.
29

30
31 Wang DG, Liu WY, Chen GT. A simple method for the isolation and purification of
32 resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *J Pharm Analysis*. 2013;3:241–247.
33

34
35 Wang J, Liu Q, Yang L, Xia X, Zhu R, Chen S, et al. Curcumin-loaded
36 TPGS/F127/P123 mixed polymeric micelles for cervical cancer therapy: formulation,
37 characterization, and in vitro and in vivo evaluation. *J Biomed Nanotechnol*.
38 2017;13:1631-46.
39

40
41 Xu W, Burke JF, Pilla S, Chen H, Jaskula-Sztul R, Gong S. Octreotide-functionalized
42 and resveratrol-loaded unimolecular micelles for targeted neuroendocrine cancer
43 therapy. *Nanoscale*. 2013;21:9924-9933.
44

45
46 Yokoyama M. Polymeric micelles as a new drug carrier system and their required
47 considerations for clinical trials. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7:145-58.
48

49
50 Zhang M, Dai T, Feng N. A novel solubility-enhanced rubusoside-based micelles for
51 increased cancer therapy. *Nanoscale Res Lett*. 2017;12:274.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60**Table I:** Composition of micellar formulations with resveratrol

Formulation	RES concentration (μM)	% F127
MS+RES-1	500	10
MS+RES-2	5000	5
MS+RES-3	5000	10

RES: resveratrol; F127: Pluronic® F127; MS+RES-1: 10% F127 and 500 μM RES; MS+RES-2: 5% F127 and 5000 μM RES; MS+RES-3: 10% F127 and 5000 μM RES.

Table II: Mean particle size, polydispersion index (PI) and zeta potential

Formulation	Mean particle size (nm)	PI	Zeta potencial (mV)
MS+RES-1	209.70 ± 81.71	0.26 ± 0.03	-15.71 ± 0.51
MS+RES-2	25.67 ± 3.96	0.30 ± 0.03	-22.80 ± 6.68
MS+RES-3	28.32 ± 3.24	0.33 ± 0.15	-29.20 ± 0.32
MS-5	6.30 ± 3.19	0.69 ± 0.38	-12.30 ± 6.17
MS-10	5.30 ± 0.07	0.42 ± 0.03	-11.20 ± 5.14

RES: resveratrol; F127: Pluronic® F127; MS+RES-1: 10% F127 and 500 µM RES; MS+RES-2: 5% F127 and 5000 µM RES; MS+RES-3: 10% F127 and 5000 µM RES; MS-5: 5% F127; MS-10: 10% F127.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60**Table III:** Encapsulation efficiency

Formulation	RES initial concentration (μM)	RES final concentration (μM)	Encapsulation efficiency (%)
MS+RES-1	500	484.10	96.82
MS+RES-2	5000	-	-
MS+RES-3	5000	479.50	95.90

RES: resveratrol; F127: Pluronic® F127; MS+RES-1: 10% F127 and 500 μM RES; MS+RES-2: 5% F127 and 5000 μM RES; MS+RES-3: 10% F127 and 5000 μM RES.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURES TITLES

Figure 1: Release of resveratrol from MS+RES-3 formulation. Each point represents the mean values \pm standard deviation obtained from three experiments.

Figure 2: Percentage of viable T24 cells after treatment with free RES and formulation MS+RES-3 (10% F127 and 5000 μ M). * $p < 0.05$ in relation to control without treatment with resveratrol. Each point represents the mean values \pm standard deviation obtained from three experiments.

Figure 3: Percentage of viable *S. aureus* cells (A), *E. coli* cells (B) and *C. albicans* (C) after treatment with free resveratrol and formulation MS+RES-3 (10% F127 and 5000 μ M). Each point represents the mean values \pm standard deviation obtained from three experiments.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

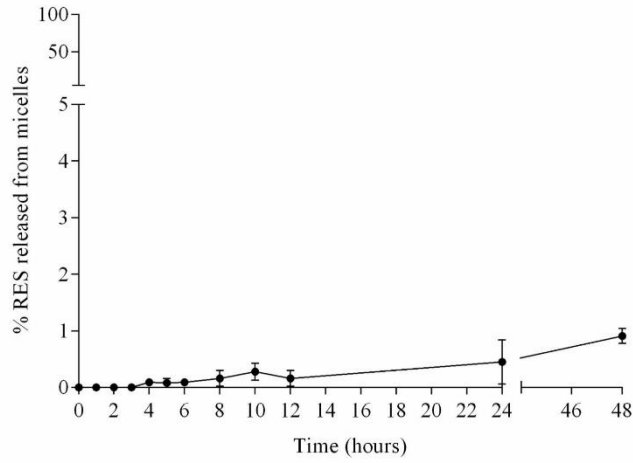


Figure 1: Release of resveratrol from MS+RES-3 formulation. Each point represents the mean values \pm standard deviation obtained from three experiments.

138x99mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

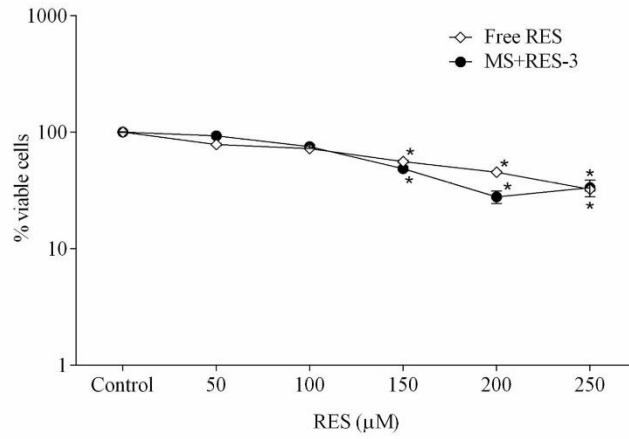


Figure 2: Percentage of viable T24 cells after treatment with free RES and formulation MS+RES-3 (10% F127 and 5000 μM). * $p < 0.05$ in relation to control without treatment with resveratrol. Each point represents the mean values \pm standard deviation obtained from three experiments.

