



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ANA MARIA OLIVEIRA FERREIRA DA MATA**

**EFEITOS DO ÁCIDO ASCÓRBICO NA MODULAÇÃO DOS MECANISMOS  
ANTITUMORAIS DO 5-FLUOROURACIL, DOCETAXEL E TAMOXIFENO EM  
*Saccharomyces cerevisiae* E SARCOMA 180**

**TERESINA**

**2017**

ANA MARIA OLIVEIRA FERREIRA DA MATA

**EFEITOS DO ÁCIDO ASCÓRBICO NA MODULAÇÃO DOS MECANISMOS  
ANTITUMORAIS DO 5-FLUOROURACIL, DOCETAXEL E TAMOXIFENO EM  
*Saccharomyces cerevisiae* E SARCOMA 180**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientação: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

Co-orientação: Prof. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Teresina

2017

## FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello

Branco Serviço de Processamento Técnico

M425e Mata, Ana Maria Oliveira Ferreira da.  
Efeitos do ácido ascórbico na modulação dos  
mecanismos antitumorais do 5-fluorouracil, docetaxel e  
tamoxifeno em *Saccharomyces cerevisiae* e sarcoma 180 /  
Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata. – 2017.  
132 f.

Mestrado – Programa de Pós Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2017.  
“Orientação: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva”.

1. Antineoplásicos. 2. Ácido Ascórbico. 3.  
*Saccharomyces cerevisiae*. 4. Sarcoma 180.I. Ana  
Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. II. Título.

CDD 616.994

ANA MARIA OLIVEIRA FERREIRA DA MATA

**EFEITOS DO ÁCIDO ASCÓRBICO NA MODULAÇÃO DOS MECANISMOS  
ANTITUMORAIS DO 5-FLUOROURACIL, DOCETAXEL E TAMOXIFENO EM  
*Saccharomyces cerevisiae* E SARCOMA 180**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Benedito Borges da Silva (Orientador)  
(Departamento Materno Infantil - UFPI)

---

Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa (Examinador Interno)  
(Departamento de Ciências Biológicas - UFPI)

---

Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa (Examinador Externo ao Programa)  
(Departamento Materno Infantil - UFPI)

---

Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa (Suplente)  
(Departamento de Química - UFPI)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**REITOR**

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

**VICE-REITOR**

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Profa. Dra. Regina Ferraz. Mendes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dra. Marcília Pinheiro da Costa



## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta conquista aos meus pais, Josué da Mata Oliveira Filho e Hildenira Oliveira Ferreira da Mata, por todo amor, carinho, apoio e incentivos durante esta jornada.

**DEDICATÓRIA ESPECIAL**

---



## **DEDICATÓRIA ESPECIAL**

À meu orientador, Prof. Dr. Benedito Borges da Silva, pelo exemplo de profissional e mestre, o qual me acolheu e me proporcionou o benefício do conhecimento e da pesquisa. Obrigada por me receber em sua família científica, por me apresentar a todos seus filhos pesquisadores e por toda a confiança e incentivo ao longo desta jornada.

**AGRADECIMENTOS**

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele esta jornada não seria possível.

Aos meus avós Josué da Mata Oliveira, Raimunda Soares Oliveira e Antônia Campos Ferreira, aos meus pais, Josué da Mata Oliveira Filho e Hildenira Oliveira Ferreira da Mata, e ao meu irmão Josué da Mata Oliveira Neto por todo amor, apoio e compreensão durante toda minha vida, bem como a todos os meus familiares, tios, primos e entes tão amados. Ao meu namorado, Rafael Caetano Magalhães Dantas, por estar ao meu lado e me apoiar sempre que precisei. E aos meus queridos amigos, por fazerem a vida mais leve e feliz.

À Universidade Federal do Piauí, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes, à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Piauí, na pessoa do Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira, e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Piauí pelo empenho em compartilhar seus conhecimentos.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante, por me despertar ao mundo científico, por toda a paciência, incentivo e compreensão. Obrigada por ter me acolhido tão bem durante todos estes anos, por todo carinho e até mesmo “puxões de orelha”, os quais me fizeram crescer como pessoa e como profissional.

Aos colegas da turma 2015-2016 do PPGCF – UFPI, pelos momentos agradáveis e difíceis nas disciplinas. Em especial ao meu “irmão”, Ricardo Melo de Carvalho, por ser esta pessoaal tão especial, por me incentivar, compreender, por enfrentar e comemorar comigo cada etapa desta difícil jornada.

À minha família científica do Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica (LAPGENIC), por participar de tudo referente a este trabalho, bem como, fazer parte de minha vida, em especial ao Marcus, Júnior, Kátia, Keylla, Márcia, Jadson, Reyca, Rai, Rosália, Antonielly, Victor, Tonny, Ag-Anne, Samara, Torequel, Leonardo e João Marcelo. Bem como a todos dos demais laboratórios, em especial a Nárcia, José Roberto, Amanda, Rusbene e Lidiane.

E aos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

*“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”*

*Fernando Pessoa*



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2. OBJETIVOS</b>	19
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	19
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	19
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	21
<b>3.1 Defesas Antioxidantes x Estresse Oxidativos</b>	22
<b>3.2 Câncer</b>	25
3.2.1 Câncer de Mama	28
3.2.1.1 Tratamento do Câncer de Mama	30
<b>3.3. Ácido Ascórbico e seu efeito no tratamento oncológico</b>	34
<b>3.4 Danos ao DNA, seus biomarcadores e modelos para estudos farmacológicos</b>	37
<b>REFERÊNCIAS</b>	43
<b>CAPÍTULO I – Ácido Ascórbico na prevenção e tratamento do câncer</b>	52
<b>RESUMO</b>	53
<b>ABSTRACT</b>	54
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	55
<b>2. METODOLOGIA</b>	57
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	58
<b>3.1 O Ácido ascórbico como agente antioxidante</b>	58
<b>3.2 O Ácido ascórbico como agente antitumoral</b>	61
<b>4. CONCLUSÃO</b>	64
<b>REFERÊNCIA</b>	65
<b>CAPÍTULO II - Efeitos do ácido ascórbico no potencial oxidativo e genotóxico de drogas antineoplásicas em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	70
<b>RESUMO</b>	71
<b>ABSTRACT</b>	72
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	73
<b>2. METODOLOGIA</b>	76
<b>2.1 Químicos e suas diluições</b>	76
<b>2.2 Teste do disco central em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	76
<b>2.3 Ensaio Cometa em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	78

<b>2.4 Cálculo do percentual de modulação do ácido ascórbico frente aos danos induzidos por drogas antineoplásicas</b>	79
<b>2.5 Análise Estatística</b>	79
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	80
<b>3.1 Avaliação do potencial oxidativo do 5-Fluorouracil, Docetaxel e Tamoxifeno e percentual de modulação do Ácido Ascórbico frente aos danos oxidativos induzidos pelas drogas em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	80
<b>3.2 Avaliação genotóxica do 5-Fluorouracil, Docetaxel e Tamoxifeno e percentual de modulação do Ácido Ascórbico frente aos danos genotóxicos induzidos pelas drogas em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	88
3.2.1 Efeitos antigenotóxicos do AA frente aos danos ao DNA de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , proficiente em superóxido dismutase, induzidos por 5-Fluorouracil, Docetaxel e Tamoxifeno	88
3.2.2 Efeitos antigenotóxicos do AA frente aos danos ao DNA de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , proficiente em superóxido dismutase, induzidos pelas interações de drogas	90
<b>4. CONCLUSÃO</b>	93
<b>REFERÊNCIA</b>	94
<b>CAPÍTULO III - Efeitos anticitotóxicos, antigenotóxicos e antimutagênicos do ácido ascórbico na modulação de efeitos de drogas antineoplásicas em Sarcoma 180</b>	100
<b>RESUMO</b>	101
<b>ABSTRACT</b>	102
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	103
<b>2. METODOLOGIA</b>	105
2.1 Químicos e suas diluições	105
2.2 Cultivo <i>in vivo</i> de Sarcoma 180	
2.3 Viabilidade celular de células de Sarcoma 180	105
2.4 Teste cometa com células de Sarcoma 180	106
2.5 Teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN) com células de Sarcoma 180	106
2.6 Índice de divisão celular (IDN)	108
2.7 Cálculos da modulação do AA frente aos danos induzidos pelos antineoplásicos em células de Sarcoma 180	108

<b>2.8 Análise Estatística</b>	108
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	109
<b>3.1 Avaliação anticitotóxica do AA frente aos danos induzidos em células de S-180 pelos antineoplásicos, por Azul de Tripán e teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN)</b>	109
<b>3.2 Avaliação dos efeitos antígenotóxicos do AA frente aos danos induzidos pelos antineoplásicos em células de S-180</b>	112
<b>3.3 Avaliação antimutagênica do AA frente aos danos induzidos em células de S-180 pelos antineoplásicos, por meio do teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN)</b>	115
<b>4. CONCLUSÃO</b>	121
<b>REFERÊNCIAS</b>	122
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	127
<b>ANEXOS</b>	129
<b>ANEXO A - Capa do artigo</b>	130
<b>ANEXO B - Trabalhos apresentados em eventos</b>	131



**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

---

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**5-FU** – 5-Fluorouracil

**µg** – microgramas

**µL** – microlitros

**µM** – micromols

**AA** – Ácido Ascórbico

**ATP** – Adenosine Triphosphate (Trifosfato de Adenosina)

**CA** – Câncer de Mama

**CAT** – catalase

**CBMN** – Cytokinesis-block micronucleus cytome (Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese)

**CM** – Câncer de Mama

**DNA** – Desoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucléico)

**DOCE** - Docetaxel

**ER** – Estrogen receptor (Receptor de Estrogênio)

**EROs** – Espécies Reativas de Oxigênio

**EUA** – Estados Unidos da América

**FD** – Frequência de danos

**g** – gramas

**GSH** – Glutathiona

**GPx** – Glutathiona Peroxidase

**Gy** - Grays

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de Hidrogênio

**HER** – Human Epidermal growth factor Receptor-type 2 (gene fator de crescimento epidérmico humano receptor)

**ID** – Índice de Danos

**IDN** – Índice de Danos Nuclear

**Kg** – Quilogramas

**mg** – miligramas

**mL** – mililitros

**mM** – milimol

**MN** – Micronúcleos

**NK** – Natural Killers (Matadores naturais)

**RNA** – Ribonucleic Acid (Ácido ribonucléico)

**S180** – Sarcoma 180

***S. cerevisiae*** – *Saccharomyces cerevisiae*

**SOD** – Superóxido Dismutase

**SOD1** – Superóxido Dismutase Citoplasmática

**SOD2** – Superóxido Dismutase Mitocondrial

**SOD1SOD2** – Duplo Mutante (Superóxido Dismutase Citoplasmática + Superóxido Dismutase Mitocondrial)

**SOD1CAT1** – Duplo Mutante (Superóxido Dismutase Citoplasmática + Catalase)

**SUS** – Sistema Único de Saúde

**ST** – Grupo Sem Tratamento

**TAMOX** – Tamoxifeno

**LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

---

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### 1. INTRODUÇÃO

**Figura 1** – Representação estrutural da dissertação 18

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

**Figura 2** – Reações que levam a formação de Espécies Reativas de Oxigênio 23

**Figura 3** – Mecanismos de ação do estresse oxidativo na carcinogênese 24

**Figura 4** – Distribuição proporcional de 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio 2016-2017 por sexo, exceto melanoma 25

**Figura 5** – Exemplos de alterações epigenéticas características de células neoplásicas 27

**Figura 6** – Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasias malignas da mama feminina, por 100 mil mulheres, estimadas para o biênio 2016-2017 no Brasil 28

**Figura 7** – Fatores de risco para o Câncer de Mama 30

**Figura 8** – Estrutura química do Tamoxifeno 31

**Figura 9** – Linha do tempo representando os protocolos de quimioterapias implantados no Brasil pelo SUS 32

**Figura 10** – Estrutura química do 5-Fluorouracil 33

**Figura 11** – Estrutura química do Docetaxel 34

**Figura 12** – Estrutura química do Ácido Ascórbico 35

**Figura 13** – Danos ao DNA, maquinaria de reparo de DNA e seus diversos mecanismos 38

**Figura 14** – Danos nucleares em linfócitos humanos expostos à radiação (5 Gy) após CBMN 40

**Figura 15** – Imagens de cometas no microscópio de fluorescência, onde as curvas vermelhas representam os núcleos e as verdes as caudas e fotomicrografias no microscópio óptico 42

## CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b> – Desenho do levantamento bibliográfico e seus critérios de inclusão e exclusão	57
<b>Tabela 1</b> – Estudos clínicos e não clínicos sobre a utilização do ácido ascórbico como antioxidante no tratamento e/ou prevenção do câncer	60
<b>Tabela 2</b> – Estudos clínicos e não clínicos sobre a utilização do ácido ascórbico como antitumoral no tratamento e/ou prevenção do câncer	63

## CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Descrição das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas no estudo	77
<b>Figura 1</b> – Grupos de tratamentos utilizados no estudo	77
<b>Tabela 2</b> – Avaliação do potencial oxidativo da associação do ácido ascórbico com 5-Fluorouracil, Docetaxel e suas associações em linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	81
<b>Tabela 3</b> – Avaliação do potencial oxidativo da associação do ácido ascórbico com Tamoxifeno, 5-Fluorouracil, Docetaxel e suas associações em linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	82
<b>Figura 2</b> – Percentual de modulação (%M) do Ácido Ascórbico nos danos induzidos pelos antineoplásicos nas linhagens SODWT, SOD1, SOD2 e SOD1SOD2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	83
<b>Figura 3</b> – Percentual de modulação (%M) do Ácido Ascórbico nos danos induzidos pelos antineoplásicos nas linhagens CAT e SOD1CAT1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	83
<b>Figura 4</b> – Índice de Danos induzidos pelos antineoplásicos e suas associações com Ácido Ascórbico em células de <i>S. cerevisiae</i> ,	89
<b>Figura 5</b> – Frequência de Danos induzidos pelos antineoplásicos e suas associações com Ácido Ascórbico em células de <i>S. cerevisiae</i> ,	89
<b>Figura 6</b> – Índice de Danos induzidos pelas interações dos antineoplásicos e suas associações com Ácido Ascórbico em células de <i>S. cerevisiae</i> ,	91
<b>Figura 7</b> – Frequência de Danos induzidos pelas interações dos antineoplásicos e suas associações com Ácido Ascórbico em células de <i>S. cerevisiae</i> ,	91

## CAPÍTULO III

<b>Figura 1</b> – Grupos de tratamento utilizados no estudo	107
---	-----

<b>Figura 2</b> - Viabilidade Celular por meio do Teste de Exclusão por Azul de Tripán em células de Sarcoma 180	109
<b>Figura 3</b> - Índice de divisão celular (IDN) induzido pelos antineoplásicos, suas interações e associações com Ácido Ascórbico em células de Sarcoma 180	111
<b>Figura 4</b> - Índice de Danos induzidos pelos antineoplásicos, suas interações e associações com Ácido Ascórbico em células de Sarcoma 180	113
<b>Figura 5</b> - Frequência de Danos induzidos pelos antineoplásicos, suas interações e associações com Ácido Ascórbico em células de Sarcoma 180	113
<b>Tabela 1</b> – Percentual de modulação do Ácido Ascórbico frente a genotoxicidade induzida pelos antineoplásicos e suas interações em células de Sarcoma 180	114
<b>Figura 6</b> - Mutagenicidade induzida pelos antineoplásicos e suas associações com Ácido Ascórbico em células de Sarcoma 180	116
<b>Figura 7</b> – Mutagenicidade induzida pelas interações dos antineoplásicos e suas associações com Ácido Ascórbico em células de Sarcoma 180	117
<b>Tabela 2</b> - Percentual de modulação do Ácido Ascórbico frente a mutagenicidade induzida pelos antineoplásicos e suas interações em células de Sarcoma 180	117
<b>Figura 8</b> – Apoptose induzida pelos antineoplásicos e suas interações em associação com Ácido Ascórbico em células de Sarcoma 180	119





## RESUMO

O Câncer é uma doença caracterizada pela proliferação anormal de células, devido a uma série de mutações, com estimativa para 2030 de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes. Seu tratamento envolve cirurgia, radioterapia, quimioterapia citotóxica, endocrinoterapia dentre outros. O Ácido Ascórbico (AA) tem sido utilizado no tratamento, demonstrando que sua suplementação vitamínica na dieta de pacientes oncológicos tem apresentado efeitos preventivos quanto ao acometimento de múltiplos tumores. O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do Ácido Ascórbico na modulação dos mecanismos antitumorais de antineoplásicos em *Saccharomyces cerevisiae* e Sarcoma 180. Esta dissertação foi estruturada em três capítulos. O Capítulo I trata de uma revisão sistemática sobre o AA, na prevenção e/ou tratamento do câncer, como antioxidante e/ou pró-oxidante em estudos clínicos e não clínicos, entre o período de 2011 a 2015, para o entendimento das variações de dose-reposta, bem como dos seus mecanismos de ação como agente antioxidante e antitumoral. Foram identificados 78 artigos dos quais apenas 30 artigos apontavam o AA na prevenção e/ou tratamento do câncer. Contudo, há controvérsias sobre as doses utilizadas, como também necessidade de estudos clínicos caracterizando melhor o seu mecanismo de ação. O Capítulo II analisou os efeitos do Ácido Ascórbico no potencial oxidativo e genotóxico dos antineoplásicos em estudo em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados obtidos apontam que o 5-Fluorouracil, Docetaxel, Tamoxifeno e suas associações, induziram danos oxidativos significantes ( $p < 0,001$ ), em todas linhagens de *S. cerevisiae*, entretanto, quando associados ao AA, apresentaram modulação significativa ( $p < 0,05$ ) nas diferentes linhagens, tanto para co- quanto para pós-tratamento. Os antineoplásicos 5-FU, DOCE e TAMOX induziram danos genotóxicos ( $p < 0,05$ ) na linhagem SODWT quando comparado com o grupo sem tratamento, observado pelo aumento do Índice (ID) e Frequência de danos (FD) nessa linhagem. De forma similar, ocorreu nas interações 5-FU+DOCE e 5-FU+TAMOX. Entretanto, os danos genotóxicos induzidos pelos antineoplásicos e associações foram modulados pelo AA ( $p < 0,05$ ) em DOCE, TAMOX, 5-FU+DOCE e 5-FU+TAMOX. Esses dados apontam que o AA teve ações antioxidantes e antigenotóxicas frente aos danos induzidos pelos antineoplásicos isolados e em associações. E o Capítulo III avaliou os efeitos anticitotóxicos, antigenotóxicos e antimutagênicos do ácido ascórbico na modulação de efeitos em drogas antineoplásicas em Sarcoma 180. Os dados apontaram que o AA na concentração de 50  $\mu\text{M}$  tem efeitos anticitotóxicos, antigenotóxicos e antimutagênicos.

**Palavras-chave:** Antineoplásicos. Ácido Ascórbico. *Saccharomyces cerevisiae*. Sarcoma 180.



## ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by abnormal cell proliferation due to a number of mutations, it is estimated to 2030 21.4 million new cases and 13.2 million deaths. Its treatment involves surgery, radiotherapy, cytotoxic chemotherapy, endocrine therapy among others. Ascorbic Acid (AA) has been used in treatment, demonstrating that its vitamin supplementation in diet of cancer patients has shown preventive effects regarding the involvement of multiple tumors. The present study aimed to evaluate effects of Ascorbic Acid in modulation of antitumor mechanisms of antineoplastic agents in *Saccharomyces cerevisiae* and Sarcoma 180. This study was structured in three chapters. Chapter I deals with a systematic review of AA in the prevention and/or treatment of cancer as an antioxidant and/or pro-oxidant in clinical and non-clinical studies between the period 2011 to 2015 for understanding of variations in dose response, as well as its mechanisms of action as an antioxidant and antitumor agent. We identified 78 articles of which only 30 articles pointed to AA in cancer prevention and / or treatment. However, there are controversies about the doses used, as well as the need for clinical studies to better characterize its mechanism of action. Chapter II analyzed the effects of Ascorbic Acid on the oxidative and genotoxic potential of antineoplastics under study in *Saccharomyces cerevisiae* strains. The results obtained indicate that 5-Fluorouracil, Docetaxel, Tamoxifen and its associations induced significant oxidative damage ( $p < 0.001$ ) in all *S. cerevisiae* strains, however, when associated with AA, they presented significant modulation ( $p < 0, 05$ ) in the different strains, both for co-treatment and post-treatment. The 5-FU, DOCE and TAMOX antineoplastic agents induced genotoxic damage ( $p < 0.05$ ) in the SODWT line when compared to the untreated group, as observed by the increase Index (ID) and Frequency of Damages (FD) in this lineage. Similarly, 5-FU+DOCE and 5-FU+TAMOX interactions occurred. However, genotoxic damage induced by antineoplastics and associations were modulated by AA ( $p < 0.05$ ) in DOCE, TAMOX, 5-FU + DOCE and 5-FU + TAMOX. These data indicate that AA had antioxidative and antigenotoxic actions against damage induced by isolated antineoplastic agents and in associations. And Chapter III evaluated the anticytotoxic, antigenotoxic and antimutagenic effects of ascorbic acid on modulation of effects of antineoplastic drugs in Sarcoma 180. The data indicated that AA at 50  $\mu\text{M}$  concentration has anticytotoxic, antigenotoxic and antimutagenic effects.

Key-words: Antineoplastics. Ascorbic Acid. *Saccharomyces cerevisiae*. Sarcoma 180.

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1. INTRODUÇÃO

Os antioxidantes são substâncias, de origem natural ou sintética, que em baixas concentrações tem papel de neutralizar efeitos oxidativos e prevenir doenças, classificados em três categorias: defesas de primeira linha (superóxido dismutase, catalase, glutaiona redutase e minerais como cobre e zinco); segunda linha (glutationa, albumina e vitaminas como C, E, A e D); e terceira linha (lipases, proteases, transferases). O estresse oxidativo corresponde ao desequilíbrio entre as defesas antioxidantes do organismo e a produção de radicais livres (dentre eles espécies reativas de oxigênio - EROs), o qual induz danos ao DNA, promove a instabilidade genômica e a proliferação celular, aumentando consequentemente as mutações somáticas e transformações neoplásicas, correlacionando-o diretamente com o desenvolvimento do câncer (CA) (REUTER et al., 2010; SINDHI et. al., 2013).

O CA é uma doença caracterizada pela proliferação anormal de células, devido a uma série de mutações, as quais afetam oncogenes e genes supressores de tumores (PELTOMAKI, 2012). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2014) em 2012 ocorreram 14,1 milhões de casos de câncer no mundo, com um total de 8,2 milhões de mortes por esta doença, sendo estimado para 2030 de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes.

O Câncer de Mama (CM) é a segunda neoplasia maligna mais comum, e a quinta maior causadora de mortes por câncer no mundo, correspondendo a 10% de todos os tipos entre as mulheres. É uma patologia heterogênea que consiste em cerca de 20 subtipos morfológicos distintos e até o momento de 4 subtipos baseados na expressão gênica, onde cada subtipo está correlacionado com fatores de risco, com impacto no prognóstico da doença. Dentre estes fatores se incluem a idade, histórico pessoal e familiar e a alta densidade da mama (JANSEN; BACKSTEIN; BROWN, 2014; KAWALEC; LOPUCH; MIKRUT, 2015).

Outro tipo de CA é o Sarcoma, neoplasia mesenquimal originada de ossos, tecidos conjuntivos (músculos, gorduras, nervos, fibras) ou tecidos relacionados, que acomete cerca de 200.000 pessoas no mundo por ano e é caracterizado pelo seu alto poder de invasão e metástase (TAYLOR et al., 2012). Representado por um grupo de neoplasias múltiplas ao invés de um único câncer, apresentando mais de 50 subtipos histológicos distintos, que podem ocorrer em qualquer idade ou qualquer parte do corpo (BURNINGHAM et. al. 2012).

Com relação ao tratamento do CM, vários os tipos de terapias empregadas, dentre elas a quimioterapia, em que é comum a associação de fármacos, visando a utilização de menores doses e buscando o sinergismo entre esses fármacos, favorecendo um melhor resultado

terapêutico (MICHAELS et al., 2016). O Docetaxel é um taxano semi-sintético, que apresenta atividade sobre tumores sólidos metastáticos que são resistentes ao tratamento com Paclitaxel, e possui como mecanismo de ação antineoplásica a interferência da dinâmica dos microtúbulos (MONTERO et al., 2005; QU et al., 2014).

O 5-Fluorouracil é um quimioterápico anti-metabólico que quando associado apresenta boa eficácia no tratamento do câncer de mama e que atua pela inibição de processos biossintéticos essenciais, dificultando o crescimento celular (ULUER et al., 2012; ZHANG et al., 2012; LI et al., 2015). Por sua vez, o Tamoxifeno é utilizado na endocrinoterapia, como quimioprevenção e tratamento do câncer de mama, com boa eficácia em pacientes com tumores receptor de estrogênio positivo e também com doença recorrente, tendo como principal mecanismo de ação a inibição competitiva do receptor de estrogênio, levando à inibição de genes reguladores de estrogênio, os quais estimulam o crescimento celular de células neoplásicas, além de induzir a apoptose (SINGH; PRUDENCE; MICHAEL, 2011; SIEUWERTS, 2014).

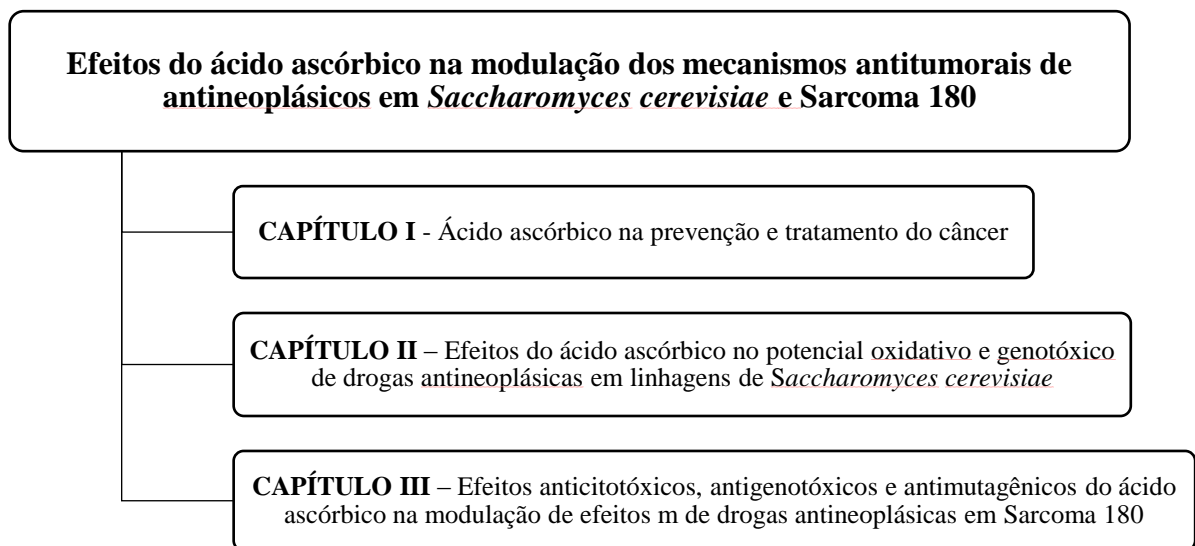
Durante a quimioterapia, alguns pacientes oncológicos utilizam antioxidantes na dieta, para suprir déficits nutricionais decorrentes do tratamento. Dentre os antioxidantes consumidos, encontram-se as vitaminas, em especial, o ácido ascórbico (AA), conhecido popularmente por vitamina C, composto hidrofílico, com propriedades antioxidantes capazes de quelar radicais livres, protegendo a estrutura celular e mantendo a homeostase celular frente a agentes tóxicos (TORRES et al, 2008; AL-ASMARI et al., 2015). O AA também tem sido utilizado na prevenção CA, devido à estas propriedades antioxidantes que podem prevenir a oxidação que induz a apoptose. Entretanto, estudos apontam que doses altas de AA podem aumentar a produção de ATP (gerado pelas mitocôndrias) induzindo apoptose em linhagens de células tumorais, por via pró-oxidante (GONZÁLEZ et al., 2010; GUERRIERO et al., 2014).

Desta forma, verifica-se que o limiar entre o efeito benéfico ou prejudicial das vitaminas, em especial do AA, ainda não está bem esclarecido na literatura, tornando assim, necessária a realização de estudos que demonstrem a sua atuação em pacientes oncológicos em uso de antineoplásicos, verificando o seu mecanismo oxidativo e a importância do constante monitoramento nutricional neste paciente. Isto nos levou a desenhar o presente estudo com o objetivo de avaliar os efeitos do Ácido Ascórbico na modulação dos mecanismos antitumorais de antineoplásicos em *Saccharomyces cerevisiae* e Sarcoma 180.

Esta dissertação foi estruturada em capítulos originados que foram submetidos a revistas nacionais e internacionais com ampla divulgação na comunidade científica (**Figura**

1). O primeiro capítulo trata de uma revisão sistemática sobre ácido ascórbico, na prevenção e/ou tratamento do câncer, como antioxidante e/ou pró-oxidante em estudos clínicos e não clínicos, entre o período de 2011 a 2015, para o entendimento das variações de dose-reposta, bem como dos seus mecanismos de ação como agente antioxidante e antitumoral. O segundo capítulo analisou os efeitos do Ácido Ascórbico no potencial oxidativo e genotóxico dos antineoplásicos em estudo em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. E o terceiro capítulo avaliou os efeitos anticitotóxicos, antigenotóxicos e antimutagênicos do ácido ascórbico na modulação de efeitos em drogas antineoplásicas em Sarcoma 180.

**Figura 1** – Representação estrutural da dissertação



## **2. OBJETIVOS**

---



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar os efeitos antigenotóxicos/antimutagênicos e anticitotóxicos do ácido ascórbico na modulação dos mecanismos antitumorais de antineoplásicos Docetaxel, 5-Fluorouracil e Tamoxifeno isolados e em associação, em *Saccharomyces cerevisiae* e em Sarcoma 180.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Realizar uma revisão sistemática sobre ácido ascórbico, na prevenção e/ou tratamento do câncer, como antioxidante e/ou pró-oxidante em estudos clínicos e não clínicos.

- Analisar os efeitos do AA no potencial oxidativo e genotóxico de antineoplásicos em estudos em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

- Avaliar a ação anticitotóxica, antigenotóxica e antimutagênica do AA na modulação dos danos ao material genético induzidas pelos antineoplásicos em S180 por meio do teste CBMN e Cometa.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

---

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

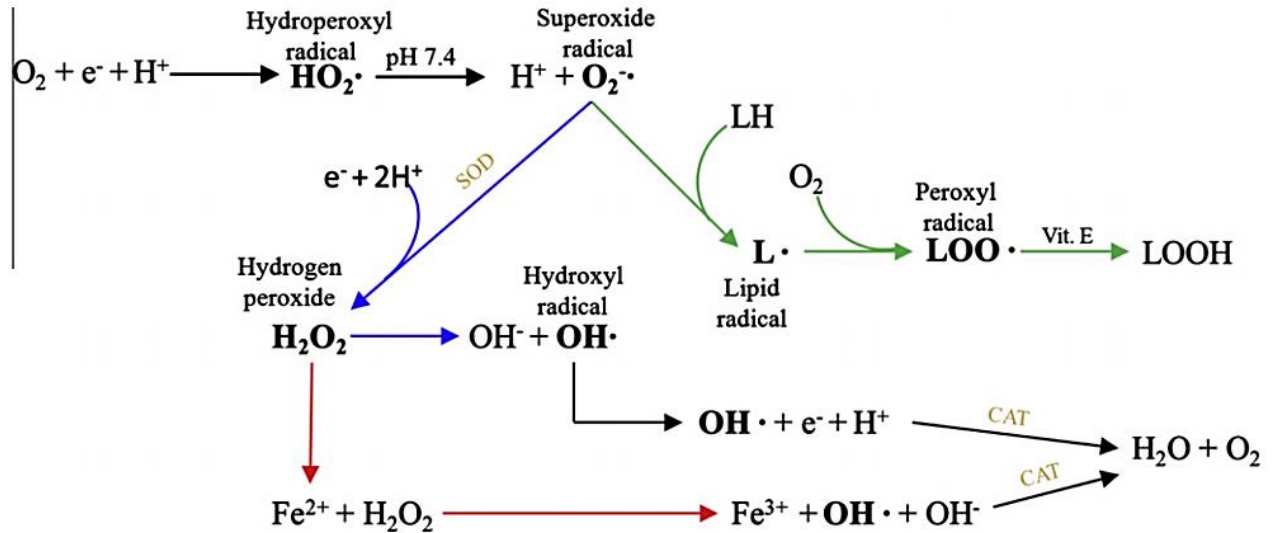
#### 3.1 Defesas antioxidantes *versus* estresse oxidativo

A homeostase do organismo é caracterizada pelo equilíbrio entre radicais livres e metabólitos reativos, originados através de metabólitos oriundos da quimioterapia, danos da radiação, fatores de crescimento, citocinas e hipóxia, e sua eliminação pelas defesas antioxidantes, as quais tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais. O sistema de defesas antioxidantes divide-se em enzimático (enzimas como a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase, catalase (CAT)) e não-enzimático (como a glutatona (GSH), vitaminas A, C e D e compostos antioxidantes (BARBOSA et al., 2010; REUTER et. al., 2010).

Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados, altamente instáveis e ativos em reações químicas, derivados de elemento como o oxigênio, que produz espécies reativas de oxigênio (EROs; *Reactive Oxygen Species* (ROS)) como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), o radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) e o radical hidroperoxil ( $\cdot HO_2$ ); o nitrogênio, que origina espécies reativas de nitrogênio (ERNs; *Reactive Nitrogen Species* (RNS)) como o óxido nítrico (NO); e o enxofre, que forma espécies reativas de enxofre (EREs; *Reactive Sulfur Species* (RSS)); por meio de peroxidação lipídica, reações de Haber Weiss e Fenton (**Figura 2**) (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

A produção excessiva de radicais livres pode acarretar em danos oxidativos, alterações nas bases nitrogenadas ou, ainda, modificações de desoxirribose, podendo gerar danos como apoptose e mutações (MENDONÇA; CARIOCA; MAIA, 2014; BARBOSA et al., 2010). Os radicais livres também ativam o citocromo C o qual ativa a família Bcl-2 (Bid e Bax) que resulta na liberação da proteína carreadora de elétrons para o citoplasma e ativação da caspase 3, 6, 7 e 9, promovendo, assim, a apoptose (DU et al., 2010; DELBRIDGE; VALENTE; STRASSER, 2012).

**Figura 2** – Reações que levam a formação de Espécies Reativas de Oxigênio. Peroxidação lipídica (setas verdes); Reações de Haber-Weiss (setas azuis); Reações de Fenton (setas vermelhas); Radicais livres ou moléculas com o mesmo comportamento ( $H_2O_2$ ) (**negrito**); Superóxido Dismutase (SOD); Catalase (CAT).



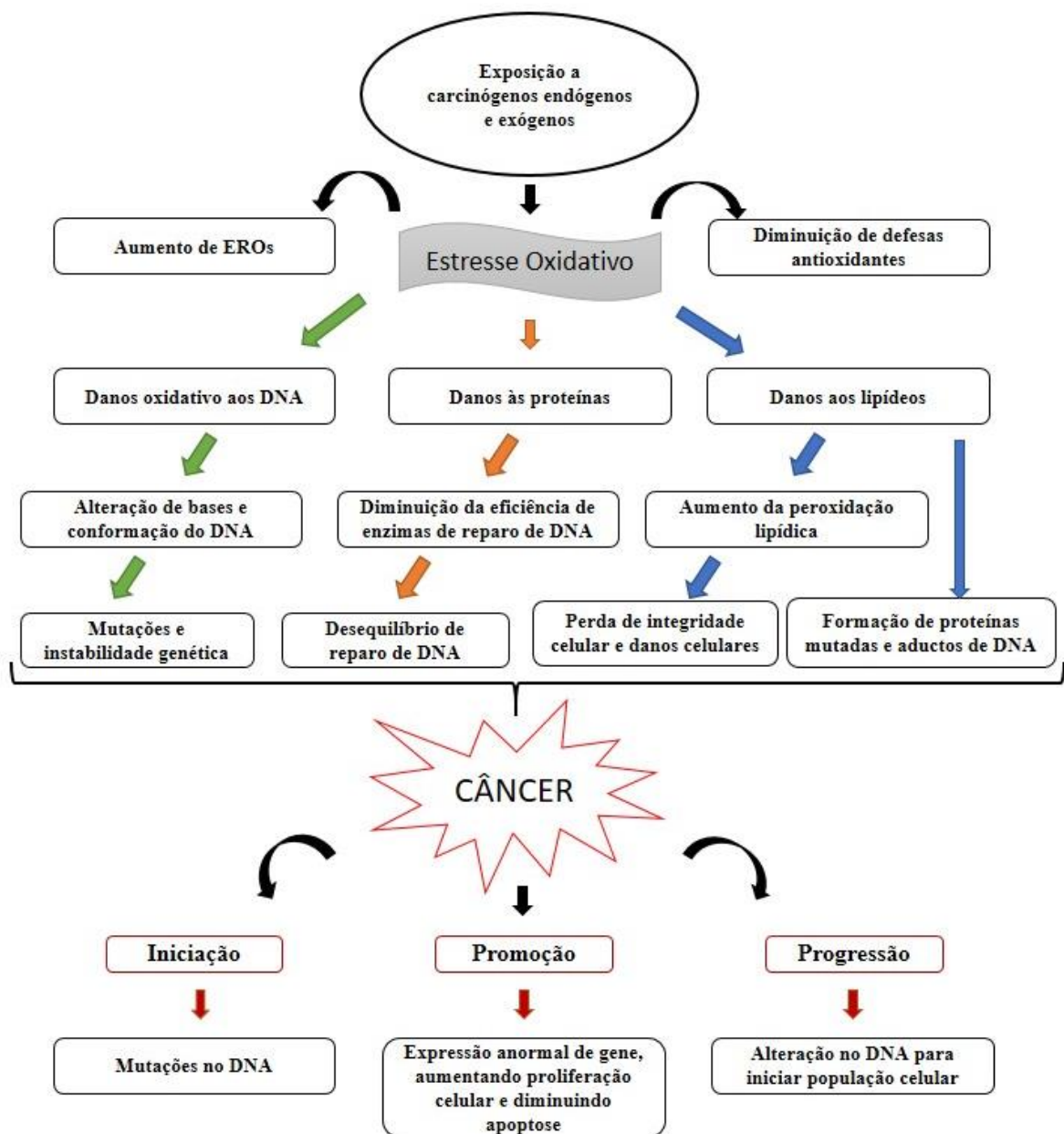
Fonte: CAROCHO; FERREIRA, 2013.

O primeiro conceito de estresse oxidativo foi descrito por Sies (1991) que o descreveu como “desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor de espécies oxidantes, levando a um dano potencial”. O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e sua eliminação pelas defesas antioxidantes do organismo é denominado estresse oxidativo, caracterizado pela redução da capacidade do sistema endógeno de “lutar” contra o ataque oxidativo de biomoléculas, e está relacionado com o desenvolvimento de diversas patologias. Dentre elas, desordens no sistema nervoso central (Parkinson e Alzheimer), que é extremamente sensível à danos por radicais livres, os quais promovem lesões aos tecidos e macromoléculas como lipídios, ácidos nucleicos e proteínas. Tais radicais, participam do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, disfunções imunes e endócrinas, danos renais e hepáticos, inflamações crônicas e até mesmo câncer (RAHAL et. al., 2014; PISOSCHI; POP, 2015).

O desenvolvimento do câncer está diretamente relacionado ao estresse oxidativo, através de três estágios: 1) iniciação – EROs produzem danos ao DNA, promovendo mutações; 2) promoção – EROs contribuem para expressão anormal de genes, modificando a comunicação entre células, e assim, aumentando a proliferação e diminuindo a apoptose; 3) progressão – EROs adicionam alterações no DNA para iniciar uma população celular. Isto ocorre através de diversos mecanismos. A exposição excessiva à carcinógenos endógenos ou

exógenos aumenta a produção de EROs e diminui as defesas antioxidantes, gerando estresse oxidativo, o qual promove: 1) danos ao DNA com alterações de bases e conformação do DNA, causando mutações e instabilidade genética; 2) danos às proteínas, diminuição da eficiência enzimas de reparo de DNA, e assim, o desequilíbrio do reparo; 3) danos aos lipídios, gerando aumento da peroxidação lipídica e perda da integridade celular, além da formação de proteínas mutadas e aductos de DNA (**Figura 3**) (REUTER et al., 2010; CHOUDHARI et al., 2014).