165x110mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

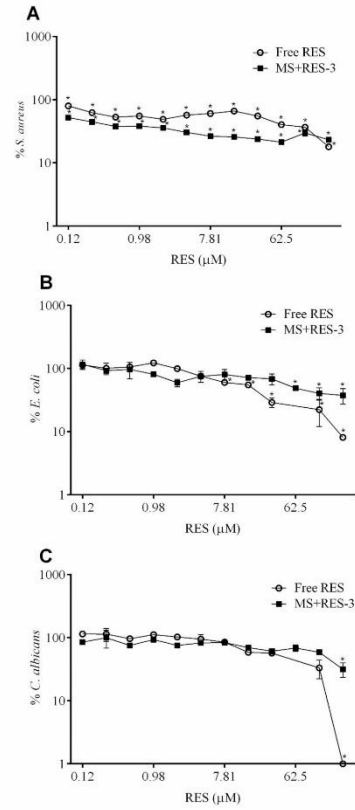


Figure 3: Percentage of viable *S. aureus* cells (A), *E. coli* cells (B) and *C. albicans* (C) after treatment with free resveratrol and formulation MS+RES-3 (10% F127 and 5000 μM). Each point represents the mean values \pm standard deviation obtained from three experiments.

138x283mm (300 x 300 DPI)

10.3. Artigo 3

Anti-Cancer Drugs

Resveratrol induces production of reactive oxygen species, interferes with the cell cycle and inhibits the cell migration of bladder tumor cells with different TP53 status
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	ACD-6166
Full Title:	Resveratrol induces production of reactive oxygen species, interferes with the cell cycle and inhibits the cell migration of bladder tumor cells with different TP53 status
Article Type:	Original Study
Section/Category:	Pre-Clinical Report
Keywords:	bladder cancer; resveratrol; TP53 gene
Corresponding Author:	Glenda da Silva Universidade Federal de Ouro Preto Ouro Preto, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Ouro Preto
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Tamires C. Almeida
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Tamires C. Almeida André S. Melo Ana Paula B. Lima Renata T. Branquinho Glenda da Silva
Order of Authors Secondary Information:	

**Resveratrol induces production of reactive oxygen species, interferes with the cell
cycle and inhibits the cell migration of bladder tumor cells with different *TP53*
status**

Running head: Resveratrol effects on bladder cancer cells

Tamires C. Almeida^a, André S. Melo^b, Ana Paula B. Lima^a, Renata T. Branquinho^a,
Glenda N. da Silva^{a,c,*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (CIPHARMA), Universidade
Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.

^b Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais,
Brazil.

^c Programa de Pós-graduação em Ciência Biológicas (CBIOL), Universidade Federal de
Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.

* Corresponding author: Glenda Nicioli da Silva, Departamento de Análises Clínicas,
Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro,
Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, 35.400-000. Tel.: +55 31 35591036. Email:
nicioli@ufop.edu.br

Conflict of Interests: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
(grant number CBBAPQ-01497-14), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
e Tecnológico (grant number CNPq-441836/2014-3), Universidade Federal de Ouro
Preto (grant number 23109.004080/2019-88), and Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior (Finance Code 001).

Abstract

The resveratrol is a polyphenolic compound found mainly in grapes which antitumor activity has been studied in several types of cancer. Although its activity and selectivity has already been demonstrated in bladder cancer cells, there are few studies on its molecular mechanisms of action in this type of cancer. Therefore, the aim of this study was to evaluate resveratrol antitumor activity and its possible mechanisms of action in bladder tumor cells with different *TP53* gene status (RT4, grade 1, *TP53* wild type; 5637-grade 2 and T24-grade 3, *TP53* mutated). Cytotoxicity, cell proliferation, reactive oxygen species production, cell migration, nuclear division index (NDI), mutagenicity and relative expression profiles of *CDH1*, *CTNNBIP1*, *HAT1*, *HDAC1*, *MYC* and *SMAD4* were evaluated. Resveratrol was cytotoxic in all cell lines, however, *TP53* mutated cells were more resistant. The increase of reactive oxygen species production after resveratrol treatment was accompanied by reduced cell proliferation in all cell lines as well as decrease of NDI. Treatment with resveratrol was not mutagenic. In *TP53* wild type cells, the inhibition of cell migration was accompanied by *CDH1* and *SMAD4* gene modulation. In *TP53* mutated cells, cell migration inhibition with *CDH1* and *CTNNBIP1* upregulation was observed. Additionally, there was *HAT* downregulation in RT4 and T24 cells. In conclusion, resveratrol has antiproliferative effect in bladder tumor cells and its mechanism of action occurred through the production of reactive oxygen species, interference with the cell cycle and inhibition of cell migration, independent of *TP53* status.

Key words: bladder cancer, resveratrol, *TP53* gene

Introduction

Bladder cancer is the 10th most common type of cancer worldwide [1]. Incidence and mortality rates are elevated in North America and Europe and low in South and Central America, although the number of new cases in some countries such as Brazil and Cuba has increased significantly in recent years [2]. Bladder tumors can be classified as superficial or muscle invasive, depending on their localization. In general, superficial bladder cancers are treated with resection and intravesical therapy, while muscle invasive types are treated with partial or total cystectomy in combination with chemotherapy [3]. Non-muscle invasive bladder tumors present high rates of recurrence and progression (approximately 60-70%). Furthermore, there has been no improvement in survival rates for bladder cancer in the last three decades [4].

The *TP53* gene plays an essential role in the regulation of the cell cycle and apoptosis and therefore contributes to cellular transformation and malignancy [5]. Mutations in the *TP53* gene commonly occur in muscle-invasive bladder cancer and are associated with increased angiogenesis, invasiveness, metastasis, recurrence and poor prognosis [6]. However, little is known about the differential gene expression patterns in human tumors that present with the wild-type or mutated *TP53* gene and the chemotherapy response [7].

It has been estimated that up to 33% of cancer cases are preventable by changes in diet and associated factors [8]. Furthermore, natural products are a very important source of compounds in the discovery and development of new drugs [9]. Regarding antitumor drugs, more than 60% are natural products or derived from natural products [10]. Compounds derived from plants have received special attention due to chemopreventive and/or therapeutic effects on various cancers, including the induction or suppression of specific cellular inflammatory activities, alteration of molecular

signaling pathways, induction of apoptosis and antiproliferative activity [11]. Furthermore, these substances possess an ability to preferentially destroy malignant cells with low levels of toxicity to non-neoplastic cells [12].