**Figura 3** – Mecanismos de ação do estresse oxidativo na carcinogênese



Fonte: Adaptado de REUTER et al., 2010; CHOUDHARI et al., 2014.

### 3.2 Câncer

O câncer (CA) é uma coleção de mecanismos patológicos complexos, caracterizado pela proliferação anormal de células, devido ao acúmulo de alterações somáticas ou epigenéticas, as quais afetam oncogenes e genes supressores de tumores, levando a uma transformação maligna (PELTOMAKI, 2012; WATSON et al., 2013). É um problema de saúde pública, onde a estimativa realizada em 2012, apontou 14 milhões de casos no mundo, com 8 milhões de óbitos. A Organização Mundial da Saúde estima para 2025 mais de 20 milhões de novos casos, sendo os mais comuns os cânceres de pulmão, mama, intestino e próstata. A estimativa para o Brasil, no biênio 2016-2017, é de 600 mil novos casos, exceto melanoma, apresentado na distribuição proporcional (**Figura 4**) o câncer de próstata como o mais incidente para homens (61.200 novos casos) e o de mama para as mulheres (57.960 novos casos) (INCA, 2015).

**Figura 4** – Distribuição proporcional de 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio 2016-2017 por sexo, exceto melanoma

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens	Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2015

As células do câncer possuem características diferentes das células normais, tais como, resistência à morte celular, proliferação celular crônica, evasão de supressores de crescimento, ativação de invasão e metástase, potencial limitado de replicação e indução de angiogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2011). De acordo com Reuter e colaboradores (2010), células normais quando não possuem os mecanismos de defesas antioxidantes adequados apresentam hipersensibilidade a EROs, o que pode desencadear o surgimento de uma neoplasia. Enquanto

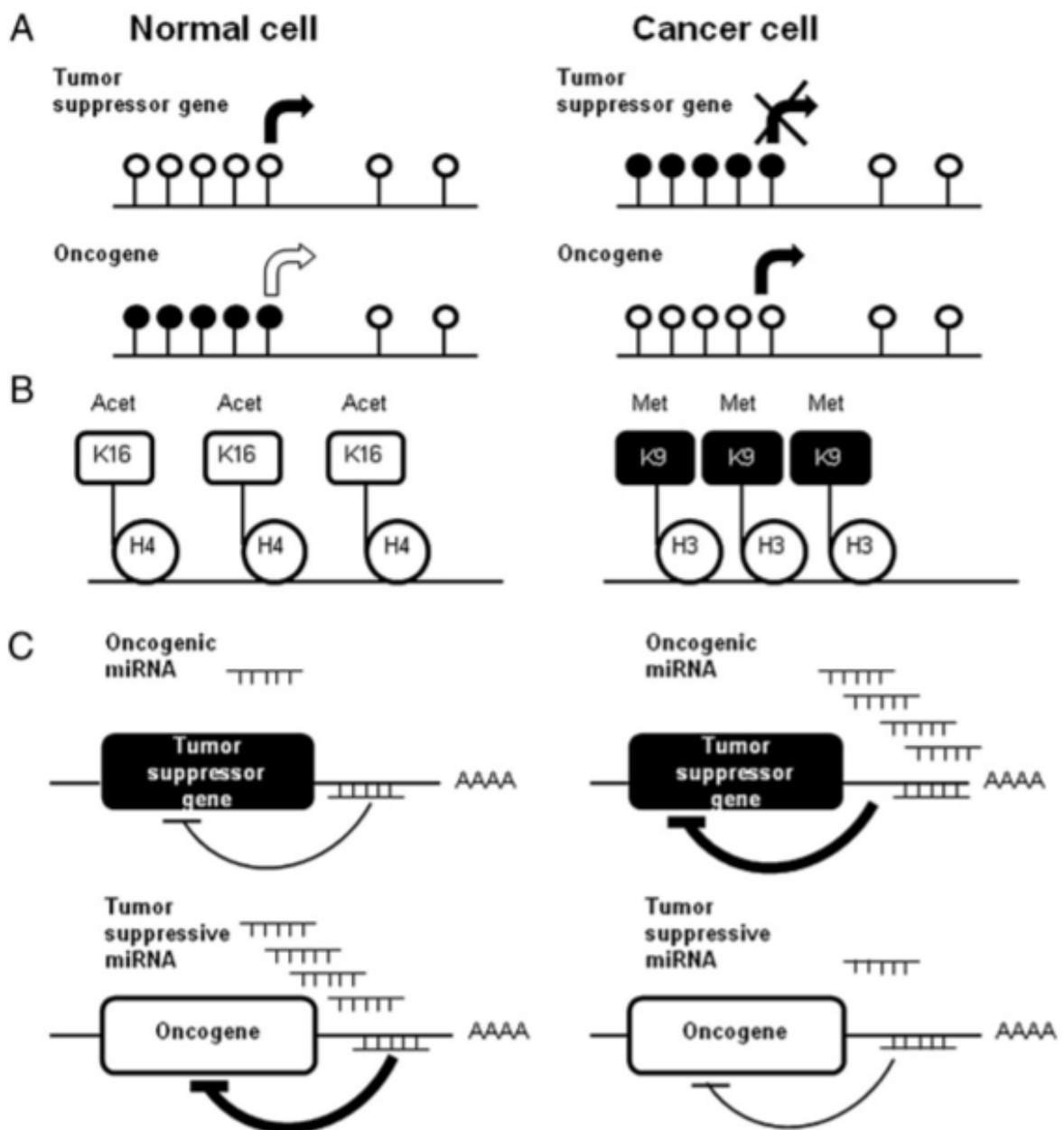
as células cancerígenas, por outro lado, desenvolvem uma super-regulação de mecanismos antioxidantes, o que as protege das EROs, como ocorre nos casos de radio e quimioresistência.

As células cancerígenas tem por etiologia alterações genéticas e epigenéticas. Pelo ponto de vista das alterações genéticas, as alterações são caracterizadas como um conjunto de proliferações clonais que ocorrem devido a mutações de genes, em sua maioria somáticas, que ocorrem no genoma durante a divisão celular e que resultam de infidelidade durante a replicação do DNA, modificações enzimáticas ou defeito no reparo de DNA, decorrentes da exposição à agentes mutagênicos endógenos ou exógenos (GREENMAN et al., 2007; LUDMIL et al., 2013).

As mutações podem ser divididas em: 1) Gênicas - que alteraram um único gene ou os bloqueiam, e envolvem substituição, deleção ou adição de pares de base; 2) Cromossômicas – que podem causar perda de cromossomos, sendo classificadas de acordo com o tipo de dano: as estruturais que envolvem deleção, duplicação, translocação, ou inversão de partes de cromossomos (aneuploidia) e também os indivíduos ou espécies com números cromossômicos (n) múltiplos do comum da espécie ou do gênero (euploidia) (BIANCOTTI et al., 2010; HANIGAN et al., 2011; SŁOCZYŃSKA et al., 2014).

Por outro lado, alterações epigenéticas correspondem a modificações que podem ocorrer no genoma, mas que não mudem a sequência de bases, e sim, a conformação estrutural da molécula de DNA, que conseqüentemente altera a expressão gênica, através de modificação de proteínas (histonas e metiltransferases), metilação do DNA e remodelamento de nucleossomos (COSTA, 2010; HEMMATZADEH et al., 2016). Peltomaki (2012) corrobora ilustrando a diferença entre uma célula normal e uma célula epimutada, onde a segunda apresenta inativação de gene supressor de tumor devido a uma hipermetilação, e a ativação de um oncogene promovida por uma hipometilação; regulação da transcrição por modificações na histonas alterando a cromatina; inativação de um gene supressor de tumor pelo aumento da expressão do oncogene miRNA e a ativação do oncogene pela redução da expressão do supressor de tumor miRNA (**Figura 5**).

**Figura 5** – Exemplos de alterações epigenéticas características de células neoplásicas. **(A)** modificação de histonas - inativação de gene supressor de tumor devido a uma hipermetilação (seta – ativação da transcrição), e a ativação de um oncogene promovida por uma hipometilação (seta branca – perda de expressão / seta preta – aumento de expressão); **(B)** regulação da transcrição por modificações na histonas alterando a cromatina; **(C)** inativação de um gene supressor de tumor pelo aumento da expressão do oncogene miRNA, e a ativação do oncogene pela redução da expressão do supressor de tumor miRNA.



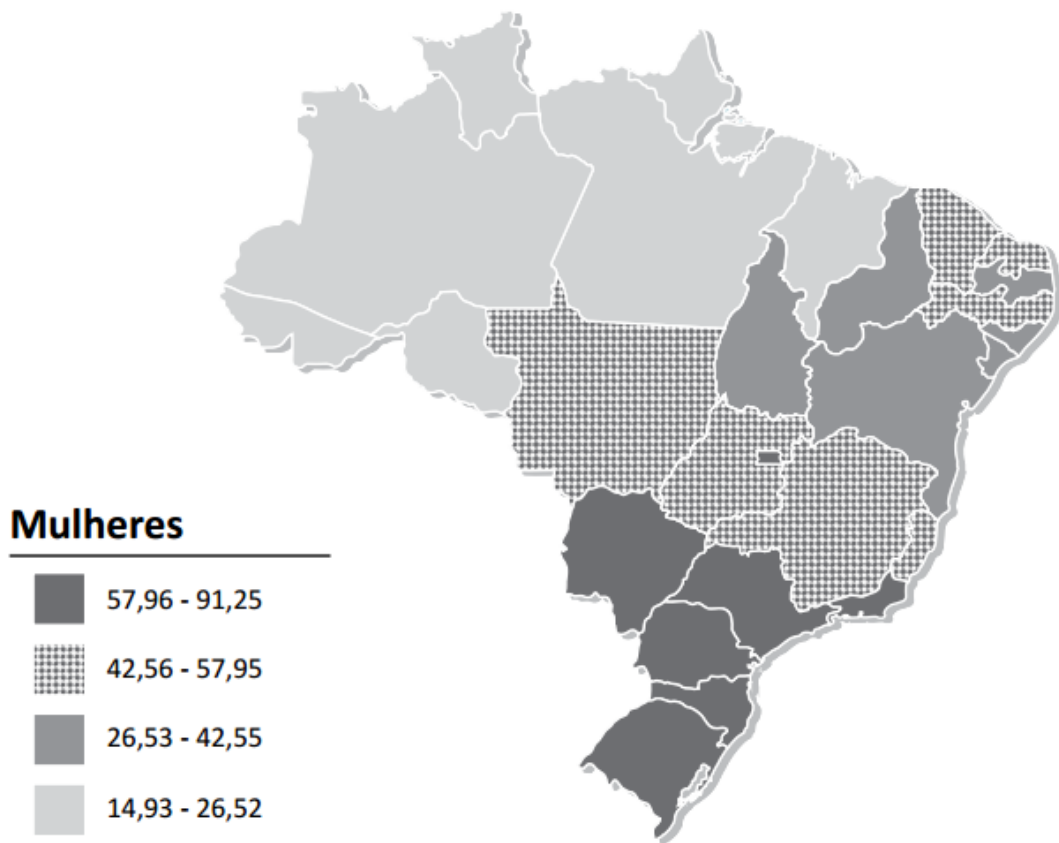
Fonte: PELTOMAKI, 2012.



### 3.2.1 Câncer de Mama

Dentre os tipos de CA, o câncer de mama (CM) é o segundo mais comum, com aproximadamente 1,67 milhões de casos em todo o mundo em 2012, representando aproximadamente 25% de todos os tipos de CA diagnosticados nas mulheres. Para o Brasil, em 2016, são esperados 57.960 casos novos, com maior frequência nas mulheres das Regiões Sul (74,30/100 mil), Sudeste (68,08/100 mil), Centro-Oeste (55,87/100 mil) e Nordeste (38,74/100 mil) (**Figura 6**) (INCA, 2015).

**Figura 6** – Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasias malignas da mama feminina, por 100 mil mulheres, estimadas para o biênio 2016-2017 no Brasil



Fonte: INCA, 2015

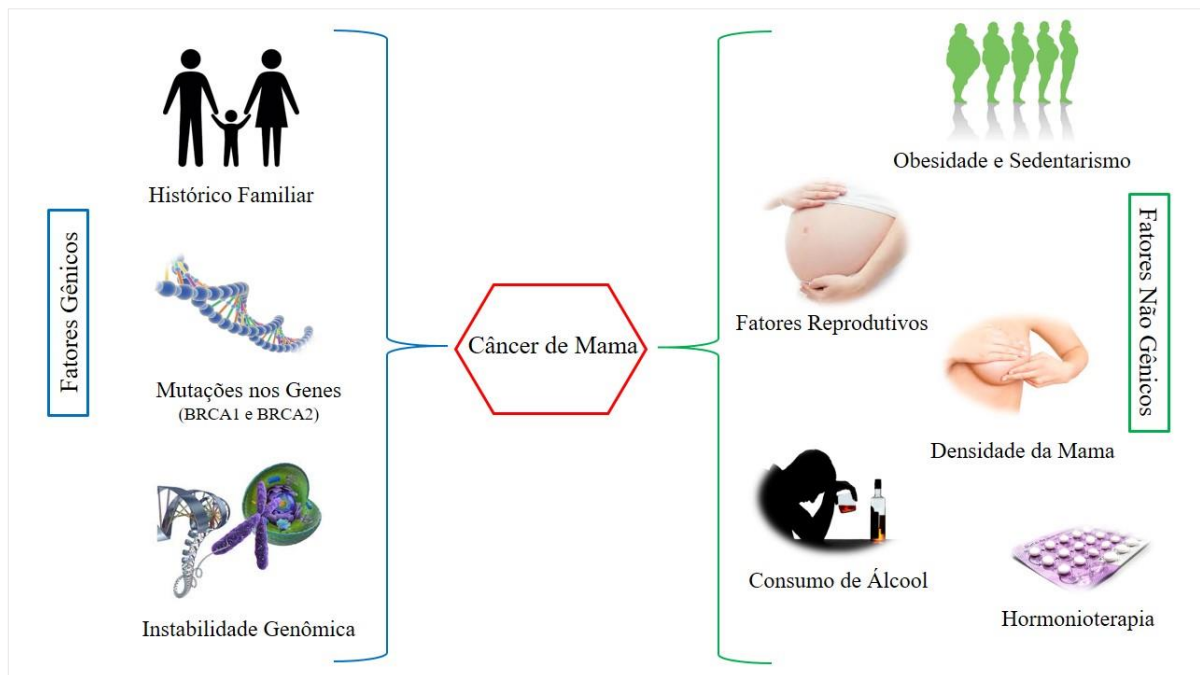
O CM é caracterizado por ser uma doença multifatorial, que envolve um desequilíbrio entre fatores dietéticos, hormonais reprodutivos e genéticos e por ser uma patologia

heterogênea que consiste em cerca de 20 subtipos morfológicos distintos e 4 subtipos baseados na expressão gênica, onde cada subtipo é caracterizado por fatores de risco particulares, responsáveis pelo tratamento e risco de progressão da doença. (SILVA et al., 2012; JANSEN; BACKSTEIN; BROWN, 2014). Os 4 subtipos baseados na expressão gênica são representados por 2 luminais (Luminal-A e Luminal-B) que predominantemente possuem receptor de hormônio positivo (ER+); um subtipo super-expressa HER2; e um do tipo basal, sem expressão de HER2 e com receptores hormonais negativos (ER-) (triplo negativo) (DAWOOD; GONZALES-ANGULO, 2013; AZIM JR; PARTRIDGE, 2014).

O diagnóstico do câncer de mama, na maioria dos casos, ocorre na idade média de 60 anos, em mulheres pós-menopausa. Em mulheres jovens pré-menopáusicas, antes dos 40 anos, seu diagnóstico está associado ao alto risco de recorrência, agressividade e morte na maioria dos casos, representando apenas 5 a 7% dos diagnósticos (AZIM JR; PARTRIDGE, 2014; NG et al. 2015). Estudos apontam que metástases cerebrais em mulheres com CM ocorrem em cerca de 10-16% dos casos, e tendem a ocorrer em mulheres jovens, com tumores agressivos e subtipos triplo negativos e HER2 positivo, com incidência anual de aproximadamente 170.000 casos por ano nos Estados Unidos da América (EUA). A metástase é descrita como a migração de células tumorais de um tecido primário, seguida de invasão, sobrevivência e extravasamento do sistema circulatório, e progressiva colonização em um sítio distante; ou como um célula tumoral geneticamente instável, que promove seleção das características que proporcionarão a invasão e colonização em órgãos à distância, dentre eles a medula, pulmão e cérebro (DAWOOD; GONZALES-ANGULO, 2013; MARINO et al., 2013).

Dentre os fatores de risco para o CM, existem fatores gênicos, os quais podem estar relacionados ao histórico familiar, principalmente mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, e instabilidade genéticas; e fatores não gênicos, que incluem: fatores reprodutivos como menarca precoce, primeira filha com idade avançada, menopausa tardia; obesidade; consumo de álcool; exposição à radiação; hormônio terapia, como o uso associado de estrogênio e progesterona na pós-menopausa, e uso de contraceptivos; sedentarismo; e densidade da mama (YANG et al. 2010; COLDITZ; BOHLKE; BERKEY, 2014) (**Figura 7**). Variações na densidade da mama, como alteração no colágeno e números de células epiteliais e não epiteliais, estão associadas ao risco de invasão e lesões proliferativas que podem ser precursoras do CM (BOYD et al., 2010).

**Figura 7 – Fatores de risco para o Câncer de Mama**



Fonte: Adaptado de YANG et al., 2010; COLDIT; BOHLKE; BERKEY, 2014.

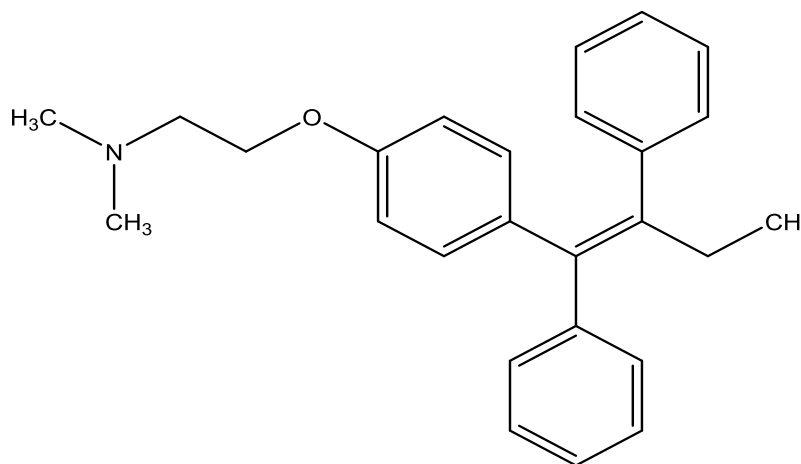
Estima-se aproximadamente 2,5 milhões de mulheres sobrevivam ao CM nos EUA, isso se deve à detecção precoce, aumento da conscientização dos pacientes e tratamentos efetivos, dentre eles cirurgia, quimioterapia e radioterapia, e suas associações com o objetivo de melhor efetividade. Entretanto, estudos apontam que os agentes quimioterápicos apresentam potencial de causar danos cardiovasculares, agudos ou crônicos, dentre eles, isquemia do miocárdio, hipertensão, arritmias, bradicardia, insuficiência cardíaca congestiva dentre outros, assim como o uso da radioterapia, a qual promove danos diretos ao miocárdio e as artérias coronarianas (DAWOOD; GONZALES-ANGULO, 2013; BODAI; TUSO, 2015).

### 3.2.1.1 Tratamento do Câncer de Mama

O tratamento do CM envolve, cirurgia, radioterapia, quimioterapia citotóxica e endocrinoterapia. A endocrinoterapia interage com os receptores de estrogênio em mulheres

com câncer de mama hormônio sensível principalmente pelo uso do tamoxifeno ou, por outro lado, inibindo a síntese de estrogênios por meio do Anastrozole, Exemestase, e Fulvestran (VISOVSKY, 2014). O Tamoxifeno (TAMOX) (**Figura 8**) geralmente é empregado como terapia após o tratamento quimioterápico, por ser antagonistas dos receptores de estrogênio na mama, fazendo o mesmo competir com este hormônio, impedindo que ocorra a ligação nesses sítios que poderiam levar a uma proliferação celular. No entanto, alguns estudos revelam que ele também pode inibir a proliferação e induzir a apoptose em câncer de mama receptor de estrogênio negativo, por meio de outro mecanismo de ação, tais como o aumento do *status* oxidativo celular, inibição de proteína C quinase, dentre outros (PKC) (LIU et al., 2014; RADIN; PATEL, 2016).

**Figura 8** – Estrutura química do Tamoxifeno



(Z)-2-(4-(1,2-diphenylbut-1-en-1-yl)phenoxy)-N,N-dimethylethan-1-amine

Chemical Formula: C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>NO

Exact Mass: 371,22

Molecular Weight: 371,52

Elemental Analysis: C, 84.06; H, 7.87; N, 3.77; O, 4.31

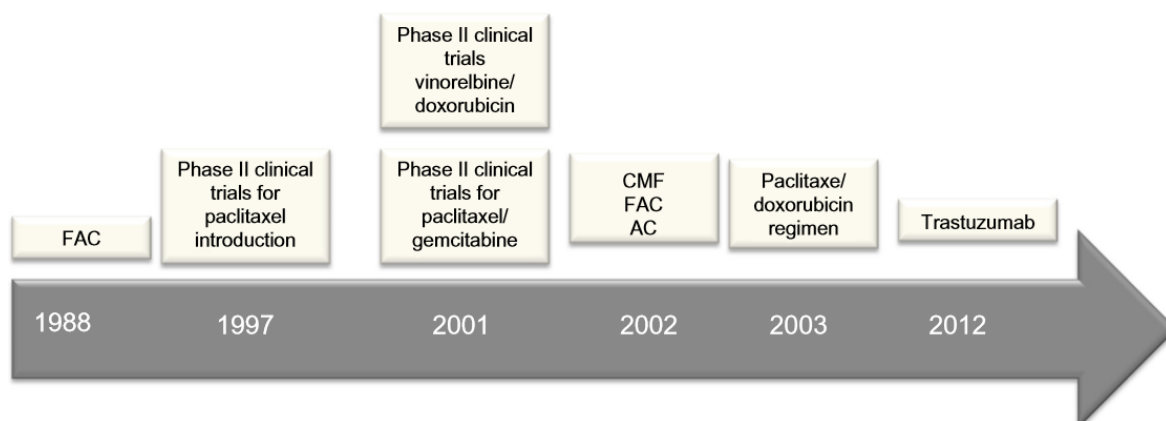
Fonte: ChemBioDraw, 2016.

Estudos apontam que o tamoxifeno causa danos oxidativos ao DNA, induzindo quebras na estrutura da molécula e a oxidação de purinas e pirimidinas. Todavia, em tumores resistente ou sensíveis à esta droga, a expressão de enzimas antioxidantes (SOD, catalase, GST) aumenta, ao mesmo tempo que a peroxidação lipídica reduz (MELO et al., 2011; NASS et al., 2015). Contudo, apesar de sua eficácia no tratamento do CM, pesquisas relatam que o uso de TAMOX está associado a efeitos colaterais indesejáveis como aumento do risco de tromboembolismo, câncer uterino tipo *Müllerian*, polipos, hiperplasia endometrial e até

mesmo carcinoma endometrial (VASCONCELOS et al., 2013; HU; HILAKIVI-CLARKE; CLARKE, 2015). Todavia, o TAMOX tem sido a endocrinoterapia mais empregada no CM e que vem sendo paulatinamente substituída pelos inibidores da aromatase, como o anastrozol, os quais tem demonstrado resultados superiores, com maior atividade e melhor tolerabilidade, em comparação a terapia com TAMOX em mulheres pós-menopáusicas (GOBBI et al., 2014).

A quimioterapia tem por base o uso de drogas antineoplásicas. No Brasil, mulheres diagnosticadas com CM foram tratadas pelo SUS por diversos protocolos ao longo dos anos, dentre eles CMF (ciclofosfamida, metrotrexato e 5-fluorouracil), FAC (5-fluorouracil, adriamicina e ciclofosfamida), FEC (5-fluorouracil, epirubicina e ciclofosfamida) e AC (adriamicina e ciclofosfamida), após o ano 2003, o SUS implantou o protocolo paclitaxel e doxorubicina, e em 2012, o trastuzumab (CECILIO et al., 2015) (**Figura 9**). Contudo, a maior lacuna da quimioterapia convencional são seus efeitos adversos e a quimiorresistência, induzida pela super-regulação de sinalizadores de sobrevivência e a resistência gênica à drogas. Para “driblar” isso, atualmente, o tratamento sistêmico é ser realizado através de combinações entre drogas, de forma adjuvante ou neoadjuvante. A terapia adjuvante é padrão ouro no tratamento, pois reduz a recorrência local e sistêmica, e a neoadjuvante é utilizada para a redução tumoral com o intuito de facilitar a conservação da mama durante a cirurgia, e seguida pela quimioterapia pós-cirurgia (VINOD et al., 2013; MICHAELS et al., 2016).

**Figura 9** – Linha do tempo representando os protocolos de quimioterapias implantados no Brasil pelo SUS

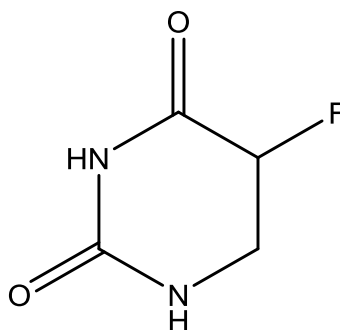


Fonte: CECILIO et al., 2015.

O 5-Fluorouracil é um quimioterápico de primeira linha no tratamento do CM, que atua pela inibição de processos biossintéticos essenciais, dificultando o crescimento celular

pela inibição da timidilato sintetase, impedindo desta forma, a transcrição de DNA e translação de RNA, além de se incorporar nestas macromoléculas, inibindo suas funções normais, levando, assim, a apoptose e a citotoxicidade (ZHANG et al., 2012; ASARA et al., 2013; LI et al., 2015) (**Figura 10**). García e colaboradores (2011) demonstraram que o 5-FU promoveu a ativação de uma proteína quinase (PKR) por meio de uma via p53- independente, induzindo apoptose em células de câncer de cólon e de mama. Entretanto, seu uso está relacionado a alguns efeitos adversos, estudos correlacionam o estresse oxidativo induzido pelo 5-fluorouracil com a mielosupressão e cardiotoxicidade em ratos (NUMAZAWA et al., 2010; LAMBERTI et al., 2012). Polk e colaboradores (2014) afirmam que o tratamento com 5-fluorouracil pode causar isquemia miocárdica, assim como arritmias, hiper e hipotensão e disfunção ventricular. Vinod e colaboradores (2013) relatam que o 5-fluorouracil, além dos efeitos adversos como leucopenia, diarreia, anorexia e vômito, desenvolve quimioresistência pela super-regulação de sinalizadores de sobrevivência, através da translocação nuclear e ativação de NF- $\kappa$ B e ativação de Akt, cuja maior função é sobrevivência e proliferação celular.

**Figura 10** – Estrutura química do 5-Fluorouracil



5-fluorodihydropyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione

Chemical Formula:  $C_4H_5FN_2O_2$

Exact Mass: 132,03

Molecular Weight: 132,09

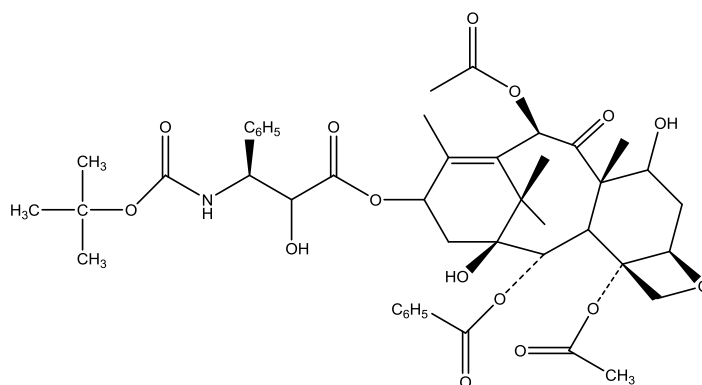
Elemental Analysis: C, 36.37; H, 3.82; F, 14.38; N, 21.21; O, 24.22

Fonte: ChemBioDraw, 2016.

O Docetaxel (**Figura 11**) é um taxano semi-sintético, que apresenta atividade sobre tumores sólidos metastáticos que são resistentes ao tratamento com Paclitaxel, e possui como mecanismo de ação antineoplásica a interferência da dinâmica dos microtúbulos (polimerização e despolimerização), interrompendo, desta forma, o ciclo celular, causando

senescência e apoptose, além de alterar a expressão e fosforilação de proteínas da família Bcl-12, induzindo apoptose (MONTERO et al., 2005; ALKEN; KELLY, 2013; QU et al., 2014). A quimioterapia com Docetaxel é efetiva devido ao fato dele superar a resistência cruzada com outras drogas antineoplásicas, porém seu uso está associado a efeitos adversos como hematotoxicidade, mialgias, artralguas e neuropatias (CHEN et al., 2013; PEREL-WINKLER et al., 2015). Frederiks e colaboradores (2015) relatam que polimorfismo no gene codificante da Glutathione-s-transferase, enzima envolvida na resposta ao estresse oxidativo, pode estar relacionado às toxicidades neurológicas induzidas pelo docetaxel. E estudos apontam que o docetaxel induz estresse oxidativo, podendo provocar disfunções endoteliais, através da modulação da proteína C quinase (TABACZAR et al., 2012; HUNG et al., 2015).

**Figura 11** – Estrutura química do Docetaxel



(2a*R*,4a*S*,6*R*,11*S*,12*S*,12b*S*)-12-(benzoyloxy)-9-(((3*S*)-3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-hydroxy-3-phenylpropanoyl)oxy)-4,11-dihydroxy-4a,8,13,13-tetramethyl-5-oxo-3,4,4a,5,6,9,10,11,12,12a-decahydro-1*H*-7,11-methanocyclodeca[3,4]benzo[1,2-*b*]oxete-6,12b(2a*H*)-diyl diacetate  
 Chemical Formula: C<sub>45</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>15</sub>  
 Exact Mass: 849,36  
 Molecular Weight: 849,93  
 Elemental Analysis: C, 63.59; H, 6.52; N, 1.65; O, 28.24

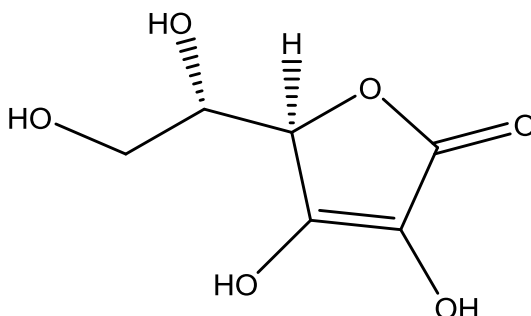
Fonte: ChemBioDraw, 2016.

### 3.3 Ácido Ascórbico

O Ácido Ascórbico (AA) (**Figura 12**) (AsC<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, vitamina C) é uma cetolactona solúvel em água, com dois grupos hidroxil ionizáveis, caracterizado por ser um excelente agente redutor, que sofre duas oxidações para formar os radicais ascorbato (Asc•-) e ácido desidroascórbico (DHA) (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012). É essencial para a vida de diversos organismos, sendo sintetizado no fígado dos mamíferos, através da formação do ácido D-glucoronico e de L-gulono- $\gamma$ -lactona, exceto nos primatas superiores, como os seres humanos, devido ao fatos destes não possuírem a enzima L-gulono- $\gamma$ -lactona oxidase,

incapacitando a síntese o AA, tornando-os assim, dependentes de fontes exógenas, como frutas e legumes, para a manutenção dos níveis fisiológicos e participação de processos de detoxificação, enzimáticos e modulatórios do metabolismo neuronal (COVARRUBIAS-PINTO, et al. 2015; MILES, et al., 2015). A ingestão diária de AA recomendada é 75-125 mg por dia. A concentração típica de AA no plasma de seres humanos saudáveis é cerca de 40-80  $\mu$ M. A dose necessária para saturar o plasma e os tecidos de um adulto é de 500 mg. A dose recomendada para prevenir doenças degenerativas e câncer é de 60 mg (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012; COVARRUBIAS-PINTO, et al. 2015).

**Figura 12** – Estrutura química do Ácido Ascórbico



(*R*)-5-((*S*)-1,2-dihydroxyethyl)-3,4-dihydroxyfuran-2(*5H*)-one

Chemical Formula:  $C_6H_8O_6$

Exact Mass: 176,03

Molecular Weight: 176,12

Elemental Analysis: C, 40.92; H, 4.58; O, 54.50

Fonte: ChemBioDraw, 2016.

O AA é um antioxidante altamente eficaz, pois participa da neutralização de EROs, na ativação de genes envolvidos no reparo de DNA, modulação de danos ao DNA em células expostas a EROS *in vitro* e *in vivo*, demonstrando que a suplementação com AA pode ajudar a prevenir doenças resultantes de danos causados por radicais livres. Porém seu efeito farmacológico ainda é controverso, pois em doses elevadas, este composto inibe o crescimento de células neoplásicas, devido a sua ação pró-oxidante, a qual pode estar relacionada a regulação negativa de EROs dependente de fatores de transcrição SP, sendo comparável a observada em outras drogas antineoplásicas como o trióxido de arsênio (PATHI et al., 2011; KONTEK; KONTEK, GRZEGORCZYK, 2013).

González e Ribolo (2010) relatam que a atividade pró-oxidante do AA pode estar relacionada com mitocôndrias, as quais podem ter papel principal na progressão tumoral, pois



geram ATP, que tem importância para a regulação de apoptose, produção e regulação de espécies reativas de oxigênio. Neste sentido, o alto conteúdo de AA pode aumentar a produção de ATP, induzindo apoptose em linhagens de células tumorais, por via pró-oxidante. Por outro lado, em baixas concentrações, o ácido ascórbico apresenta papel antioxidante podendo prevenir a oxidação, um dos fatores para indução de apoptose. Carochio e Ferreira (2013) afirmam que agentes antioxidantes podem agir como pró-oxidantes, dependendo de sua concentração e natureza das moléculas vizinhas, dentre outros fatores, discorrendo sobre estudos que apontam a influência dos antioxidantes em doenças neurodegenerativas, assim como a participação de pró-oxidantes no câncer.

A utilização de AA no tratamento do câncer tem sido estudada nos últimos 50 anos, demonstrando que a suplementação vitamínica de AA pela dieta tem apresentado efeitos preventivos em múltiplos tumores. Todavia, estudos apontam que doses elevadas de AA por via oral, somente permite atingir concentrações plasmáticas de 1g/dia, o excesso é excretado pelo organismo, onde concentrações em níveis de mM só são possíveis por meio de administração intravenosa de elevadas doses (FRAJESE et al., 2016). O AA intravenoso é um tratamento alternativo de câncer utilizado com o objetivo de retardar o avanço do câncer. Há provas biológicas que altas concentrações extracelulares de AA podem reduzir a toxicidade da quimioterapia ou aumentar a sua eficácia. No entanto, nenhuma informação clínica está disponível para indicar quais tipos de câncer e regimes de quimioterapia podem apresentar resultados favoráveis ou desfavoráveis com o uso de ácido ascórbico intravenoso (HOFFER et al., 2015). Miles e colaboradores (2015) realizaram estudos para avaliar o efeito de concentrações fisiológicas de AA em células de melanoma metastático, tendo sido mostrada a redução da atividade de HIF-1 e transcrição nas células neoplásicas, promovendo diminuição da progressão maligna e possibilitando uma melhoria na terapia.

Du, Cullen e Buettner (2012) realizaram um estudo em camundongos com câncer de pâncreas, os quais receberam duas doses diárias (4 g/Kg) de AA. O tratamento apresentou uma redução da taxa de crescimento tumoral, entretanto, após cessar o tratamento, foi observado um aumento do crescimento tumoral, evidenciando que o AA, neste modelo, agiu de forma citostática, não citotóxica. Os autores relatam que há estudos que apontam que o uso do AA em conjunto com quimioterápicos convencionais apresentam efeitos citotóxicos sinérgicos. Stephenson e colaboradores (2013) relatam que estudos com linhagens celulares apontam efeitos citotóxicos do AA em linhagens celulares nas concentrações  $\mu\text{M}$  e mM. Ensaio pré-clínicos com elevadas doses de AA apresentaram efeitos antineoplásicos em modelos animais e culturas de tecidos. E clínicos iniciais sugeriram que o AA (intravenoso ou

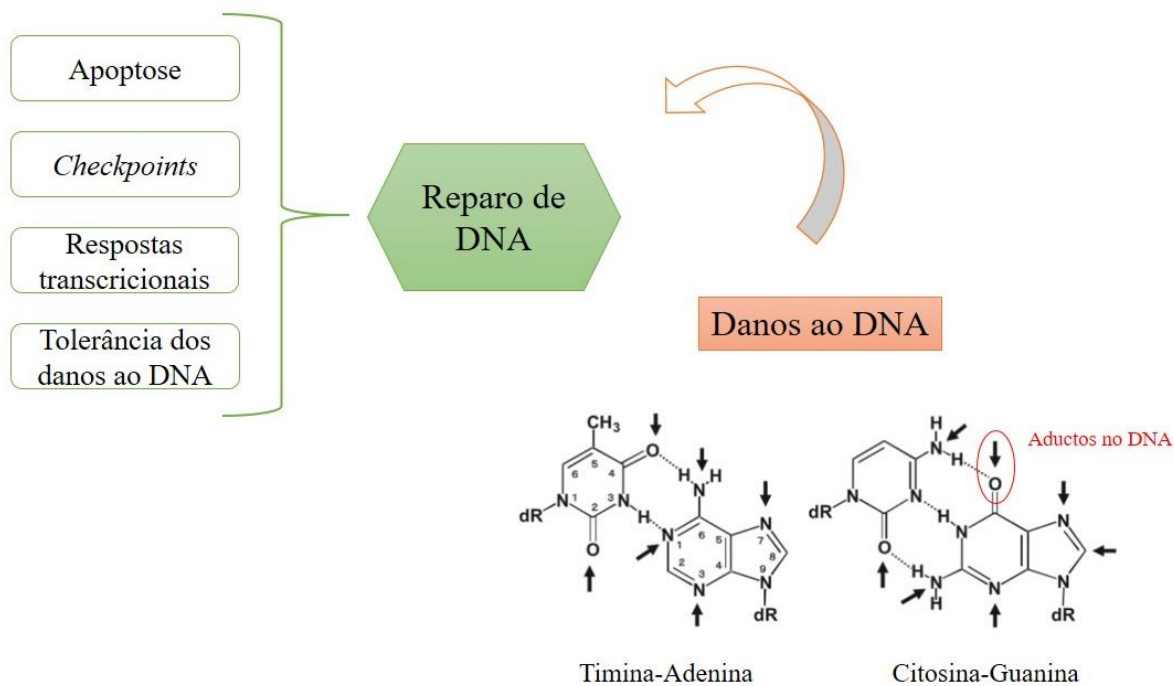
oral) pode diminuir os sintomas e prolongar a vida de pacientes com câncer terminal. Pathi e colaboradores (2011) realizaram um estudo com células de câncer de cólon (SW480 e RKO) e observaram que o AA na dose de 1-3 mM reduziu a proliferação celular, devido a diminuição da expressão de proteínas SP, assim como, indução da apoptose e necrose.

Estudos apontam que células neoplásicas possuem maior sensibilidade a citotoxicidade induzida pelo AA do que células normais. Esta diferença de sensibilidade pode ser explicada pelos baixos níveis de enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e peroxirredoxinas) e altos níveis de EROs nas células neoplásicas (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012). Kontek, Kontek e Grzegorzcyk (2013) realizaram estudos com células câncer de colo retal (HT29) *in vitro*, os quais evidenciaram que o AA influencia nas lesões oxidativas ao DNA em células neoplásicas, onde na presença de AA+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 µM) foi observada uma diminuição da viabilidade celular das células HT29.

### **3.4 Danos ao DNA, seus biomarcadores e modelos para estudos farmacológicos**

As células dos mamíferos possuem uma maquinaria de reparo de DNA para manutenção da integridade do material genético por meio de diversos mecanismos, tais como indução de apoptose para eliminação de células lesadas, respostas transcricionais para promover a sobrevivência celular, tolerância dos danos ao DNA, ativação de *checkpoints* de danos ao DNA durante o ciclo celular e iniciação do reparo do DNA (ABBOTTS; THOMPSON; MADHUSUDAN, 2014). Contudo, defeitos nesta maquinaria podem desencadear a carcinogênese, que possui como principal mecanismo os danos ao DNA, oriundo de agentes mutagênicos que reagem com os átomos de oxigênio nas ligações fosfodiésteres do DNA. A Guanina, por exemplo, é a base nitrogenada mais reativa, afetada diretamente pelos mutágenos ambientais, os quais lhe promovem aductos (KASAI, 2016) (**Figura 13**).

**Figura 13** – Danos ao DNA, maquinaria de reparo de DNA e seus diversos mecanismos.



Fonte: Adaptado de ABBOTTS; THOMPSON; MADHUSUDAN, 2014; KASAI, 2016.

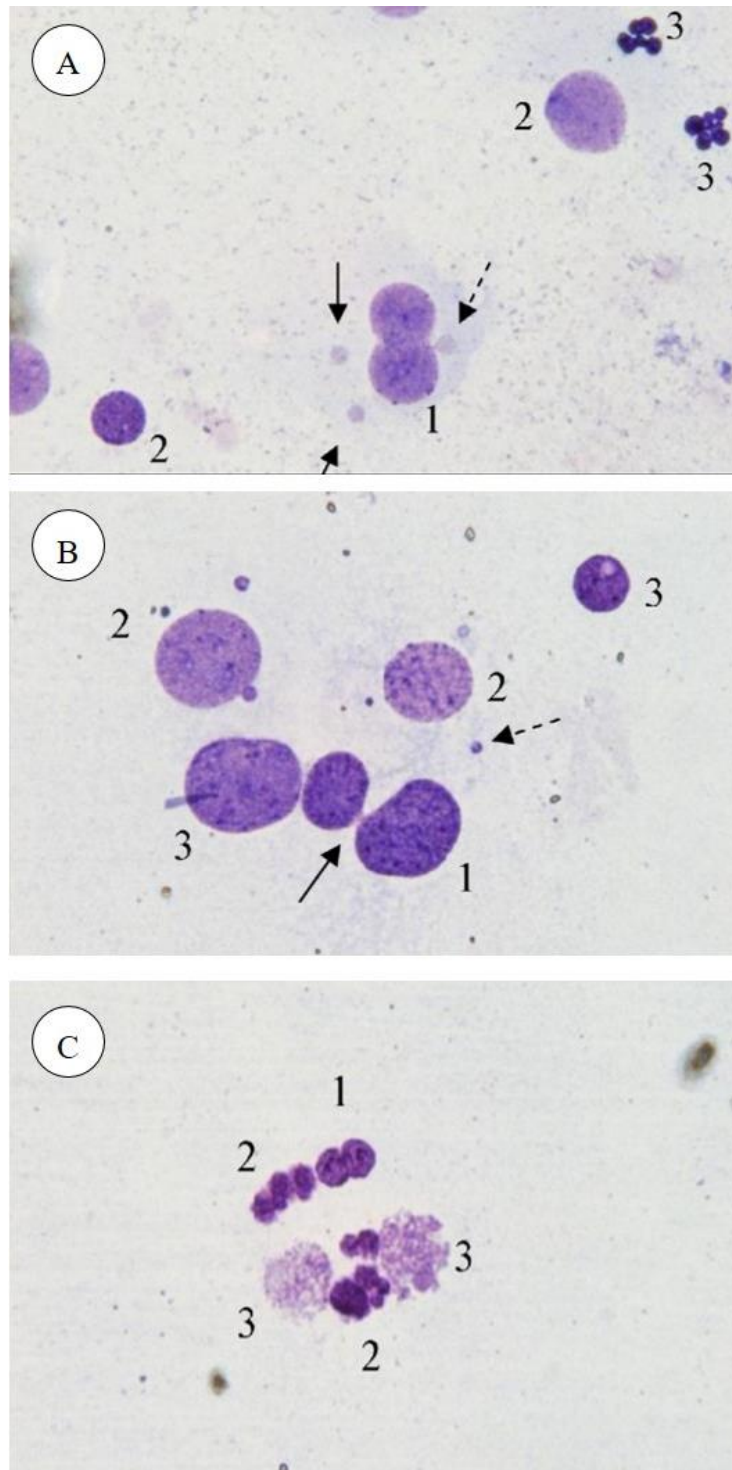
Os danos oxidativos ao DNA estão diretamente relacionados com a carcinogênese, conforme relatado anteriormente. Devido a isto, há a necessidade da utilização de modelos farmacológicos para a avaliação destes danos. A utilização de modelos biológicos têm sido amplamente adotada, por permitir a superação de restrições éticas e experimentais relacionadas à forma de vida alvo, uma vez que tais modelos representam uma ampla classe de seres vivos, em termos de processos biológicos. Dentre estes modelos, encontra-se as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), amplamente utilizadas em estudos de estresse oxidativo, por possuírem um sistema eucariótico celular com metabolismo semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos apropriados de ativação metabólica (citocromo P450) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias (SOARES, 2005; KARATHIA et al., 2010). Graziano e colaboradores (2016) afirmam que a *S. cerevisiae* tem

seu uso como modelo de investigação para processos fisiológicos, biológicos e patológicos, assim como na área da toxicogenômica.

Os danos mutagênicos e genotóxicos, são danos ao DNA que podem ser avaliados por diversos biomarcadores e modelos, dentre eles o teste de micronúcleo e o ensaio cometa (GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015). O Teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN) é um método citogenético, que foi desenvolvido inicialmente para cultura de linfócitos humanos e posteriormente adaptado para outros tipos celulares, utilizado para a avaliação de danos ao DNA (micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas, brotos nucleares, apoptose e necrose), que se baseia na análise de células binucleadas, as quais apresentam uma divisão celular completa com bloqueio de divisão subsequente realizado pela Citocalasina-B (FENECH, 2000; PEJCHAL et al., 2011).

Os micronúcleos (MN) são oriundos de fragmentos de cromossomos ou cromossomos soltos, os quais não foram incluídos no núcleo principal durante a mitose, devido a alterações estruturais espontâneas ou por fatores mutagênicos, envoltos por uma membrana nuclear, tornando-se um artefato nuclear, pequeno e separado. As pontes nucleoplasmáticas são indicativo de disfunção dos telômeros após perda de reparo ou quebra dupla do DNA, que gera cromossomos dicêntricos puxados para polos opostos do fuso mitótico durante a anáfase, formando uma ponte estreita entre os dois núcleos. E os brotos nucleares são corpos ligados ao núcleo principal, por uma ligação nucleoplasmática fina, originados por um mecanismo pelo qual as células removem o DNA amplificado (amplificação de gene) (FENECH, 2011; PEJCHAL et al., 2011). A **Figura 14 (A e B)** demonstra a presença destes danos nucleares por meio do teste CBMN em linfócitos humanos expostos a radiação (5 Gy) (PEJCHAL et al., 2011).

**Figura 14** – Danos nucleares em linfócitos humanos expostos à radiação (5 Gy) após CBMN. **(A)** - 1) Célula binucleada com dois micronúcleos e um broto nucleoplasmático (setas); 2) Célula mononucleada sem citoplasma; 3) Células apoptóticas (corpos apoptóticos). **(B)** - 1) Célula binucleada com micronúcleo e ponte nucleoplasmática (seta); 2) Célula mononucleada com micronúcleo (seta pontilhada); 3) Célula mononucleada sem micronúcleo. **(C)** - 1) Célula apoptótica inicial com cromatina condensada dentro do limite nuclear intacto; 2) Célula apoptóticas tardias exibindo fragmentação nuclear; 3) Células necróticas com membrana nuclear danificada e irregular.



Fonte: PEJCHAL et al., 2011.

A necrose é um importante marcador evolutivo de diversas patologias, sendo provocada por fatores que impossibilitam a viabilidade fisiológica celular, independente das caspases de morte celular (FANG et al, 2016). A apoptose é caracterizada por células arredondadas, com pseudópodes retraídos, volume celular reduzido, cromatina condensada e núcleos fragmentados (corpos apoptóticos), podendo ser desencadeada por fatores intrínseco e extrínsecos. A apoptose intrínseca é desencadeada por diversas condições, como danos ao DNA e estresse oxidativo, e requer a permeabilização da membrana mitocondrial, estando diretamente relacionada a família de proteínas Bcl-2. A apoptose extrínseca é conduzida por um complexo de sinalização composto por sinais extracelulares de estresse, que são detectados e propagados por receptores de membranas específicos (Fas, TNFR1 e TRAIL) (GORDY; HE, 2012; POMARA et al., 2015). A **Figura 15 (C)** apresenta células apoptóticas e necróticas, passíveis de análise por meio do teste CBMN, em linfócitos humanos expostos a radiação (5 Gy) (PEJCHAL et al., 2011).

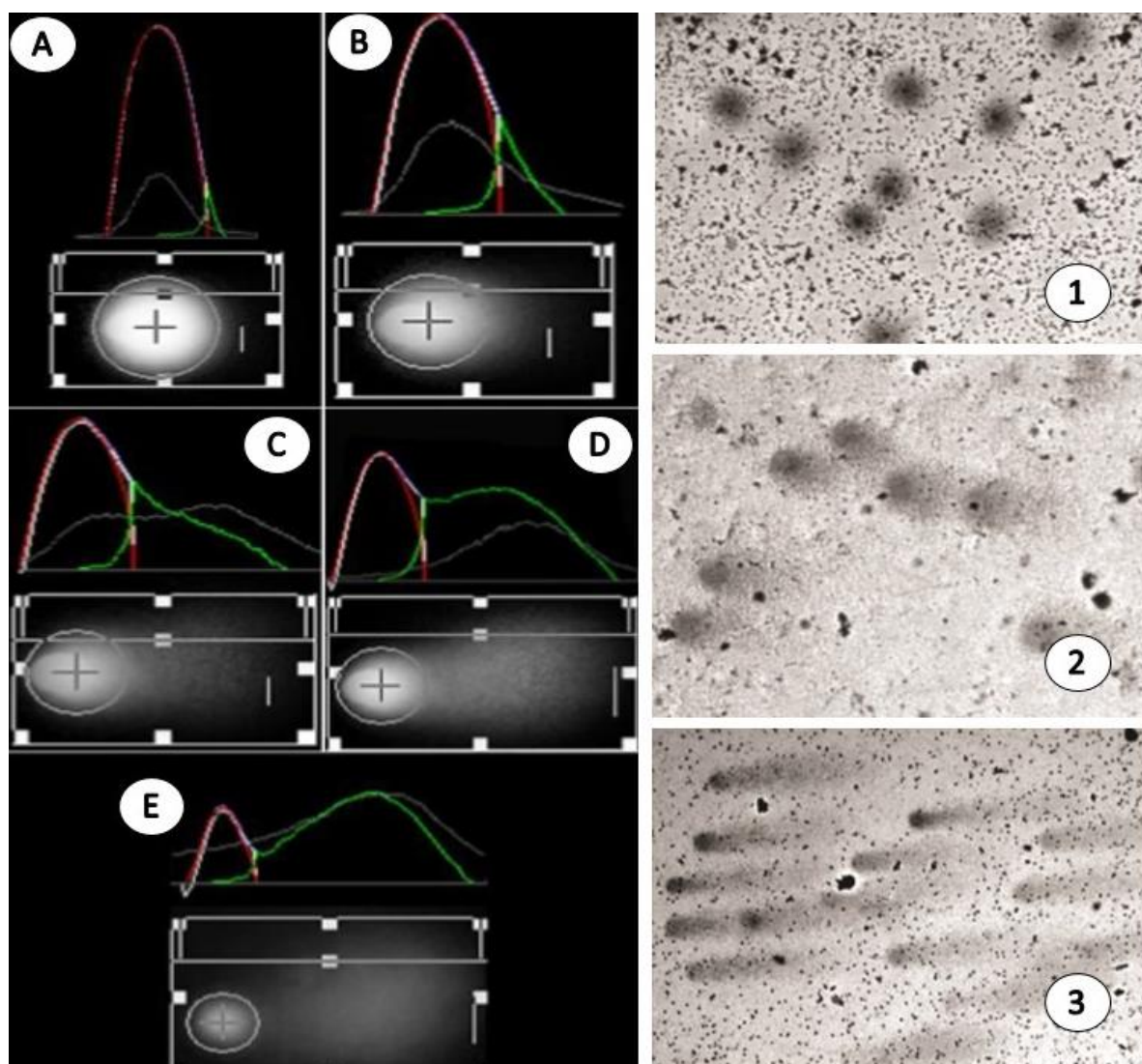
No presente estudo, o CBMN foi realizado em culturas de Sarcoma 180 (S180). Os Sarcomas representam cerca de 1% dos cânceres em adultos, 10% em crianças e 15% em adolescentes, e constituem um grupo heterogêneo, e raro, de tumores de origem mesenquimal que podem ser classificados em: de tecidos moles (gordura, músculos, nervos, vasos sanguíneos e tecidos conjuntivos) e ósseos. Nos EUA, no ano de 2012 foram registrados cerca de 11.280 novos casos de sarcomas em tecidos moles, e 2890 de ósseos, com 3900 e 1410 óbitos, respectivamente (AMANKWAH; CONLEY; REED, 2013; LIMA et al., 2014).

O S180, modelo do estudo, corresponde a uma linhagem de células tumorais (linhagem Murino), amplamente utilizado para estudos farmacológicos de avaliação de agentes anti-tumorais, caracterizado na forma de ascite e inoculado de forma intraperitoneal em camundongos ou ratos. Possui características indefinidas, altos índices de metástase e prognóstico ruim, o que tornou um ótimo modelo experimental ao longo dos anos, como modelo comparativo com respostas semelhantes em células neoplásicas em humanas (BERNARDES et al., 2015; FERREIRA et al., 2015).

Com relação ao Ensaio Cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis*), este é um dos métodos mais importantes para estudo de genotoxicidade e danos ao DNA, quem tem por princípio a migração dos fragmentos danificados e negativamente carregados de DNA em direção ao ânodo durante a eletroforese (neutra ou alcalina), gerando uma cabeça, que consiste no DNA intacto, e um rastro semelhante a uma cauda de cometa, onde a medição desta cauda reflete a extensão dos danos ao DNA (VANDGHANOONI; ESKANDANI, 2011; GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015). Ele pode ser utilizado para mensurar danos ao

DNA em células eucarióticas, capaz de detectar quebras de fita simples e dupla no DNA, as quais têm um papel relevante na formação de aberrações cromossômicas, além de modificações nas bases de DNA, onde o grau da lesão no DNA é verificado através de microscopia, onde cem células são criteriosamente analisadas e classificadas em diferentes graus de lesão que variam de zero (células sem alteração morfológica) até quatro (DNA totalmente fragmentado) (SAMPAIO et al., 2012; APOSTOLOU et al., 2014) (**Figura 15**).

**Figura 15** – Imagens de cometas no microscópio de fluorescência, onde as curvas vermelhas representam os núcleos e as verdes as caudas e fotomicrografias no microscópio óptico. (A) Dano zero; (B) Dano 1; (C) Dano 2; (D) Dano 3; (E) Danos 4; (1) Dano mínimo; (2) Dano Médio; (3) Dano máximo.



Fonte: Adaptado de VANDGHANOONI; ESKANDANI, 2011; GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015.

**REFERÊNCIAS**

---



## REFERÊNCIAS

- ABBOTTS, R.; THOMPSON, N.; MADHUSUDAN, S. DNA repair in cancer: emerging targets for personalized therapy. **Cancer Manag Res.** v. 19, n. 6 p. 77-92, 2014.
- AL-ASMARI, A.K.; KHAN, A.Q.; AL-QUASIM, A.M.; AL-YOUSELF, Y. Ascorbic acid attenuates antineoplastic drug 5-fluorouracil induced gastrointestinal toxicity in rats by modulating the expression of inflammatory mediators. **Toxicology Reports.** v.2, p. 908-916, 2015.
- ALKEN, S.; KELLY, C.M. Benefit risk assessment and update on the use of docetaxel in the management of breast cancer. **Cancer Management and Research,** v. 5, n.1, p. 357–365, 2013.
- AMANKWAH. E.K.; CONLEY, A.P.; REED, D.R. Epidemiology and therapies for metastatic sarcoma. **Clinical Epidemiology,** v. 5, p. 147–162, 2013.
- ASARA, Y.; MARCHAL, J.A.; CARRASCO, E.; BOULAIZ, H.; SOLINAS, G.; BANDIERA, P.; GARCIA, M.A.; FARACE, C.; MONTELLA, A.; MADEDDU, R. cadmium modifies the cell cycle and apoptotic profiles of human breast cancer cells treated with 5-fluorouracil. **International Journal of Molecular,** v.14, n.8, p.16602- 16616, 2013.
- APOSTOLOU, P.; TOLOUDI, M.; KOURTIDOU, E.; MIMIKAKOU, G.; VLACHOU, I.; CHATZIOANNOU, A.; PAPASOTITIOU, I. Use of the comet assay technique for quick and reliable prediction of in vitro response to chemotherapeutics in breast and colon cancer. **Journal of Biological Research,** v. 2014, p. 21:14, 2014.
- AZIM JR, H.A.; PATRIDGE, A.H. Biology of breast cancer in young women. **Breast Cancer Research.** v. 16, n. 427, p. 1-9, 2014
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse Oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição,** v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BERNARDES, T.M.; BESERRA, H.E.O.; VEXENAT, S.C.O.R.; LANGONI, H.; ROCHA, N.S. Phenotypic Characterization Murine Sarcoma TG-180 Immunophenotypical Characterization Murine Sarcoma TG-180. **Open Journal of Pathology,** v.5, p. 59-64, 2015.
- BIANCOTTI, J. C.; NARWANI, K.; BUEHLER, N.; MANDEFRO, B.; GOLAN-LEV, T.; YANUKA, O.; CLARK, A.; HILL, D.; BENVENISTY, N.; LAVON, N. Human embryonic stem cells as models for aneuploid chromosomal syndromes. **Stem cells (Dayton, Ohio),** v. 28, n. 9, p. 1530-1540, 2010.
- BODAI, B.I.; FACS; M.D.; TUSO, P.; FACP, M.D.; FASN, P. Breast Cancer Survivorship: A Comprehensive Review of Long-Term Medical Issues and Lifestyle Recommendations. **Spring,** v. 19, n.2, p. 48-79, 2015.

BOYD N.F.; MARTIN, L.J.; BRONSKILL, M.; YAFFE, M.J.; DURIC, N.; MINKIN, S. Breast Tissue Composition and Susceptibility to Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n.16, p. 1224–1237, 2010.

BURNINGHAM, Z.; HASHIDE, M.; SPECTOR, L.; SCHIFFMAN, J.D. The epidemiology of Sarcoma. **Clinical Sarcoma Research**. v. 2012, p. 2-14, 2012.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem Toxicol**. v. 51, p. 15-25, 2013.

CECILIO, A.P. et al. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 2015, n. 7, p. 43-49, 2015.

CHEN, X.L.; CHEN, X.Z.; YANG, C.; LIAO, Y.B.; LI, H.; WANG, L.; KUN YANG, K.; LI, K.; HU, J.K.; ZHANG, B.; CHEN, Z.X.; CHEN J.P.; ZHOU, Z.G. Docetaxel, Cisplatin and Fluorouracil (DCF) Regimen Compared with Non-Taxane-Containing Palliative Chemotherapy for Gastric Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Plos One**, v.8, n.4, p. 4-8, 2013.

CHOUDHARI, S.K.; CHAUDHARY, M.; GADBAIL, A.R.; SHARMA, A.; TEKADE, S. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review. **Oral Oncology**. v. 50, p. 10-18, 2014.

COLDITZ, G.A.; BOHLKE, K.; BERKEY, C.S. Breast cancer risk accumulation starts early – Prevention must also. **Breast Cancer Res Treat**. v. 145, n. 3, p. 567-579, 2014.

COSTA, F.F. Epigenomics in cancer management. **Cancer Management and Research**, n. 2, p. 255–265, 2010.

COVARRUBIAS PINTO, A.; ACUÑA, A.I.; BELTRÁN, F.A.; DÍAZ, L.T.; CASTRO, M.A. Old Things New View: Ascorbic Acid Protects the Brain in Neurodegenerative Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 28194–28217, 2015.

DAWOOD, S.; GONZALEZ A. M. Progress in the biological understanding and management of breast cancer-associated central nervous system metastases. **Oncologist**, v.18, n.6, p. 675-684, 2013.

DELBRIDGE, A.R.D.; VALENTE, L.J.; STRASSER, A. The role of the apoptotic machinery in tumor suppression. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.4, p. 118-129, 2012.

DU, J.; MARTIN, S. M.; LEVINE, M.; WAGNER, B. A.; BUETTNER, G. R.; WANG, S. H.; TAGHIYEV, A. F.; DU, C.; KNUDSON, C. M.; CULLEN, J. J. Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer. **Clinical cancer research**, v. 16, n. 2, p. 509-520, 2010.

FANG, C. et al. Illuminating necrosis: From mechanistic exploration to preclinical application using fluorescence molecular imaging with indocyanine green. **Scientific reports**, v. 6, p. 1-12, 2016.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n.1, p. 81–95, 2000.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**. v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FERREIRA, P.M.; COSTA, P.M.; COSTA, A.M.; LIMA, D.J.; DRUMOND, R.R.; SILVA, J.D.; MOREIRA, D.R.; OLIVEIRA FILHO, G.B.; FERREIRA, J.M.; QUEIROZ, M.G.; LEITE, A.C.; PESSOA, C. Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 3, p. 1-18, 2015.

FRAJESE G.V.; BENVENUTO, M.; FANTINI, M.; AMBROSIN, E.; SACCHETTI, P.; MASUELLI, L.; GIGANTI, M.G.; MODESTI, A.; BEI, R. Potassium increases the antitumor effects of ascorbic acid in breast cancer cell lines in vitro. **Oncology Letters**, v.11, n.6, p. 4224-4234, 2016.

FREDERIKS, C.N.; LAM, S.W.; GUCHELAAR, H.J.; BOVEN, B. Genetic polymorphisms and paclitaxel- or docetaxel-induced toxicities: A systematic review. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, n.10, p. 935–950, 2015.

GARCÍA, M.A.; CARRASCO, E.; AGUILERA, M.; ALVAREZ, P.; RIVAS, C.; CAMPOS, J.M.; PRADOS, J.C.; CALLEJA, M.A.; ESTEBAN, M.; MARCHAL, J.A.; ARÁNEGA, A. The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil promotes pkr-mediated apoptosis in a p53-independent manner in colon and breast cancer cells. **PLOS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

GOBBI, S. et al. Nonsteroidal aromatase inhibitors for the treatment of breast cancer: an update. **Anticancer Agents Med Chem**. v.14, n.1, p.54-65, 2014.

GONZÁLEZ, M.J.; ROSARIO-PÉREZ, G.R.; MONTE, C.; RICART, M. Mitochondria, energy and cancer: the relationship with ascorbic acid. **Journal of Orthomolecular Medicine**, v. 25, n. 1, p. 29-38, 2010.

GORDY, C.; HE, Y.W. The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead?. **Protein Cell**, v. 3, n.1, p. 17-27, 2012.

GRAZIANO, S.; GULLÌ, M.; MAESTRI, E.; MARMIROLI, N. The global effect of exposing bakers' yeast to 5-fluorouracil and nystatin; a view to Toxichip. **Chemosphere**, v. 145, n.1, p. 470-479, 2016.

GREENMAN, C. et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. **Nature**, v. 446, n. 7132, p. 153–158, 2007.

GUERRIERO, E.; SORICE, A.; CAPONE, F.; NAPOLITANO, V.; COLONNA, G.; STORTI, G.; CASTELLO, G.; COSTANTINI, S. Vitamin C effect on mitoxantrone-induced cytotoxicity in human breast cancer cell lines. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. 115-23, 2014.

GUNASEKARANA, V.; GLADWIN, V.R.; CHAND, P. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. **J Clin Diagn Res**. v. 9, n. 3, p. 1-5, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HANIGAN, M. H.; DELA CRUZ, B. L.; SHORD, S. S.; MEDINA, P. J.; FAZILI, J.; THOMPSON, D. M. Optimizing chemotherapy: concomitant medication lists. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 89, n. 1, p. 114-119, 2011.

HEMMATZADEH, M.; MOGAMMADI, H. JADIDI-NIARAGH, F.; ASGHARI, F.; YOUSEFI, M. The role oncomirs in the pathogenesis and treatment of breast cancer, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 78, p. 129-139, 2016.

HOFFER, L.J.; ROBITAILLE, L.; ZAKARIAN, R.; MELNYCHUK, D.; KAVAN, P.; AGULNIK, J.; COHEN, V.; SMALL, D.; MILLER JUNIOR, W.H. High-Dose Intravenous Vitamin C Combined with Cytotoxic Chemotherapy in Patients with Advanced Cancer: A Phase I-II Clinical Trial. **PLoS One**, v. 10, n.4, p. 1-19, 2015.

HU, R.; HILAKIVI-CLARKE, L.; CLARKE, R. Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer. **Oncology Letters**, v. 9, p. 1495-1501, 2015.

HUNG, C-H.; CHAN, S-H.; CHU, P-M.; TSAI, K-L. docetaxel facilitates endothelial dysfunction through oxidative stress via modulation of protein kinase c beta: the protective effects of sotrastaurin. **Toxicological Sciences**, v. 145, n.1, p. 59–67, 2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2014**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf> .

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2016**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>

JANSEN, L.A.; BACKSTEIN, R.M.; BROWN, M.H. Breast size and breast cancer: A systematic Review. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 67, p. 1615 - 1623, 2014.

KARATHIA, H.; VILAPRINYO, E.; SORRIBAS, A.; ALVES, R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. **Plos one**, v. 6, n.2, 2011.

KASAI, H. What causes human cancer? Approaches from the chemistry of DNA damage. **Genes and Environment**, v. 38, n. 19, p. 1-13, 2016.

KAWALEC, P.; ŁOPUCH, S.; MIKRUT, A. Effectiveness of Targeted Therapy in Patients With Previously Untreated Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Clinical Breast Cancer**, v. 15, n. 2, p. 90-100, 2015.

KONTEC, R.; KONTEK, B.; GRZEGORCZYK, K. Vitamin C modulates DNA damage induced by hydrogen peroxide in human colorectal adenocarcinoma cell lines (HT29) estimated by comet assay in vitro. **Archives of Medical Science**, v.9, n.6, p. 1006–1012, 2013.

LAMBERTI, M.; PORTO, S.; MARRA, M.; ZAPPAVIGNA, S.; GRIMALDI, A.; FEOLA, D.; PESCE, D.; NAVIGLIO, S.; SPINA, A.; SANNOLO, N.; CARAGLIA, N. 5-Fluorouracil induces apoptosis in rat cardiocytes through intracellular oxidative stress. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 31, n.60, p. 2-8, 2012.

LI, W.; TANUMIHARDJAC, J.; MASUYAMAD, T.; KORSHIN, G. Examination of the kinetics of degradation of the antineoplastic drug 5-fluorouracil by chlorine and bromine. **Journal of Hazardous Materials**, v. 282, p. 125–132, 2015.

LIMA, A.P.; PEREIRA, F.C.; ALMEIDA, M.A.; MELLO, F.M.; PIRES, W.C.; PINTO, T.M.; DELELLA, F.K.; FELISBINO, S.; MORENO, V.; BATISTA, A.A.; SILVEIRA-LACERDA, E. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium(II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 105-125, 2014.

LIU, C-H.; HUNG, M-H.; WANG, D-S.; CHU, P-Y.; SU, J-C.; TENG, T-H.; HUANG, C-T.; CHAO, T-T.; WAG, C-Y.; SHIAU, C-W.; TSENG, L-M.; CHENG, K-F. Tamoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A-dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor-negative human breast cancer cells. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 431, 2014.

LUDMIL, B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, 2013.

MARINO, N.; WODITSCHKA, S.; REED, L.T.; NAKAYAMA, J.; MAYER, M.; WETZEL, M.; STEEG, P.S. Breast Cancer Metastasis Issues for the Personalization of Its Prevention and Treatment. **The American Journal of Pathology**, v. 183, n.4, p. 1084-1095, 2013.

MENDONÇA, P.S.; CARIOCA, A.A.F.; MAIA, F.M.M. Interações entre estresse oxidativo, terapia utilizada e estadiamento em pacientes com câncer colorretal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.60, n.2, p.129-134, 2014.

MICHAELS, A.Y.; KERALIYA, A.R.; TIRUMANIL, S.H.; SHINAGAREL, A.B.; RAMAIYA, N.H. Systemic treatment in breast cancer: a primer for radiologists. **Insights Imaging**, v. 7, p. 131-144, 2016.

MILES, S.L.; FISCHER, A.P.; JOSHI, S.J.; NILES, R.M. Ascorbic acid and ascorbate-2-phosphate decrease HIF activity and malignant properties of human melanoma cells. , v. 15, n. 867, p. 2-12 , 2015.

MONTERO, A.; FOSSELLA, F.; HORTOBAGYI, G.; VALERO, V. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. **Lancet Oncol**, v. 6, p. 229–39, 2005.

PELTOMAKI, P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. **Experimental Cell Research**, v. 318, p. 299-310, 2012.

NG, C.K.Y. et al. Intra-tumor genetic heterogeneity and alternative driver genetic alterations in breast cancer with heterogeneous HER2 gene amplification. **Genome Biology**, v. 16, n. 107, 1-21, 2015

- PATHI, S.S.; LEI, P.; SREEVALSAN, S.; CHADALAPAKA, G.; JUTOORU, I.; SAFE, S. Pharmacologic doses of ascorbic acid repress specificity protein (sp) transcription factors and sp-regulated genes in colon cancer cells. **Nutrition and Cancer**, v. 63, n.7, p. 1133–1142, 2011.
- PEJCHAL, J.; VASILIEVA, V.; HRISTOZOVA, M.; VILASOVÁ, Z.; VÁVROVÁ, J.; ALYAKOV, M.; TICHÝ, A.; ZÁRYBNICKÁ, L.; ŠINKOROVÁ, Z.; TAMBOR, V.; KUBELKOVÁ, K.; DRESLER, J. Cytokinesis-block micronucleus (cbmn) assay/cbmn cytome assay in human lymphocytes after in vitro irradiation and its use in biodosimetry. **Military Medical Science Letters**, v.80, n.1, p. 28-37, 2011.
- PEREL-WINKLER, A.; BELOKOVSKAYA, R.; AMIGUES, I.; LARUSSO, M.; HUSSAIN, N. A Case of Docetaxel Induced Myositis and Review of the Literature. **Case Reports in Rheumatology**, v. 2015, n.1, p.1-9, 2015.
- PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 97, p. 55-74, 2015.
- POLK, A.; VISTISEN, K.; VAAGE-NILSEN, M.; NIELSEN, D.L. A systematic review of pathophysiology of 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity. **BMC Pharmacology & Toxicology**. v. 15, n. 47, p. 1-11, 2014.
- POMARA, C.; NERI, M.; BELLO, S.; FIORE, C.; RIEZZ, I.; TURILLAZZ, E. Neurotoxicity by Synthetic Androgen Steroids: Oxidative Stress, Apoptosis, and Neuropathology: A Review. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n.1, p.132-145, 2015.
- QU, S.; WANG, K.; XUE, H.; WANG, Y.; WU, R.; LIU, C.; GAO, A.C.; GOUT, P.W.; COLLINS, C.C.; WANG, Y. Enhanced anticancer activity of a combination of docetaxel and Aneustat (OMN54) in a patient-derived, advanced prostate cancer tissue xenograft model. **Molecular oncology**, v. 8, p. 311-322, 2014.
- RADIN, D.P.; PATEL, P. Delineating the molecular mechanisms of tamoxifen's oncolytic actions in estrogen receptor-negative cancers. **European Journal of Pharmacology**. 781:173–180 2016.
- RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Research International**. v. 2014, p. 1-14, 2014.
- REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1603–1616, 2010.
- SAMPAIO, H.A.C.; OLIVEIRA, N.M.; SABRY, M.O.D.; CARIOCA, A.A.F.; PINHEIRO, L.G.P. Influência do tipo de terapia antineoplásica sobre marcadores antropométricos e dietéticos em mulheres portadoras de câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 2, p. 223-230, 2012.
- SIES, H. Oxidative Stress: from basic research to clinical application. **Am. J. Med.** v. 91, p. 31-38, 1991.

SIEUWERTS, A.M.; LYNG, M.B.; GELDER, M.E.M; WEERD, V.; SWEEP, F.C.G.J.; FOEKENS, J.A.; SPAN, P.N.; MARTENS, J.W.M.; DITZEL, H.J. Evaluation of the ability of adjuvant tamoxifen-benefit gene signatures to predict outcome of hormone-naive estrogen receptor-positive breast cancer patients treated with tamoxifen in the advanced setting. **Molecular oncology**, v. 8, p. 1679-1689, 2014.

SILVA, A.G.; EWALD, I. et al. Li- Fraumeni-like syndrome associated with a large BRCA 1 intragenetic deletion. **BMC Cancer**., n.12, p.237, 2012.

SINDHI, V.; GUPTA, V.; SHARMA, K.; BAHTNAGAR, S.; KUMARI, R.; DHAKA, N. Potencial applications of antioxidants – a review. **Journal of Pharmacy Research**. v. 2013, p. 828-835, 2013.

SINGH, M.S.; FRANCIS, P.A.; MICHAEL, M. Tamoxifen, cytochrome P450 genes and breast cancer clinical outcomes. **The Breast**, v. 20, p. 111-118, 2011.

SLOCZYNSKA, K.; POWROZNIK, B.; PEKALA, E.; WASZKIELEWICZ, A. M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal of applied genetics**, v. 55, n. 2, p. 273-285, 2014.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 41, n. 1, jan./mar., 2005.

STEPHENSON, C.M.; LEVIN, R.D.; SPECTOR, T.; LIS, C.G. Phase I clinical trial to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of high-dose intravenous ascorbic acid in patients with advanced cancer. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.72, n.1, p.139–146, 2013.

TAYLOR, B.R.; BARRETINA, J.; MAKI, R.G.; ANTONESCU, C.R.; SINGER, S.; LADANYI, M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. **Nat Rev Cancer**. v. 11, n. 8, p. 541-557, 2012.

TORRES, M.A.; JHINGRAN, A.; THAMES, H.D.; LEVENBACK, C.F.; BODURKA, D.C. Comparison of treatment tolerance and outcomes in patients with cervical cancer treated with concurrent chemoradiotherapy in a prospective randomized trial or with standard treatment. **Eur. J. Cancer**, v. 40, n. 1314-1319, 2008.

ULUER,E.T.; AYDEMIRB, I.; INANA, S.; OZBILGINA, K.; VATANSEVER, H.S. Effects of 5-fluorouracil and gemcitabine on a breast cancer cell line (MCF-7) via the JAK/STAT pathway. **Acta Histochemica**, v. 114, p. 641– 646, 2012.

VANDGHANOONI, S.; ESKANDANI, M. Comet Assay: A Method to Evaluate Genotoxicity of Nano-Drug Delivery System. **BioImpacts**, v. 1, n. 2, p. 87-97, 2011.

VASCONCELOS, A.L.C.; NUNES, B.; DUARTE, C.; MENDONÇA, V.; RIBEIRO, M.; GRILLO, I.M. Tamoxifen in breast cancer *ipse dixit* in uterine malignant mixed Müllerian tumor and sarcoma – A report of 8 cases and review of the literature. **Reports of practical oncology and radiotherapy**, v. 18, p. 251-260, 2013.

VINOD, B.S.; ANTONY, J.; NAIR, H.H.; PULIYAPPADAMBA, V.T.; SAIKIA, M.; NARAYANAN, S.S.; BENVIN, A.; ANTO, R.J. Mechanistic evaluation of the signaling events regulating curcumin-mediated chemosensitization of breast cancer cells to 5-fluorouracil. **Cell Death and Disease**. v. 26, p. 1-13, 2013.

VISOVSKY, C. Treatment Considerations for the Management of Patients With Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer. **J. Adv. Pract. Onco**. v. 5, n. 5, p. 321-330, 2014.

WATSON, I.R.; TAKAHASHI, K.; FULTREAL, P.A.; CHIN, L. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. **Nat Rev Genetic**. v. 14, n. 10, p. 703-718, 2013.

YANG, X.R. Associations of Breast Cancer Risk Factors With Tumor Subtypes: A Pooled Analysis From the Breast Cancer Association Consortium Studies. **JNCI**. v. 103, n. 3, p. 250-263, 2011.

ZHANG, W.; FENG, M.; ZHENG, G.; CHEN, Y.; WANG, X.; PEN, B.; YIN, J.; YU, Y.; HE, Z. Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial–mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417 , p. 679–685, 2012.



## CAPÍTULO I

### **Ácido ascórbico na prevenção e tratamento do câncer**

Artigo publicado na Revista da Associação Médica Brasileira

*Fator de impacto - 0,933*



## Ácido Ascórbico na prevenção e tratamento do Câncer

*Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata<sup>1</sup>, Ricardo Melo de Carvalho<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar<sup>2</sup>, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante<sup>1,2</sup>, Benedito Borges da Silva<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil,

<sup>2</sup> Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), Piauí, Brasil.

### RESUMO

Este estudo de revisão teve por objetivo o mapeamento sistemático sobre ácido ascórbico, na prevenção e/ou tratamento do câncer, como antioxidante e/ou pró-oxidante em estudos clínicos e não clínicos, entre o período de 2011 a 2015, para o entendimento das variações de dose-reposta, bem como dos seus mecanismos de ação como agente antioxidante e antitumoral. No banco de dados do Pubmed e Bireme com o uso do descritor “câncer e ácido ascórbico” foram identificados 78 artigos dos quais apenas 30 artigos apontavam o ácido ascórbico na prevenção e/ou tratamento do câncer. Contudo, há controvérsias sobre as doses utilizadas, como também necessidade de estudos clínicos caracterizando melhor o seu mecanismo de ação. Desta forma, outros estudos devem ser realizados para o entendimento das variações de dose-reposta, bem como seu direcionamento de mecanismos de ação, tanto como agente antioxidante ou antitumoral, para auxiliar o tratamento e a prevenção do câncer, visando melhor qualidade de vida aos pacientes e a população em geral.

**Palavras-chave:** câncer, prevenção, ácido ascórbico, antioxidante, antitumoral.

## **ABSTRACT**

This review aimed at the systematic mapping of ascorbic acid in prevention and/or treatment of cancer, such as antioxidant and/or pro-oxidant in clinical and non-clinical studies, from 2011 to 2015, for understanding dose-response variations as well as their mechanism of action as an antioxidant and antitumor agent. In database of Pubmed and Bireme using the descriptor "cancer and ascorbic acid" were identified 78 articles of which only 30 articles pointed ascorbic acid in prevention and/or treatment of cancer. However, there are controversies about doses used, as well as the need for clinical studies featuring best its mechanism of action. Thus, other studies are needed to understand dose-response variations, as well as its targeting mechanisms of action, both as an antioxidant and antitumor agent, to assist treatment and prevention of cancer, to better quality of life for patients and general population.

**Key-words:** cancer, prevention, ascorbic acid, antioxidant, antitumoral.

## 1. INTRODUÇÃO

A palavra “Câncer” é originada da palavra grega “*Karkinos*” que significa caranguejo, a qual relaciona os vasos sanguíneos infiltrados no tumor com as garras deste animal. Atualmente, o câncer se caracteriza por uma doença complexa que envolve a alteração da expressão de genes, que proporciona a sobrevivência e proliferação celular, a qual pode ser modificada por fatores genômicos e epigenômicos (SUNG et al., 2011). Os fatores genômicos se caracterizam por modificações nos sítios dos genes, promovendo mutações, enquanto os epigenômicos correspondem a modificações que não alteram a sequência de bases do DNA, mas sim, sua conformação, por meio de alterações nas histonas, metilações nas bases de DNA e remodelamento de nucleossomos (GREENMAN, et al., 2007; COSTA, 2010).

Células cancerosas operam sob alto nível de estresse oxidativo, devido a seus altos níveis basais de espécies reativas de oxigênio por sua transformação oncogênica e sua reprogramação metabólica (AKLADIOS et al., 2015). O estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre a produção de radicais livres (ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ), óxido nítrico (NO) dentre outros) e sua eliminação por mecanismos de defesas antioxidantes (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), dentre outros), o qual induz danos celulares, causados pela peroxidação lipídica que gera desarranjo e perda de função e integridade da membrana celular, além de danos ao DNA, promovendo a instabilidade genômica e a proliferação celular, aumentando conseqüentemente as mutações somáticas e transformações neoplásicas (REUTER et al., 2010; RAJAKUMAR; PUGALENDHI; THILAGAYATHI, 2015).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer em 2012 houve a ocorrência de 14,1 milhões de casos de câncer no mundo, com um total de 8,2 milhões de mortes por câncer. Estima-se que em 2030, a carga global de câncer será de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes, principalmente devido ao crescimento e envelhecimento da população (INCA, 2014). Dentre os tipos de câncer, o câncer de mama é o segundo mais comum, tendo sido estimado cerca de 1,67 milhões de novos casos de Câncer de Mama no mundo em 2012, o que representa 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados em mulheres, no Brasil. Sua mortalidade equivale a 70% e a sobrevivência em 5 anos varia entre 80 a 40%, dependendo do desenvolvimento econômico do país. Estima-se que no Brasil, em 2010, o número de novos casos é superior a 49.000 (LEE et al., 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que o consumo de frutas e verduras pode auxiliar na prevenção do câncer, devido a sua composição com nutrientes como vitaminas, minerais e fibras (XIAO et al., 2011). Segundo o INCA, os alimentos antioxidantes, ricos em ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides (vitamina A) e tocoferol (vitamina E), selênio e flavonóides, são recomendados seguindo doses preconizadas pelo Dietary Reference Intake (DRI), pois estes podem atuar na prevenção do câncer, inibindo a oxidação e a produção de radicais livres, como também favorecendo o estresse oxidativo e promovendo até mesmo a carcinogênese (INCA, 2011).