Resveratrol is a polyphenolic compound found in grapes, berries and peanuts [13]. Plants produce resveratrol in response to environmental stress, such as exposure to sunlight and heavy metals, climate change and pathogenic microorganism infection [14]. Several studies demonstrated its antitumor effects on different types of cancer [15], including bladder cancer [16-18]. Additionally, non-tumor cells were more resistant to resveratrol treatment than tumor cells, indicating selectivity [19]. Despite all these findings, few studies have been performed to better understand the molecular effects of resveratrol on different types of cancer and different *TP53* status cells.

Considering the evidence of antineoplastic potential of resveratrol and the importance of *TP53* mutations in bladder cancer, the aim of this study was to investigate the effects of resveratrol on cellular responses and gene (*CDH1*, *CTNNBIP1*, *HAT1*, *HDAC1*, *MYC* and *SMAD4*) expression in bladder cancer cell lines with a wild type (wt) or mutated *TP53* gene. Our results will help to clarify the mechanism of action of resveratrol.

Methods

Materials

Resveratrol (> 99%), Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), penicillin G, streptomycin, trypsin, neutral red, trypan blue, cytochalasin and 2,7-dichlorofluorescein diacetate were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, United States). Fetal bovine serum was purchased from Cultilab Ltda. (Campinas, Brazil). Amphotericin B was purchased from Cristália

(Itapira, Brazil). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Neon (Suzano, Brazil). Giemsa solution was purchased from Dinâmica (Diadema, Brazil).

Resveratrol

Resveratrol was solubilized at a concentration of 500 μM in culture medium with 2% DMSO immediately before its use. For each assay the same concentration of DMSO was also used as controls.

Cell lines

The cell lines RT4, 5637, and T24 from human bladder carcinoma were obtained from the cell bank of Rio de Janeiro, Brazil. The 5637 and T24 cells were obtained from high-grade bladder tumors. The 5637 cells contain two *TP53* mutations, one at codon 72 (Arg > Pro) and another at codon 280 (Arg > Thr) [20, 21]. T24 cells contain a *TP53* allele encoding an in-frame deletion of tyrosine 126 [20]. The RT4 cells were obtained from a low-grade papillary bladder tumor with wild type *TP53* gene. The RT4 and T24 cell lines were maintained in DMEM and the 5637 cells were maintained in RPMI medium. Both culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin G, 100 U/mL streptomycin and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B. Cells were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 .

Cytotoxicity and cell proliferation

Cytotoxicity and cell proliferation rates were assessed by neutral red uptake and trypan blue exclusion assays. Initially, 1×10^4 cells were plated in 96-well plates. After 24 hours, the cells were treated with different concentrations of resveratrol (12.5, 25, 50, 100, 150 and 200 μM) for 24 hours. The concentrations and treatment time were

defined based on the studies made by Lin et al. [17], Bai et al. [18], and Almeida et al. [22]. Untreated cells were cultured in parallel as a negative control.

For evaluating cytotoxicity and cell proliferation using neutral red uptake assay, the cells were washed with Hanks' solution (0.4 g KCl, 0.06 g KH₂PO₄, 0.04 g Na₂HPO₄, 0.35 g NaHCO₃, 1g glucose and 8 g NaCl in 1000 mL H₂O) and complete fresh medium was added to the cell proliferation assay. Cells were sampled for cytotoxicity and cell proliferation assays immediately and at 24 hours after treatment, respectively. Briefly, the neutral red solution (50 µg/mL) was added and the cells were incubated for 3 hours. Afterwards the cells were washed with PBS (without calcium and magnesium) and fixed with glutaraldehyde 5%. The desorb solution was added and the plate was horizontally shaken for 10 minutes. The absorbance was measured at 570 nm. Absorbance results are proportional to the percentage of viable cells. Both tests were conducted in triplicate.

For evaluating cytotoxicity and cell proliferation using trypan blue exclusion assay, the cells were washed with Hanks' solution and detached using trypsin. Cells were sampled for cytotoxicity and cell proliferation assays immediately and at 24 hours after treatment, respectively. The cell suspension was centrifuged at 2000 rpm for 15 minutes. The supernatant was discarded and the cells were resuspended in 50 µL of culture medium. Trypan blue solution (4%) was added to the cell suspension (5 µL trypan blue in 10 µL cell suspension) and the mixture was incubated for 5 minutes. Viable cells (unstained by trypan blue) were counted in a Neubauer chamber. Both tests were conducted in triplicate.

Quantification of reactive oxygen species

Reactive oxygen species were quantified using 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a fluorescent probe [23]. The cells were plated on a 96-well plate (7×10^4 cells/well) and incubated for 24 hours. Then, cells were treated with different concentrations of resveratrol (50, 100 and 150 μM) for 24 hours. Untreated cells were used as controls. After treatment, the cells were stained in phenol red free culture medium containing 10 μM DCFH-DA and incubated in the dark for 30 minutes at 37°C. After labeling, the cells were washed twice with Hanks' solution. Fluorescence reading was performed on a fluorescence plate reader using wavelengths of 485 nm for excitation and 535 nm for emission. Tests were conducted in triplicate.

Wound healing assay

Wound healing assay was carried out as previously described by Gándara et al. [24] with minor modifications. The cells were plated on 12-well plates (5×10^5 cells/well). After 24 hours, the cell monolayer was scraped with sterile 200 μL tip to create a wound. The wound was photographed using an inverted microscope with camera attached. The cells were washed and treated with 150 μM of resveratrol for 24 hours. Untreated cells were used as controls. After the treatment, cell migration was photographed. Cell motility quantification was performed using ImageJ software by measuring the wound width in three random selected microscopic fields.

Cytokinesis-block micronucleus assay and nuclear division index (NDI)

The micronucleus assay was performed based on the technique described by Fenech [25]. Initially, 1×10^6 cells were placed in Petri dish (100 mm \times 20 mm). After 24 hours, cells were treated with resveratrol at 50, 100 and 150 μM for 4 hours [25]. Cells treated with doxorubicin at a concentration of 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 2 hours were used as

a positive control. After the treatment, 15 μ L of cytochalasin B solution (2 mg/mL in DMSO) were added and the cells were incubated again for 24 (T24 and 5637) or 44 (RT4) hours [26]. At the end of the incubation stage, cells were collected and centrifuged at 57xG for 5 minutes. The supernatant was discarded and 5 mL of cold hypotonic solution (0.075 M KCl) were added. After another centrifugation stage (57 xG, 5 minutes), the supernatant was discarded and the cells were fixed with 5 mL of methanol/acetic acid (3:1) solution and formaldehyde. The slides were prepared, stained with 5% Giemsa solution and analyzed under a light microscope at 1000x magnification. The assay was performed in triplicate.

One thousand binucleated cells were analyzed in each slide to determine the frequencies of micronucleated cells. Five hundred cells were analyzed in each slide to determine the NDI. The NDI was calculated as previously described by Fenech et al. [25]: $NDI = M1 + 2 (M2) + 3 (M3) + 4 (M4) / N$, whereas M1-M4 is the number of cells with 1-4 nuclei and N is the total number of viable cells.

CDHI, CTNNBIP1, HAT1, HDAC1, MYC and SMAD4 gene expression

Cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/25 cm³ culture flask and incubated for 24 hours. Then, the cells were treated with resveratrol (50, 100 and 150 μ M) for 24 hours. Immediately after the treatment, cells were washed with Hanks' solution and collected for RNA extraction. Total RNA was isolated using the miRNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations and purities and quality were determined using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) and 2% agarose gel, respectively. The cDNA synthesis was carried out using the High Capacity kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. *CDHI* (Hs00170423), *CTNNBIP1* (Hs00172016), *HAT1* (Hs00186320),

HDAC1 (Hs02621185), *MYC* (Hs01570247) and *SMAD4* (Hs00929647) gene expressions were performed using the TaqMan system (Applied Biosystems). *GAPDH* (Hs99999905_m1) was used as housekeeping gene. For every PCR sample, a negative (no template) control was processed as a routine control.

Relative gene expression data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Fold change and fold regulation values were calculated as described by Livak and Schmittgen [27]. Fold regulation represents fold change results in a biologically meaningful way. Fold change values greater than one indicate an up-regulation and the fold regulation is equal to the fold change. Fold change values less than one indicate a down-regulation and the fold regulation is the negative inverse of the fold change.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism® 5. The data were analyzed using the one-way ANOVA, and *post hoc* analysis by Tukey's test. The results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

Cytotoxicity and cell proliferation

Neutral red uptake

Significant cytotoxicity was detected in RT4 cells 24 hours after treatment with resveratrol at the concentrations of 50, 100, 150 and 200 μM . For 5637 and T24 cells the cytotoxic effect was observed at 100, 150 and 200 μM of resveratrol (Fig. 1-A). The IC_{50} values were estimated to be 97.11 μM for RT4 cells, 220.08 μM for 5637 cells and 198.38 μM for T24 cells.

Significant decrease of cell proliferation was detected in all cell lines for all tested concentration of resveratrol, except 12.5 μM (Fig. 1-B).

Trypan blue exclusion

Cytotoxic effect was observed in RT4 cells after treatment with resveratrol at 50, 100, 150 and 200 μM . In 5637 cells, the cytotoxic effect was observed at 100, 150 and 200 μM and in T24 cells at 200 μM (Fig. 1-C). The IC_{50} values were estimated to be 83.58 μM for RT4 cells, 148.58 μM for 5637 cells and 163.16 μM for T24 cells.

There was significant decrease of cell proliferation at 50, 100, 150 and 200 μM of resveratrol in RT4 and 5637 cells. Significant decrease of cell proliferation was detected in T24 cell for all tested concentration of resveratrol, except 12.5 μM (Fig. 1-D).

Quantification of reactive oxygen species

There was a significant increase in the production of reactive oxygen species after treatment with resveratrol at all concentrations tested to RT4 cells and at 100 and 150 μM to 5637 and T24 cells (Fig. 2).

Wound healing assay

Resveratrol treatment inhibited cell migration in all cell lines studied. Furthermore, there was an increase in the width of the wound (14.34% for RT4, 2.03% for 5637 and 19.38% for T24) probably caused by cell death (Fig. 3). There was no significant difference between DMSO control and untreated control (data not shown).

Cytokinesis-block micronucleus assay and NDI

In all cell lines, resveratrol treatment did not cause an increase in the frequency of micronuclei (Table 1). There was a significant decrease in NDI after treatment with resveratrol in all cell lines (Table 2).

CDHI, CTNNBIP1, HAT1, HDAC1, MYC and SMAD4 gene expression

In RT4 cells, *CDHI* gene was upregulated while *SMAD4* and *HAT* genes were downregulated after resveratrol treatment. In 5637 cells, *CDHI* and *CTNNBIP1* genes were upregulated after resveratrol treatment. In T24 cells, *CDHI* and *CTNNBIP1* genes were upregulated and *HAT* gene was downregulated after resveratrol treatment (Fig. 4). The fold change values are shown in Table 3.

Discussion

The potential of resveratrol as a new possibility for cancer treatment was demonstrated in several studies, including clinical trials [28, 29]. However, regarding bladder cancer, it is necessary to better study its mechanisms of action, especially understanding its relationship with the *TP53* gene status due to the importance of this gene in bladder cancer [30].

In this study, we used two methods that evaluate different cellular endpoints to determine the cell viability after treatment with resveratrol. The neutral red uptake method is based on the ability of the neutral red compound (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride) to pass the cell membrane and to concentrate in lysosomes of viable cells [31]. The trypan blue exclusion assay is based on cell membrane integrity, since viable cells with intact membranes are impermeable to this polar dye [32]. Both endpoints indicated that *TP53* mutated cells were approximately two times more resistant to resveratrol cytotoxic effects than wild type *TP53* cells.

Mutations in *TP53* are often connected to resistance to standard medications, including cisplatin, doxorubicin and gemcitabine [33]. Since p53 serves as a central inducer of apoptosis, *TP53* mutations can protect, at least partially, from this death pathway induced by drugs. Additionally, the functions of p53 extend to several non-apoptotic forms of cell death and other processes such as DNA repair, autophagy and senescence [34], which are all known to affect anticancer drug responses.