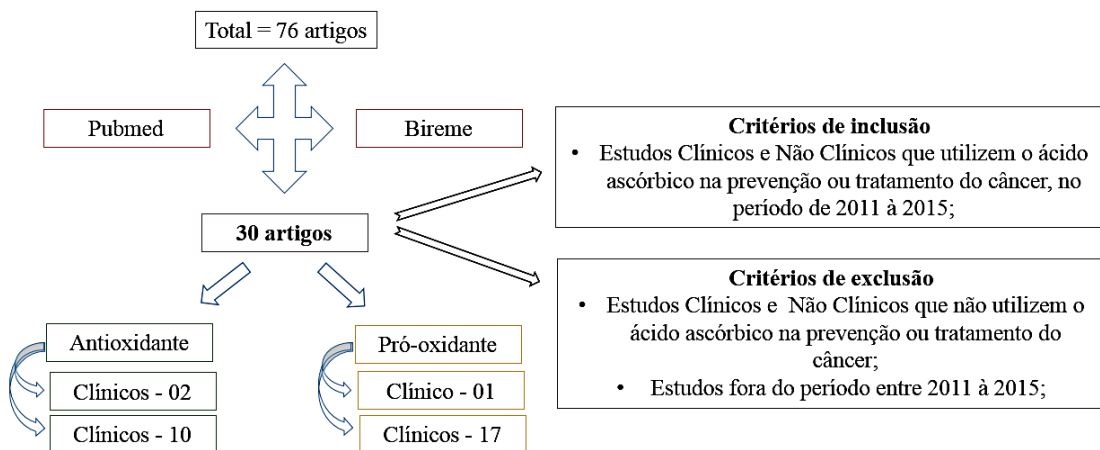
O ácido ascórbico (vitamina C) tem sido muito utilizado no tratamento e prevenção do câncer, contudo resultados clínicos não conclusivos ainda tem sido obtidos. Em baixas concentrações ele apresenta papel antioxidante, prevenindo a oxidação que induz apoptose, entretanto, seu o alto conteúdo pode aumentar a produção de ATP (gerado pelas mitocôndrias) induzindo apoptose em linhagens de células tumorais, por via pró-oxidante (GONZÁLEZ et al., 2010). Estudos apontam que em linhagens celulares de câncer de mama, tratadas com mitoxantrone e ácido ascórbico, apresentaram atividade antineoplásica em dose-dependente influenciando na apoptose, ciclo celular e sinalização celular, aumentando a citotoxicidade do antineoplásico (GUERREIRO et al., 2014).

Todavia, há ainda muitas controvérsias sobre o papel da vitamina C, na prevenção e tratamento do câncer. O presente estudo de revisão visa realizar um mapeamento sistemático sobre ácido ascórbico, na prevenção e/ou tratamento do câncer, como antioxidante e/ou pró-oxidante em estudos clínicos e não clínicos, entre o período de 2011 a 2015, para o entendimento das variações de dose-reposta, bem como dos seus mecanismos de ação como agente antioxidante e antitumoral.

## 2. METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada através de um levantamento bibliográfico de artigos científicos de estudos clínicos e não clínicos, entre o período de 2011 à 2015, nos sites de busca Pubmed e Bireme, com os descritores “câncer” e “ácido ascórbico”. Foram encontrados 78 artigos, dos quais 30 foram utilizados para o levantamento de acordo com os critério de inclusão, estudos clínicos e não clínicos que utilizem o ácido ascórbico na prevenção e/ou tratamento do câncer, entre o período de 2011 a 2015; e critérios de exclusão, os estudos que não utilizem ácido ascórbico no tratamento e/ou prevenção do câncer e que estejam fora do período estabelecido (**Figura 1**). Dos artigos selecionados para a análise, 12 utilizavam o ácido ascórbico como antioxidante, sendo 02 estudos clínicos e 10 não clínicos, e 18 como pró-oxidantes, dos quais apenas um era clínico e os demais (17) eram não clínicos.

**Figura 1** – Desenho do levantamento bibliográfico e seus critérios de inclusão e exclusão



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 O ácido ascórbico como agente antioxidante

O ácido ascórbico é um micronutriente essencial para a saúde humana, que possui atividade antioxidante e participa da produção de proteínas como o colágeno, norepinefrina e serotonina. É adquirido através da ingestão de diversas plantas, principalmente frutas cítricas como limão e laranja, e vegetais como tomate e brócolis, com dose diária recomendada de 90 mg para homens e 75 mg para mulheres (ADITI; GRAHAM, 2012).

A **Tabela 1** apresenta os estudos clínicos e não clínicos referentes a utilização do ácido ascórbico como antioxidante no tratamento e/ou prevenção do câncer, descrevendo seu uso em diversos tipos de câncer ou linhagens de células, em diferentes doses/concentrações e seus mecanismos de ação. Os estudos clínicos (02) envolvem diferentes tipos de câncer (pâncreas, mama, rins, pulmão, fígado, bexiga, linfoma, próstata, cólon, cérebro, leucemia, estômago, ovário, pele e útero) e doses de ácido ascórbico (0,04 – 0,28 mM; 1 – 10 mM), com relação aos não clínicos (10), estes utilizam diversas linhagens de células neoplásicas (MCF-7 de câncer de mama; carcinoma renal; B16FO de melanoma; HeLa de câncer cervical; pulmão; neuroblastoma; leucemia linfoblástica aguda; 143-B de osteosarcoma), em doses/concentrações variadas (0,85 mM; 0,05 e 0,5 mM; 0,1 mM; 0,11 e 0,28 mM ; 4 mM; 1,2 mM; 0,1 – 0,4 mM; 0,28 mM).

As plantas e a maioria dos animais sintetizam o ácido ascórbico através da glicose. Contudo, os humanos não sintetizam, devido ao não funcionamento do gene L-glutalactona oxidase, então esta vitamina é obtida através da dieta, como ascorbato e ácido dehidroascórbico (DHA). A concentração normal de ácido ascórbico no plasma humano é cerca de 40 a 80  $\mu$ M, e é nessa concentração que a vitamina C endógena age como antioxidante. Concentrações fisiológicas de ascorbato demonstraram inibição da oxidação do LDL e ação sinérgica com a vitamina E impedindo a oxidação lipídica de membranas celulares (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012). Estudos descrevem que o ácido ascórbico intravenoso é mais efetivo para elevar os níveis séricos de ascorbato, do que quando administrado oralmente (MANDL; SZARKA; BANHEGYI, 2009).

Os estudos clínicos evidenciaram como principais mecanismos de ação antioxidante a redução dos níveis de proteína C-reativa e citocinas pró-inflamatórias, e a diminuição da inflamação. E os não clínicos elucidaram a atenuação da citotoxicidade, redução de apoptose, proteção de células neoplásicas contra peroxidação lipídica, modulação de marcadores do

câncer de proliferação (Ki67), invasão e metástase (MMP-2 e -9), angiogênese (VEGF), apoptose (TUNEL e Bcl-2) e inflamação (COX-2, iNOS e GST $\pi$ ), diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio gerada por 4-(hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR), limitação do potencial invasivo, além de dificultar a metástase, o crescimento tumoral e secreção de citocinas inflamatórias, bem como o reforço do encapsulamento de tumores, atividade anti-apoptótica pelo recrutamento de Bcl-2 e proteção contra a indução de lesões pulmonares por exposição ao fumo, através da inibição da expressão da ciclina D1 (**Tabela 1**).

A vitamina C é um excelente agente redutor, que sofre duas oxidações consecutivas para formar o radical ascorbato ( $Asc^{\cdot-}$ ), o qual é relativamente não reativo devido a estabilidade do elétron não pareado, e dismuta o ácido ascórbico em DHA, e é esta função de agente redutor que mantém as enzimas, mantendo desta forma a maquinaria bioquímica de células e tecidos funcionando normalmente (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012).

Esse baixo potencial de elétrons e sua estabilidade de ressonância é o que o lhe acomete como antioxidante. Os autores relatam também que a vitamina C tem o papel de coletar as espécies reativas de oxigênio, atuando como antioxidante para manter o equilíbrio redox intracelular e minimizar os danos oxidativos causados por estes radicais livres (RAHAL et al., 2014). Corroborando com estes estudos, outros pesquisadores citam que nutrientes como vitamina A, C e E são capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio, oriundas entre o desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e o estresse oxidativo provocado por doenças como o câncer ou pelo seu tratamento, desta forma os antioxidantes, como o ácido ascórbico, por exemplo, podem auxiliar tanto na prevenção do câncer ou no seu tratamento, através da redução dos efeitos colaterais relacionadas à quimioterapia (PORTANTIOLO et al., 2014).



**Tabela 1** – Estudos clínicos e não clínicos sobre a utilização do ácido ascórbico como antioxidante no tratamento e/ou prevenção do câncer

TIPO DE ESTUDO	TIPO CÂNCER/CELULAR	MECANISMO DE AÇÃO	DOSE/CONCENTRAÇÃO	REFERÊNCIAS
<b>Clínico</b>	Pâncreas, mama, rins, pulmão, fígado, bexiga, linfoma, próstata, cólon, gástrico	Redução dos níveis de proteína C-reativa e citocinas pró-inflamatórias	0,04 – 0,28 mM	(MIKIROVA et al., 2012)
<b>Não Clínico</b>	Câncer de mama em camundongos	Dificulta metástase, o crescimento tumoral e secreção de citocinas inflamatórias, bem como reforça o encapsulamento de tumores	0,85 mM	(CHA et al., 2013)
<b>Não Clínico</b>	Células MCF-7 de câncer de mama	Atenuação da citotoxicidade, redução de apoptose, proteção de células neoplásicas contra peroxidação lipídica	0,05 e 0,5 mM	(SUBRAMANI et al., 2014)
<b>Não Clínico</b>	Células MCF-7 de câncer de mama	Diminuição citotoxicidade	0,1 mM	(TOR et al., 2015)
<b>Clínico</b>	Pâncreas, mama, rins, pulmão, fígado, bexiga, linfoma, próstata, cólon, cérebro, leucemia, estômago, ovário, pele e útero	Diminuição da inflamação	1 – 10 mM	(MIKIROVA et al., 2011)
<b>Não Clínico</b>	Células de carcinoma renal	Atividade anti-apoptótica pelo recrutamento de Bcl-2	0,11 e 2,28 mM	(GARG et al., 2011)
<b>Não Clínico</b>	Células de melanoma (B16FO)	Dificulta metástase, o crescimento tumoral	4 mM	(ROOMI et al., 2012)
<b>Não Clínico</b>	Células de câncer cervical (HeLa)	Modulação de marcadores do câncer de proliferação (Ki67), invasão e metástase (MMP-2 e -9), angiogênese (VEGF), apoptose (TUNEL e Bcl-2) e inflamação (COX-2, iNOS e GST $\pi$ )	4 mM	(ROOMI et al., 2015)
<b>Não Clínico</b>	Câncer de pulmão em furões	Proteção contra a indução de lesões pulmonares por exposição ao fumo, através da inibição da expressão da ciclina D1	1,2 mM	(KIM et al., 2012)
<b>Não Clínico</b>	Células de neuroblastoma	Atividade anti-apoptótica	0,1 – 0,4 mM	(HARDAWAY et al., 2012)
<b>Não Clínico</b>	Células de leucemia linfoblástica aguda	Diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio gerada por 4-(hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR)	100 $\mu$ M	(APRAIZ et al., 2012)
<b>Não Clínico</b>	Células de osteosarcoma (143-B)	Limitação do potencial invasivo	0,28 mM	(CMOCH et al., 2014)

### 3.2 O ácido ascórbico como agente antitumoral

A suplementação vitamínica pode melhorar os benefícios e a qualidade de vida dos pacientes com câncer, contudo, a literatura aponta controvérsias sobre o tratamento de câncer com o uso de ácido ascórbico. Pesquisadores relatam que estudos *in vitro* com linhagens celulares de neuroblastoma, câncer de bexiga, pâncreas e outros apresentaram efeito citotóxico do ácido ascórbico, e estudos *in vivo* deram suporte a este potencial anticâncer da vitamina C (ICHIM et al., 2011).

A **Tabela 2** relata os estudos clínicos e não clínicos sobre a utilização do ácido ascórbico como antitumoral no tratamento e/ou prevenção do câncer, descrevendo seu uso em diversos tipos de câncer ou linhagens de células, em diferentes doses/concentrações e seus mecanismos de ação. Dentre eles, apenas um estudo clínico foi elucidado, o qual analisa pacientes com câncer metastático pancreático com uso de ácido ascórbico nas doses de 0,28; 0,34 e 0,56 mM.

Com relação aos estudos não clínicos (17), estes utilizaram diferentes linhagens de células neoplásicas (IOSE-385, OVCA-3, SKOV-3 e OVCA-432 de ovário; escamosas do esôfago e CP-A, CP-B, CP-C e CP-D do esôfago; 23132/87 de carcinoma gástrico, HT-29 de cólon, SKOV-3 de ovário, BXPC-3 de pâncreas, BT-20, MDA-MB-468, MDA-MB-231 e MCF-7 de mama, U-13898, U-87 e U-251 de glioblastoma, HUVEC de células endoteliais e NHDF de fibroblastos; HeLa de câncer cervical; carcinoma de cólon; e HEp-2 de carcinoma de laringe; SK-N-MC de neuroblastoma; PANC-1, AsPC-1, BxPC-3 e MIA PaCa-2 de câncer pancreático; linfoma Burkitt vírus Epstein-Barr positivo e células linfoblastóides; PC3 de câncer de próstata; mesotelioma pleural maligno; NSCLC de epiteliais de câncer de pulmão; carcinoma sólido de Ehrlich; RKO e SW480 de câncer de cólon), em diversas concentrações de ácido ascórbico (0,25 mM; 0,1 – 2 mM; 0,3 mM; 0,5 mM; 0,005 – 0,1 mM; 4 mM; 28,39 mM; 3 - 10 mM; 1 - 6 mM; 4,26 mM; 22,71 mM; 0,4 mM; 11,36 mM; 0,5 – 5mM; 0,68 mM; 1 – 3 mM).

Em baixas concentrações milimolares, o ácido ascórbico é capaz de “matar” algumas linhagens celulares *in vitro*, e *in vivo* gera radicais superóxidos, peróxidos de hidrogênio e ascorbil extracelulares responsáveis por sua atividade citotóxica, porém concentrações tão altas quanto 20 mM não apresentaram risco a linhagem de células não malignas (MCCARTY; CONTRERAS, 2014). Outros estudos asseguram que altas doses de ácido ascórbico são efetivas na morte celular em estudos *in vitro* e na inibição do crescimento tumoral *in vivo* (TAKEMURA et al., 2010). Corroborando com este estudo, pesquisadores descrevem que a

vitamina C pode agir de forma tóxica seletiva em alguns tipos celulares de tumor, como pró-oxidante, pois concentração acima da fisiológica (0,1 mM), entre 1 mM e 10 mM, são tóxicas a células neoplásicas *in vitro*, como por exemplo, para células de melanoma e neuroblastoma, onde concentrações entre 10 nM a 1 mM é capaz de induzir apoptose (PARK, 2013).

Como mecanismo de ação antitumoral, o estudo clínico relatou a diminuição do tamanho do tumor. Os não clínicos relataram a inibição da progressão celular, através do aumento dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; efeito anti-proliferativo das células tumorais, através de interferência no ciclo celular (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) e geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; citotoxicidade; alteração de proteínas relacionadas à apoptose; redução e inibição do crescimento celular; diminuição dos níveis de serotonina, aumento do grau de necrose hemorrágica e permeabilidade do endotélio; produção de espécies reativas de oxigênio, através da liberação de Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>; indução de apoptose; indução de aponecrose em células resistentes à apoptose; inibição proliferação celular e secreção de MMP-2 e -9 e aumento de secreção de TIMP-2; indução autofagia; supressão tumoral; bloqueio da progressão e metástase tumoral; ativação da apoptose e via mecanismo de produção de espécies reativas de oxigênio-dependente; perda de viabilidade celular; aumento da expressão de p53; sub-regulação de proteínas (Sp1, Sp3 e Sp4) e diminuição da expressão de genes que envolvem a proliferação celular e angiogênese (**Tabela 2**).

A vitamina C pode ser utilizada para complementar o tratamento do câncer desde 1974, auxiliando na qualidade de vida e sobrevivência dos pacientes. Estudos em humanos, animais e *in vitro*, demonstram que antioxidantes como ácido ascórbico, tocoferóis e carotenoides podem inibir o crescimento de células neoplásicas, induzir a apoptose, aumentar a diferenciação celular e inibir a atividade da proteína C quinase e adenil ciclase, comprovando sua ação atitumoral, e afirmando que sua terapia em altas doses pode trazer benefícios aos pacientes, melhorando seu prognóstico e eficácia terapêutica (GROERB, 2009).

Estudos citam que dentre os mecanismos pró-oxidantes do ácido ascórbico está sua capacidade de reduzir íons metálicos como o Fe<sup>3+</sup> e Cu<sup>3+</sup>, processo o qual, produz radicais livres, como o radical hidroxil, os quais interagem com o DNA, causando quebras nas ligações fosfodiésteres, além de modificações nas bases, que gera indução a citotoxicidade (PUTCHALA et al., 2013). Pesquisas apontam outro mecanismo de ação antitumoral, a proliferação de células *Natural Killers* (NK) sem afetar suas funções normais. Segundo eles, estas células tem capacidade de “matar” células tumorais sem a necessidade de direcionamento de sensibilização, e que o ácido ascórbico promove sua proliferação (HUJIKENS et al., 2015).



**Tabela 2** – Estudos clínicos e não clínicos sobre a utilização do ácido ascórbico como antitumoral no tratamento e/ou prevenção do câncer

TIPO DE ESTUDO	TIPO CÂNCER/CELULAR	MECANISMO DE AÇÃO	DOSE/CONCENTRAÇÃO	REFERÊNCIAS
Não Clínico	Células de câncer de ovário (IOSE-385, OVCAR-3, SKOV-3 e OVCA-432)	Inibição da progressão celular, através do aumento dos níveis de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,25 mM	(LI et al., 2014)
Não Clínico	Diferentes linhagens de células	Efeito anti-proliferativo das células tumorais, através de interferência no ciclo celular (G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> ) e geração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,1 – 2 mM	(FROMBERG, 2011)
Não Clínico	Células AGS	Inibição da progressão celular, citotoxicidade, alteração de proteínas relacionadas à apoptose	0,3 mM	(NAGGAPAN, et al., 2013)
Não Clínico	Células escamosas do esôfago e células Barrett's do esôfago (CP-A, CP-B, CP-C e CP-D)	Redução do crescimento celular	0,5 mM	(MERLO et al., 2011)
Não Clínico	Células de carcinoma gástrico (23132/87), de cólon (HT-29), ovário (SKOV-3) pâncreas (BXP-3), mama (BT-20, MDA-MB-468, MDA-MB-231 e MCF-7), glioblastoma (U-13898, U-87 e U-251), células endoteliais (HUVEC) e fibroblastos (NHDF)	Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,005 – 0,1 mM	(KLINGELHOEFFER et al., 2012)
Não Clínico	Células de câncer cervical (HeLa)	Redução do crescimento celular	4 mM	(ROOMI et al., 2015)
Não Clínico	Carcinoma de cólon em camundongos	Diminuição dos níveis de serotonina, aumento do grau de necrose hemorrágica e permeabilidade do endotélio	28,39 mM	(BAGULEY; DING; RICHARDSON, 2014)
Não Clínico	Carcinoma de laringe (HEp-2)	Produção de espécies reativas de oxigênio, através da liberação de Ca <sub>2</sub> <sup>+</sup>	3 - 10 mM	(MARTINOVICH et al., 2012)
Não Clínico	Células de neuroblastoma	Indução de apoptose	1 - 6 mM	(HARDAWAY; BADISA; SOLIMAN, 2012)
Não Clínico	Células de câncer pancreático (PANC-1, AsPC-1, BxPC-3 e MIA PaCa-2)	Indução de aponecrose em células resistentes à apoptose	4,26 mM	(DINNEN, 2013)
Não Clínico	Células de linfoma Burkitt vírus Epstein-Barr positivo e células linfoblastóides	Produção de espécies reativas de oxigênio e indução de morte celular	22,71 mM	(SHATZER et al., 2013)
Não Clínico	Células de neuroblastomas (SK-N-MC) <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<i>in vitro</i> - indução apoptose, inibição proliferação celular e secreção de MMP-2 e -9 e aumento de secreção de TIMP-2 <i>in vivo</i> - inibição do crescimento tumoral	Não relatada	(ROOMI et al., 2013)
Clínico	Câncer metastásico pancreático	Diminuição do tamanho do tumor	0,28; 0,43 e 0,5 mM	(MONTI et al., 2012)
Não Clínico	Células de câncer de próstata (PC3) em camundongos	Produção de espécies reativas de oxigênio, indução autofagia, supressão tumoral	0,4 mM	(TOMASETTI et al., 2012)
Não Clínico	Células de mesotelioma pleural maligno em ratos	<i>in vitro</i> – sinergismo no mecanismo de citotoxicidade <i>in vivo</i> - bloqueio da progressão e metástase tumoral, redução do tamanho do tumor	11.36 mM	(VOLTA et al., 2013)
Não Clínico	Células epiteliais de câncer de pulmão (NSCLC)	Indução de morte celular por ativação da apoptose e via mecanismo de produção de espécies reativas de oxigênio-dependente, perda de viabilidade celular	0,5 – 5mM	(VUYURI et al., 2013)
Não Clínico	Carcinoma sólido de Ehrlich em camundongos	Inibição do crescimento tumoral e aumento da expressão de p53	0,68 mM	(BASSIONY et al., 2014)
Não Clínico	Células de câncer de cólon (RKO e SW480)	Diminuição da proliferação celular, indução apoptose e necrose, sub-regulação de proteínas (Sp1, Sp3 e Sp4) e diminuição da expressão de genes que envolvem a proliferação celular e angiogênese	1 – 3 mM	(PATHI et al., 2011)

#### 4. CONCLUSÃO

Estudos relatam o uso do ácido ascórbico, na prevenção e no tratamento do câncer. Contudo, existem controvérsias sobre seu papel antioxidante e anti-tumoral. Este estudo observou que há relatos na literatura de diferentes doses/concentrações de ácido ascórbico, onde como antioxidante ele pode atuar por diversos mecanismos como na atenuação da citotoxicidade, redução de apoptose, proteção de células neoplásicas contra peroxidação lipídica, redução do crescimento tumoral e secreção de citocinas inflamatórias, dentre outros. E como antitumoral, através inibição da progressão celular, aumento dos níveis de  $H_2O_2$ , efeito anti-proliferativo das células tumorais, citotoxicidade, indução de apoptose, dentre outros. Ainda há incompatibilidade com relação as doses de ácido ascórbico utilizadas, como também a necessidade de caracterização em relação aos estudos clínicos de seus mecanismos de ação. Desta forma, outros estudos devem ser realizados para o entendimento das variações de dose-reposta, bem como seu direcionamento de mecanismos de ação, tanto como agente antioxidante ou antitumoral, para auxiliar o tratamento e a prevenção do câncer, visando melhor qualidade de vida dos pacientes e população em geral.

## REFERÊNCIAS

- ADITI, A.; GRAHAM, D.Y.; Vitamin C, Gastritis, and Gastric Disease: a historical review and update. **Dig Dis Sci.** v. 57, n. 10, p. 1-22, 2012.
- AKLADIOS, F.N.; ANDREW, S.D.; CHRISTOPHER, J.; PARKINSON, C.J. Selective Induction of Oxidative Stress in Cancer cells via Synergistic Combinations of Agents Targeting Redox Homeostasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2015.
- APRAIZ, A.; IDKOWIAK-BALDYS, J.; NIETO-REMENTERÍA, N.; BOYANO, M.D.; HANNUM, Y.A.; ASUMENDI, A. Dihydroceramide accumulation and reactive oxygen species are distinct and non essential events in 4-HPR mediated leukemia cell death. **Biochem Cell Biol.** v. 90, n. 2, p. 209-223, 2012.
- BAGULEY, B.C.; DING, Q.; RICHARDSON, E. Preliminary evidence that high-dose vitamin C has a vascular disrupting action in mice. **Frontiers in oncology.** v. 4, n. 310, p. 1-6, 2014.
- BASSIONY, H.; SABET, S.; EL-DIN, T.A.S.; MOHAMED, M.M.; EL-GHOR, A.A. Magnetite Nanoparticles Inhibit Tumor Growth and Upregulate the Expression of P53/P16 in Ehrlich Solid Carcinoma Bearing Mice. **Plos One.** v. 9, n. 11, p 1-9, 2014.
- CHA, J.; ROOMI, W.; IVANOV, V.; KALINOVSKY, T.; NEIDZWUIECKI, A.; RATH, M. Ascorbate supplementation inhibits growth and metastasis of B16FO melanoma and 4T1 breast cancer cells in vitamin C-deficient mice. **International Journal of Oncology.** v. 42, p. 55-64, 2013.
- CMOCH, A.; PODSZYWALOW-BARTNICKA, P.; PALCZEWSKA, M.; PIWOCK, K.; GROVES, P.; PIKULA, S. Stimulators of Mineralization Limit the Invasive Phenotype of Human Osteosarcoma Cells by a Mechanism Involving Impaired Invadopodia Formation. **Plos One.** v. 9, n. 10, p. 1-13, 2014.
- COSTA, F.F. Epigenomics in cancer management. **Cancer Management and Research.** v. 2010, n. 2, p. 255-265, 2010.
- DINNEN, R.D. Re-directing apoptosis to aponecrosis induces selective cytotoxicity to pancreatic cancer cells through increased ROS, decline in ATP levels and VDAC. **Mol Cancer Ther.** v. 12, n. 12, p. 2792-2803, 2013.
- DU, J.; CULLEN, J.J.; BUETTNER, G.R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1826, n. 1, p. 443-457, 2012.
- FROMBERG, A. Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 67, p. 1157–1166, 2011.
- GARG, N.K.; MANGAL, S.; SAHU, T.; MEHTA, A.; VYAS, S.P.; TYAGI, R.K. Evaluation of anti-apoptotic activity of different dietary antioxidants in renal cell carcinoma against hydrogen peroxide. **Asian Pac J Trop Biomed.** v. 1, n. 1, 57-63, 2011.

GONZÁLEZ, M.J.; ROSARIO-PÉREZ, G.R.; MONTE, C.; RICART, M. Mitochondria, energy and cancer: the relationship with ascorbic acid. **Journal of Orthomolecular Medicine**. v. 25, n. 1, p. 29-38, 2010.

GREENMAN, C. et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. **Nature**. v. 446, n. 7132, p. 153-158, 2007.

GUERRIERO, E. et al. Vitamin C effect on mitoxantrone-induced cytotoxicity in human breast cancer cell lines. **PloS one**. v. 9, n. 12, p. 115-23, 2014.

GROERB, U. Antioxidants and Other Micronutrients in Complementary Oncology. **Breast Care**. v. 4, n. 1, p. 13-20, 2009.

HARDAWAY, C.M.; BADISA, R.B.; SOLIMAN, K.F.A. Effect of ascorbic acid and hydrogen peroxide on mouse neuroblastoma cells. **Mol Med Report**. v. 5, n. 6, p. 1449–1452, 2012.

HUIJSKENS, M.J.A.J. et al. Ascorbic acid promotes proliferation of natural killer cell populations in culture systems applicable for natural killer cell therapy. **Cytotherapy**. v. 17, n. 5, p. 613-620, 2015.

ICHIM, T.E. et al. Intravenous ascorbic acid to prevent and treat cancer-associated sepsis? **Journal of Translational Medicine**. v. 9, n. 25, p. 1-13, 2011.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes Silva (INCA). Consenso Nacional de Nutrição Oncológica – Vol II. 2011. Disponível em:  
[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/consenso\\_nutricao\\_vol2.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/consenso_nutricao_vol2.pdf)

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2014. Disponível em:  
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>.

KIM, Y.; CHONGVIRIYAPHAN, N.; LIU, C.; RUSSEL, R.M.; WANG, X. Combined  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid protects against smoke-induced lung squamous metaplasia in ferrets. **Lung Cancer**. v. 75, n. 1, p. 15–23, 2012.

KLINGELHOEFFER, C. et al. Natural resistance to ascorbic acid induced oxidative stress is mainly mediated by catalase activity in human cancer cells and catalase-silencing sensitizes to oxidative stress. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 12, n. 61, p. 1-10, 2012.

LEE, B.L. et al. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. **Lancet Oncol**. v. 13, n. 1, p. 95–102, 2012.

LI, H. et al., Estradiol 17 $\beta$  and Its Metabolites Stimulate Cell Proliferation and Antagonize Ascorbic Acid-Suppressed Cell Proliferation in Human Ovarian Cancer Cells. **Reproductive Sciences**. v. 219, n. 1, p. 102-111, 2014.

MANDL, J.; SZARKA, A.; BANHEGYI, G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. **British Journal of Pharmacology**. v. 157, n. 1, p. 1097–1110, 2009.



MARTINOVICH, G.G.; GOLUBEVA, E.M.; MARTINOVICH, I.V.; CHERENKEVICH, S.N. Redox Regulation of Calcium Signaling in Cancer Cells by Ascorbic Acid Involving the Mitochondria Electron Transport Chain. **Journal of biophysics**. v. 2012, p. 1-6, 2012.

MCCARTY, M.F.; CONTRERAS, F. Increasing superoxide production and the labile iron pool in tumor cells may sensitize them to extracellular ascorbate. **Frontiers in oncology**. v. 4, n. 249, p. 1-19, 2014.

MELO, J.G.; SANTOS, A.G.; AMORIN, E.L.C.; NASCIMENTO, S.C. ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants used as antitumor agentes in Brazil: na ethnobotanical approach. **Evidence-based complementary and alternative medicine**. v.2011, n.1, 1-4. 2011.

MERLO, L.M.F.; KOSOFF, R.E.; GARDINER, K.L.; MALEY, C.C. An *in vitro* co-culture model of esophageal cells identifies ascorbic acid as a modulator of cell competition. **BMC Cancer**. v. 11, n. 461, p. 1-10, 2011.

MIKIROVA, N.; CASCIARI, J.; RIORDAN, N.; HUNNINGHAKE, R. Clinical experience with intravenous administration of ascorbic acid: achievable levels in blood for different states of inflammation and disease in cancer patients. **Journal of Translational Medicine**. v. 11, n. 191, p. 1-10, 2011.

MIKIROVA N, CASCIARI J, ROGERS A, TAYLOR P. Effect of high-dose intravenous vitamin C on inflammation in cancer patients. **Journal of Translational Medicine**. v. 10, n. 189, p. 1-10, 2012.

MONTI, D.A. et al. Phase I Evaluation of Intravenous Ascorbic Acid in Combination with Gemcitabine and Erlotinib in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer. **Plos One**. v. 7, n. 1, p. 1-7, 2012.

NAGGAPAN, A. et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in vitamin C-treated AGS cells. **Biochemistry**. v. 14, n. 24, p. 1-11, 2013.

NASS, N.; SEL, S.; IGNATOV, A.; ROESSNER, A.; KALINSKI, T. Oxidative stress and glyoxalase I activity mediate dicarbonyl toxicity in MCF-7 mamma carcinoma cells and a tamoxifen resistant derivative. **Biochimica et Biophysica Acta** 1860 (2016) 1272–1280.

NUMAZAWA, S.; SUGIHARA, K.; MIYAKE, S.; TOMIYAMA, H.; HIDA, A.; HATSUNO, M. YAMAMOTO, M.; YOSHIDA, T. possible involvement of oxidative stress in 5-fluorouracil-mediated myelosuppression in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, p. 40–45. 2010.

PARK, S. The Effects of High Concentrations of Vitamin C on Cancer Cells. **Nutrients**. v. 5, n. 1, p. 3496-3505, 2013.

PATHI, S.S.; LEI, P.; SREEVALSAN, S.; CHADALAPAKA, G.; JUTOORU, I.; SAFE, S. Pharmacologic doses of ascorbic acid repress specificity protein (sp) transcription factors and sp-regulated genes in colon cancer cells. **Nutr Cancer**. v. 63, n. 7, p. 1133–1142, 2011.

PORTANTIOLO, T.N.; VALE, I.A.V.; BERGMAN, R.B.; ALIB, R.T. Consumo de Vitaminas Antioxidantes por Mulheres com Câncer de Mama submetidas ao Tratamento

Quimioterápico na Cidade de Pelotas-RS. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 60, n. 4, p. 323-329, 2014.

PUTCHALA, M.C.; RAMANI, P.; SHERLIN, H.J.; PREMKUMAR, P.; NATESAN, A. Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity – A systematic review. **Archives of oral biology**. v. 58, n. 1, p. 563–574, 2013.

RAHAL, A. et al. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Research International**. v. 2014, p. 1-19, 2014.

RAJAKUMAR, T.; PUGALENDHI, P.; THILAGAVATHI, S. Dose response chemopreventive potential of allyl isothiocyanate against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. **Chem Biol Interact**. v. 25, n. 231, p. 35-43, 2015.

REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**. v. 49, n. 1, p. 1603–1616, 2010.

ROOMI, M.W.; KALINOVSKY, T.; ROOMI, N.W.; NIEDZWIECKI, A. RATH, M. Suppression of metastasis of intratesticular inoculation of B16FO melanoma cells by a novel nutriente mixture in male athymic nude mice. *Experimental and therapeutic medicine*.2012; 4:775-780.

ROOMI, M.W.; CHA, J.; KALINOVSKY, T.; ROOMI, N.W.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. Inhibition of the SK-N-MC human neuroblastoma cell line in vivo and in vitro by a novel nutrient mixture. **Oncology Reports**. v. 29, p. 1714-1720, 2013.

ROOMI, M.W.; CHA, J.; KALINOVSKY, T.; ROOMI, N.W.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. Effects of a nutrient mixture on immunohistochemical localization of cancer markers in human cervical cancer HeLa cell tumor xenografts in female nude mice. **Experimental and therapeutic medicine**. v. 9, p. 294-302, 2015.

SHATZER, A.N.; ESPEY, M.G.; CHAVEZ, M.; TU, H.; LEVINE, M.; COHEN, J.I. Ascorbic Acid Kills Epstein-Barr Virus (EBV) Positive Burkitt Lymphoma Cells and EBV Transformed B-Cells *in Vitro*, but not *in Vivo*. **Leuk Lymphoma**. v. 54, n. 5, p. 1069–1078, 2013.

SUBRAMANI, T. et al. Vitamin C suppresses cell death in MCF-7 human breast cancer cells induced by tamoxifen. **J. Cell. Mol. Med**. v. 18, n. 2, p. 305-313, 2014.

SUNG B, PRASAD S, YADAV VR, LAVASANIFAR A, AGGARWAL BB. Cancer and diet: How are they related? **Free Radic Res**. v. 45, n. 8, p. 864–879, 2011.

TABACZAR, S.; KOCEVA-CHYLA, A.; CZEPAS, J.; PIENIAZEK, A.; PIASECKA-ZELGA, J.; GWOZDZINSKI, K. Nitroxide pirolin reduces oxidative stress generated by doxorubicin and docetaxel in blood plasma of rats bearing mammary tumor. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 153-163. 2012.

TAKEMURA, Y.; SATOH, M.; SATOH, K.; HAMADA, H.; SEKIDO, Y.; KUBOTA, S. High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 394, p. 249–253, 2010.

TOMASETTI, M. et al. Alpha-Tocopheryl Succinate Inhibits Autophagic Survival of Prostate Cancer Cells Induced by Vitamin K3 and Ascorbate to Trigger Cell Death. **PLoS One**. v, 7, n. 12, p. 1-12, 2012.

TOR, Y.S. et al. Induction of Apoptosis in MCF-7 Cells via Oxidative Stress Generation, MitochondriaDependent and Caspase-Independent Pathway by Ethyl Acetate Extract of *Dillenia suffruticosa* and Its Chemical Profile. **Plos One**. v. 10, n. 6, p. 1-25, 2015.

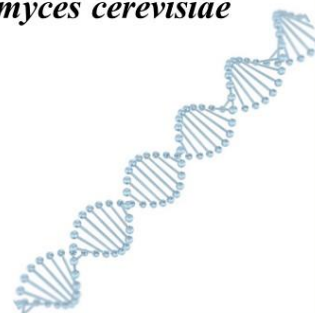
VOLTA, V. et al. Preclinical Demonstration of Synergistic Active Nutrients/Drug (AND) Combination as a Potential Treatment for Malignant Pleural Mesothelioma. **Plos One**. v. 8, n. 3, p. 1-9, 2013.

VUYYURI, S.B.; RINKINEN, J.; WORDEN, E.; SHIM, H.; LEE, S.; DAVIS, K.R. Ascorbic Acid and a Cytostatic Inhibitor of Glycolysis Synergistically Induce Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **Plos One**. v. 8, n. 6, p. 1-13, 2013.

XIAO, H. et al. Attributable Causes of Cancer in China: Fruit and Vegetable. **Chin J Cancer Res**. V. 23, n. 3, p. 171-176, 2011.

## CAPÍTULO II

**Efeitos do Ácido Ascórbico no potencial oxidativo e genotóxico de drogas antineoplásicas em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***



## Efeitos do Ácido Ascórbico no potencial oxidativo e genotóxico de drogas antineoplásicas em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata<sup>1</sup>, Reyca Rodrigues e Silva<sup>2</sup>, Antônio Lima Braga<sup>1</sup>, Ricardo Melo de Carvalho<sup>1</sup>, José Victor de Oliveira Santos, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar<sup>3</sup>, Márcia Correia Fernanda Jardim Paz<sup>3</sup>, MD Toriquil Islam<sup>3</sup>, João Marcelo de Castro e Sousa<sup>3</sup>, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante<sup>1,3</sup>, Benedito Borges da Silva<sup>1,3</sup>

1 Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPI - Teresina-PI, Brasil

2 Centro Universitário UNINOVAFAPI – Teresina-PI, Brasil

3 Doutorado em Biotecnologia – RENORBIO – Brasil

### RESUMO

O desenvolvimento do Câncer está diretamente relacionado ao estresse oxidativo. Durante o tratamento, pacientes oncológicos utilizam antioxidantes na dieta, dentre eles, o Ácido Ascórbico (AA). O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos modulatórios do Ácido Ascórbico frente aos danos oxidativos e genotóxicos induzidos pelo 5-Fluorouracil, Docetaxel e Tamoxifeno em linhagens de *S. cerevisiae*, proficiente e mutadas em defesas antioxidantes. Os resultados obtidos apontam que o 5-Fluorouracil, Docetaxel, Tamoxifeno e suas associações, induziram danos oxidativos significantes ( $p < 0,001$ ), em todas linhagens de *S. cerevisiae*, entretanto, quando associados ao AA, apresentaram modulação significativa ( $p < 0,05$ ) nas diferentes linhagens, tanto para co- quanto para pós-tratamento. Os antineoplásicos 5-FU, DOCE e TAMOX induziram genotoxicidade ( $p < 0,05$ ) na linhagem SODWT quando comparado com o grupo sem tratamento, observado pelo aumento do ID e FD nessa linhagem. De forma similar, ocorreu nas interações 5-FU+DOCE e 5-FU+TAMOX. Entretanto, os danos genotóxicos induzidos pelos antineoplásicos e associações foram modulados pelo AA ( $p < 0,05$ ) em DOCE (ID - 42,5% e FD - 39,1%), o TAMOX (ID - 51,4% e FD - 50%), 5-FU+DOCE (ID - 43,5% e FD - 42,9%) e 5-FU+TAMOX (ID - 37% e FD - 33,6%). Esses dados apontam que o AA teve ações antioxidantes e antígeno-tóxicas frente aos danos induzidos pelos antineoplásicos isolados e em associações. Assim apontamos a realização de outros testes não clínicos e clínicos para elucidar as interferências do AA durante terapias oncológicas.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo. 5-Fluorouracil. Docetaxel. Tamoxifeno. Ácido Ascórbico. *Saccharomyces cerevisiae*.

## ABSTRACT

Development of Cancer is directly related to oxidative stress. During treatment, cancer patients use dietary antioxidants, including Ascorbic Acid (AA). The aim of the present study was to evaluate the effects of Ascorbic Acid on oxidative and genotoxic effects induced by 5-Fluorouracil, Docetaxel and Tamoxifen in *S. cerevisiae* strains, proficient and mutated in antioxidant defenses. The results obtained indicate that 5-Fluorouracil, Docetaxel, Tamoxifen and its associations induced significant oxidative damage ( $p < 0.001$ ) in all *S. cerevisiae* strains, however, when associated with AA, they presented significant modulation ( $p < 0,05$ ) in different strains, both for co-treatment and post-treatment. The 5-FU, DOCE and TAMOX antineoplastic drugs induced genotoxicity ( $p < 0.05$ ) in the SODWT line when compared to the untreated group, observed by the increase in ID and FD in this lineage. Similarly, 5-FU+DOCE and 5-FU+TAMOX interactions occurred. However, genotoxic damages induced by antineoplastics and associations were modulated by AA ( $p < 0.05$ ) in DOCE (ID - 42,5% and FD - 39,1%), TAMOX (ID - 51,4% and FD - 50%), 5-FU+DOCE (ID - 43,5% and FD - 42,9%) and 5-FU+TAMOX (ID - 37% and FD - 33,6%). These data indicate that AA had antioxidative and antigenotoxic actions against damage induced by isolated antineoplastic agents and in associations. We therefore suggest that other non-clinical and clinical tests be performed to elucidate the interferences of AA during cancer therapies.

**Key-words:** Oxidativo Stress. 5-Fluorouracil. Docetaxel. Tamoxifeno. Ascorbic Acid. *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1. INTRODUÇÃO

Os Radicais Livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados, altamente instáveis e ativos em reações químicas, derivados de elemento como o oxigênio, que produz Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), as quais em excesso, pode acarretar em danos oxidativos, alterações nas bases nitrogenadas ou, ainda, modificações de desoxirribose, podendo gerar danos como apoptose e mutações (CAROCHO; FERREIRA, 2013; MENDONÇA; CARIOCA; MAIA, 2014).

O estresse oxidativo é caracterizado por essa produção excessiva de radicais livres e pela redução da capacidade do sistema de defesas antioxidantes endógeno (enzimático - Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase, Catalase (CAT)); e não-enzimático - glutathione (GSH)) de “lutar” contra o ataque oxidativo de biomoléculas, estando diretamente relacionado ao desenvolvimento de diversas patologias, pois alguns sistemas, como o sistema nervoso central, são extremamente sensíveis à danos por radicais livres, os quais promovem danos a tecidos e macromoléculas (lipídios, ácidos nucleicos e proteínas). Assim, participam do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), cardiovasculares, disfunções imunes e endócrinas, danos renais e hepáticos, inflamações crônicas e até mesmo do câncer (BARBOSA et al., 2010; RAHAL et al., 2014; PISOSCHI; POP, 2015).

O Câncer (CA) é a patologia com maior frequência de óbitos pelo mundo devido a fatores moleculares altamente complexos, compreendidos entre a predisposição gênica e a influência do estilo de vida. Seu desenvolvimento está diretamente relacionado ao estresse oxidativo, através de três estágios: mutações - devido a produção de danos ao DNA, por meio de EROs; proliferação celular e diminuição da apoptose – onde EROs contribuem para expressão anormal de genes, modificando, assim, a comunicação entre células; e progressão – por meio de alterações no DNA provocadas muitas vezes por EROS, dando início a uma nova população celular (REUTER et al., 2010; D’ORAZIO, 2012; CHOUDHARI et al., 2014).

De acordo com o INCA (2015), em 2012 houve a ocorrência de 14,1 milhões de casos de CA no mundo, com um total de 8,2 milhões de óbitos. Estima-se que em 2030, a carga global de CA será de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de óbitos. Dentre os tipos de CA, o Câncer de Mama (CM) é o segundo mais comum (correspondendo a 10% de todos os tipos de câncer em mulheres), e o quinto maior causador de morte no mundo, caracterizado por ser uma patologia heterogênea, com cerca de 20 subtipos morfológicos distintos e quatro

subtipos baseados na expressão gênica (JANSEN; BACKSTEIN; BROWN, 2014; KAWALEC; LOPUCH; MIKRUT, 2015). Para o Brasil, em 2016, são esperados 57.960 casos novos de CM, com maior frequência nas mulheres das Regiões Sul (74,30/100 mil), Sudeste (68,08/100 mil), Centro-Oeste (55,87/100 mil) e Nordeste (38,74/100 mil) (INCA, 2015).

Seu tratamento é realizado por meio de vários tipos de terapias, dentre elas a quimioterapia, a qual observa-se uso de fármacos em associação, dentre eles o Docetaxel (DOCE), 5-Fluorouracil (5-FU) e o Tamoxifeno (TAMOX). O DOCE é utilizado principalmente para tratar a metástase celular, pois promove a interrupção do ciclo celular e posterior apoptose. O 5-FU impede o metabolismo celular de sintetizar metabolitos essenciais, levando a apoptose durante a divisão celular. O TAMOX, geralmente é empregado como terapia após o tratamento quimioterápico, por ser um modulador dos receptores de estrogênio, fazendo o mesmo competir com este hormônio, impedindo que ocorra a ligação nesses sítios que poderiam levar a uma proliferação celular (ALKEN; KELLY, 2013; ASARA et al, 2013; LIU et al., 2014).

Durante a quimioterapia, alguns pacientes oncológicos utilizam antioxidantes na dieta, para suprir déficits nutricionais decorrentes do tratamento. Dentre os antioxidantes consumidos, encontram-se as vitaminas, em especial, o ácido ascórbico (AA), conhecido popularmente por vitamina C, composto hidrofílico, com propriedades antioxidantes capazes de quelar radicais livres, protegendo a estrutura celular e mantendo a homeostase celular frente a agentes tóxicos (TORRES et al, 2008; AL-ASMARI et al., 2015). O AA também tem sido utilizado na prevenção CA, devido à estas propriedades antioxidantes que podem prevenir a oxidação que induz a apoptose. Entretanto, estudos apontam que doses altas de AA podem aumentar a produção de ATP (gerado pelas mitocôndrias) induzindo apoptose em linhagens de células tumorais, por via pró-oxidante (GONZÁLEZ et al., 2010; GUERRIERO et al., 2014).

Essas controvérsias sobre o uso do AA durante o tratamento ou prevenção do CA, surge a necessidade de novos estudos para a compreensão deste tema. A utilização de modelo biológicos têm sido amplamente adotada, por permitir a superação de restrições éticas e experimentais relacionadas à forma de vida alvo, uma vez que tais modelos representam uma ampla classe de seres vivos, em termos de processos biológicos. Dentre estes modelos, encontra-se as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), amplamente utilizadas em estudos de estresse oxidativo, por possuírem um sistema eucariótico celular com metabolismo semelhante ao de eucariotos superiores (SOARES, 2005; KARATHIA et al., 2010). Por se



tratar de células eucarióticas, estudos de genotoxicidade e danos ao DNA podem ser desenvolvidos por meio do Ensaio Cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis*) capaz de detectar quebras de fita simples e dupla no DNA nesses modelos (GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015). O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos modulatórios do Ácido Ascórbico frente aos danos oxidativos e genotóxicos induzidos pelo 5-Fluorouracil, Docetaxel e Tamoxifeno em linhagens de *S. cerevisiae*, proficiente e mutadas em defesas antioxidantes.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Químicos e suas diluições

As drogas utilizadas no estudo foram: 1) Fluorouracila (Eurofarma), solução injetável de 25 mg/mL, diluído em salina estéril até a concentração final de 20 µg/mL ; 2) Docetaxel tri-hidratado (Eurofarma), solução injetável de 20 µg/mL, diluído em salina (0,9%) estéril até a concentração final de 2 µg/mL; Citrato de Tamoxifeno (Eurofarma), comprimido de 20 mg, diluído em solução salina (0,9 %) com Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%, até a concentração final de 20 µg/mL; e Ácido L(+) Ascórbico P.A. (Dinâmica Ltda.), diluído em tampão fosfato estéril até a concentração final de 50 µmol. Como controle positivo foi utilizado peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 mM, e como controle negativo salina estéril (0,9%).

### 2.2 Teste do disco central em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

O teste foi aplicado de acordo com Oliveira et al. (2008). As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no ensaio de atividade oxidante com seus genótipos relevantes estão apresentadas na **Tabela 1**. A linhagem EG118 é defectiva no sistema enzimático que envolve a enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD - produto do gene SOD1), enquanto a EG110 apresenta mutação na SOD mitocondrial (MnSOD - produto do gene SOD2); EG133 é o duplo mutante, defectivo para SOD1 e SOD2; EG103 corresponde à linhagem selvagem, portanto proficiente nestas enzimas; EG223 defectiva na enzima catalase (Cat1); e a linhagem duplo mutante EG, defectiva para Sod1Cat1.

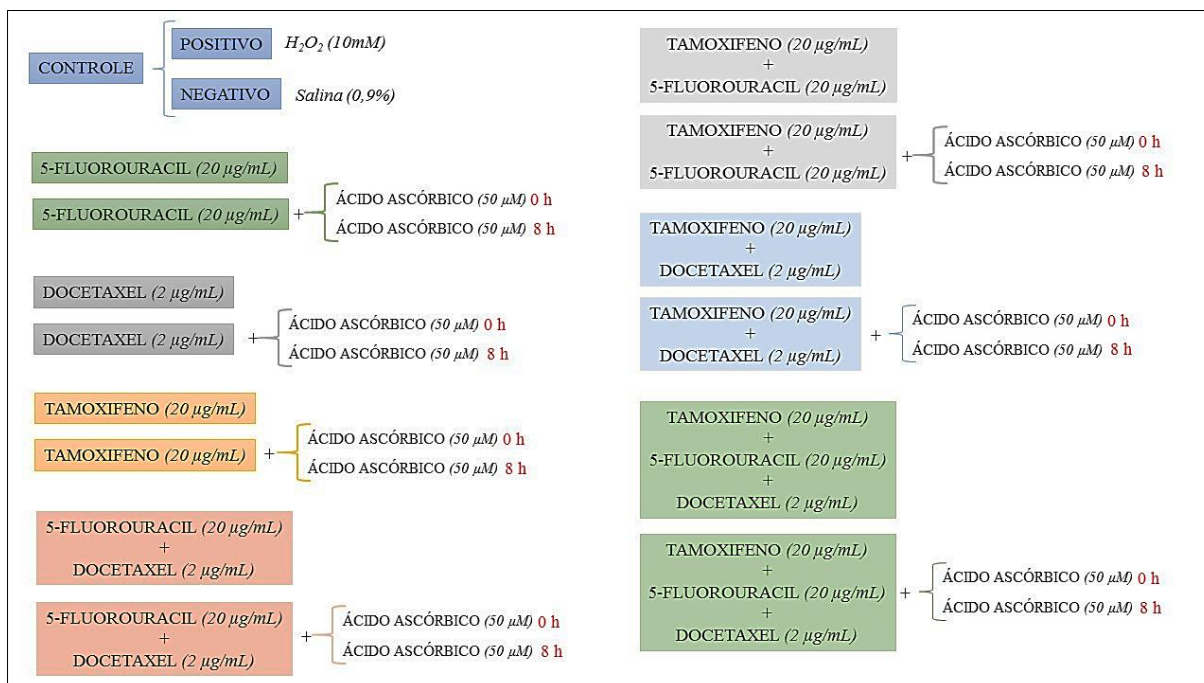
As linhagens foram cultivadas em meio YEL (extrato de levedura 0,5%, 2% de Bacto-peptona, 2% de glucose) a 28°C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária, de acordo com Oliveira e colaboradores (2014). As células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem de uma placa de Petri em um ciclo contínuo, para ambos os lados da placa, contendo no centro um disco de papel filtro estéril. Neste, foram adicionados 100 µL totais dos antineoplásicos (Tamoxifeno – 20 µg/mL; 5-Fluorouracil – 20 µg/mL; Docetaxel – 2 µg/mL) isolados, dissolvidos em salina (0,9%) estéril, e em associação com AA (50 µmol), diluído em tampão fosfato, o qual foi administrado no momento (co-tratamento) e 8 horas após a administração dos tratamentos (período correspondente à meia-vida das drogas). Tratamentos descritos na **Figura 1**. Após 48h de incubação em estufa a

34°C, foram mensurados os halos de inibição do crescimento. A inibição do crescimento leveduriforme foi medida em milímetros, desde a margem do disco de papel-filtro para o início do crescimento celular. Os valores podem variar de 0 mm (crescimento completo) a 40 mm (ausência de crescimento), para o tamanho da placa de Petri. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

**Tabela 1.** Descrição das linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no estudo.

Descrição	Genótipo	Origem
EG103 (SODWT)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	Edith Gralla, L Angeles
EG118 (Sod1Δ)	sod1::URA3 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG110 (Sod2Δ)	sod2::TRP1 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG133 (Sod1ΔSod2Δ)	sod1::URA3 sod2::TRP1 double mutant all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG223 (Cat1Δ)	EG103, except cat1: TRP1	Edith Gralla, L Angeles
EG (Sod1ΔCat1Δ)	EG103, except sod1:: URA3 and cat1:: TRP1	Edith Gralla, L Angeles

**Figura 1** – Grupos de tratamentos utilizados no estudo



### 2.3 Ensaio Cometa em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens foram cultivadas em meio YEL (extrato de levedura 0,5%, 2% de Bacto-peptona, 2% de glucose) a 28°C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária, de acordo com Oliveira e colaboradores (2014). Foi realizada uma contagem celular, onde a concentração celular final para a cultura em meio líquido foi ajustada a  $0.5 \times 10^6$  células/mL. Assim, as células foram semeadas em 1 mL de meio para cada respectiva linhagem e tratamento, conforme descrito anteriormente no item 2.2, entretanto, os tratamentos com AA foram realizados apenas em co-tratamento (0h). Após 48h de incubação em estufa a 34°C, realizou-se a versão alcalina do ensaio cometa, conforme descrito por Silva e colaboradores (2016), com adaptações. Onde 10 µl das amostras foram misturadas com uma fina camada de agarose “low melting” 0,75% (95 µl) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%; estas lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% DMSO na hora do uso), por no mínimo 1 hora até no máximo 72 horas a 4°C, para o rompimento das membranas celulares. A lise celular permite a migração dos fragmentos de DNA realizada após a incubação das lâminas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos e subsequente aplicação de uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos nas células lisadas sobre as lâminas para microscopia em uma cuba de eletroforese de DNA. As lâminas foram neutralizadas logo após a eletroforese com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com Giemsa (OSIPOV et al., 2014). Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). O ID foi obtido pela avaliação visual das classes de dano (de 0 a 4), extraíndo-se um índice que expressa o dano geral sofrido por uma população de células (50 células por lâmina em duplicata), os núcleos intactos aparecem redondos (classe 0 – sem danos), já nas células lesadas, o DNA migra do núcleo em direção ao ânodo, durante a eletroforese, mostrando uma “cauda” de fragmentos sedimentados, semelhante a um cometa e são classificados entre classes um (dano mínimo) a quatro (dano máximo). A FD foi calculada baseada no número de células sem cauda (dano 0) menos 100.

## 2.4 Cálculo do percentual de modulação do ácido ascórbico frente aos danos induzidos por drogas antineoplásicas

Após calculada a estatística dos testes em *S. cerevisiae*, foram calculados os valores do percentual de modulação (%M) do AA nos danos induzidos pelos antineoplásicos associados entre si, bem como com o ácido ascórbico, através da seguinte fórmula:

$$\%M = (A - (B + AA)) / A * 100$$

Onde, “A” representa os valores dos danos provocados pelos antineoplásicos e suas associações, e “B+AA” representa os valores dos antineoplásicos associados ao ácido ascórbico.

## 2.5 Análise Estatística

Os resultados que obedeceram a uma distribuição paramétrica foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA), com teste de Bonferroni como *post hoc test*, através do programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, Copyright©. Significância para  $P < 0,05$ . Os dados não paramétricos (percentagens) foram analisados por meio do teste qui-quadrado.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação do potencial oxidativo do 5-Fluorouracil, Docetaxel e Tamoxifeno e percentual de modulação do Ácido Ascórbico frente aos danos oxidativos induzidos pelas drogas em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada para o estudo de mecanismos de proteção celular contra Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (WU et al., 2011). Os resultados da avaliação do potencial oxidativo do 5-Fluorouracil, Docetaxel e Tamoxifeno em *S. cerevisiae*, apontam que todas as drogas induziram danos oxidativos significantes ( $p < 0,0001$ ) em todas as linhagens testadas, quando comparados ao controle negativo (**Tabela 2 e 3**).

O ácido ascórbico em associação com os antineoplásicos apresentou significantes ( $p < 0,05$ ) efeitos modulatórios para a maioria das linhagens, exceto para Sod1 $\Delta$ Sod2 $\Delta$ . O AA modulou em 45% e 42 % os danos oxidativos induzidos pelo 5-FU em co-tratamento e em pós-tratamento na linhagem SODWT, respectivamente. Na linhagem Sod1 $\Delta$  a modulação do AA foi de 55% em co-tratamento e 51% em pós-tratamento frente a oxidação do 5-FU (**Figura 2A**). A Sod1 (citoplasmática) é responsável por proteger as mitocôndrias contra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante os processos de respiração celular; enquanto que Sod2 (mitocondrial) constitui a principal enzima responsável por remover íons superóxido do citoplasma. Prontamente, a catalase (Cat) degrada peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (HÖFERL et al., 2014; GAMERO-SANDEMETRIO; GÓMEZ-PASTOR; MATAALLANA, 2014). Em relação à linhagem Cat1 $\Delta$ , foi evidenciada que o AA modulou danos oxidativos com percentual de 64% em co-tratamento para 5-FU (**Figura 3A**). O 5-FU é um quimioterápico com meia-vida entre de 10 à 20 minutos, que atua pela inibição de processos biossintéticos essenciais, dificultando o crescimento celular pela inibição da timidilato sintetase, impedindo desta forma, a transcrição de DNA e translação de RNA, além de se incorporar nestas macromoléculas, inibindo suas funções normais, levando, assim, a apoptose e a citotoxicidade (ZHANG et al., 2012; ASARA et al., 2013; LI et al., 2015).

**Tabela 2** – Avaliação do potencial oxidativo da associação do ácido ascórbico com 5-Fluorouracil, Docetaxel e suas associações em linhagens de *S. cerevisiae*. Os valores correspondem a Média  $\pm$  Desvio padrão das medidas dos halos de inibição de crescimento das linhagens. ANOVA, two-way, pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$ . a: comparado a salina; b: comparado a 5-FU; c: comparado a Doce+AA; d: comparado a 5-FU+Doce; Doce: Docetaxel (2  $\mu\text{g/mL}$ ); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu\text{g/mL}$ ); AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu\text{mol}$ );  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Peróxido de Hidrogênio (10 mM); 0h: co-tratamento; 8h: após 8h;

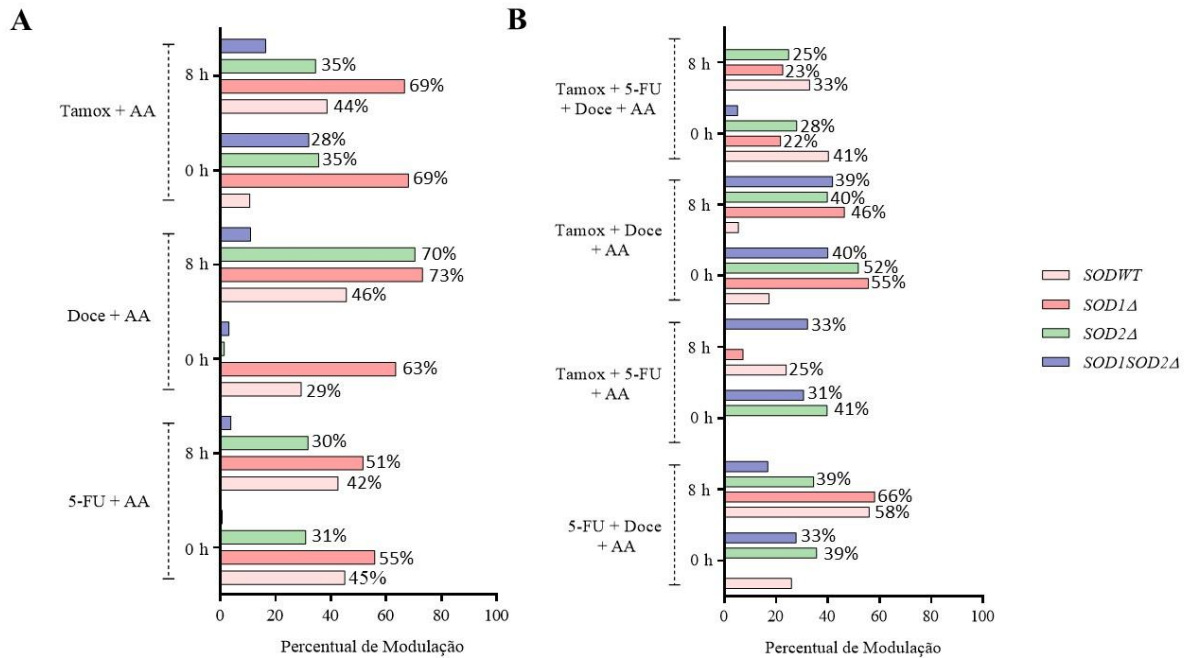
Grupos	SODWT	Sod1 $\Delta$	Sod2 $\Delta$	Sod1 $\Delta$ Sod2 $\Delta$	Cat1 $\Delta$	Sod1 $\Delta$ Cat1 $\Delta$
Salina 0,9%	1,75 $\pm$ 1,25	0,75 $\pm$ 0,95	0,50 $\pm$ 0,57	0,75 $\pm$ 0,95	0,50 $\pm$ 0,35	0,50 $\pm$ 0,57
$\text{H}_2\text{O}_2$	35,0 $\pm$ 3,55 <sup>***a</sup>	33,2 $\pm$ 0,50 <sup>***a</sup>	33,7 $\pm$ 0,95 <sup>***a</sup>	14,5 $\pm$ 12,08 <sup>***a</sup>	28,25 $\pm$ 4,59 <sup>***a</sup>	30,5 $\pm$ 1,91 <sup>***a</sup>
5-FU	30,0 $\pm$ 4,32 <sup>***a</sup>	30,0 $\pm$ 4,23 <sup>***a</sup>	35,5 $\pm$ 4,04 <sup>*a</sup>	32,7 $\pm$ 0,95 <sup>**a</sup>	27,7 $\pm$ 1,70 <sup>**a</sup>	30,7 $\pm$ 1,50 <sup>***a</sup>
5-FU + AA (0h)	16,5 $\pm$ 1,91 <sup>**b</sup>	13,2 $\pm$ 3,94 <sup>***b</sup>	24,5 $\pm$ 4,79	32,5 $\pm$ 2,08	9,75 $\pm$ 0,95 <sup>***b</sup>	27,5 $\pm$ 3,10
5-FU + AA (8h)	17,2 $\pm$ 7,08 <sup>**b</sup>	14,5 $\pm$ 3,69 <sup>***b</sup>	24,2 $\pm$ 5,67	31,5 $\pm$ 2,38	25,5 $\pm$ 5,50	32,5 $\pm$ 3,10
Doce	29,8 $\pm$ 8,66 <sup>**a</sup>	33,5 $\pm$ 1,29 <sup>***a</sup>	35,5 $\pm$ 2,38 <sup>*a</sup>	32,0 $\pm$ 1,63 <sup>**a</sup>	23,7 $\pm$ 4,19 <sup>***a</sup>	23,7 $\pm$ 4,11 <sup>***a</sup>
Doce + AA (0h)	21,1 $\pm$ 3,71	12,2 $\pm$ 2,06 <sup>***c</sup>	35,0 $\pm$ 0,81	31,0 $\pm$ 3,36	8,5 $\pm$ 2,64 <sup>***c</sup>	6,75 $\pm$ 3,94 <sup>***c</sup>
Doce + AA (8h)	16,2 $\pm$ 4,24	9,0 $\pm$ 2,58 <sup>***c</sup>	10,2 $\pm$ 6,85 <sup>***c</sup>	28,5 $\pm$ 3,10	13,0 $\pm$ 2,58 <sup>**c</sup>	8,75 $\pm$ 4,78 <sup>***c</sup>
5-FU + Doce	37,5 $\pm$ 1,29 <sup>***a</sup>	37,5 $\pm$ 1,29 <sup>***a</sup>	36,2 $\pm$ 2,63 <sup>***a</sup>	32,0 $\pm$ 1,63 <sup>***a</sup>	26,2 $\pm$ 2,06 <sup>**a</sup>	23,7 $\pm$ 4,11 <sup>***a</sup>
5-FU + Doce + AA (0h)	33,5 $\pm$ 2,38	12,0 $\pm$ 2,16 <sup>***d</sup>	32,7 $\pm$ 3,59	21,7 $\pm$ 6,02 <sup>**d</sup>	17,5 $\pm$ 2,08 <sup>*d</sup>	20,5 $\pm$ 4,20
5-FU + Doce + AA (8h)	23,0 $\pm$ 4,96 <sup>***d</sup>	12,5 $\pm$ 2,64 <sup>***d</sup>	10,5 $\pm$ 2,08 <sup>***d</sup>	26,7 $\pm$ 3,86	20,7 $\pm$ 4,42	23,5 $\pm$ 2,64

**Tabela 3** – Avaliação do potencial oxidativo da associação do ácido ascórbico com Tamoxifeno, 5-Fluorouracil, Docetaxel e suas associações em linhagens de *S. cerevisiae*. Os valores correspondem a Média  $\pm$  Desvio padrão das medidas dos halos de inibição de crescimento das linhagens. ANOVA, two-way, pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$ . a: comparado a salina; b: comparado a Tamox; c: comparado a Tamox+5-FU; d: comparado a Tamox+Doce; e: comparado a Tamox+Doce+5-FU; Tamox: Tamoxifeno (20  $\mu\text{g/mL}$ ); Doce: Docetaxel (2  $\mu\text{g/mL}$ ); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu\text{g/mL}$ ); AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu\text{mol}$ );  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Peróxido de Hidrogênio (10 mM); 0h: co-tratamento; 8h: após 8h;

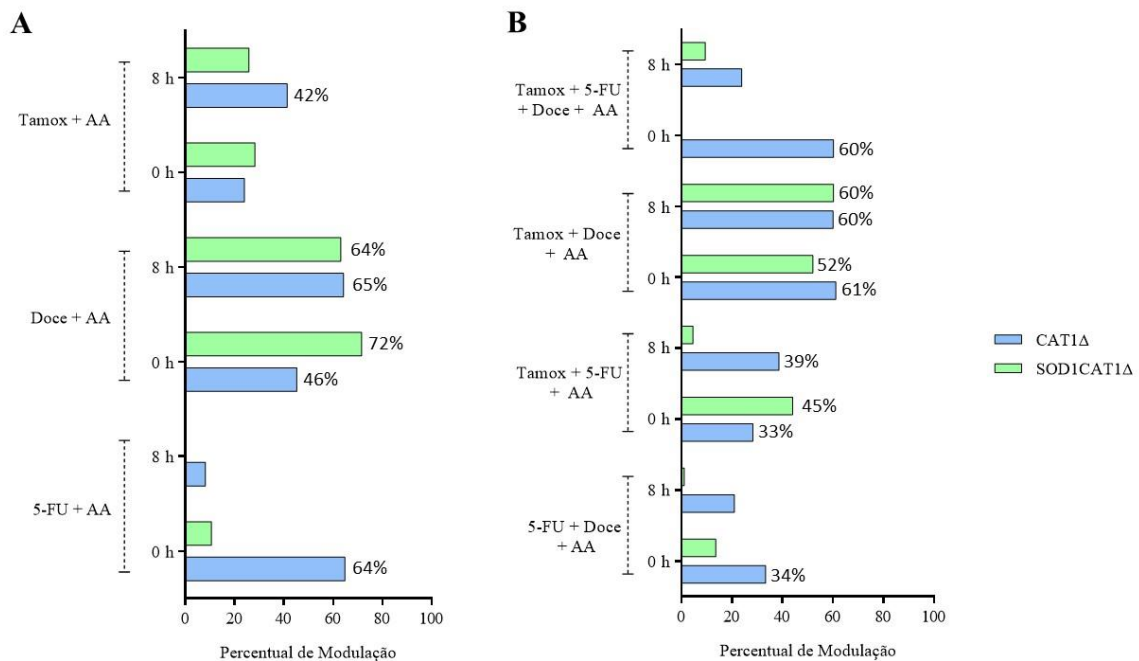
Grupos	SODWT	Sod1A	Sod2A	Sod1A/Sod2A	Cat1A	Sod1A/Cat1A
Salina 0,9%	1,75 $\pm$ 1,25	0,75 $\pm$ 0,95	0,50 $\pm$ 0,57	0,75 $\pm$ 0,95	0,50 $\pm$ 0,35	0,50 $\pm$ 0,57
$\text{H}_2\text{O}_2$	35,0 $\pm$ 3,55 <sup>***a</sup>	33,2 $\pm$ 0,50 <sup>***a</sup>	33,7 $\pm$ 0,95 <sup>***a</sup>	14,5 $\pm$ 12,08 <sup>***a</sup>	28,25 $\pm$ 4,59 <sup>***a</sup>	30,5 $\pm$ 1,91 <sup>***a</sup>
Tamox	30,7 $\pm$ 5,67 <sup>***a</sup>	30,5 $\pm$ 2,51 <sup>***a</sup>	22,5 $\pm$ 2,08 <sup>***a</sup>	20,7 $\pm$ 7,67 <sup>***a</sup>	23,0 $\pm$ 6,48 <sup>***a</sup>	21,2 $\pm$ 4,57 <sup>*a</sup>
Tamox + AA (0h)	22,7 $\pm$ 2,21	31,0 $\pm$ 4,83	14,2 $\pm$ 2,06 <sup>***b</sup>	15,0 $\pm$ 6,67	17,5 $\pm$ 4,93	15,2 $\pm$ 10,08
Tamox + AA (8h)	17,2 $\pm$ 4,42 <sup>**b</sup>	17,7 $\pm$ 7,36 <sup>**b</sup>	14,7 $\pm$ 1,255 <sup>***b</sup>	17,2 $\pm$ 5,56	13,5 $\pm$ 3,00 <sup>*b</sup>	15,7 $\pm$ 7,80
Tamox + 5-FU	24,0 $\pm$ 4,24 <sup>***a</sup>	23,7 $\pm$ 14,06 <sup>*a</sup>	18,2 $\pm$ 4,64 <sup>***a</sup>	31,0 $\pm$ 2,94 <sup>***a</sup>	26,5 $\pm$ 0,35 <sup>***a</sup>	27,2 $\pm$ 6,60 <sup>***a</sup>
Tamox + 5-FU + AA (0h)	24,7 $\pm$ 4,99	31,0 $\pm$ 4,83	11,0 $\pm$ 4,76	21,5 $\pm$ 5,26 <sup>*c</sup>	19,0 $\pm$ 2,12	15,2 $\pm$ 7,22
Tamox + 5-FU + AA (8h)	18,2 $\pm$ 4,64	22,7 $\pm$ 12,28	18,5 $\pm$ 2,38	21,0 $\pm$ 5,22 <sup>*c</sup>	16,2 $\pm$ 5,65	26,0 $\pm$ 7,43
Tamox + Doce	18,7 $\pm$ 7,08 <sup>**a</sup>	35,0 $\pm$ 0,0 <sup>***a</sup>	27,0 $\pm$ 6,00 <sup>***a</sup>	27,5 $\pm$ 10,47 <sup>***a</sup>	22,5 $\pm$ 6,02 <sup>***a</sup>	24,5 $\pm$ 6,65 <sup>***a</sup>
Tamox + Doce + AA (0h)	15,5 $\pm$ 5,80	15,5 $\pm$ 4,43 <sup>***d</sup>	13,0 $\pm$ 7,39 <sup>*d</sup>	16,5 $\pm$ 0,57	8,7 $\pm$ 1,89 <sup>**d</sup>	11,7 $\pm$ 6,13 <sup>**d</sup>
Tamox + Doce + AA (8h)	17,2 $\pm$ 1,70	18,7 $\pm$ 4,78 <sup>***d</sup>	16,2 $\pm$ 5,62 <sup>*d</sup>	11,5 $\pm$ 5,80 <sup>*d</sup>	9,0 $\pm$ 2,94 <sup>**d</sup>	9,75 $\pm$ 1,70 <sup>**d</sup>
Tamox + Doce + 5-FU	34,7 $\pm$ 1,25 <sup>***a</sup>	26,5 $\pm$ 11,90 <sup>*a</sup>	31,2 $\pm$ 3,59 <sup>***a</sup>	14,5 $\pm$ 2,64 <sup>***a</sup>	22,0 $\pm$ 2,94 <sup>***a</sup>	13,2 $\pm$ 7,54 <sup>**a</sup>
Tamox + Doce + 5-FU + AA (0h)	20,7 $\pm$ 2,87 <sup>***e</sup>	20,7 $\pm$ 5,12	22,5 $\pm$ 2,08	13,7 $\pm$ 1,50	8,7 $\pm$ 3,86 <sup>***e</sup>	13,2 $\pm$ 1,89
Tamox + Doce + 5-FU + AA (8h)	23,2 $\pm$ 4,64 <sup>***e</sup>	20,5 $\pm$ 9,39	23,5 $\pm$ 6,55	14,7 $\pm$ 1,70	16,2 $\pm$ 3,40	12,0 $\pm$ 2,44



**Figura 2** – Percentual de modulação (%M) do Ácido Ascórbico nos danos induzidos pelos antineoplásicos nas linhagens SODWT, SOD1, SOD2 e SOD1SOD2 de *Saccharomyces cerevisiae*. **A** – Tamox+AA; Doce+AA e 5-FU+AA; **B** – Tamox+5-FU+Doce+AA; Tamox+Doce+AA; Tamox+5-FU+AA e 5-FU+Doce+AA. Percentual de modulação calculado pela fórmula  $\%M = (A-(B+AA))/A*100$ ; Tamox: Tamoxifeno (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); Doce: Docetaxel (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu\text{mol}$ ).



**Figura 3** – Percentual de modulação (%M) do Ácido Ascórbico nos danos induzidos pelos antineoplásicos nas linhagens CAT e SOD1CAT1 de *Saccharomyces cerevisiae*. **A** – Tamox+AA; Doce+AA e 5-FU+AA; **B** – Tamox+5-FU+Doce+AA; Tamox+Doce+AA; Tamox+5-FU+AA e 5-FU+Doce+AA. Percentual de modulação calculado pela fórmula  $\%M = (A-(B+AA))/A*100$ ; Tamox: Tamoxifeno (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); Doce: Docetaxel (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu\text{mol}$ ).



Existem relatos do estresse oxidativo induzido pelo 5-FU em medula óssea de ratos, indicando que seu uso pode estar relacionado à mielosupressão em ratos (NUMAZAWA et al., 2010). Lamberti e colaboradores (2012), relacionaram o estresse oxidativo gerado pelo 5-FU com o desenvolvimento de cardiotoxicidade em ratos. E García e colaboradores (2011) demonstraram que o 5-FU promoveu a ativação de uma proteína quinase (PKR) por meio de uma via p53- independente, induzindo apoptose em células de câncer de cólon e de mama.

De forma similar ao observado para o 5-FU, o DOCE também causou danos oxidativos em *S. cerevisiae*, mas esses efeitos foram modulados pelo AA em 63% em co-tratamento e 73% em pós-tratamento para a Sod1 $\Delta$  e para Sod2 $\Delta$ , foi verificado modulação de 70% de modulação do DOCE, em pós-tratamento (**Figura 2A**). O DOCE induz estresse oxidativo, podendo provocar disfunções endoteliais, através da modulação da proteína C quinase, e que o polimorfismo no gene codificante da Glutathione-s-transferase, enzima envolvida na resposta ao estresse oxidativo, pode estar relacionado às toxicidades neurológicas induzidas pelo DOCE (TABACZAR et al., 2012; FREDERIKS et al., 2015; HUNG et al., 2015).

O DOCE é um taxano semi-sintético, com meia-vida de 4 minutos à 11:01 horas, que apresenta atividade sobre tumores sólidos metastáticos que são resistentes ao tratamento com Paclitaxel, e possui como mecanismo de ação antineoplásica a interferência da dinâmica dos microtúbulos (polimerização e despolimerização). Desta forma, ocorre a interrupção do ciclo celular, causando senescência e apoptose, além de alterar a expressão e fosforilação de proteínas da família Bcl-12, induzindo apoptose (ALKEN; KELLY, 2013; QU et al., 2014; MONTERO et al., 2015).

O TAMOX é uma droga anti-estrogênica, com meia-vida de 4 à 7 horas, aprovado em 1977 pela *Food and Drug Administration* (FDA) como agente supressor de estrógeno para tratar câncer de mama, utilizado na prevenção de mulheres com alto risco de CM, como terapia adjuvante, depois do tratamento primário, e para o tratamento de carcinoma ductal *in situ* (LUM et al., 2013; YANG et al., 2013). Em associação com os antineoplásicos na terapia do câncer para ampliar a ação antitumoral dos antineoplásicos (SINGH; PRUDENCE; MICHAEL, 2011).

No presente estudo a exemplo do 5FU e do DOCE, O TAMOX induziu danos oxidativos nas linhagens de *S. cerevisiae* testadas, mas a oxidação pode ser modulada em AA em pós-tratamento (56%) na linhagem mutada para a superóxido dismutase mitocondrial (Sod2 $\Delta$ ) e em pós-tratamento com percentuais de 56%, 53%, 34% para a SODWT, e Sod1 $\Delta$  e Sod2 $\Delta$ . O AA não interferiu nos danos do TAMOX nas linhagens mutadas para catalase

(Figura 2A). González e colaboradores (2010) relatam que em baixas concentrações o AA apresenta papel antioxidante e pode prevenir a oxidação que induz apoptose, contudo, uma alta concentração de AA pode aumentar a produção de ATP (gerado pelas mitocôndrias) induzindo apoptose em linhagens de células tumorais, por via pró-oxidante.

Apoptose é um processo de morte celular caracterizado por mudanças morfológicas e bioquímicas, tais como condensação da cromatina, fragmentação nuclear e quebra do DNA, redução do volume celular, ativação de caspase, desnaturação de proteínas e modificações na estrutura das membranas, de importância no controle do crescimento celular, que pode ocorrer em condições fisiológicas ou patológicas. As condições fisiológicas incluem morte celular de células senescentes para involução fisiológica de tecidos, como o endométrio. E as condições patológicas estão relacionadas à morte induzida por células T citotóxicas do processo imune, vírus, radiações, hipóxia, e terapia com drogas anticancerígenas (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; WONG, 2011; KOFF; RAMACHADIRAN; BERNAL-MIZEACHI, 2014).

Nass e colaboradores (2015) observaram que o TAMOX induziu danos oxidativos em tumores resistentes ou sensíveis à esta droga, e que a expressão de enzimas antioxidantes (SOD, catalase, GST) aumentou, ao mesmo tempo que a peroxidação lipídica reduziu, no entanto, foi evidenciada a redução do conteúdo de glutathione nos tumores. O AA, ou ascorbato, popularmente conhecido como vitamina C, é uma importante vitamina hidrofílica com propriedades antioxidantes e oxiredutoras de grande importância, a qual protege contra o estresse oxidativo, por sequestro de EROs, além de apresentar papel na sintase endotelial para o óxido nítrico e na regulação da pressão sanguínea (TRABER; ETEVENS, 2011; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Cabe enfatizar que o TAMOX é eficaz para pacientes com receptor de estrogênio positivo ( $ER^+$ ) e doença recorrente, como também, na terapia quimiopreventiva para mulheres com um alto risco de metástase de câncer de mama  $ER^+$ , e tem como mecanismo de ação a inibição competitiva do receptor de estrogênio, que leva à inibição de genes reguladores de estrogênio, impedindo a proliferação de células tumorais, e a consequente progressão da doença, além de induzir apoptose de câncer receptor de estrogênio negativo ( $ER^-$ ), por meio do aumento do *status* oxidativo celular, da inibição de proteína C quinase (PKC) (SINGH; PRUDENCE; MICHAEL, 2011; RADIN; PATEL, 2016).