We also observed that there was a decrease on cell proliferation rates in all cell lines. This result provided evidence that the resveratrol concentrations used led to the loss of reproductive integrity, probably due to its sustained lethal damage independently of *TP53* status. The significant decrease of NDI values after treatment with resveratrol also confirmed its antiproliferative effects since this parameter provides a measure of the proliferative status of the viable cell fraction and can be used as a marker of cytostatic effect [35]. These findings are in agreement with our previous observation of decrease of RT4, 5637 and T24 cell colonies in clonogenic survival assay after resveratrol treatment [22].

Resveratrol treatment caused an increase in the production of reactive oxygen species in all cell lines studied. This effect may be at least partially responsible for the reduction in cell proliferation caused by resveratrol treatment. It seems contradictory that resveratrol, a compound widely known for its anti-oxidant effect, causes the increase of reactive oxygen species production and produces oxidative stress. However, it is important to note that resveratrol is a polyphenol, a compound that can act as both anti-oxidant and pro-oxidant, depending on its concentration, its redox potential, the presence of metal ions and the pH of the medium [36]. Several studies have confirmed that high resveratrol concentrations induce excessive production of reactive oxygen species in tumor cells [37, 38].

The oxidative stress caused by resveratrol treatment is possibly related to primary DNA damage caused by this compound as previously reported [22]. Nevertheless, it was not detected mutagenic effects in the micronucleus assay. These results suggest that resveratrol, although genotoxic, is not aneugenic or clastogenic to mutated or wt *TP53* cells. Lee et al. [39] also did not find mutagenic effects in promyelocytic leukemia cells after treatment with resveratrol.

While cell migration is crucial in development and tissue repair, it also mediates diseases such as cancer [40]. The traditional view of cancer metastasis is based on the notion that single cells detach from primary tumors, enter the blood and lymphatic vessels and finally colonize in healthy tissues to form a secondary tumor [41]. We demonstrated that resveratrol treatment reduced cell migration rates in all studied cell lines. This modulation was accompanied by *CDH1* upregulation (2.49-upregulation at 150 μ M for RT4, 1.98- and 3.65-upregulation at 100 and 150 μ M, respectively, for 5637 and 1.83-upregulation for T24). This gene encodes a protein (cadherin 1) that mediates cell-cell adhesion [42]. Loss of *CDH1* expression is one of the characteristics observed in epithelial-mesenchymal transition, a process often observed in carcinogenesis in which an epithelial cell loses cell-cell polarity and adhesion, acquiring migratory and invasive properties [43].

In wt *TP53* cells, the reduction of *SMAD4* expression (4.54-, 6.67- and 4.35-fold downregulation at 50, 100 and 150 μ M, respectively) probably also contributed to the reduction of cell migration. Li et al. [44] showed that the Nodal/ALK/Smad4 signaling pathway is related to cell migration in RT4 cells. *NODAL* (Nodal Growth Differentiation Factor) functions as an oncogene by regulating migration and invasion via the ALK/Smad signaling pathway. *NODAL* knockdown inhibits *SMAD4* expression, resulting in inhibited migration and invasion.

In *TP53* mutated cell lines, the reduction of cell migration caused by resveratrol was also accompanied by *CTNNB1P1* upregulation (4.81-fold upregulation for T24 at 150 μ M and 1.58-, 2.13- and 2.65-fold upregulation for 5637 at 50, 100 and 150 μ M, respectively). The *CTNNB1P1* encoded protein (catenin beta interacting protein 1) is a negative regulator of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. It was demonstrated the participation of this pathway in the regulation of cell proliferation and migration in bladder cancer [45].

The *MYC* oncogene expression is related to the transcription of genes involved in processes such as angiogenesis, metastasis and cell migration [46]. Wang et al. [47] found cell proliferation inhibition and decrease of cell migration rates in breast cancer, which was accompanied by a reduction of c-myc protein levels. In contrast, we did not detect any changes in *MYC* expression in either wild type or mutated *TP53* cells, suggesting that this gene is not involved in resveratrol effects in bladder cancer cells.

Several natural products have been studied as possible acetylation modulators for cancer treatment [48]. Acetylation is the most common post-translational epigenetic modification. The balance between acetylation and deacetylation through the enzymes histone acetyltransferases and deacetylases regulates the general level of acetylation [49]. We did not observe modulation of *HDAC1* expression, however there was decrease of *HAT1* expression in RT4 and T24 cells after resveratrol treatment (1.49-fold downregulation for RT4 at 150 μ M and 2.56-, 4.17- and 3.70-fold downregulation for T24 at 50, 100 and 150 μ M, respectively). High expression of *HAT1* is related to several kinds of cancer and could reflect its role in chromatin assembly [50]. This process needs to be maintained with a high capacity to accompany the continuing DNA replication of tumor cells. Yang et al. [51] showed that depletion of *HAT1* sensitized cells to DNA

damage compromised the global chromatin structure, inhibited cell proliferation and induced cell death.

In conclusion, resveratrol presented antiproliferative activity independent of *TP53* status in bladder cancer cells, interfering with the cell cycle, inducing production of reactive oxygen species and inhibiting the cell migration.

Acknowledgements

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (grant number CBBAPQ-01497-14), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant number CNPq-441836/2014-3), Universidade Federal de Ouro Preto (grant number 23109.004080/2019-88), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Finance Code 001).

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; **68**:394-424.
2. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol* 2017; **71**:96-108.
3. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, Lotan Y. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2017; **3**:1-19.
4. Berdik C. Unlocking bladder cancer. *Nature* 2017; **551**:S34-S35.
5. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell* 2017; **170**:1062-1078.

6. Mitra AP, Datar RH, Cote RJ. Molecular pathways in invasive bladder cancer: New insights into mechanisms, progression, and target identification. *J Clin Oncol.* 2006; **24**:5552–5564.
7. Stadler WM, Lerner SP, Groshen S, Stein JP, Shi SR, Raghavan D, et al. Phase III study of molecularly targeted adjuvant therapy in locally advanced urothelial cancer of the bladder based on p53 status. *J Clin Oncol* 2011; **29**:3443-3449.
8. Kant AK, Park MF, Hollenbeck Y, Schatzkin A. Patterns of recommended dietary behaviors predict subsequent risk of mortality in a large cohort of men and women in the United States. *J Nutr* 2009; **139**:1374-1380.
9. Yin B, Fang DM, Zhou XL, Gao F. Natural products as important tyrosine kinase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2019; **182**:111664.
10. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 2003; **66**:1022e1037.
11. González-Vallinas M, González-Castejon M, Rodríguez-Casado A, Ramírez De Molina A. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. *Nutr Rev* 2013; **71**:585-599.
12. Liu Y, Feng N. Nanocarriers for the delivery of active ingredients and fractions extracted from natural products used in traditional Chinese medicine (TCM). *Adv Colloid Interface Sci* 2015; **221**:60-76.
13. Wang DG, Liu WY, Chen GT. A simple method for the isolation and purification of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *J Pharm Anal* 2013; **3**:241-247.
14. Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 2009; **486**: 95-102.

15. Rauf A, Imran M, Butt MS, Nadeem M, Peters DG, Mubarak MS. Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018; **58**:1428-1447.
16. Bai Y, Yang H, Zhang G, Hu L, Lei Y, Qin Y, et al. Inhibitory effects of resveratrol on the adhesion, migration and invasion of human bladder cancer cells. *Mol Med Rep* 2017; **15**:885-889.
17. Lin X, Wu G, Huo W, Zhang Y, Jin F. Resveratrol induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction in bladder carcinoma cells. *Int J Urol* 2012; **19**:757-764.
18. Bai Y, Mao Q, Qin J, Zheng X, Wang Y, Yang K, et al. Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest human T24 bladder cancer cells *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo*. *Cancer Sci* 2009; 101:488-493.
19. Zhou C, Ding J, Wu Y. Resveratrol induces apoptosis of bladder cancer cells via miR-21 regulation of the Akt/Bcl-2 signaling pathway. *Mol Med Rep* 2014; **9**:1467-1473.
20. Cooper MJ, Haluschak JJ, Johson D, Schwartz S, Morrison LJ, Lippa M, et al. p53 mutations in bladder carcinoma cell lines. *Oncol Res* 1994; **6**:569-579.
21. Rieger KM, Little AF, Swart JM, Kastrinakis WV, Fitzgerald JM, Hess DT, et al. Human bladder carcinoma cell lines as indicators of oncogenic change relevant to urothelial neoplastic progression. *Br J Cancer* 1995; **72**:683-690.
22. Almeida TC, Guerra CCC, De Assis BLG, de Oliveira Aguiar Soares RD, Garcia CCM, Lima AA, et al. Antiproliferative and toxicogenomic effects of resveratrol in bladder cancer cells with different *TP53* status. *Environ Mol Mutagen.* 2019; **60**:740-751.
23. Rodenak-Kladniew B, Castro A, Stärkel P, De Saeger C, García De Bravo M, Crespo R. Linalool induces cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells through

- oxidative stress generation and modulation of Ras/MAPK and Akt/mTOR pathways. *Life Sci* 2018; **199**:48-59.
24. Gándara L, Sandes E, Di Venosa G, Prack Mc Cormick B, Rodriguez L, Mamone L, et al. The natural flavonoid silybin improves the response to Photodynamic Therapy of bladder cancer cells. *J Photochem Photobiol B* 2014; **133**:55-64.
25. Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res* 2000; **455**:81-95.
26. Savio AL, da Silva GN, de Camargo EA, Salvadori DM. Cell cycle kinetics, apoptosis rates, DNA damage and TP53 gene expression in bladder cancer cells treated with allyl isothiocyanate (mustard essential oil). *Mutat Res* 2014; **762**:40-46.
27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods* 2001; **25**:402-408.
28. Howells LM, Berry DP, Elliott PJ, Jacobson EW, Hoffmann E, Hegarty B, et al. Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases--safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Cancer Prev Res* 2011; **4**:1419-1425.
29. Zhu W, Qin W, Zhang K, Rottinghaus GE, Chen YC, Kliethermes B, et al. Trans-resveratrol alters mammary promoter hypermethylation in women at increased risk for breast cancer. *Nutr Cancer* 2012; **64**:393-400.
30. Ciccarese C, Massari F, Blanca A, Tortora G, Montironi R, Cheng L, et al. Tp53 and its potential therapeutic role as a target in bladder cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2017; **21**:401-414.
31. Triglia D, Sherard Braa S, Yonan C, Naughton GK. Cytotoxicity testing using neutral red and MTT assays on a three-dimensional human skin substrate. *Toxicol In Vitro* 1991; **5**:573-578.

32. Tran SL, Puhar A, Ngo-Camus M, Ramarao N. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *PLoS One* 2011; **6**:e22876.
33. Hientz K, Mohr A, Bhakta-Guha D, Efferth T. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* 2017; **8**:8921-8946.
34. Kruiswijk F, Labuschagne CF, Vousden KH. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; **16**: 393-405.
35. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocol* 2007; **2**:1084-104
36. Biasutto L, Mattarei A, Marotta E, Bradaschia A, Sassi N, Garbisa S, et al. Development of mitochondria-targeted derivatives of resveratrol. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; **18**:5594-5597.
37. Sun W, Wang W, Kim J, Keng P, Yang S, Zhang H, et al. Anti-cancer effect of resveratrol is associated with induction of apoptosis via a mitochondrial pathway alignment. *Adv Exp Med Biol* 2008; **614**:179-186.
38. Low ICC, Chen ZX, Pervaiz S. Bcl-2 modulates resveratrol-induced ROS production by regulating mitochondrial respiration in tumor cells. *Antioxid Redox Signal* 2010; **13**:807-819.
39. Lee SK, Zhang W, Sanderson BJ. Selective growth inhibition of human leukemia and human lymphoblastoid cells by resveratrol via cell cycle arrest and apoptosis induction. *J Agric Food Chem* 2008; **56**:7572-7577.
40. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **10**:445-457.
41. Trepap X, Chen Z, Jacobson K. Cell migration. *Compr Physiol* 2012; **2**:2369-2392.