Melo e colaboradores (2011) relatam que o tamoxifeno causa danos oxidativos ao DNA, induzindo quebras na estrutura da molécula e a oxidação de purinas e pirimidinas, entretanto, tais danos podem ser reduzidos por substâncias antioxidantes, protegendo as células contra tais danos. Os antioxidantes são muito utilizados na prevenção e tratamento

câncer. Terapias com doses intravenosas de AA têm sido utilizadas no tratamento do câncer, e estudos tem demonstrado que tratamentos com doses intravenosas elevadas de AA podem reduzir inflamação em pacientes com câncer, por meio da redução de proteína C-reativa e de citocinas pró-inflamatórias, entretanto, esta suplementação pode ser perigosa, pois ao mesmo tempo em que eles diminuem os níveis de EROs, eles também podem inibir a apoptose induzida por EROs (MIKIROVA et al, 2012; FU et al., 2014).

A terapia neoadjuvante de docetaxel com capecitabina, com a utilização do tamoxifeno após a quimioterapia, no tratamento de câncer de mama HER2<sup>-</sup>, têm demonstrado uma modesta melhora no tratamento, aumentando o índice de resposta patológica completa. Contudo, a combinação de 3 ciclos de ciclofosfamida+metotrexato+5-FU, seguida de tamoxifeno, não é eficaz em pacientes pós-menopausa com câncer de mama node-negativo ER<sup>+</sup>, mas altamente efetiva em câncer de mama ER<sup>-</sup> (AEBI et al., 2011; ZELNAK et al., 2013).

Assim como no tratamento com Tamoxifeno, onde a suplementação com AA causou efeito protetor, em linhagens celulares de CM, contra a peroxidação lipídica e citotoxicidade, induzida pelo Tamoxifeno, propondo o efeito modulatório do AA no tratamento com Tamoxifeno, implicando que essa suplementação pode possuir efeitos adversos em pacientes oncológicos (SUBRAMANI et al., 2014). Cha e colaboradores (2013) verificam o efeito modulatório da suplementação de AA, em camundongos deficientes de AA com CM e melanoma, a qual inibiu o crescimento tumoral, metástase e a secreção de citocinas inflamatórias, sugerindo que a agressividade tumoral pode estar relacionada à baixas concentrações de AA.

Corroborando com os resultados obtidos na avaliação dos efeitos oxidativos do 5FU, DOCE e TAMOX, bem como para os efeitos do AA na modulação dos danos oxidativos em linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e mutadas em defesas enzimáticas, a associação entre esses antineoplásicos e os efeitos do AA foram similares. Os resultados da avaliação do potencial oxidativo das associações de 5-FU, Docetaxel e Tamoxifeno, em *S. cerevisiae*, apontam que todas as associações dos antineoplásicos induziram danos oxidativos significantes ( $p < 0,0001$ ) em todas as linhagens testadas, quando comparados ao controle negativo. Contudo, quando associado ao ácido ascórbico, essas associações de antineoplásicos, apresentarem efeitos modulatórios significantes ( $p < 0,05$ ) nas linhagens (**Figura 2A e 3A**).

Amin e colaboradores (2012) relatam que a associação do 5-FU à doxorrubicina e ciclofosfamida, provoca um aumento da peroxidação da membrana de fosfolipídios das

células, aumentando a toxicidade e levando ao desenvolvimento de patologias, como problemas cardíacos, limitando a sua utilização. Sua associação com a cisplatina é utilizada no tratamento de câncer de estômago e esôfago, porém a cisplatina possui diversos efeitos colaterais, como náuseas e vômitos. Com isso, estudos foram realizados combinando o Doce à essa associação, os quais obtiveram benefícios significantes na qualidade de vida dos pacientes, quando comparado à associação da cisplatina com 5-FU (LIM et al., 2010; TANAKA et al., 2010; KOIZUMI et al., 2014).

O AA na linhagem SODWT modulou os danos oxidativos da associação 5-FU+DOCE em 58% e para TAMOX+DOCE+5-FU em 33%, em pós-tratamento. Para a linhagem Sod1 $\Delta$  foi verificada modulação de 68% co-tratamento e 66% pós-tratamentos para Tamox+5-FU+AA; e 55% em co-tratamento e 46% em pós-tratamento para Tamox+Doce+AA, quando comparado às associações sem ácido ascórbico. Em Sod2 $\Delta$  foi evidenciada modulação de 70% pós-tratamento para 5-FU+DOCE+AA. Em Sod1 $\Delta$ Sod2 $\Delta$  foi observada modulação de 32% em co-tratamento para 5-FU+DOCE+AA; e 30% em co-tratamento e 32% em pós-tratamento para TAMOX+5-FU+AA, quando comparado às associações sem ácido ascórbico (**Figura 2B**). Em Cat1 $\Delta$  foi verificada modulação de 33% em co-tratamento para Tamox+5-FU; 61% em co-tratamento e 60% em pós-tratamento para TAMOX+DOCE+AA; e 60% em co-tratamento para TAMOX+DOCE+5-FU+AA, quando comparado às associações sem ácido ascórbico. E Em Sod1 $\Delta$ Cat1 $\Delta$  foi evidenciada modulação de 52% em co-tratamento e 60% em pós-tratamento para TAMOX+DOCE+AA, quando comparado à associação sem ácido ascórbico (**Figura 3B**).

Corroborando com os resultados obtidos neste estudo, onde foram observados efeitos oxidativos significantes induzidos pelo 5-FU, DOCE, TAMOX e suas associações, nas linhagens utilizadas de *S. cerevisiae*., os antineoplásicos exercem seus efeitos através da indução de estresse oxidativo, via o sistema xantina - xantina oxidase, nas mitocôndrias e NADPH oxidase, causando uma citotoxicidade mediada por EROs. As mitocôndrias podem ter papel principal na progressão tumoral, pois geram ATP, que tem importância para a regulação de apoptose, produção e regulação de espécies reativas de oxigênio (GONZÁLEZ et al., 2010; MAHBOOB et al., 2012; PREDDY, 2014). Entretanto, Pieniżek e colaboradores (2013) relatam que a associação de taxanos (placitaxel ou docetaxel) com doxorrubicina, induz aumento de estresse oxidativo em fígados de ratas, em comparação às drogas sozinhas, sugerindo um modo de ação pró-oxidante sinérgico.

Os dados apontam modulação significativa ( $p < 0,05$ ) nas diferentes linhagens, tanto para co- quanto para pós-tratamento. Alguns estudos corroboram com os achados. Al-Asmari e

colaboradores (2015) observaram que a suplementação de AA no tratamento com 5-FU em ratas, apresentou atenuação na peroxidação lipídica e atividade da mieloperoxidase, induzida pelo 5-FU, e ativação de NF- $\kappa$ B e expressão de COX-2, sugerindo que o AA modulou o estresse oxidativo induzido pelo 5-FU.

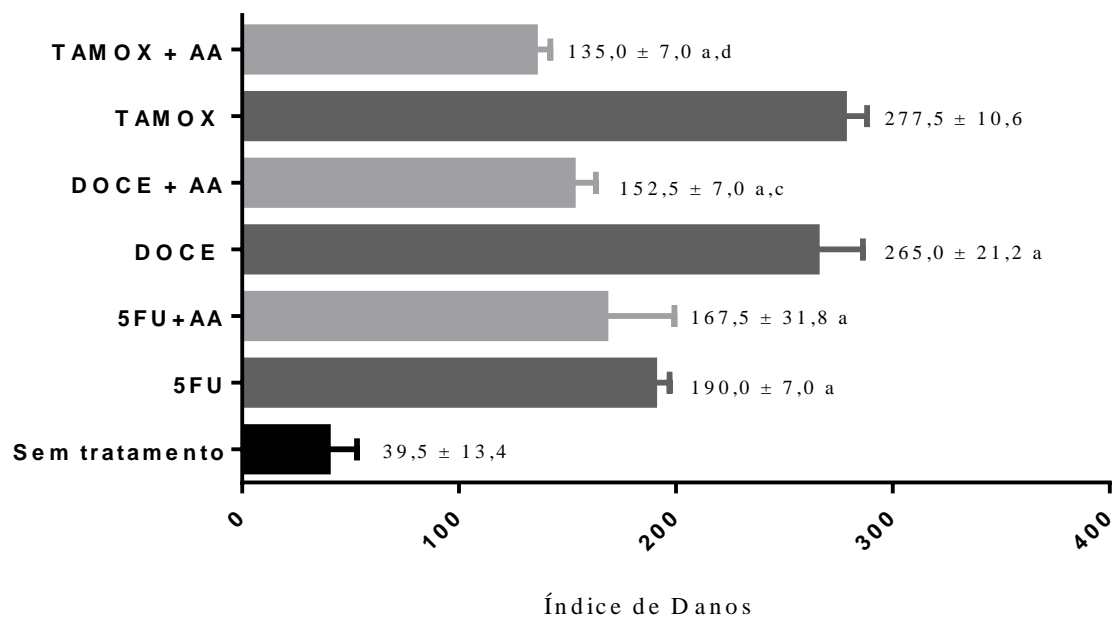
Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que previne, retarda ou remove danos oxidativos em moléculas alvo, podendo ter origem enzimática, como as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase, Catalase (CAT)); e não-enzimática, como flavonoides, minerais, fenóis, carotenóides e vitaminas (A, C, E e K). Substâncias antioxidantes agem por meio de uma combinação de mecanismos, promovendo a remoção de espécies reativas do oxigênio do meio celular, realizando a varredura das EROS e sequestro de metais catalizadores na formação de radicais livres, além de induzirem a geração de antioxidantes endógenos (BREWER, 2011). Entretanto, Frömberg e colaboradores (2011) verificaram que o potencial redox do AA apresentou efeitos terapêuticos em linhagens de câncer de próstata tratadas com DOCE, 5-FU, Epirubicina e Irinotecan, por meio de mecanismos extracelulares, indução de apoptose e efeito anti-proliferativo pela interrupção do ciclo celular.

### **3.2 Avaliação genotóxica do 5-Fluorouracil, Docetaxel e Tamoxifeno e percentual de modulação do Ácido Ascórbico frente aos danos genotóxicos induzidos pelos antineoplásicos em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***

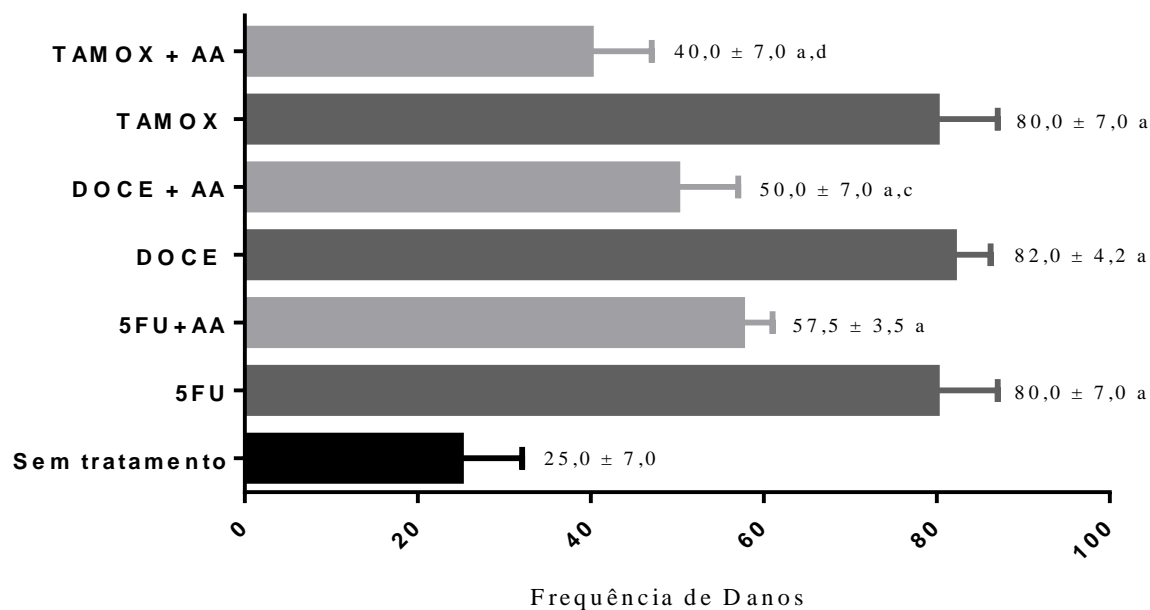
#### **3.2.1 Efeitos antigenotóxicos do AA frente aos danos ao DNA de *Saccharomyces cerevisiae*, proficiente em superóxido dismutase, induzidos por 5-Fluorouracil, Docetaxel e Tamoxifeno**

Os antineoplásicos 5-FU, DOCE e TAMOX induziram genotoxicidade ( $P < 0,05$ ) na linhagem de *S. cerevisiae* proficiente em superóxido dismutase quando comparado com o grupo sem tratamento. Como observado esses antineoplásicos induziram danos oxidativos pelo aumento do ID e FD nessa linhagem, que podem ser evidenciados no teste cometa na sua versão alcalina (GOMES JÚNIOR et al., 2015). Entretanto, os danos genotóxicos foram modulados de forma significativa no co-tratamento com AA para o DOCE (ID - 42,5% e FD - 39,1%) e o TAMOX (ID - 51,4% e FD - 50%) (**Figura 4 e 5**), demonstrando ação antigenotóxica do AA.

**Figura 4** – Índice de Danos induzidos pelos antineoplásicos e suas associações com Ácido Ascórbico em células de *S. cerevisiae*. ANOVA two-way, pós-teste de Bonferroni. Valores significantes (Média  $\pm$  Desvio Padrão) para \*P<0,05. a: comparado a ST; b: comparado a 5-FU; c: comparado a DOCE; e: 5-FU+DOCE. ST: grupo sem tratamento; DOCE: Docetaxel (2  $\mu$ g/mL); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu$ g/mL); TAMOX: Tamoxifeno (20  $\mu$ g/mL) AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu$ mol).



**Figura 5** – Frequência de Danos induzidos pelos antineoplásicos e suas associações com Ácido Ascórbico em células de *S. cerevisiae*. ANOVA two-way, pós-teste de Bonferroni. Valores significantes (Média  $\pm$  Desvio Padrão) para \*P<0,05; \*\*P<0,001; \*\*\*P<0,0001. a: comparado a ST; b: comparado a 5-FU; c: comparado a DOCE; d: comparado a TAMOX. ST: grupo sem tratamento; DOCE: Docetaxel (2  $\mu$ g/mL); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu$ g/mL); TAMOX: Tamoxifeno (20  $\mu$ g/mL) AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu$ mol).



Há duas versões do teste cometa, a neutra e a alcalina. A versão neutra é considerada menos sensível, porque detecta apenas lesões de fita dupla de DNA. A alcalina detecta maior variedade de lesões de DNA, como quebra de fita simples, lesões de sítios alcalinos lábeis, locais de reparos incompletos e *crosslinks* (BRIANEZI, 2009). Essas lesões ao DNA detectadas por este teste, são oriundas de agentes mutagênicos que reagem com os átomos de oxigênio nas ligações fosfodiésteres do DNA (KASAI, 2016) e permanecem no material genético quando há defeitos maquinaria de reparo, a qual tem por função a manutenção da integridade do material genético por meio de diversos mecanismos, tais como indução de apoptose para eliminação de células lesadas, respostas transcricionais para promover a sobrevivência celular, tolerância dos danos ao DNA, ativação de *checkpoints* de danos ao DNA durante o ciclo celular e iniciação do reparo do DNA (ABBOTTS; THOMPSON; MADHUSUDAN, 2014).

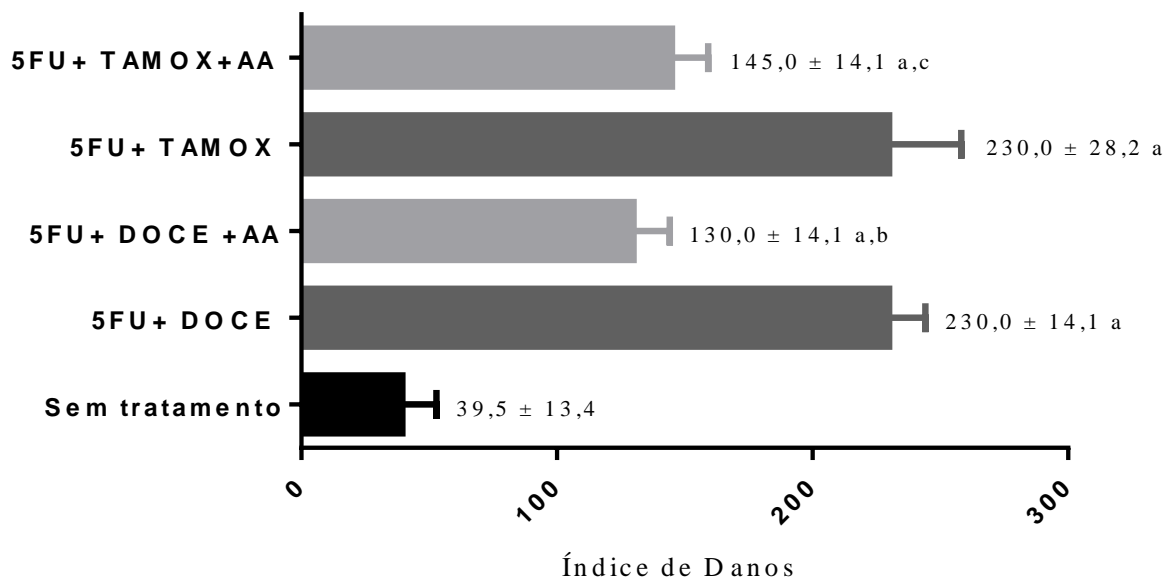
### 3.2.2 Efeitos antigenotóxicos do AA frente aos danos ao DNA de *Saccharomyces cerevisiae*, proficiente em superóxido dismutase, induzidos pelas interações de drogas

As interações 5-FU+DOCE e 5-FU+TAMOX induziram similares ( $P < 0,05$ ) efeitos genotóxicos pelo aumento do ID e FD na linhagem SODWT quando comparado ao grupo sem tratamento. Esses danos apontam que os efeitos oxidantes dos antineoplásicos podem ser relacionados com a genotoxicidade. Esses danos foram modulados pelo AA nas interações 5-



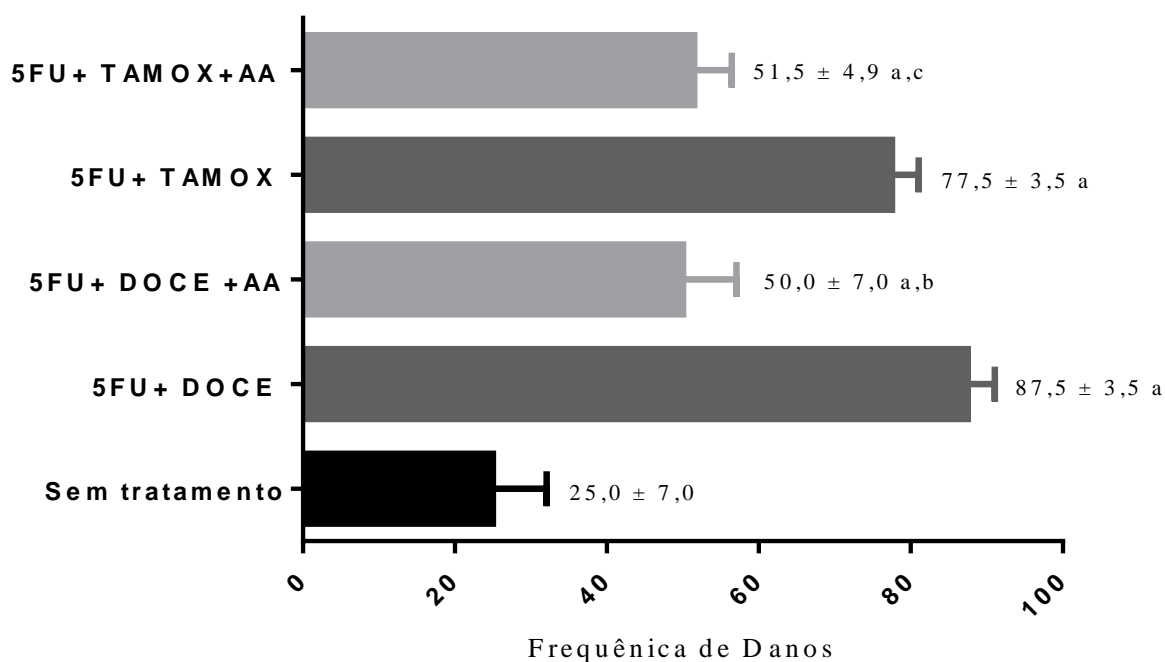
FU+DOCE (ID - 43,5% e FD - 42,9%) e o 5-FU+TAMOX (ID - 37% e FD - 33,6%) (**Figura 6 e 7**).

**Figura 6** – Índice de Danos induzidos pelas interações dos antineoplásicos e suas associações com Ácido Ascórbico em células de *S. cerevisiae*. ANOVA two-way, pós-teste de Bonferroni. Valores significantes (Média  $\pm$  Desvio Padrão) para \*P<0,05. a: comparado a ST; b: comparado a 5-FU+DOCE; c: comparado a 5-FU+TAMOX. ST: grupo sem tratamento; DOCE: Docetaxel (2  $\mu$ g/mL); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu$ g/mL); TAMOX: Tamoxifeno (20  $\mu$ g/mL) AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu$ mol).



**Figura 7** – Frequência de Danos pelas interações dos antineoplásicos e suas associações com Ácido Ascórbico em células de *S. cerevisiae*. ANOVA two-way, pós-teste de Bonferroni. Valores significantes (Média  $\pm$  Desvio Padrão) para \*P<0,05. a: comparado a ST; b: comparado a 5-FU+DOCE; c: comparado a 5-FU+TAMOX. ST: grupo sem tratamento;

DOCE: Docetaxel (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); TAMOX: Tamoxifeno (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu\text{mol}$ ).



Foi observada modulação do AA frente aos danos genotóxicos induzidos pelas interações dos antineoplásicos. O AA é um antioxidante altamente eficaz, que participa da neutralização de EROs, na ativação de genes envolvidos no reparo de DNA, modulação de danos ao DNA em células expostas a EROS *in vitro* e *in vivo*, demonstrando que a suplementação com AA pode ajudar a prevenir doenças resultantes de danos causados por radicais livres. Porém seu efeito farmacológico ainda é controverso, pois em doses elevadas, este composto inibe o crescimento de células neoplásicas, devido a sua ação pró-oxidante, a qual pode estar relacionada a regulação negativa de EROs dependente de fatores de transcrição SP, sendo comparável a observada em outras drogas antineoplásicas como o trióxido de arsênico (PATHI et al., 2011; KONTEK; KONTEK, GRZEGORCZYK, 2013). Há relatos sobre a ação genotóxica e pró-oxidante do AA, onde testes *in vitro* com linhagens celulares indicam que o AA, em baixas concentrações junto com íons de metais de transição, atua como pró-oxidante, agindo por meio da reação de Fenton, aumentando os danos ao DNA induzidos por EROs e estimulando a formação de radicais hidroxilas (KONTEK; KONTEK, GRZEGORCZYK, 2013).

#### 4. CONCLUSÃO

Os antineoplásicos 5FU, DOCE e TAMOX induzem danos oxidativos, como observado em *S. cerevisiae* proficientes e mutadas em defesas antioxidantes, para as enzimas superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial e para catalase. Entretanto, considerado a meia vida dos antineoplásicos o co-tratamento e o pós-tratamento com o AA pode interferir significativamente nos mecanismos de indução oxidativa que levam a apoptose, como efeito necessário para a ação antitumoral, com percentuais de modulação, em sua maioria acima de 50%. Os dados sugerem que em células eucarióticas o AA pode interferir na ação antitumoral de antineoplásicos, especialmente em relação aos danos oxidativos ao DNA de *S. cerevisiae*, o que pode comprometer a eficácia do tratamento, especialmente durante o período de ação dos antineoplásicos. Também foi observado que os antineoplásicos isolados e em associações (5FU e DOCE; 5FU E TAMOX) induzem genotoxicidade na linhagem de *S. cerevisiae* proficiente em superóxido dismutase, por possíveis mecanismos oxidativos. Mas esses danos foram modulados pelo AA. Esses dados apontam que o AA teve ações antioxidantes e antigenotóxicas frente aos danos induzidos pelos antineoplásicos isolados e em associações. Assim apontamos a realização de outros testes não clínicos e clínicos para elucidar as interferências do AA durante terapias oncológicas.

## REFERÊNCIAS

ABBOTTS, R.; THOMPSON, N.; MADHUSUDAN, S. DNA repair in cancer: emerging targets for personalized therapy. **Cancer Manag Res.** v. 19, n. 6 p. 77-92, 2014.

AEBI, S. ;SUN, Z.; BRAUN, D.; PRICE, K.N.; CASTIGLIONE-GERTSCH, M.; RABAGLIO, M.; GELBER, R.D.; CRIVELLARI, D.; LINDTNER, J. ;SNYDER, R.; KARLSSO, P; SIMONCINI, E.; GUSTERSON, B.A.; VIALE, G.; REGAN, M.M.; COATES, A.S.; GOLDBIRSCHE, A. Differential efficacy of three cycles of CMF followed by tamoxifen in patients with ER-positive and ER-negative tumors: Long-term follow up on IBCSG Trial IX. **Annals of Oncology**, 22: 1981–1987, 2011. doi:10.1093/annonc/mdl754

AL-ASMARI,A.K.; KHAN, A.Q.; AL-QASIM,A..M.; AL-YOUSEF, Y. Ascorbic acid attenuates antineoplastic drug 5-fluorouracil inducedgastrointestinal toxicity in rats by modulating the expression ofinflammatory mediators. **Toxicology Reports**, v. 2, 908–916, 2015.

ALKEN, S.; KELLY, C.M. Benefit risk assessment and update on the use of docetaxel in the management of breast cancer. **Cancer Management and Research.** 5 357–365. 2013. <http://dx.doi.org/10.2147/CMAR.S49321>.

AMIN, K.A.; MOHAMED, B.M.; EL-WAKI, M.A.M.; IBRAHEM, S.O. impact of breast cancer and combination chemotherapy on oxidative stress, hepatic and cardiac markers. **J Breast Cancer.**15(3): 306-312. 2012.

ASARA, Y.; MARCHAL, J.A.; CARRASCO, E.; BOULAIZ, H.; SOLINAS, G.; BANDIERA, P.; GARCIA, M.A.; FARACE, C.; MONTELLA, A.; MADEDDU, R. cadmium modifies the cell cycle and apoptotic profiles of human breast cancer cells treated with 5-fluorouracil. **Int. J. Mol. Sci.** 2013, 14, 16600-16616; doi:10.3390/ijms140816600.

BARBOSA, K.B.; COSTA, N.M.B. ALFENAS, R.C.G. DE PAULA, S.O. MINIM, V.P.R. BRESSAN, J.; estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição.** v. 23, n.4, 629-243. 2010.

BREWER, M.S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.10: 222-247, 2011.

BRIANEZI, G. S. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 4, p. 325-334, ago. 2009.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem Toxicol.**;51:15-25. 2013.doi: 10.1016/j.fct.2012.09.021. Epub 2012 Sep 24.

CHA, J.; WAHEED ROOMI, M.; IVANOV, V.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, V.; RATH, M. Ascorbate supplementation inhibits growth and metastasis of B16FO melanoma

and 4T1 breast cancer cells in vitamin C-deficient mice. **International journal of oncology**. 42: 55-64, 2013. DOI: 10.3892/ijo.2012.1712.

CHOU DHARI, S.T.; CHAUDARY, M.; GADBAIL, A.R.; SHARMA, A.; TEKADE, S. Oxidative and antioxidant mechanisms in oral cancer and precancer: a review. **Oral oncology**, v.50, 10-18, 2014.

D'ORAZIO, Nicolantonio et al. Fucoxantin: A treasure from the sea. **Marine drugs**, v. 10, n. 3, p. 604-616, 2012.

FREDERIKS, C.N. LAM, S.W.; GUCHELAAR, H.J.; BOVEN, B. Genetic polymorphisms and paclitaxel- or docetaxel-induced toxicities: A systematic review. **Cancer Treatment Reviews** 41 (2015) 935–950.

FRÖMBERG, A.; GUTSCH, D.; SCHULZE, D.; VOLLBRACHT, C.; WEISS, G.; CZUBAYKO, F. AIGNER, A. Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs. **Cancer Chemother Pharmacol**. 67:1157–1166. 2011. DOI 10.1007/s00280-010-1418-6

FU, Y.; YANG, G.; ZHU1, F.; PENG, C.; LI, W.; LI, H.; KIM, H-G .; BODE, AM.; DONG, Z.; DONG, Z. Antioxidants decrease the apoptotic effect of 5-Fu in colon cancer by regulating Src-dependent caspase-7 phosphorylation. **Cell Death and Disease**, 5, e983, 2014. doi:10.1038/cddis.2013.509

GAMERO-SANDEMETRIO, E.; GÓMEZ-PASTOR, R.; MATALLANA, E. Antioxidant defense parameters as predictive biomarkers for fermentative capacity of active dried wine yeast. **Biotechnol. J.**, v. 9, 1055–1064. 2014.

GARCÍA, M.A.; CARRASCO, E.; AGUILERA, M.; ALVAREZ, P.; RIVAS, C.; CAMPOS, J.M.; PRADOS, J.C.; CALLEJA, M.A.; ESTEBAN, M.; MARCHAL, J.A.; ARÁNEGA, A. The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil promotes pkr-mediated apoptosis in a p53-independent manner in colon and breast cancer cells. **PLoS ONE** 6(8), 2011. e23887. doi:10.1371/journal.pone.0023887.

GONZÁLEZ, M.J.; ROSARIO-PÉREZ, G.R.; MONTE, C.; RICART, M. Mitochondria, energy and cancer: the relationship with ascorbic acid. **Journal of Orthomolecular Medicine**, v. 25, n. 1, p. 29-38, 2010.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**; 53(3): 335-343, 2007.

GUERRIERO, E.; SORICE, A.; CAPONE, F.; NAPOLITANO, V.; COLONNA, G.; STORTI, G.; CASTELLO, G.; COSTANTINI, S. Vitamin C effect on mitoxantrone-induced cytotoxicity in human breast cancer cell lines. **PLoS one**, v. 9, n. 12, p. 115-23, 2014.

HÖFERL, M.; STOILOVA, I.; SCHMIDT, E.; WANNER, J.; JIROVETZ, L.; TRIFONOVA, D.; KRASTEVA, L.; KRASTANOV, A. Chemical composition and antioxidant properties of juniper berry (*Juniperus communis* L.) essential oil. action of the essential oil on the antioxidant protection of *Saccharomyces cerevisiae* model organism. **Antioxidants**, v. 3, 81-98, 2014. doi:10.3390/antiox3010081.

HUNG, C-H.; CHAN, S-H.; CHU, P-M.; TSAI, K-L. docetaxel facilitates endothelial dysfunction through oxidative stress via modulation of protein kinase c beta: the protective effects of sotrastaurin. **Toxicological sciences**, 145(1), 59–67, 2015.

INCA, Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016 - Incidência do câncer no Brasil**. Ministério da saúde, Rio de Janeiro-RJ, 2015.

JANSEN, L.A.; BACKSTEIN, R.M.; BROWN, M.H. Breast size and breast cancer: A systematic review. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, 67, 1615-1623. 2014.

KARATHIA, H.; VILAPRINYO, E.; SORRIBAS, A.; ALVES, R. Saccharomyces cerevisiae as a model organism: a comparative study. **Plos one**. v. 6, n.2, 2011.

KASAI, H. What causes human cancer? Approaches from the chemistry of DNA damage. **Genes and Environment**. v. 38, n. 19, p. 1-13, 2016.

KAWALEC, P.; ŁOPUCH, S.; MIKRUT, A. Effectiveness of Targeted Therapy in Patients With Previously Untreated Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Clinical Breast Cancer**, v. 15, n. 2, p. 90-100, 2015.

KOFF, J.L.; RAMACHANDIRAN, S.; BERNAL-MIZRACHI, L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, 16, 2942-2955, 2015; doi:10.3390/ijms16022942.

KOIZUMI, W.; KIM, Y. H.; FUJII, M.; KIM, H. K.; IMAMURA, H.; LEE, K. H., The JACCRO and KCSG Study Group. Addition of docetaxel to S-1 without platinum prolongs survival of patients with advanced gastric cancer: a randomized study (START). **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 140(2), 319–328. 2014. <http://doi.org/10.1007/s00432-013-1563-5>

KONTEC, R.; KONTEK, B.; GRZEGORCZYK, K. Vitamin C modulates DNA damage induced by hydrogen peroxide in human colorectal adenocarcinoma cell lines (HT29) estimated by comet assay in vitro. **Archives of Medical Science**, v.9, n.6, p. 1006–1012, 2013.

LAMBERTI, M.; PORTO, S.; MARRA, M.; ZAPPAVIGNA, S.; GRIMALDI, A.; FEOLA, D.; PESCE, D.; NAVIGLIO, S.; SPINA, A.; SANNOLO, N.; CARAGLIA, N. 5-Fluorouracil induces apoptosis in rat cardiocytes through intracellular oxidative stress. **journal of experimental & clinical cancer research**, 31:60, 2012.

LI, W.; LIN, Z.; YANG, C.; WANG, Y.; QIAO, Y. Study on the chemical constituents of Momordica charantia L. leaves and method for their quantitative determination. **Biomedical Research**, 26 (3): 415-419. 2015.

LIM, D.H.; PARK, S.H.; PARK, K.W.; KANG, J.H.; OH, S.W.; HWANG, I.G.; KWON, J.M.; LEE, S-C.; LEE, H-L.; KIM, H.S.; LIM, H.Y.; KANG, W.K. Retrospective analyses of cisplatin-based doublet combination chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. **BMC Cancer**. 10:583, 2010. DOI: 10.1186/1471-2407-10-583

LIU, C-H.; HUNG, M-H.; WANG, D-S.; CHU, P-Y.; SU, J-C.; TENG, T-H.; HUANG, C-T.; CHAO, T-T.; WAG, C-Y.; SHIAU, C-W.; TSENG, L-M.; CHENG, K-F. Tamoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A-dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor-negative human breast cancer cells. **Breast Cancer Research**.16:431. 2014. <http://breast-cancer-research.com/content/16/5/431>.

LUM, DWK.; PEREL, P.; HINGORANI, AD.; HOLMES, MV. *CYP2D6* Genotype and Tamoxifen Response for Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE**, 8(10): e76648. doi:10.1371/journal.pone.0076648.

MAHBOOB, M.; RAHMAN, M. F.; REKHADEVI, P. V.; SAILAJA, N.; BALASUBRAMANYAM, A.; PRABHAKAR, P. V.; SINGH, S.P.; REDDY, U.A.; RAO, G.S.; GROVER, P. Monitoring of oxidative stress in nurses occupationally exposed to antineoplastic drugs. **Toxicol Int**. 2012 Jan-Apr; 19(1): 20–24. doi: 10.4103/0971-6580.94510.

MELO, J.G.; SANTOS, A.G.; AMORIN, E.L.C.; NASCIMENTO, S.C. ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants used as antitumor agentes in Brazil: na ethnobotanical approach. **Evidence-based complementary and alternative medicine**. v.2011, n.1, 1-4. 2011.

MENDONÇA, P.S.; CARIOCA, A.A.F.; MAIA, F.M.M. interações entre estresse oxidativo, terapia utilizada e estadiamento em pacientes com câncer colorretal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 60(2): 129-134. 2014.

MIKIROVA, N.; CASCIARI, J.; ROGERS, A.; TAYLOR, P. Effect of high-dose intravenous vitamin C on inflammation in cancer patients. **Journal of Translational Medicine**, 10:189,2012. <http://www.translational-medicine.com/content/10/1/189>

MONTERO, A.; FOSSELLA, F.; HORTOBAGYI, G.; VALERO, V. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. **Lancet Oncol**, v. 6, p. 229–39, 2005. NASS, N.; SEL, S.; IGNATOV, A.; ROESSNER, A.; KALINSKI, T. Oxidative stress and glyoxalase I activity mediate dicarbonyl toxicity in MCF-7 mamma carcinoma cells and a tamoxifen resistant derivative. **Biochimica et Biophysica Acta** 1860 (2016) 1272–1280.

NUMAZAWA, S.; SUGIHARA, K.; MIYAKE, S.; TOMIYAMA, H.; HIDA, A.; HATSUNO, M. YAMAMOTO, M.; YOSHIDA, T. possible involvement of oxidative stress in 5-fluorouracil-mediated myelosuppression in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 108, 40–45. 2010. Doi: 10.1111/j.1742-7843.2010.00621.x.

OLIVEIRA, G. L. S. ; OLIVEIRA, F. R. A. M. ; ALENCAR, M. V. O. B. ; GOMES JÚNIOR, A. L. ; SOUZA, A. A. ; CAVALCANTE, A. A. C. M. ; FREITAS, R. M. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 5, p. 136-147, 2014.

PATHI, S.S.; LEI, P.; SREEVALSAN, S.; CHADALAPAKA, G.; JUTOORU, I.; SAFE, S. Pharmacologic doses of ascorbic acid repress specificity protein (sp) transcription factors and sp-regulated genes in colon cancer cells. **Nutrition and Cancer**, v. 63, n.7, p. 1133–1142, 2011.

PIENIAŹEK, A.; CZEPAS, J.; PIASECKA-ZELGA, J.; GWOŹDZIŃSKI, K.; KOCEVA-

CHYLA, A. Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel. **Advances in Medical Sciences**, v.58, n.1,p. 104–111. June 2013. doi:10.2478/v10039-012-0063-1.

PREDDY, V.R. Cancer: oxidative stress and dietary antioxidants. **Elsevier Science Limited**, 1 Ed. 2014.

QU, S.; WANG, K.; XUE, H.; WANG, Y.; WU, R.; LIU, C.; GAO, A.C.; GOUT, P.W.; COLLINS, C.C. Enhanced anticancer activity of a combination of docetaxel and Aneustat (OMN54) in a patient-derived, advanced prostate cancer tissue xenograft model. **Molecular Oncology**. 8: 311-322. 2014.

RADIN, D.P.; PATEL, P. Delineating the molecular mechanisms of tamoxifen's oncolytic actions in estrogen receptor-negative cancers. **European Journal of Pharmacology**. 781:173–180 2016.

RAHAL, A.; KUMAR, A. SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R. et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BiomedResearch International**. 2014.  
REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1603–1616, 2010.

SINGH, M.S.; FRANCIS, P.A.; MICHAEL, M. Tamoxifen, cytochrome P450 genes and breast cancer clinical outcomes. **The Breast**, v. 20, p. 111-118, 2011.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 41, n. 1, jan./mar., 2005.

SUBRAMANI, T.; YEAP, S.K.; HO, W.Y.; HO, C.L.; OMA, A.R.; AZIZ, S.A.; RAHMAN, N.M.A.N.A.; BANU, N. Vitamin C suppresses cell death in MCF-7 human breast cancer cells induced by tamoxifeno. **J. Cell. Mol. Med**. v. 18, n. 2, p. 305-313, 2014.

TABACZAR, S.; KOCEVA-CHYLA, A.; CZEPAS, J.; PIENIAZEK, A.; PIASECKA-ZELGA, J.; GWOZDZINSKI, K. Nitroxide pirolin reduces oxidative stress generated by doxorubicin and docetaxel in blood plasma of rats bearing mammary tumor. **Journal of physiology and pharmacology**, 63, 2, 153-163. 2012.

TANAKA, Y.; YOSHIDA, K.; SANADA, Y.; OSADA, S.; YAMAGUCHI, K.; TAKAHASHI, T. Biweekly docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil (DCF) chemotherapy for advanced esophageal squamous cell carcinoma: a phase I dose-escalation study. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 66(6), 1159–1165. 2010. <http://doi.org/10.1007/s00280-010-1447-1>

TOR, Y.S.; YAZAN, L.S.; FOO, J.B.; WIBOWO, A.; ISMAIL, N.; CHEAH, Y.K.; ET AL. Induction of apoptosis in mcf-7 cells via oxidative stress generation, mitochondria-dependent and caspase- independent pathway by ethyl acetate extract of dillenia suffruticosa and its chemical profile. **PLOS ONE** 10(6): E0127441. 2015. DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0127441



TORRES, M.A.; JHINGRAN, A.; THAMES, H.D.; LEVENBACK, C.F.; BODURKA, D.C. Comparison of treatment tolerance and outcomes in patients with cervical cancer treated with concurrent chemoradiotherapy in a prospective randomized trial or with standard treatment. **Eur. J. Cancer**, v. 40, n. 1314-1319, 2008.

TRABER, M. G.; STEVENS, J. F. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 5, p. 1000-1013, 2011.

WONG, R.S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, 30:87, 2011. <http://www.jeccr.com/content/30/1/87>

WU, M.J.; O'DOHERTY, P.P.J.; MURPHY, P.A.; LYONS, V.; CHRISTOPHERSEN, M.; ROGERS, P.J.; BAILEY, T.D.; HIGGINS, V.J. Different reactive oxygen species lead to distinct changes of cellular metal ions in the eukaryotic model organism *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. J. Mol. Sci.** 2011, 12, 8119-8132; doi:10.3390/ijms12118119.

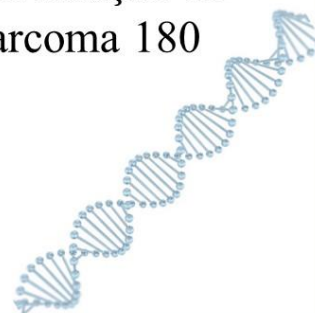
YANG, G.; NOWSHEEN, S.; AZIZ, K.; GOWEGAKILAS, A.G.; Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, 139 392–404. 2013.

ZELNAK, A.B.; STYBLO, T.M.; RIZZO, M.; GABRAM, S.G.; WOOD, W.C.; HARICHANDHERDT, S.; KIM, S.; LIU, Y. O'REGAN, R.M. Final Results from Phase II Trial of Neoadjuvant Docetaxel and Capecitabine Given Sequentially or Concurrently for HER2-Negative Breast Cancers. **Clinical Breast Cancer**, Vol. 13, No. 3, 173-9. 2013.

ZHANG, W.; FENG, M.; ZHENG, G. CHEN, Y.; WANG, X.; PEN, B.; YIN, J.; YU, Y.; HE, Z. Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial–mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 417. 679–685. 2012.

### CAPÍTULO III

Efeitos anticitotóxicos, antigenotóxicos e antimutagênicos do ácido ascórbico na modulação de efeitos de drogas antineoplásicas em Sarcoma 180



## **Efeitos anticitotóxicos, antigenotóxicos e antimutagênicos do ácido ascórbico na modulação de efeitos de drogas antineoplásicas em Sarcoma 180**

*Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata<sup>1</sup>; Rai Pablo Sousa de Aguiar<sup>2</sup>; Jadson Silva Teixeira<sup>2</sup>; Antonielly Reis<sup>2</sup>; Ricardo Melo de Carvalho<sup>1</sup>; Marcus Vinicius Oliveira Barros de Alencar<sup>3</sup>; Márcia Fernanda Correia Jardim Paz<sup>3</sup>; MD. Torequl Islam<sup>3</sup>; Paulo Michel Pinheiro Ferreira<sup>1,3</sup>; Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante<sup>1,3</sup>; Benedito Borges da Silva<sup>1,3</sup>*

1 Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPI - Teresina-PI, Brasil

2 Centro Universitário UNINOVAFAPI – Teresina-PI, Brasil

3 Doutorado em Biotecnologia – RENORBIO – Brasil

### **RESUMO**

O tratamento do câncer envolve cirurgia, radioterapia, quimioterapia, endocrinoterapia, dentre outros. O Ácido Ascórbico (AA) tem sido utilizado no tratamento, demonstrando que sua suplementação vitamínica na dieta de pacientes oncológicos tem apresentado efeitos preventivos quanto ao acometimento de múltiplos tumores. O presente estudo teve por objetivo a avaliação da ação anticitotóxica, antigenotóxica e antimutagênica e do AA na modulação dos danos ao DNA induzidos pelo 5-Fluorouracil, Docetaxel e Tamoxifeno em Sarcoma 180 por meio dos testes cometa e de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN). O teste com o azul de Tripán apontou que o tratamento com as drogas, e suas interações, reduziu significativamente a viabilidade celular em relação ao grupo sem tratamento (ST), entretanto, o AA em associação com os antineoplásicos e suas interações apresentou significantes efeitos modulatórios. O índice de danos nucleares (IDN) dos antineoplásicos e interações foram mais baixos do que suas associações com AA em relação ao ST, entretanto, foi observada uma modulação significativa ( $P < 0,05$ ) do AA no grupo 5-FU+TAMOX+AA. Por meio do teste cometa foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) do ID e nas células tratadas com 5-FU, DOCE, TAMOX, em relação a ST, assim como nas interações entre os antineoplásicos (5-FU+DOCE e 5-FU+TAMOX), entretanto, foi evidenciada uma modulação significativa ( $P < 0,05$ ) do AA quando associado ao 5-FU (47,1%), DOCE (48,5%), TAMOX (41,6%) e 5-FU+DOCE+AA (41%). De forma semelhante ocorreu em FD, havendo modulação significativa ( $P < 0,05$ ) do AA em 5-FU+TAMOX (31%). E por meio do CBMN foi evidenciado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de brotos e pontes nucleoplasmáticas nas células tratadas com as drogas, com modulação significativa do AA quando associado aos antineoplásicos reduzindo a quantidade de brotos (67,4%; 40% e 38,5%) e pontes (60,9%; 48,2% e 44%), as interações apresentaram aumento significativo de micronúcleos, pontes e brotos em relação ao ST, com modulação do AA na frequência de pontes (25,5% e 30%), e brotos (35,9% e 45,4%). Houve aumento significativo de apoptoses nas células tratadas em relação ao ST, havendo modulação significativa em 5-FU+AA (47,2%), DOCE+AA (37,4%), TAMOX+AA (42%), 5-FU+DOCE+AA (35,9%) e 5-FU+TAMOX+AA (45,4%). Os dados apontaram que o AA na concentração de 50  $\mu\text{M}$  tem efeitos anticitotóxicos, antigenotóxicos e antimutagênicos. Essas atividades do AA em Sarcoma 180 são de importância para outros estudos que apontem os riscos de interações entre o AA e os antineoplásicos para a eficácia de terapias oncológicas, especialmente durante a ação dos antineoplásicos frente a muitas controvérsias sobre o uso de antioxidante durante as terapias oncológicas.

**Palavras-chave:** Antineoplásicos. Ácido Ascórbico. Sarcoma 180. CBMN. Ensaio Cometa.

## ABSTRACT

Cancer treatment involves surgery, radiotherapy, chemotherapy, endocrine therapy, among others. Ascorbic Acid (AA) has been used in treatment, demonstrating that its vitamin supplementation in diet of cancer patients has shown preventive effects regarding the involvement of multiple tumors. The aim of the present study was to evaluate the anticytotoxic, antigenotoxic and antimutagenic action of AA in modulation of DNA damage induced by 5-Fluorouracil, Docetaxel and Tamoxifen in Sarcoma 180 by comet and cytokinesis-block micronucleus tests (CBMN). The test with blue of Tripan pointed out that the treatment with the drugs, and their interactions, significantly reduced cell viability in relation to untreated group (UT), however, the AA in association with antineoplastic interactions presented significant modulatory effects. Nuclear damage index (IDN) of antineoplastics and interactions were lower than their associations with AA in relation to UT, however, a significant modulation ( $P < 0.05$ ) of AA in 5-FU+TAMOX+AA group was observed. By means of comet test, a significant increase ( $P < 0.05$ ) was observed of ID in cells treated with 5-FU, DOCE, TAMOX compared to untreated group (UT), as well as in interactions between the antineoplastic drugs (5-FU+DOCE and 5-FU+TAMOX), however, a significant modulation ( $P < 0.05$ ) of AA was observed when associated with 5-FU (47.1%), DOCE (48.5%), TAMOX (41,6%) and 5-FU+DOCE+AA (41%). Similarly, FD occurred, with significant modulation ( $P < 0.05$ ) of AA in 5-FU+TAMOX (31%). By means of CBMN a significant increase ( $P < 0.05$ ) of nucleoplasmic shoots and bridges was observed in cells treated with the drugs, with significant modulation of AA when associated with antineoplastic agents, reducing the number of shoots (67.4%, 40% and 38.5%) and bridges (60.9%, 48.2% and 44%), the interactions showed a significant increase of micronuclei, bridges and shoots in relation to UT, with modulation of AA in the frequency of bridges (25.5% and 30% ) and shoots (35.9% and 45.4%). There was a significant increase in apoptosis in treated cells compared to UT, with significant modulation in 5-FU+AA (47.2%), DOCE+AA (37.4%), TAMOX+AA (42%), 5-FU+DOCE+AA (35.9%) and 5-FU+TAMOX+AA (45.4%). The data indicated that AA at 50  $\mu\text{M}$  concentration has anticytotoxic, antigenotoxic and antimutagenic effects. These AA activities in Sarcoma 180 are of importance to other studies that point out the risks of interactions between AA and antineoplastics for the efficacy of cancer therapies, especially during the action of antineoplastics in face of many controversies over the use of antioxidant during cancer therapies.

**Key-words:** Antineoplastics. Ascorbic Acid. Sarcoma 180. CBMN. Comet Assay.

## 1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde estima para 2025 mais de 20 milhões de novos casos de câncer. A estimativa para o Brasil, no biênio 2016-2017, são de 600 mil novos casos, exceto melanoma, apresentado na distribuição proporcional o câncer de próstata como o mais incidente para homens (61.200 novos casos) e o de mama para as mulheres (57.960 novos casos). O Câncer de Mama (CM) é o segundo mais comum no mundo, com aproximadamente 1,67 milhões de casos em 2012, representando aproximadamente 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres (INCA, 2015).

Os Sarcomas representam cerca de 1% dos cânceres em adultos, 10% em crianças e 15% em adolescentes, e constituem um grupo heterogêneo, e raro, de tumores de origem mesenquimal que podem ser classificados em: de tecidos moles (gordura, músculos, nervos, vasos sanguíneos e tecidos conjuntivos) e ósseos. Nos EUA, no ano de 2012 foram registrados cerca de 11.280 novos casos de sarcomas em tecidos moles, e 2890 de ósseos, com 3900 e 1410 óbitos, respectivamente (AMANKWAH; CONLEY; REED, 2013; LIMA et al., 2014).

O tratamento do câncer envolve endocrinoterapia, cirurgia, radioterapia e quimioterapia citotóxica, ou suas combinações. A quimioterapia tem por base o uso de drogas antineoplásicas, como o 5-Fluorouracil e Docetaxel, que possuem diferentes mecanismos de ação, dentre eles a citotoxicidade (LI et al., 2015; MONTERO et al., 2015). No Brasil, por exemplo, mulheres diagnosticadas com CM foram tratadas pelo SUS por diversos protocolos quimioterápicos ao longo dos anos, dentre eles CMF (ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil), FAC (5-fluorouracil, adriamicina e ciclofosfamida), FEC (5-fluorouracil, epirubicina e ciclofosfamida), AC (adriamicina e ciclofosfamida), paclitaxel e doxorubicina, e o trastuzumab (CECILIO et al., 2015). Com relação a endocrinoterapia, esta possui diferentes agentes terapêuticos como o Tamoxifeno e Toremifeno, Anastrozole e Exemestase, e Fulvestran, os quais interferem na estimulação do estrogênio em células de CM, principalmente em mulheres ER+ (VISOVSKY, 2014).

O Ácido Ascórbico (AA) tem sido utilizado no tratamento do câncer, demonstrando que a suplementação vitamínica de AA pela dieta tem apresentado efeitos preventivos em múltiplos tumores (FRAJESE et al., 2016). O AA é um antioxidante altamente eficaz, que participa da neutralização de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), na ativação de genes envolvidos no reparo de DNA, modulação de danos ao DNA em células expostas a EROS *in vitro* e *in vivo*, demonstrando que a suplementação com AA pode ajudar a prevenir doenças

resultantes de danos causados por radicais livres, como câncer e doenças neurodegenerativas. Porém seu efeito farmacológico ainda é controverso, pois em doses elevadas, este composto inibe o crescimento de células neoplásicas, devido a sua ação pró-oxidante, a qual pode estar relacionada a regulação negativa de EROs dependente de fatores de transcrição SP, sendo comparável a observada em outras drogas antineoplásicas como o trióxido de arsênio (PATHI et al., 2011; KONTEK; KONTEK, GRZEGORCZYK, 2013).

Os estudos sobre a interferência do AA na eficácia da quimioterapia ainda são incipientes. Existem diversos modelos farmacológicos, como por exemplo, o Sarcoma 180 (S180), e metodologias, como o Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese (CBMN) e o Ensaio Cometa que podem ser aplicadas no monitoramento de danos citogenéticos. O S180 são células tumorais (linhagem Murino) amplamente utilizadas para estudos farmacológicos de avaliação de agentes anti-tumorais, por apresentar respostas semelhantes em células neoplásicas humanas (BERNARDES et al., 2015). Com relação as metodologias, o CBMN é um biomarcador de mutagenicidade utilizado para avaliar danos no DNA em células binucleadas por meio da presença de micronúcleos (MN), pontes e brotos nucleoplasmáticos, além de células apoptóticas e necróticas (BULL et al., 2011). E o Ensaio Cometa é um importante biomarcador de genotoxicidade utilizado para mensurar danos ao DNA em células eucarióticas, capaz de detectar quebras de fita simples e dupla no DNA (APOSTOLOU et al., 2014). Assim, o presente estudo teve por objetivo a avaliação da ação antigenotóxica, antimutagênica e anticitotóxica do AA na modulação dos danos ao material genético induzidas pelo 5-Fluorouracil, Docetaxel e Tamoxifeno em S-180 por meio dos testes cometa e CBMN.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Químicos e suas diluições

As drogas utilizadas no estudo foram: 1) Fluorouracila (Eurofarma), solução injetável de 25 mg/mL, diluído em salina estéril até a concentração final de 20 µg/mL ; 2) Docetaxel tri-hidratado (Eurofarma), solução injetável de 20 µg/mL, diluído em salina (0,9%) estéril até a concentração final de 2 µg/mL; Citrato de Tamoxifeno (Eurofarma), comprimido de 20 mg, diluído em solução salina (0,9 %) com Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%, até a concentração final de 20 µg/mL; e Ácido L(+) Ascórbico P.A. (Dinâmica Ltda.), diluído em tampão fosfato estéril até a concentração final de 50 µmol.

As concentrações das drogas foram calculadas baseadas nas doses padrões utilizadas por pacientes oncológicos e a concentração do AA foi previamente determinada devido ao fato de que concentrações acima de 40-80 µmol podem ter efeito pró-oxidantes, considerando que os antioxidantes devem agir em baixas concentrações, como relatado por Halliwell (2006).

### 2.2 Cultivo *in vivo* de Sarcoma 180

As células tumorais da linhagem celular Sarcoma 180 (S-180) foram mantidas em camundongos através de passagens intraperitoneais semanais. Os procedimentos experimentais de manutenção do tumor sarcoma 180 em camundongos *Mus musculus* foram previamente aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFPI, sobre o número 081/14. O líquido ascítico, com células de Sarcoma 180 germinadas por 7 a 9 dias, foi aspirado da cavidade intraperitoneal em condições assépticas e centrifugado (500 rpm, 5 min, 4° C) para obtenção do *pellet* celular. A concentração celular para a cultura em RPMI foi ajustada a  $0.5 \times 10^6$  células/mL (FERREIRA et al., 2011).

### 2.3 Viabilidade celular de células de Sarcoma 180

A viabilidade celular foi analisada com a aplicação do teste de exclusão por azul de Tripán de acordo com Renzi et al. (1993). Após o período de 72 horas de tratamento, bem como as células sem tratamento, foram usadas para a aplicação da técnica, onde 90 µL da



suspensão de células foram retirados das culturas e acrescidos de 10 µL do azul de Tripán aos diferentes grupos. As células não viáveis foram contadas por sua coloração azulada, sendo consideradas como células mortas. Em oposição, as células viáveis não apresentam esta coloração devido às suas capacidades de bloquearem a entrada do corante azul de Tripán. As diferenciações celulares foram observadas em microscopia óptica com o aumento de 40X, com o auxílio da câmara de Neubauer.

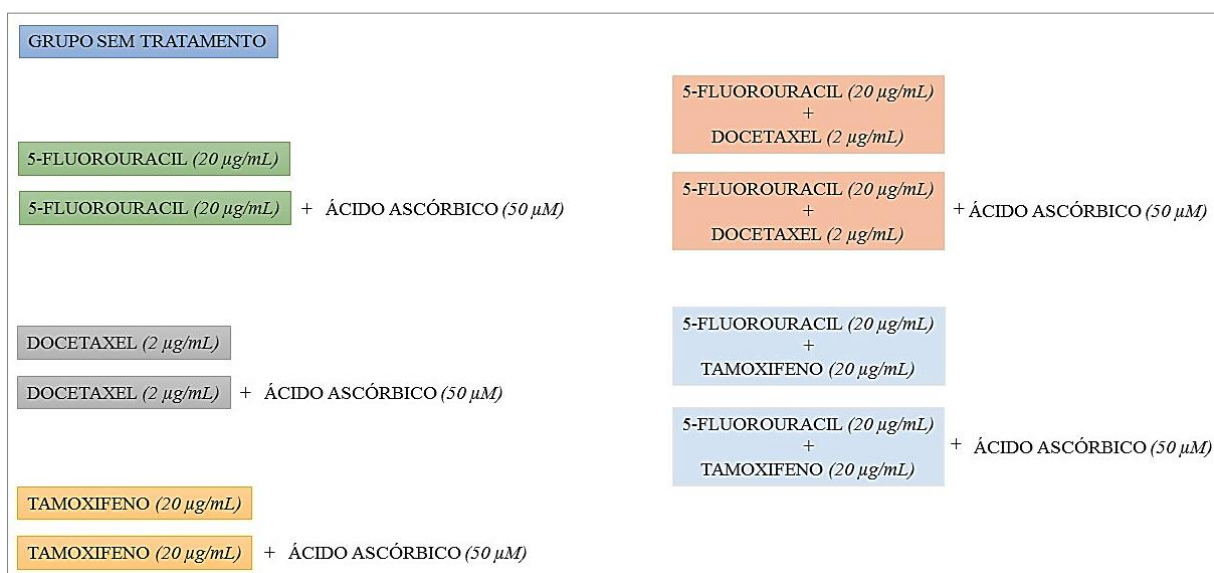
#### **2.4 Teste cometa com células de Sarcoma 180**

Após a centrifugação das culturas de S-180, seguiu-se a versão alcalina do teste cometa, conforme descrito por Tice e colaboradores (2000) com adaptações. Alíquotas de 10 µl das amostras foram misturadas com uma fina camada de agarose “low melting” 0,75% (95 µl) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%; estas lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% DMSO na hora do uso), por no mínimo 1 hora até no máximo 72 horas a 4°C, para o rompimento das membranas celulares. A lise celular permitiu a migração dos fragmentos de DNA que foi realizada após a incubação das lâminas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos e subsequente aplicação de uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V por 15 minutos nas células lisadas sobre as lâminas para microscopia em uma cuba de eletroforese de DNA. As lâminas foram neutralizadas logo após a eletroforese com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com solução de prata. Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). O ID foi obtido pela avaliação visual das classes de dano (de 0 a 4), extraindo-se um índice que expressa o dano geral sofrido por uma população de células (50 células por lâmina em duplicata), os núcleos intactos aparecem redondos (classe 0 – sem danos), já nas células lesadas, o DNA migra do núcleo em direção ao ânodo, durante a eletroforese, mostrando uma “cauda” de fragmentos sedimentados, semelhante a um cometa e são classificados entre classes um (dano mínimo) a quatro (dano máximo). A FD foi calculada baseada no número de células sem cauda (dano 0) menos 100.

#### **2.5 Teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN) com células de Sarcoma 180**

O teste CBMN foi realizado de acordo com Fenech (2007), com adaptações. Em frascos de cultura contendo 2 mL de meio RPMI suplementados com soro bovino fetal (20%), antibióticos (Sigma, St. Louis, MO) e fitohemaglutinina A (Gibco, Grand Island, NY) foram adicionados 20  $\mu$ L de suspensão celular de Sarcoma 180 ( $0.5 \times 10^6$ /mL). Em cada frasco de cultura foram adicionados 10  $\mu$ L das soluções contendo antineoplásicos em estudo na concentração final de 5-Fluorouracil 20  $\mu$ g/mL, Docetaxel 2  $\mu$ g/mL e Tamoxifeno 20  $\mu$ g/mL, os quais foram preparados por meio de diluição com solução salina (0,9%) estéril, e utilizados separadamente, bem como em associação entre eles. Além disso, foram adicionados 10  $\mu$ L de ácido ascórbico na concentração final de 50  $\mu$ mol (AA) para o co-tratamento, solubilizado em tampão fosfato, totalizando 11 grupos diferentes (**Figura 1**).

**Figura 1** – Grupos de tratamento utilizados no estudo



As células foram incubadas por 44h a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, foram adicionados às culturas 6  $\mu$ g/mL de Citocalasina B (Sigma, St. Louis, MO), retornando os frascos à incubação por mais 28h. Ao final de 72h, as culturas foram transferidas para tubos *falcon* e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* celular foi levemente agitado, sendo centrifugados novamente após a adição de 5 mL de fixador (metanol:ácido acético 5:1) e 3 gotas de formaldeído aos tubos. O procedimento foi repetido por 2 vezes utilizando fixador 3:1 e sem o formaldeído. Ao final, o sobrenadante foi descartado e 2 a 4 gotas da suspensão celular foram gotejados sobre lâminas, as quais foram coradas com solução de Giemsa 20% por 7 minutos. As lâminas foram analisadas por meio de microscópio óptico, com aumento de 1000X, considerando os danos nucleares (micronúcleos,

pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares) e apoptose, presentes em 1000 células por lâmina em duplicata.

## 2.6 Índice de divisão celular (IDN)

O IDN de acordo com Ionescu e colaboradores (2011) é um importante marcador de proliferação celular para mensuração de citotoxicidade, calculado pela fórmula pré-

$$NDI = \frac{M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)}{500}$$

estabelecida, onde “M1” a “M4” representa o número de células viáveis com 1 a 4 núcleos.

## 2.7 Cálculos da modulação do AA frente aos danos induzidos pelos antineoplásicos em células de Sarcoma 180

Os valores do percentual de modulação do AA nos danos (mutagênicos e genotóxicos) induzidos pelos antineoplásicos Docetaxel, 5-Fluorouracil e Tamoxifeno, bem como associados entre si e com o ácido ascórbico, foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%M = (A - (B + AA)) / A * 100$$

Onde, “A” representa os valores dos danos induzidos pelos antineoplásicos, e “B+AA” representa os valores induzidos pelos antineoplásicos associados ao Ácido Ascórbico.

## 2.8 Análise Estatística

Os resultados que obedeceram a uma distribuição paramétrica foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, através do programa GraphPad

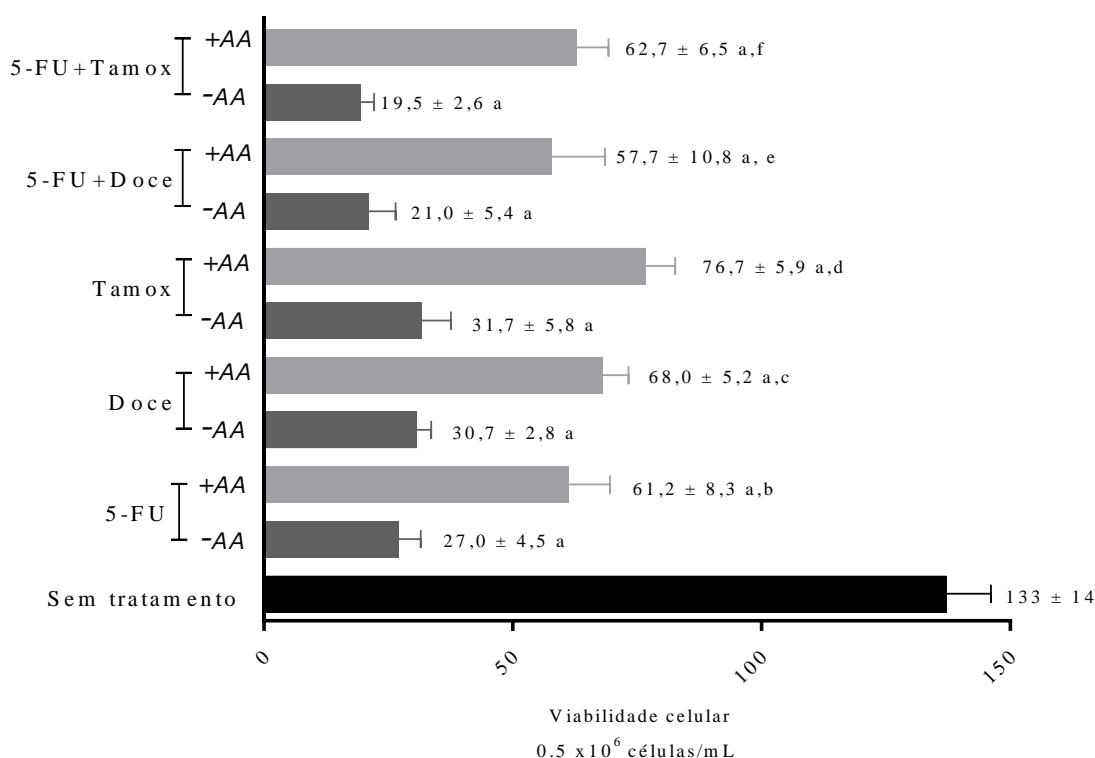
Prism versão 6.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, Copyright©. Significância para  $P < 0,05$ . Os dados não paramétricos (percentagens) foram analisados por meio do teste qui-quadrado. O mesmo programa (GraphPad Prism©) foi utilizado para confecção dos gráficos e tabelas dos resultados obtidos neste trabalho.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação anticitotóxica do AA frente aos danos induzidos em células de S-180 pelos antineoplásicos, por Azul de Tripán e teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN)

O tratamento com 5-FU, DOCE e TAMOX reduziu significativamente a viabilidade celular em relação ao grupo sem tratamento (ST). De forma similar, foi observada a redução da viabilidade nas interações entre os antineoplásicos 5-FU+DOCE e 5-FU+TAMOX. Entretanto, o AA em associação com os antineoplásicos apresentou significantes efeitos modulatórios em 5-FU+AA, DOCE+AA e TAMOX+AA, bem como nas interações entre as drogas 5-FU+DOCE+AA e 5-FU+TAMOX+AA (**Figura 2**).

**Figura 2** - Viabilidade Celular por meio do Teste de Exclusão por Azul de Tripán em células de Sarcoma 180. ANOVA two-way, pós-teste de Bonferroni. Valores significantes (Média  $\pm$  Desvio Padrão) para  $P < 0,05$ ; a: comparado a ST; b: comparado a 5-FU; c: comparado a DOCE; d: comparado a TAMOX; e: comparado a 5-FU+DOCE; f: comparado a 5-FU+TAMOX. ST: grupo sem tratamento; DOCE: Docetaxel (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); TAMOX: Tamoxifeno (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu\text{mol}$ ).



Dentre as terapias utilizadas para o tratamento do câncer estão a quimioterapia e a endocrinoterapia. A quimioterapia é empregada desde 1950, e tem como objetivo a redução da população de células tumorais a zero, para assim, levar a cura, por meio de drogas citotóxicas que causam danos ao DNA e levam a apoptose (LAWRENCE; CAMERON; ARGYLE, 2015; SAVAGE, 2015). Os resultados obtidos corroboram com a literatura, pois demonstram uma diminuição significativa da viabilidade celular das células de S180 quando tratadas com os quimioterápicos 5-FU e DOCE. A endocrinoterapia é muito utilizada no tratamento de CM, pois interfere na estimulação do estrogênio em células neoplásicas, principalmente em mulheres ER+, e possui diferentes agentes terapêuticos como o Tamoxifeno e Toremifeno, Anastrozole e Exemestase, e Fulvestran (VISOVSKY, 2014). O TAMOX também apresentou redução significativa da viabilidade celular, fato que pode ser relacionado ao dano oxidativo induzido pelo seu uso, conforme descrito por Nass e colaboradores (2015).

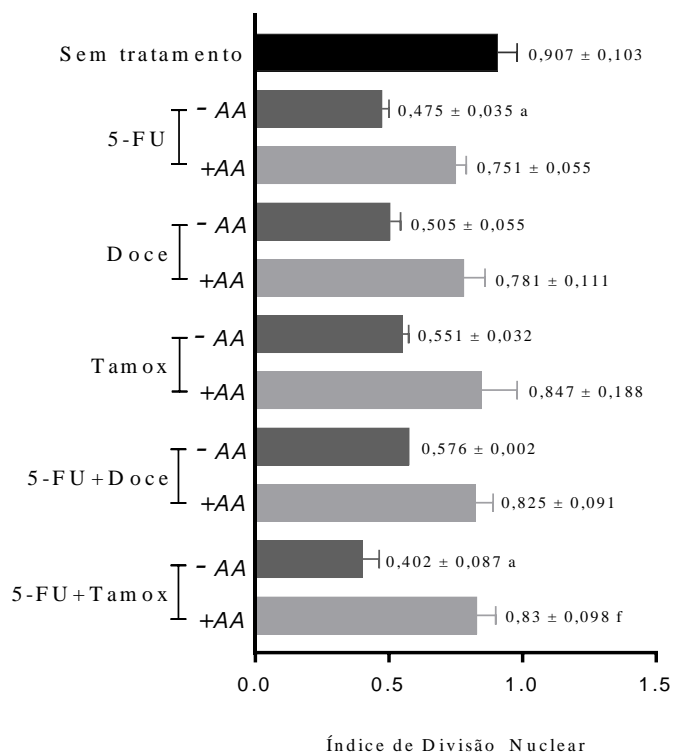
Entretanto, o uso do AA apresentou modulação significativa na diminuição da viabilidade celular induzida pelas drogas. Subramani e colaboradores (2014) relatam que no tratamento do CM o AA é geralmente usado durante a quimioterapia para aumentar a imunidade, especialmente por suplementação durante o tratamento com tamoxifeno, que induz efeitos citotóxicos, apoptose por ativação de pro-caspases, e citostático em pacientes com câncer de mama. Estudo *in vitro*, de células humanas de câncer de mama MCF-7 em exposição ao AA, relevaram atenuação da morte celular induzida pela droga, podendo afetar a resposta terapêutica.

Com a avaliação da citotoxicidade por meio do CBMN em células de S180 foi possível a avaliação da mutagenicidade induzida pelos antineoplásicos e suas interações em associação com o AA. O CBMN é um método citogenético, que foi desenvolvido inicialmente para cultura de linfócitos humanos e posteriormente adaptado para outros tipos celulares, utilizado para a avaliação de danos ao DNA (micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas, brotos nucleares, apoptose e necrose), que se baseia na análise de células binucleadas, as quais apresentam uma divisão celular completa com bloqueio de divisão subsequente realizado pela Citocalasina-B (FENECH, 2000; PEJCHAL et al., 2011).

Outro parâmetro avaliado, foi o Índice de Divisão Celular (IDN), importante marcador de proliferação celular para mensuração de citotoxicidade. O IDN dos antineoplásicos (5-FU, DOCE e TAMOX) e interações (5-FU+DOCE e 5-FU+TAMOX) foram significativamente menores do que suas associações com AA (5-FU+AA; DOCE+AA; TAMOX+AA; 5-FU+DOCE+AA e 5-FU+TAMOX+AA) em relação ao grupo sem tratamento. Entretanto, foi

observada uma modulação significativa ( $P < 0,05$ ) do AA no grupo 5-FU+TAMOX+AA em relação a 5-FU+TAMOX (**Figura 3**).

**Figura 3** - Índice de divisão celular (IDN) induzido pelos antineoplásicos, suas interações e associações com Ácido Ascórbico em células de Sarcoma 180. ANOVA two-way, pós-teste de Bonferroni. Valores significantes (Média  $\pm$  Desvio Padrão) para  $P < 0,05$ ; DOCE: Docetaxel (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); TAMOX: Tamoxifeno (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu\text{mol}$ ).



Foi observada uma modulação significativa na associação do Ácido Ascórbico com a interação 5-FU+TAMOX, demonstrando que o uso do AA reduziu a citotoxicidade neste tipo de associação. Du, Cullen e Buettner (2012) relatam que há estudos que apontam que o uso do AA em conjunto com quimioterápicos convencionais apresentam efeitos citotóxicos sinérgicos. Entretanto, em estudos com camundongos com câncer de pâncreas, os quais receberam duas doses diárias (4 g/Kg) de AA e o tratamento apresentou uma redução da taxa de crescimento tumoral, entretanto, após cessar o tratamento, foi observado um aumento do crescimento tumoral, evidenciando que o AA, neste modelo, agiu de forma citostática, não citotóxica. Stephenson e colaboradores (2013) relatam que estudos com linhagens celulares apontam efeitos citotóxicos do AA em linhagens celulares nas concentrações  $\mu\text{M}$  e  $\text{mM}$ . Ensaio pré-clínicos com elevadas doses de AA apresentaram efeitos antineoplásicos em modelos animais e culturas de tecidos. E clínicos iniciais sugeriram que o AA (intravenoso ou

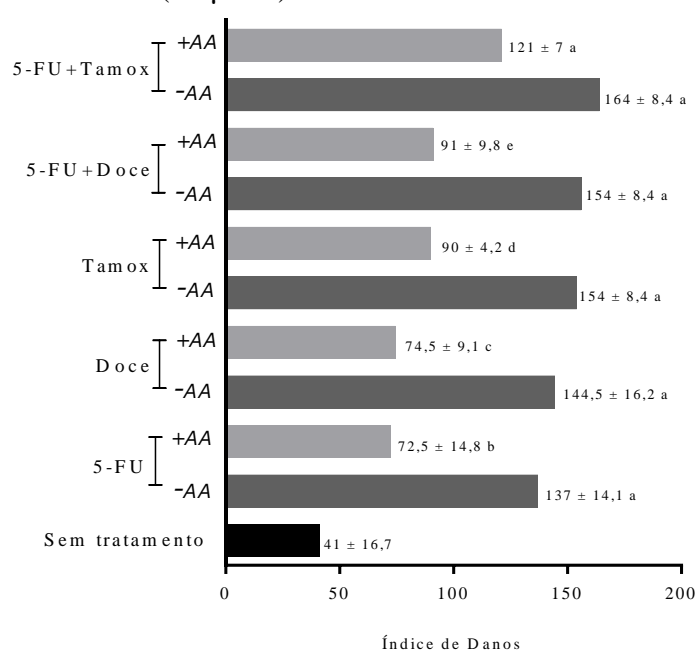
oral) pode diminuir os sintomas e prolongar a vida de pacientes com câncer terminal. Pathi e colaboradores (2011) realizaram um estudo com células de câncer de cólon (SW480 e RKO) e observaram que o AA na dose de 1-3 mM reduziu a proliferação celular, devido a diminuição da expressão de proteínas SP, assim como, induziu apoptose e necrose.

### **3.2 Avaliação dos efeitos antigenotóxicos do AA frente aos danos induzidos pelos antineoplásicos em células de S-180**

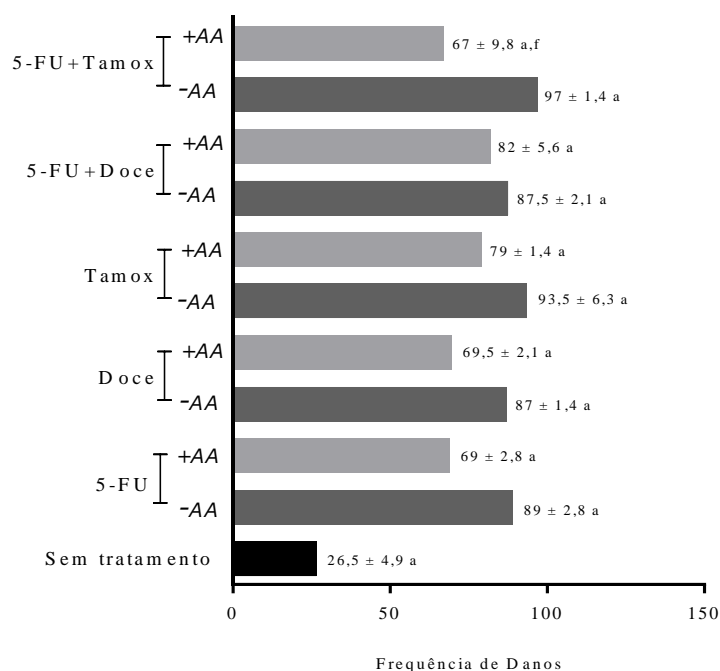
Foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) do ID nas células tratadas com 5-FU, DOCE e TAMOX, em relação ao grupo sem tratamento (ST), assim como nas interações entre os antineoplásicos (5-FU+DOCE e 5-FU+TAMOX). Entretanto, foi evidenciada uma modulação significativa ( $P < 0,05$ ) do AA quando associado ao 5-FU (47,1%), DOCE (48,5%) e TAMOX (41,6%). Quando associado as interações de drogas, o AA apresentou modulação significativa ( $P < 0,05$ ) apenas em 5-FU+DOCE+AA (41%) (**Figura 4; Tabela 1**). Com relação a FD, foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) nas células tratadas com 5-FU, DOCE e TAMOX, em relação ao grupo sem tratamento (ST), bem como nas interações entre os antineoplásicos (5-FU+DOCE e 5-FU+TAMOX). A associação do AA não evidenciou modulação nas células tratadas com 5-FU, DOCE e TAMOX. Contudo, quando associado a 5-FU+TAMOX, o AA apresentou modulação significativa ( $P < 0,05$ ) (31%) (**Figura 5; Tabela 1**).



**Figura 4** – Índice de Danos induzidos pelos antineoplásicos, suas interações e associações com Ácido Ascórbico em células de Sarcoma 180. ANOVA two-way, pós-teste de Bonferroni. Valores significantes (Média  $\pm$  Desvio Padrão) para \* $P < 0,05$ . a: comparado a ST; b: comparado a 5-FU; c: comparado a DOCE; e: 5-FU+DOCE. ST: grupo sem tratamento; DOCE: Docetaxel (2  $\mu\text{g/mL}$ ); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu\text{g/mL}$ ); TAMOX: Tamoxifeno (20  $\mu\text{g/mL}$ ) AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu\text{mol}$ ).



**Figura 5** – Frequência de Danos induzidos pelos antineoplásicos, suas interações e associações com Ácido Ascórbico em células de Sarcoma 180. ANOVA two-way, pós-teste de Bonferroni. Valores significantes (Média  $\pm$  Desvio Padrão) para \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$ ; \*\*\* $P < 0,0001$ . a: comparado a ST; f: comparado a 5-FU+TAMOX. ST: grupo sem tratamento; DOCE: Docetaxel (2  $\mu\text{g/mL}$ ); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu\text{g/mL}$ ); TAMOX: Tamoxifeno (20  $\mu\text{g/mL}$ ) AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu\text{mol}$ ).



**Tabela 1** - Percentual de modulação do Ácido Ascórbico frente a genotoxicidade induzida pelos antineoplásicos e suas interações em células de Sarcoma 180. Percentual obtido a partir da equação:  $\%M = (A - (B + AA)) / A * 100$ , onde A significa a genotoxicidade provocada pela droga, e B significa a droga + Ácido Ascórbico. Valores significantes (%) para \*P<0,05. b: comparado a 5-FU; c: comparado a DOCE; d: comparado a TAMOX; e: comparado a 5-FU+DOCE; f: comparado a 5-FU+TAMOX. DOCE: Docetaxel (2 µg/mL); 5-FU: 5-Fluorouracil (20 µg/mL); TAMOX: Tamoxifeno (20 µg/mL) AA: Ácido Ascórbico (50 µmol).

	Índice de Danos	Frequência de Danos
5-FU+AA	47,1% <sup>b</sup>	22,5%
DOCE+AA	48,5% <sup>c</sup>	20,2%
TAMOX+AA	41,6% <sup>d</sup>	15,6%
5-FU+DOCE+AA	41% <sup>e</sup>	6,3%
5-FU+TAMOX+AA	26,3%	31% <sup>f</sup>

O teste cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis*), é um dos métodos mais importantes para estudo de genotoxicidade e danos ao DNA, quem tem por princípio a migração dos fragmentos danificados, e negativamente carregados, de DNA em direção ao ânodo durante a eletroforese (neutra ou alcalina), gerando uma cabeça, que consiste no DNA intacto e um rastro semelhante a uma cauda de cometa, onde a medição desta cauda reflete a extensão dos danos ao DNA (VANDGHANOONI; ESKANDANI, 2011; GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015). Este ensaio foi utilizado para evidenciar o aumento de danos ao DNA induzidos por diferentes concentrações de 5-FU em hepatócitos e linfócitos de zebrafish (KOVACS et al., 2015). O ensaio também apresentou significância para danos ao DNA em

*Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia* expostos a 5-FU, doxorubicina e outras quatro drogas, sendo considerado assim, a ferramenta mais sensível para avaliação de exposição genotóxica (PARELLA et al., 2015).