42. Wierstra I. The transcription factor FOXM1c binds to and transactivates the promoter of the tumor suppressor gene E-cadherin. *Cell Cycle* 2011; 10:760-766.
43. Schneider MR, Kolligs FT. E-cadherin's role in development, tissue homeostasis and disease: insights from mouse models: tissue-specific inactivation of the adhesion protein E-cadherin in mice reveals its functions in health and disease. *Bioessays* 2015; **37**:294-304.
44. Li Y, Zhong W, Zhu M, Hu S, Su X. Nodal regulates bladder cancer cell migration and invasion via the ALK/Smad signaling pathway. *Onco Targets Ther* 2018; **11**:6589-6597.
45. Chen Z, Zhou L, Wang L, Kazobinka G, Zhang X, Han X, Li B, Hou T. HBO1 promotes cell proliferation in bladder cancer via activation of Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Carcinog* 2018; **57**:12- 21.
46. Walz S, Lorenzin F, Morton J, Wiese KE, von Eyss B, Herold S, et al. Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature* 2014; **511**:483-487
47. Wang W, Zhang L, Chen T, Guo W, Bao X, Wang D, et al. Anticancer Effects of Resveratrol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles on Human Breast Cancer Cells. *Molecules* 2017; **22**:E1814.
48. Merarchi M, Sethi G, Shanmugam MK, Fan L, Arfuso F, Ahn KS. Role of natural products in modulating histone deacetylases in cancer. *Molecules* 2019; 24:e1047.
49. Huang M, Huang J, Zheng Y, Sun Q. Histone acetyltransferase inhibitors: An overview in synthesis, structure-activity relationship and molecular mechanism. *Eur J Med Chem* 2019; **178**:259-286.
50. Parthun MR. Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. *Oncogene* 2007; **26**:5319-5328.

51. Yang X, Li L, Liang J, Shi L, Yang J, Yi X, et al. Histone acetyltransferase 1 promotes homologous recombination in DNA repair by facilitating histone turnover. *J Biol Chem* 2013; **288**:18271-18282.

Table 1: Frequencies of micronucleated (%) RT4, T24 and 5637 cells after treatment with resveratrol.

	Control	DMSO Control	Positive Control	RES 50 μ M	RES 100 μ M	RES 150 μ M
RT4	0	0	0.011 \pm 0.002*	0	0	0
5637	0.003 \pm 0.001	0.002 \pm 0.001	0.013 \pm 0.001*	0.002 \pm 0.001	0.003 \pm 0.001	0.001 \pm 0.001
T24	0.004 \pm 0.001	0.003 \pm 0.001	0.014 \pm 0.004*	0.004 \pm 0.001	0.001 \pm 0.001	0.002 \pm 0.001

Control: untreated control. DMSO: vehicle control. Positive control: doxorubicin (0.4 μ g/mL). RES: resveratrol. * $P < 0.05$ compared to control.

Table 2: Nuclear division index (NDI) for the RT4, 5637 and T24 cells after the treatment with resveratrol.

	Control	DMSO control	RES 50 μ M	RES 100 μ M	RES 150 μ M
RT4	1.824 \pm 0.034	1.778 \pm 0.038	1.727 \pm 0.058	1.645 \pm 0.052*	1.415 \pm 0.036*
5637	1.805 \pm 0.015	1.837 \pm 0.016	1.815 \pm 0.013	1.744 \pm 0.006*	1.737 \pm 0.012*
T24	1.887 \pm 0.005	1.925 \pm 0.019	1.774 \pm 0.012*	1.695 \pm 0.003*	1.629 \pm 0.007*

Control: untreated control. DMSO: vehicle control. RES: resveratrol. * $P < 0.05$ compared to control.

Table 3: Fold changes values calculated for RT4, 5637 and T24 cells after treatment with resveratrol.

Genes	RES (μ M)	RT4			5637			T24		
		50	100	150	50	100	150	50	100	150
	<i>CDH1</i>	1.25	1.32	2.49	1.48	1.92	3.65	0.59	0.36	1.83
	<i>CTNNB1PI</i>	1.28	0.98	1.48	1.58	2.13	2.65	0.92	2.32	4.81
	<i>HAT</i>	1.86	1.38	0.67	1.16	0.99	0.94	0.39	0.24	0.27
	<i>HDAC</i>	0.86	0.91	0.46	1.22	0.98	1.08	1.28	2.20	2.02
	<i>MYC</i>	1.76	2.35	1.87	1.06	0.97	1.07	0.58	0.86	0.98
	<i>SMAD4</i>	0.22	0.15	0.23	0.96	1.18	1.36	0.86	1.21	1.77

RES: resveratrol.

Figure captions

Figure 1: Percentages of viable cells (logarithmic scale) in RT4, 5637, and T24 cell lines immediately (A and C) and 24 hours (B and D) after treatment with resveratrol analyzed by the neutral red uptake and trypan blue exclusion method, respectively. Control: untreated cells. DMSO: vehicle control. RES: resveratrol. * $P < 0.05$ compared with control.

Figure 2: Production of reactive oxygen species in RT4, 5637 and T24 cells after resveratrol treatment. Control: untreated control. DMSO control: vehicle control. RES: resveratrol. * $P < 0.05$ compared to control.

Figure 3: Photographs and quantification of cell migration in RT4 (A and B), 5637 (C and D) and T24 (E and F) cells after resveratrol treatment. Control: untreated control. RES: resveratrol. * $P < 0.05$ compared to control.

Figure 4: Relative expression of genes *CDH1*, *CTNNB1P1*, *HAT1*, *HDAC1*, *MYC* and *SMAD4* in RT4, 5637 and T24 cells treated with resveratrol for 24 h. Control: untreated cells. DMSO: vehicle control. RES: resveratrol. * $P < 0.05$ compared with control.