Os dados apontam o aumento de danos genotóxicos (ID e FD) induzidos pelos antineoplásicos e suas interações em relação ao grupo sem tratamento. Estes danos ao DNA são uma importante via para o tratamento oncológico, onde os agentes genotóxicos agem por meio de acionamento de *checkpoints* de reparo com o objetivo de interromper o crescimento e desencadear a apoptose em células neoplásicas, as quais perdem a capacidade de reparo (TORGOVNICK; SCHUMACHER, 2015). Entretanto, foi observada uma modulação significativa do AA quando associado aos antineoplásicos e suas interações, evidenciando uma diminuição dos danos genotóxicos induzidos pelas drogas, agindo, desta forma, como antioxidante. O AA é um antioxidante altamente eficaz que participa da neutralização de EROs e sua utilização no tratamento do câncer tem sido estudada nos últimos 50 anos, demonstrando que a suplementação vitamínica de AA pela dieta tem apresentado efeitos preventivos em múltiplos tumores (FRAJESE et al., 2016).

Estudos apontam que a suplementação alimentar, ou terapia nutricional, tem sido empregada nos últimos 100 anos em pós-operatório de pacientes oncológicos com o objetivo de reduzir os efeitos adversos da cirurgia, como infecções e desnutrição. A imunonutrição é uma área da farmaconutrição que por meio da implementação de fórmulas na dieta contendo aminoácidos, vitaminas, lipídios e nucleotídeos, melhora a função imune, e conseqüentemente, sua resposta ao tratamento (MAUSKOPF et al., 2012; KLEK; SZYBINSKI; SZCZEPANEK, 2014).

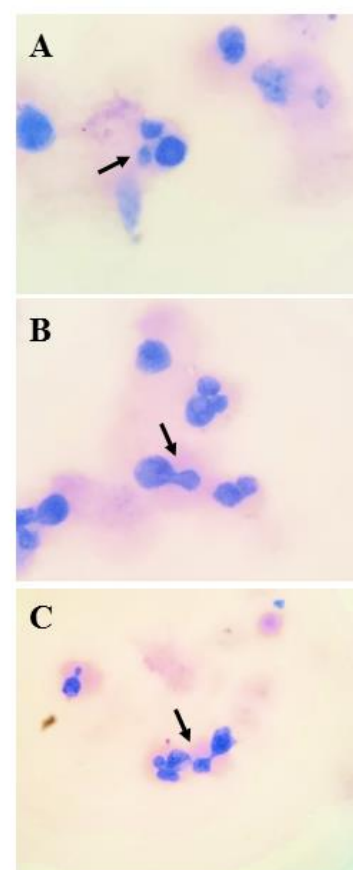
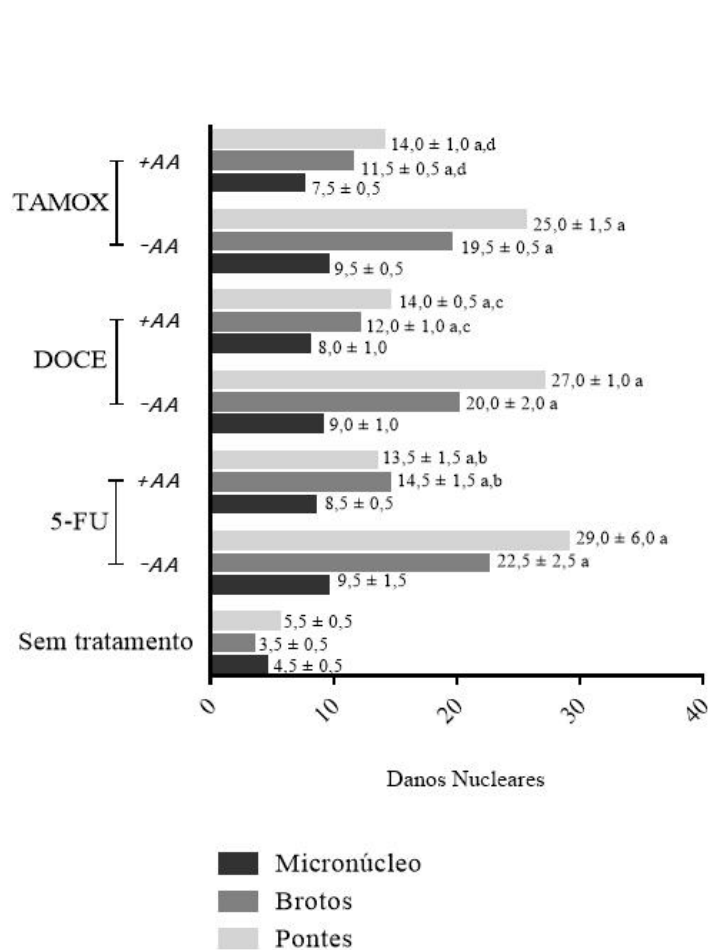
### **3.3 Avaliação antimutagênica do AA frente aos danos induzidos em células de S-180 pelos antineoplásicos, por meio do teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN)**

A avaliação dos efeitos mutagênicos induzidos pelos antineoplásicos e suas interações em associação com o AA, foi realizada através de um estudo *ex vivo* com células de Sarcoma 180 (S-180). O S-180 corresponde a uma linhagem de células tumorais (linhagem Murino), amplamente utilizado para estudos farmacológicos de avaliação de agentes anti-tumorais, caracterizado na forma de ascite e inoculado de forma intraperitoneal em camundongos ou ratos. Possui características indefinidas, altos índices de metástase e prognóstico ruim, o que tornou um ótimo modelo experimental ao longo dos anos, como modelo comparativo com

respostas semelhantes em células neoplásicas em humanas (BERNARDES et al., 2015; FERREIRA et al., 2015).

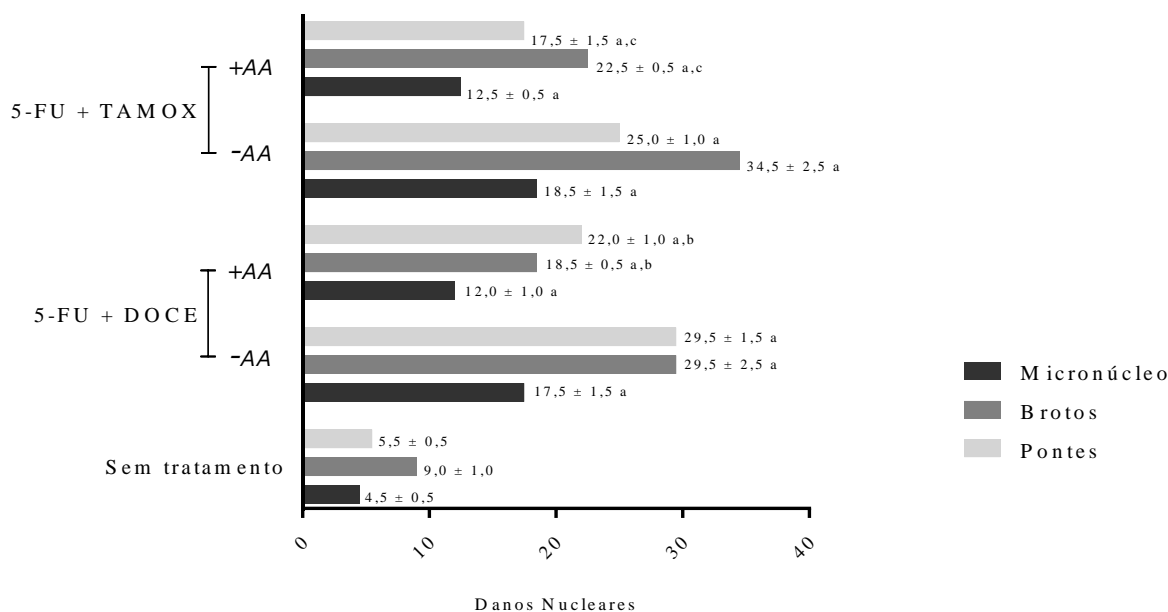
Após a realização do CBMN em células de S180, foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de brotos e pontes nucleoplasmáticas nas células tratadas com 5-FU, DOCE e TAMOX, em relação ao grupo sem tratamento (ST), assim como nas interações entre os antineoplásicos (5-FU+DOCE e 5-FU+TAMOX), as quais apresentaram aumento significativo de micronúcleos, pontes e brotos em relação ao ST. Entretanto, foi evidenciada uma modulação significativa do AA quando associado aos antineoplásicos (5-FU+AA; DOCE+AA e TAMOX+AA), reduzindo a quantidade de brotos (67,4%; 40% e 38,5% respectivamente) e pontes (60,9%; 48,2% e 44% respectivamente), bem como, quando associado as interações de drogas (5-FU+DOCE+AA e 5-FU+TAMOX+AA), reduzindo pontes (25,5% e 30% respectivamente), e brotos (35,9% e 45,4% respectivamente) (**Figura 6 e 7; Tabela 2**).

**Figura 6** - Mutagenicidade induzida pelos antineoplásicos e suas associações com Ácido Ascórbico em células de Sarcoma 180. ANOVA two-way, pós-teste de Bonferroni. Valores significantes (Média  $\pm$  Desvio Padrão) para  $P < 0,05$ . a: comparado a ST; b: comparado a 5-FU; c: comparado a DOCE; d: comparado a TAMOX; ST: grupo sem tratamento; DOCE: Docetaxel (2  $\mu\text{g/mL}$ ); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu\text{g/mL}$ ); TAMOX: Tamoxifeno (20  $\mu\text{g/mL}$ ) AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu\text{mol}$ ).



Perfil fotomicrográfico de células de Sarcoma 180 com micronúcleo (A), broto nuclear (B) e ponte nucleoplásmica (C). Giemsa 10%.

**Figura 7** - Mutagenicidade induzida pelas interações dos antineoplásicos e suas associações com Ácido Ascórbico em células de Sarcoma 180. ANOVA two-way, pós-teste de Bonferroni. Valores significantes (Média ± Desvio Padrão) para  $P < 0,05$ . a: comparado a ST; b: comparado a 5-FU+DOCE; c: comparado a 5-FU+TAMOX; ST: grupo sem tratamento; DOCE: Docetaxel (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); TAMOX: Tamoxifeno (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu\text{mol}$ ).



**Tabela 2** - Percentual de modulação do Ácido Ascórbico frente a mutagenicidade induzida pelos antineoplásicos e suas interações em células de Sarcoma 180. Percentual obtido a partir da equação:  $\%M = (A - (B + AA)) / A * 100$ , onde A significa a mutagenicidade provocada pela droga, e B significa a droga + Ácido Ascórbico. Valores significantes (%) para  $P < 0,05$ ; a: comparado a 5-FU; b: comparado a DOCE; c: comparado a TAMOX; d: comparado a 5-FU+DOCE; e: comparado a 5-FU+TAMOX. DOCE: Docetaxel (2  $\mu\text{g/mL}$ ); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu\text{g/mL}$ ); TAMOX: Tamoxifeno (20  $\mu\text{g/mL}$ ); AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu\text{mol}$ ).

	Micronúcleo	Brotos	Pontes	Apoptose
5-FU+AA	10,6%	67,4% <sup>a</sup>	60,9% <sup>a</sup>	47,2% <sup>a</sup>
DOCE+AA	11,2%	40% <sup>b</sup>	48,2% <sup>b</sup>	37,4% <sup>b</sup>
TAMOX+AA	21,1%	38,5% <sup>c</sup>	44% <sup>c</sup>	42% <sup>c</sup>
5-FU+DOCE+AA	31,5%	37,3% <sup>d</sup>	25,5% <sup>d</sup>	35,9% <sup>d</sup>
5-FU+TAMOX+AA	32,5%	34,8% <sup>e</sup>	30% <sup>e</sup>	45,4% <sup>e</sup>

Como observado, os dados foram significantes para pontes, brotos e apoptose. Os micronúcleos são oriundos de fragmentos de cromossomos ou cromossomos soltos, os quais não foram incluídos no núcleo principal durante a mitose, devido a alterações estruturais espontâneas ou por fatores mutagênicos, envoltos por uma membrana nuclear, tornando-se um artefato nuclear, pequeno e separado. As pontes nucleoplasmáticas são indicativo de disfunção dos telômeros após perda de reparo ou quebra dupla do DNA, que gera cromossomos dicêntricos puxados para polos opostos do fuso mitótico durante a anáfase, formando uma ponte estreita entre os dois núcleos. E os brotos nucleares são corpos ligados ao núcleo principal, por uma ligação nucleoplasmática fina, originados por um mecanismo

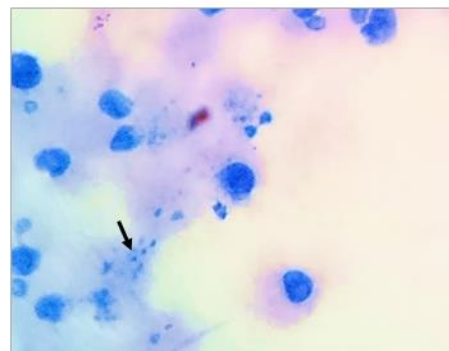
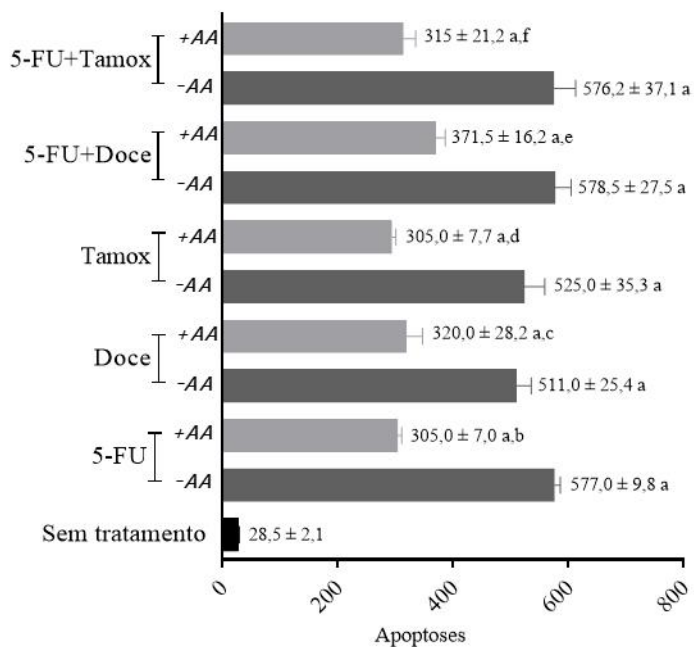
pelo qual as células removem o DNA amplificado (amplificação de gene) (FENECH, 2011; PEJCHAL et al., 2011).

Cornetta e colaboradores (2008) realizaram o teste de micronúcleo em enfermeiras expostas a antineoplásicos e observaram aumento significativo de níveis de danos ao DNA, onde a idade e o gênero influenciavam no aumento de MN em relação ao grupo controle. Bouraoui e colaboradores (2011) realizaram estudos semelhantes e observaram que houve um aumento de MN e aberrações cromossômicas nas amostras de enfermeiras expostas a antineoplásicos. Mrdanovic e colaboradores (2012) também desenvolveram estudo semelhante e evidenciaram um aumento significativo de MN, entretanto, após suplementação vitamínica (vitaminas C, E, A e selênio) houve uma diminuição significativa da frequência de MN com relação ao grupo controle. Villarini e colaboradores (2016) elaboraram um meta-análise sobre estes estudos com trabalhadores expostos a antineoplásicos e apontam que 15 dos 24 estudos analisados descrevem um aumento significativo da frequência de MN nesses sujeitos comparados ao grupo controle.

Com relação a análise de células necróticas e apoptóticas, foi evidenciado, após o CBMN em células de S180, um aumento significativo de apoptoses nas células tratadas com 5-FU, DOCE e TAMOX em relação ao grupo sem tratamento (ST). De forma similar, ocorreu nas interações entre os antineoplásicos, onde foi notado um aumento significativo de apoptoses nas células tratadas com 5-FU+DOCE e 5-FU+TAMOX em relação ao ST. Entretanto, a associação do AA apresentou uma modulação significativa em 5-FU+AA (47,2%), DOCE+AA ( $P<0,01$ ) (37,4%) e TAMOX+AA (42%), bem como nas interações entre os antineoplásicos (5-FU+DOCE+AA e 5-FU+TAMOX+AA) (35,9% e 45,4% respectivamente) (**Figura 8; Tabela 2**).

**Figura 8** - Apoptose induzida pelos antineoplásicos e suas interações em associação com Ácido Ascórbico em células de S-180. ANOVA two-way, pós-teste de Bonferroni. Valores

significantes (Média  $\pm$  Desvio Padrão) para  $P < 0,05$ ; a: comparado a ST; b: comparado a 5-FU; c: comparado a DOCE; d: comparado a TAMOX e: comparado a 5-FU+DOCE; f: comparado a 5-FU+TAMOX. ST: grupo sem tratamento; DOCE: Docetaxel (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 5-FU: 5-Fluorouracil (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); TAMOX: Tamoxifeno (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) AA: Ácido Ascórbico (50  $\mu\text{mol}$ ).



Perfil fotomicrográfico de células de Sarcoma 180 em apoptose. Giemsa 10%.



A apoptose é caracterizada por células arredondadas, com pseudópodes retraídos, volume celular reduzido, cromatina condensada e núcleos fragmentados (corpos apoptóticos), podendo ser desencadeada por fatores intrínsecos e extrínsecos. A apoptose intrínseca é desencadeada por diversas condições, como danos ao DNA e estresse oxidativo, e requer a permeabilização da membrana mitocondrial, estando diretamente relacionada a família de proteínas Bcl-2. A apoptose extrínseca é conduzida por um complexo de sinalização composto por sinais extracelulares de estresse, que são detectados e propagados por receptores de membranas específicos (Fas, TNFR1 e TRAIL) (GORDY; HE, 2012; POMARA et al., 2015).

A atividade antitumoral da maioria das terapias anti-câncer tem por base mecanismos de ação que levam a indução de morte celular em células neoplásicas (FULDA, 2013). O 5-FU tem como mecanismo de ação a inibição de processos biossintéticos essenciais, dificultando o crescimento celular pela inibição da timidilato sintetase, impedindo desta forma, a transcrição de DNA e translação de RNA, além de se incorporar nestas macromoléculas, inibindo suas funções normais, levando, assim, a apoptose e a citotoxicidade (ZHANG et al., 2012; ASARA et al., 2013; LI et al., 2015). O DOCE atua pela interferência da dinâmica dos microtúbulos interrompendo o ciclo celular e promovendo senescência e apoptose, a qual ocorre devido a alterações na expressão e fosforilação de proteínas da família Bcl-12 (QU et al., 2014; MONTERO et al., 2015). E o TAMOX é um modulador dos receptores de estrógeno, o qual compete com este hormônio e impede que ocorra a ligação nesses sítios que poderiam levar a uma proliferação celular. Estudos apontam que ele também pode inibir a proliferação e induzir a apoptose de câncer ER, por meio do aumento do *status* oxidativo celular, da inibição de proteína C quinase (PKC) (LIU et al., 2014; RADIN; PATEL, 2016).

Entretanto, estudos apontam sobre a resistência de células neoplásicas à quimioterapia, por meio de diversos mecanismos, como absorção reduzida, aumento da bomba de efluxo e evasão da morte celular programada, ou apoptose, a qual tem sido reconhecida como uma das principais alterações que promovem o crescimento maligno (PECQUEUR et al., 2013; SUN, 2016). Fulda (2013) afirma que uma das características dos cânceres humanos é a evasão da apoptose, devido à perda de expressão ou de função de moléculas pró-apoptóticas ou pela super-expressão de proteínas que inibem a morte celular. Resultados semelhantes foram encontrados neste estudo proveniente da ação moduladora do AA, que proporcionou diminuição da apoptose quando associada aos quimioterápicos e suas interações.

#### 4. CONCLUSÃO

Os antineoplásicos 5-FU, DOCE e TAMOX (nas concentrações testadas), bem como suas interações induziram genotoxicidade, por possíveis mecanismos oxidativos; mutagenicidade por indução de anormalidades nucleares indicativas de clastogenia e /ou aneugenia, pela formação de micronúcleos, indução de brotos (superexpressão de genes), bem como de pontes nucleoplasmáticas, na linhagem tumoral S-180. Entretanto, o AA modulou esses danos por diversos mecanismos associados aos efeitos antitumorais dos antineoplásicos com excelentes percentuais de modulação. Os dados apontaram que o AA na concentração de 50  $\mu\text{M}$  tem efeitos: **(1)** anticitotóxico, por interferência na viabilidade celular e IDN; **(2)** antigenotóxicos, por possíveis mecanismos antioxidantes que interferiram sobre os índices de frequências de danos dos antineoplásicos ao DNA de S-180 e **(3)** antimutagênicos, pela inibição de anormalidade nucleares do tipo pontes e brotos e por modulação de morte celular, especialmente de apoptoses. Essas atividades do AA em S-180 são de importância para outros estudos que apontem os riscos de interações entre o AA e os antineoplásicos para a eficácia de terapias oncológicas, especialmente durante a ação dos antineoplásicos frente a muitas controvérsias sobre o uso de antioxidante durante as terapias oncológicas.

## REFERÊNCIAS

- AMANKWAH, E.K.; CONLEY, A.P.; REED, D.R. Epidemiology and therapies for metastatic sarcoma. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 147–162, 2013.
- ASARA, Y.; MARCHAL, J.A.; CARRASCO, E.; BOULAIZ, H.; SOLINAS, G.; BANDIERA, P.; GARCIA, M.A.; FARACE, C.; MONTELLA, A.; MADEDDU, R. cadmium modifies the cell cycle and apoptotic profiles of human breast cancer cells treated with 5-fluorouracil. **International Journal of Molecular**, v.14, n.8, p.16602- 16616, 2013.
- APOSTOLOU, P.; TOLOUDI, M.; KOURTIDOU, E.; MIMIKAKOU, G.; VLACHOU, I.; CHATZIIOANNOU, A.; PAPASOTITIOU, I. Use of the comet assay technique for quick and reliable prediction of in vitro response to chemotherapeutics in breast and colon cancer. **Journal of Biological Research**, v. 2014, p. 21:14, 2014.
- BERNARDES, T.M.; BESERRA, H.E.O.; VEXENAT, S.C.O.R.; LANGONI, H.; ROCHA, N.S. Phenotypic Characterization Murine Sarcoma TG-180 Immunophenotypical Characterization Murine Sarcoma TG-180. **Open Journal of Pathology**, v.5, p. 59-64, 2015.
- BOURAOUI, S.; BRAHEM, A.; TABKA, F.; MRIZEK, N.; SAAD, A.; ELGHEZAL, H. Assessment of chromosomal aberrations, micronuclei and proliferation rate index in peripheral lymphocytes from Tunisian nurses handling cytotoxic drugs. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 41, n.1, p. 250-257, 2011
- BULL, C.F.; BEETSTRA-HILL, S.; BENASSI-EVANS, B.J.; CROTT, J.W. KIMURA, M.; TEO, T.; WU, J.; FENECH, M.F. Application and adaptation of the in vitro micronucleus assay for the assessment of nutritional requirements of cells for DNA damage prevention. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 193–197, 2011.
- CECILIO, A.P. et al. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 2015, n. 7, p. 43-49, 2015.
- CORNETTA, T.; PADUA, L.; TESTA, A.; IEVOLI, E.; FESTA, F.; TRANFO, G.; BACCELLIERE, L.; COZZI, R. Molecular biomonitoring of a population of nurses handling antineoplastic drugs. **Mutation Research**, v. 638, n.1, p.75–82, 2008.
- DU, J.; MARTIN, S. M.; LEVINE, M.; WAGNER, B. A.; BUETTNER, G. R.; WANG, S. H.; TAGHIYEV, A. F.; DU, C.; KNUDSON, C. M.; CULLEN, J. J. Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer. **Clinical cancer research**, v. 16, n. 2, p. 509-520, 2010.
- FANG, C. et al. Illuminating necrosis: From mechanistic exploration to preclinical application using fluorescence molecular imaging with indocyanine green. **Scientific reports**, v. 6, p. 1-12, 2016.
- FRAJESE G.V.; BENVENUTO, M.; FANTINI, M.; AMBROSIN, E.; SACCHETTI, P.; MASUELLI, L.; GIGANTI, M.G.; MODESTI, A.; BEI, R. Potassium increases the antitumor effects of ascorbic acid in breast cancer cell lines in vitro. **Oncology Letters**, v.11, n.6, p. 4224-4234, 2016.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n.1, p. 81–95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocol**. v. 2, n. 5, p. 1084-1094, 2007.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**. v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; VIANA, M.P.; SOUZA, T.M.; Vasconcelos, I.M.; SOARES, B.M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; CARVALHO, A.F.U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 3, p. 1045-1058, 2011.

FERREIRA, P.M.; COSTA, P.M.; COSTA, A.M.; LIMA, D.J.; DRUMOND, R.R.; SILVA, J.D.; MOREIRA, D.R.; OLIVEIRA FILHO, G.B.; FERREIRA, J.M.; QUEIROZ, M.G.; LEITE, A.C.; PESSOA, C. Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 3, p. 1-18, 2015.

FULDA, S. Regulation of cell death in cancer—possible implications for immunotherapy. **Frontiers in oncology**, v. 3, n. 2, p. 1-5, 2013.

GORDY, C.; HE, Y.W. The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead?. **Protein Cell**, v. 3, n.1, p. 17-27, 2012.

GUNASEKARANA, V.; GLADWIN, V.R.; CHAND, P. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. **J Clin Diagn Res**. v. 9, n. 3, p. 1-5, 2015.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2016**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>

IONESCU, M.E.; CIOCIRLAN, M.; BECHEANU, G.; NICOLAIE, T.; DITESCU, C.; TEIUSANU, A.G.; GOLOGAN, S.I.; ARBANAS, T.; DICULESCU, M.M. Nuclear Division Index may Predict Neoplastic Colorectal Lesions. **A Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 3, p. 173-178, 2011.

KLEK, S.; SZYBINSKI, P.; SZCZEPANEK, K. Perioperative Immunonutrition in surgical cancer patients: a summary of decade of research. **World J Surg**, v. 38, p. 803-812, 2014.

KONTEC, R.; KONTEK, B.; GRZEGORCZYK, K. Vitamin C modulates DNA damage induced by hydrogen peroxide in human colorectal adenocarcinoma cell lines (HT29) estimated by comet assay in vitro. **Archives of Medical Science**, v.9, n.6, p. 1006–1012, 2013.

KOVACS, R.; CSENKI, Z.; BAKOS, K.; URBANYI, B.; HORVATH, A.; VRHOVAC, V.G.; GAJSKI, G.; GERIC, M.; NEGREIRA, N.; ALDA, M.L.; BARCELO, D.; HEATH, E.; KOSJEK, T.; ZEGURA, B.; NOVAK, M.; ZAJC, I.; BAEBLER, S.; ROTTER, A.; RAMSAK, Z.; FILIPIC, M. Assessment of toxicity and genotoxicity of low doses of 5-fluorouracil in zebrafish (*Danio rerio*) two-generation study. **Water research**, v. 77, n.1, p. 201-212, 2015.

LAWRENCE, J.; CAMERON, D.; ARGYLE, D. Species differences in tumour responses to cancer chemotherapy. **Phil.Trans. R. Soc. B**, v. 370, p. 1-12, 2015.

LI, W.; TANUMIHARDJAC, J.; MASUYAMAD, T.; KORSHIN, G. Examination of the kinetics of degradation of the antineoplastic drug 5-fluorouracil by chlorine and bromine. **Journal of Hazardous Materials**, v. 282, p. 125–132, 2015.

LIMA, A.P.; PEREIRA, F.C.; ALMEIDA, M.A.; MELLO, F.M.; PIRES, W.C.; PINTO, T.M.; DELELLA, F.K.; FELISBINO, S.; MORENO, V.; BATISTA, A.A.; SILVEIRA-LACERDA, E. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium(II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 105-125, 2014.

MAUSKOPF, J.A.; CANDRILLI, S.D.; CHEVROU-SÉVERAC, H.; OCHOA, J.B. Immunonutrition for patients undergoing elective surgery for gastrointestinal cancer: impact of hospital costs. **World J Surg**, v. 10, n. 136, p. 1-7, 2012.

MONTERO, A.; FOSSELLA, F.; HORTOBAGYI, G.; VALERO, V. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. **Lancet Oncol**, v. 6, p. 229–39, 2005.

MRDANOVIC, J.; JUNGIC, S.; ŠOLAJIC, S.; BOGDANOVIC, V.; JURIŠIĆ, V. Effects of orally administered antioxidants on micronuclei and sister chromatid exchange frequency in workers professionally exposed to antineoplastic agents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n.8, p. 2937–2944, 2012.

NASS, N.; SEL, S.; IGNATOV, A.; ROESSNER, A.; KALINSKI, T. Oxidative stress and glyoxalase I activity mediate dicarbonyl toxicity in MCF-7 mamma carcinoma cells and a tamoxifen resistant derivative. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1860, p. 1272–1280, 2015.

PARRELLA, A.; LAVORGNA, M.; CRISCUOLO, E.; RUSSO, C.; ISIDORI, M. Eco-genotoxicity of six anticancer drugs using comet assay in daphnids. **Journal of Hazardous Materials**, v. 286, n. 9, p. 573–580, 2015.

PATHI, S.S.; LEI, P.; SREEVALSAN, S.; CHADALAPAKA, G.; JUTOORU, I.; SAFE, S. Pharmacologic doses of ascorbic acid repress specificity protein (sp) transcription factors and sp-regulated genes in colon cancer cells. **Nutrition and Cancer**, v. 63, n.7, p. 1133–1142, 2011.

PECQUEUR, C.; OLIVER, L.; OIZEL, K.; LALIER, L.; VALLETTE, F.M. Targeting Metabolism to Induce Cell Death in Cancer Cells and Cancer Stem Cells. **International Journal of Cell Biology**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

PEJCHAL, J.; VASILIEVA, V.; HRISTOZOVA, M.; VILASOVÁ, Z.; VÁVROVÁ, J.; ALYAKOV, M.; TICHÝ, A.; ZÁRYBNICKÁ, L.; ŠINKOROVÁ, Z.; TAMBOR, V.; KUBELKOVÁ, K.; DRESLER, J. Cytokinesis-block micronucleus (cbmn) assay/cbmn

cytome assay in human lymphocytes after in vitro irradiation and its use in biodosimetry. **Military Medical Science Letters**, v.80, n.1, p. 28-37, 2011.

POMARA, C.; NERI, M.; BELLO, S.; FIORE, C.; RIEZZ, I.; TURILLAZZ, E. Neurotoxicity by Synthetic Androgen Steroids: Oxidative Stress, Apoptosis, and Neuropathology: A Review. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n.1, p.132-145, 2015.

QU, S.; WANG, K.; XUE, H.; WANG, Y.; WU, R.; LIU, C.; GAO, A.C.; GOUT, P.W.; COLLINS, C.C.; WANG, Y. Enhanced anticancer activity of a combination of docetaxel and Aneustat (OMN54) in a patient-derived, advanced prostate cancer tissue xenograft model. **Molecular oncology**, v. 8, p. 311-322, 2014.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FOSTER, R. The evaluation of the multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA**, v. 21, p. 89-96, 1993.

SAMPAIO, H.A.C.; OLIVEIRA, N.M.; SABRY, M.O.D.; CARIOCA, A.A.F.; PINHEIRO, L.G.P. Influência do tipo de terapia antineoplásica sobre marcadores antropométricos e dietéticos em mulheres portadoras de câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 2, p. 223-230, 2012.

SAVAGE, P. Clinical observations on chemotherapy curable malignancies: unique genetic events, frozen development and enduring apoptotic potential. **BMC Cancer**, v. 15, n. 11, p. 1-25, 2015.

STEPHENSON, C.M.; LEVIN, R.D.; SPECTOR, T.; LIS, C.G. Phase I clinical trial to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of high-dose intravenous ascorbic acid in patients with advanced cancer. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.72, n.1, p.139-146, 2013.

SUBRAMANI, T.; YEAP, S.K.; HO, W.Y.; HO, C.L.; OMA, A.R.; AZIZ, S.A.; RAHMAN, N.M.A.N.A.; BANU, N. Vitamin C suppresses cell death in MCF-7 human breast cancer cells induced by tamoxifeno. **J. Cell. Mol. Med.** v. 18, n. 2, p. 305-313, 2014.

SUN, W. Ambra1 in autophagy and apoptosis: Implications for cell survival and chemotherapy resistance. **Oncology Letters**, v. 12, p. 367-374, 2016.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TORGOVNICK, A.; SCHUMACHER, B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. 157, p. 1-15, 2015.

VANDGHANOONI, S.; ESKANDANI, M. Comet Assay: A Method to Evaluate Genotoxicity of Nano-Drug Delivery System. **BioImpacts**, v. 1, n. 2, p. 87-97, 2011.

VILLARINI, M.; GIANFREDI, V.; LEVORATO, S.; VANNINI, S.; SALVATORI, T.; MORETTI, M. Occupational exposure to cytostatic/antineoplastic drugs and cytogenetic damage measured using the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay: A systematic review of the literature and meta-analysis. **Mutation research**, v. 1, n.1, p. 1-11, 2016.

VISOVSKY, C. Treatment Considerations for the Management of Patients With Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer. **J. Adv. Pract. Onco.** v. 5, n. 5, p. 321-330, 2014.

ZHANG, W.; FENG, M.; ZHENG, G.; CHEN, Y.; WANG, X.; PEN, B.; YIN, J.; YU, Y.; HE, Z. Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial–mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, p. 679–685, 2012.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização da revisão sistemática sobre o Ácido Ascórbico na prevenção e/ou tratamento do câncer foi observado que ainda há incompatibilidade com relação as doses de ácido ascórbico utilizadas, como também a necessidade de caracterização em relação aos estudos clínicos de seus mecanismos de ação. Desta forma, outros estudos devem ser realizados para o entendimento das variações de dose-reposta, bem como seu direcionamento de mecanismos de ação, tanto como agente antioxidante ou antitumoral, para auxiliar o tratamento e a prevenção do câncer, visando melhor qualidade de vida dos pacientes e população em geral.

No estudo realizado em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, os dados demonstraram que o Ácido Ascórbico teve ações antioxidantes e antígeno-tóxicas frente aos danos induzidos pelos antineoplásicos isolados e em associações. Assim apontamos a realização de outros testes não clínicos e clínicos para elucidar as interferências do Ácido Ascórbico durante terapias oncológicas.

Por fim, foi realizado um estudo com células de Sarcoma 180, onde os dados apontaram que o Ácido Ascórbico na concentração de 50  $\mu\text{M}$  tem efeitos: Anticítotóxico, por interferência na viabilidade celular; Antígeno-tóxicos, por possíveis mecanismos antioxidantes que interferiram sobre os índices de frequências de danos dos antineoplásicos ao DNA de S-180; e Antimutagênicos, pela inibição de anormalidade nucleares do tipo pontes e brotos e por modulação de morte celular, especialmente de apoptoses. Essas atividades do Ácido Ascórbico em Sarcoma 180 são de importância para outros estudos que apontem os riscos de interações entre o Ácido Ascórbico e os antineoplásicos para a eficácia de terapias oncológicas, especialmente durante a ação dos antineoplásicos frente a muitas controvérsias sobre o uso de antioxidante durante as terapias oncológicas.

**ANEXOS**

---

## ANEXO A

## Capa do artigo publicado na Revista da Associação Médica Brasileira

## REVIEW ARTICLE

**Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer**

ANA MARIA OLIVEIRA FERREIRA DA MATA<sup>1</sup>, RICARDO MELO DE CARVALHO<sup>1</sup>, MARCUS VINÍCIUS OLIVEIRA BARROS DE ALENCAR<sup>2</sup>,  
ANA AMÉLIA DE CARVALHO MELO CAVALCANTE<sup>1,2</sup>, BENEDITO BORGES DA SILVA<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Pharmaceutical Science Graduate Program, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brazil

<sup>2</sup>Biotechnology Graduate Program, Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), PI, Brazil

**SUMMARY**

This review is aimed at the systematic mapping of ascorbic acid in the prevention and/or treatment of cancer in clinical and non-clinical studies from 2011 to 2015, in order to understand dose-response variations as well as its mechanisms of action as an antioxidant and antitumor agent. Seventy-eight articles were retrieved from the PubMed/Bireme database, of which only 30 included ascorbic acid in the prevention and/or treatment of cancer. However, there are controversies regarding doses and a lack of clinical studies featuring its mechanism of action more clearly. Other studies are needed to understand dose-response variations, as well as its targeting mechanisms of action, both as an antioxidant and antitumor agent, to assist treatment and prevention of cancer, aiming at better quality of life for both patients and the general population.

**Keywords:** neoplasms, cancer, prevention, ascorbic acid, antioxidants.

Study conducted at Universidade Federal do Piauí and at Rede Nordeste de Biotecnologia, PI, Brazil

Article received: 9/23/2015  
Accepted for publication: 11/8/2015

\* Correspondence:  
Address: Av. Elias Tajra, 1260, apto. 600  
Teresina, Piauí - Brazil  
Postal code: 64049-300  
beneditoborges@globo.com

<http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.62.07.680>

## ANEXO B

### Trabalhos apresentados em eventos

Trabalho “**Ácido Ascórbico como agente antitumoral no tratamento do câncer**” apresentado no III Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste.



III SIMPÓSIO LATINO – AMERICANO DE  
BIOTECNOLOGIA DO NORDESTE - III SLAB  
ENCONTRO LUSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA  
De 11 a 13 de dezembro de 2015 | Parnaíba-PI

#### CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado “**ÁCIDO ASCÓRBICO COMO AGENTE ANTITUMORAL NO TRATAMENTO DO CÂNCER**” de autoria de Stephânia Coelho do Rêgo, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, Ricardo Melo de Carvalho, Marcus Vinícius de Oliveira Barros Alencar, Jadson Silva Teixeira, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Paulo Michel Pinheiro Ferreira, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante, Benedito Borges da Silva foi apresentado no III Simpósio Latino – Americano de Biotecnologia do Nordeste – III SLAB, realizado de 11 a 13 de dezembro de 2015, na categoria pôster.

Teresina, PI, 13 de dezembro de 2015

  
Presidente do III SLAB  
Dr. José Roberto de Almeida Leite

  
Diretor GPI Cursos  
Starley Jone Nogueira Candeira

#### REALIZAÇÃO



Trabalho “**Ácido Ascórbico como agente antioxidante na prevenção e tratamento do câncer**” apresentado no III Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste.



III SIMPÓSIO LATINO – AMERICANO DE  
BIOTECNOLOGIA DO NORDESTE - III SLAB  
ENCONTRO LUSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA  
De 11 a 13 de dezembro de 2015 | Parnaíba-PI

#### CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado “**ÁCIDO ASCÓRBICO COMO AGENTE ANTIOXIDANTE NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DO CÂNCER**” de autoria de Stephânia Coelho do Rêgo, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, Ricardo Melo de Carvalho, Marcus Vinícius de Oliveira Barros Alencar, Rai Pablo Sousa de Aguiar, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Paulo Michel Pinheiro Ferreira, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante, Benedito Borges da Silva foi apresentado no III Simpósio Latino – Americano de Biotecnologia do Nordeste – III SLAB, realizado de 11 a 13 de dezembro de 2015, na categoria pôster.

Teresina, PI, 13 de dezembro de 2015

  
Presidente do III SLAB  
Dr. José Roberto de Almeida Leite

  
Diretor GPI Cursos  
Starley Jone Nogueira Candeira

#### REALIZAÇÃO



Trabalho “Avaliação do potencial oxidativo do 5-Fluorouracil e Docetaxel em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e dos efeitos do Ácido Ascórbico” apresentado no III Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste.



III SIMPÓSIO LATINO – AMERICANO DE  
BIOTECNOLOGIA DO NORDESTE - III SLAB  
ENCONTRO LUSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA  
De 11 a 13 de dezembro de 2015 | Parnaíba-PI

#### CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OXIDATIVO DO 5-FLUOROURACIL E DOCETAXEL EM LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* E DOS EFEITOS DO ÁCIDO ASCÓRBICO" de autoria de Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, Reyca Rodrigues e Silva, Ricardo Melo de Carvalho, Bárbara Cristina Silva Holanda Queiroz, Stefânia Coelho do Rêgo, Débora Cássia Viera Gomes, Marcus Vinícius de Oliveira Barros Alencar, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante, Benedito Borges da Silva foi apresentado no III Simpósio Latino – Americano de Biotecnologia do Nordeste – III SLAB, realizado de 11 a 13 de dezembro de 2015, na categoria pôster.

Teresina, PI, 13 de dezembro de 2015



Presidente do III SLAB  
Dr. José Roberto de Almeida Leite



Diretor GPI Cursos  
Starley Jone Nogueira Candeira

---

REALIZAÇÃO