Figure 1

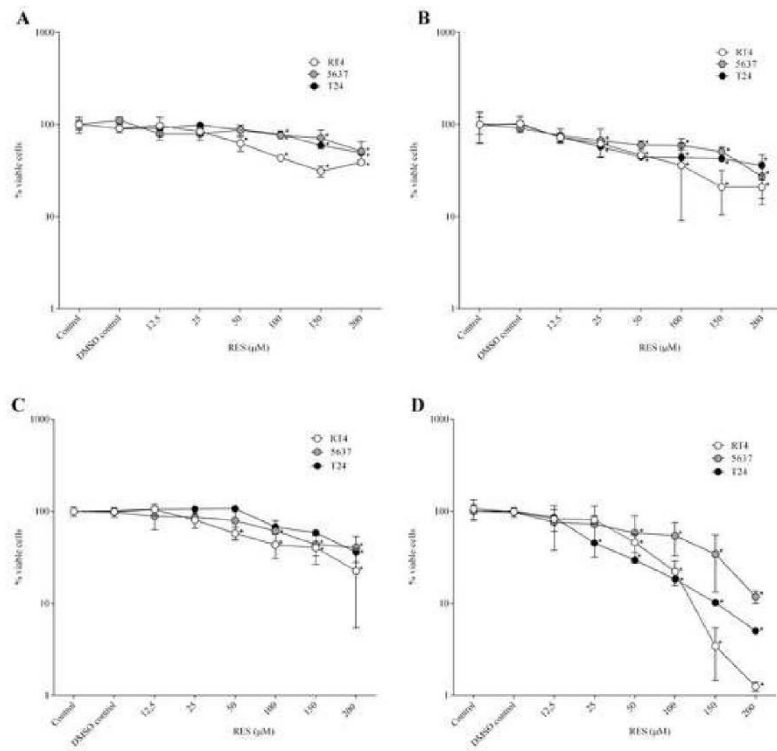


Figure 2

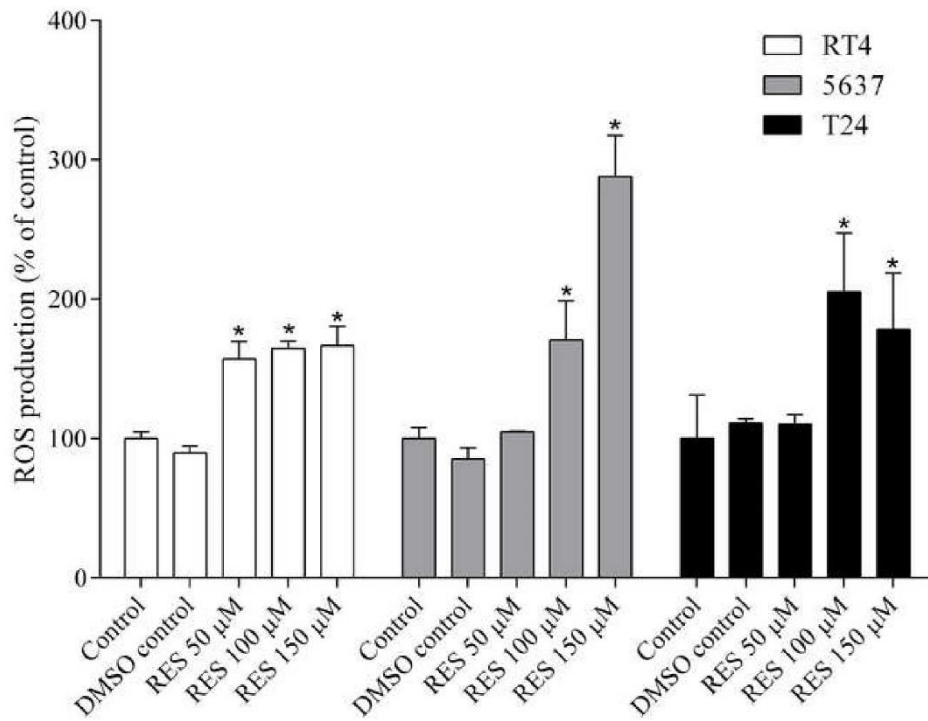


Figure 3

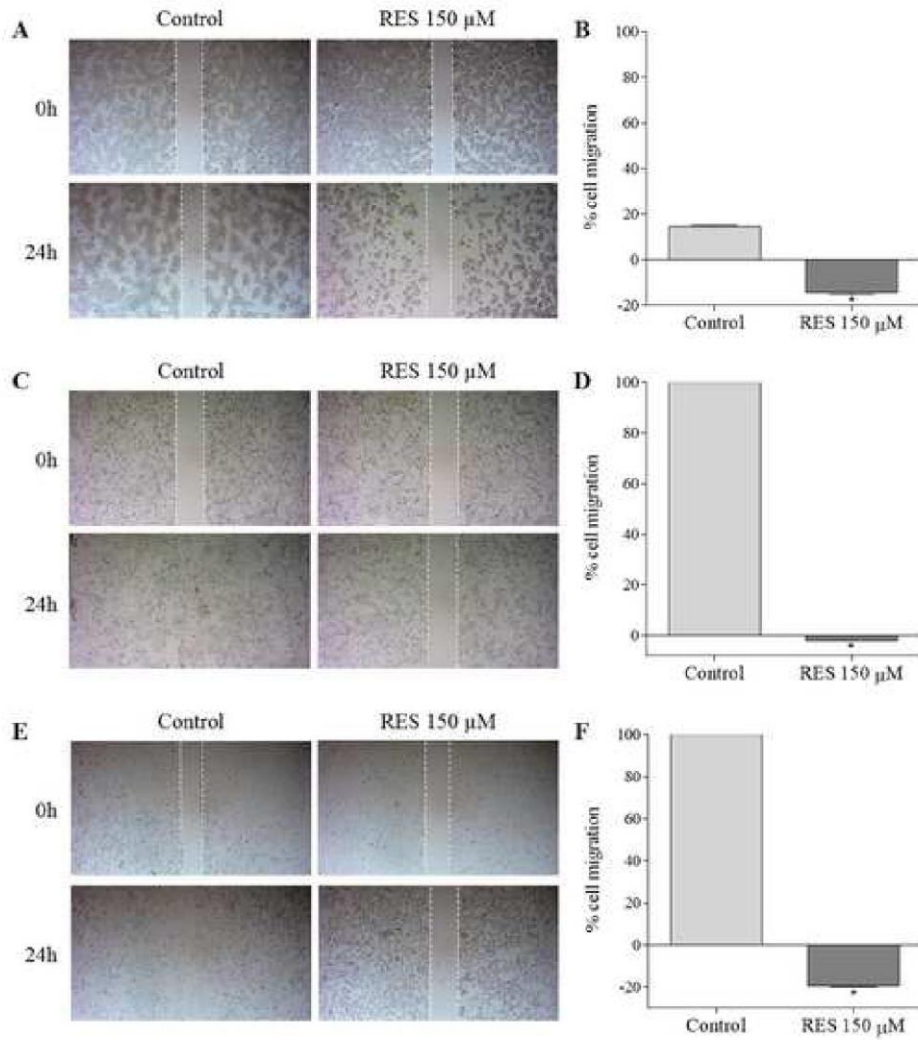


Figure 4

