



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ASSOCIAÇÃO DO PALMITATO DE RETINOL E ÁCIDO ASCÓRBICO FRENTE  
AOS DANOS TOXICOGENÉTICOS DE ANTINEOPLÁSICOS EM DIFERENTES  
SISTEMAS TESTES**

**LEONARDO DA ROCHA SOUSA**

**TERESINA – PIAUÍ**  
**SETEMBRO/2017**

**LEONARDO DA ROCHA SOUSA**

**ASSOCIAÇÃO DO PALMITATO DE RETINOL E ÁCIDO ASCÓRBICO FRENTE  
AOS DANOS TOXICOGENÉTICOS DE ANTINEOPLÁSICOS EM DIFERENTES  
SISTEMAS TESTES**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa**

**TERESINA – PIAUÍ  
SETEMBRO/2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Universidade Federal do Piauí**  
**Serviço de Processamento Técnico**  
**Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde**

S725a Sousa, Leonardo da Rocha.  
Associação do palmitato de retinol e ácido ascórbico frente aos danos toxicogénéticos de antineoplásicos em diferentes sistemas testes / Leonardo da Rocha Sousa. – 2017.  
140 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

“Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa.”  
Bibliografia

1. Antineoplásicos. 2. Ácido ascórbico. 3. Danos toxicogénéticos. 4. Palmitato de retinol. 5. Terapias oncológicas. I. Título. II. Teresina – Universidade Federal do Piauí.

CDD 615.58

**LEONARDO DA ROCHA SOUSA**

**ASSOCIAÇÃO DO PALMITATO DE RETINOL E ÁCIDO ASCÓRBICO FRENTE  
AOS DANOS TOXICOGENÉTICOS DE ANTINEOPLÁSICOS EM DIFERENTES  
SISTEMAS TESTES**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa (Orientador)**  
Campus Senador Helvidio Nunes de Barros – UFPI

---

**Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva (Examinador Interno)**  
Campus Senador Helvidio Nunes de Barros – UFPI

---

**Prof. Dr. Leonardo Henrique Guedes de Moraes Lima (Examinador Externo)**  
Campus Senador Helvidio Nunes de Barros – 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**

Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. Viriato Campelo

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

**FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**

**FARMACÊUTICAS**

Profa. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

*Dedico este trabalho a Deus, pelo dom da vida; à minha família, em especial a minha mãe Maria Josefina da Rocha (in memoriam), minha esposa Joyre Karol e ao meu filho Heitor Rocha pelo apoio e incentivo diário.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida bem como pela saúde e força necessárias para superar os desafios cotidianos.

Aos meus pais, *Maria Josefina da Rocha Sousa (in memoriam)* e *Antônio Eleutério de Sousa* pela vida e por me proporcionarem muitas coisas boas, entre elas, a educação.

A minha esposa *Joyre Karol* pela compreensão, paciência e incentivo no dia-a-dia.

Ao meu filho *Heitor Araújo Rocha* por todos os dias alegrar a minha vida tornando-a mais suave e feliz.

As minhas irmãs *Lívia Rocha* e *Lianna Rocha* pela união e apoio incondicional, sobretudo nos momentos difíceis.

A minha tia *Maria Silva*, meu avô *Emídio João* e aos meus primos *Erivaldo Rocha*, *Everaldo Rocha* e *Jória Rocha* por sempre me ajudarem desde a infância.

Aos meus colegas de trabalho do Instituto Federal do Piauí - IFPI - em especial aos professores *Josemar Júnior*, *Jurecir Silva*, *Márcio Edvandro*, *Leila Maria* e *Ricardo Melo*.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Piauí – UFPI pelo conhecimento transmitido, em especial a professora *Ana Amélia* por ter me dado à oportunidade de iniciar na vida científica através desse projeto de pesquisa e ao meu orientador, professor *João Marcelo*, por ter me ajudado a concluir esse trabalho com “chave de ouro”.

Aos colegas da turma 2016-2017 do PPGCF – UFPI, pelos momentos de alegria bem como por compartilhar os momentos de “sufoco” durante as disciplinas e experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica - LAPGENIC - em especial, *Ricardo Melo*, *José Victor*, *Rosália Tôrres*, *Ag-Anne Melo*, *Antonio Lima*, *Rai Pablo*, *Jadson Teixeira*, *Torequl Islam*, *Ana Maria*, *Márcia Fernanda*, *Antonielly Campinho*, *Williams Filho* e *Nárcia Mariana*.

Aos colaboradores do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF), em especial, *Sr. Orlando*, *Sr. Ary*, *Sr. Senna* e *Dona Ivelta*.

Aos colaboradores do PPGCF, em especial a *Suyanne* e a *Sávia* pela boa vontade de sempre ajudar quando precisei de algo.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

... *Muitíssimo Obrigado!*

*"Só sei que nada sei!"*

*Sócrates*



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**AA** – Ácido Ascórbico

**AC** – Esquema quimioterápico composto por ciclofosfamida e doxorubicina

**ALT** – Alanina aminotransferase

**AR** – Ácido retinóico

**AST** – Aspartato aminotransferase

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

**ATRA** – All trans retinoic acid

**CA** – Câncer

**CAT** - Catalase

**CHCM** – Concentração de hemoglobina corpuscular média

**CPA** – Ciclofosfamida

**CuZnSOD** – Superóxido dismutase cobre-zinco

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**DOX** – Doxorubicina

**ENC** – Eritrócito normocromático

**EPC** – Eritrócito policromático

**EROs** – Espécies Reativas de Oxigênio

**FD** – Frequência de Danos

**GB** – Glóbulos Brancos

**GV** – Glóbulos Vermelhos

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

**Hb** – Hemoglobina

**HCM** – Hemoglobina corpuscular média

**Ht** – Hematócrito

**ID** – Índice de danos

**INCA** – Instituto nacional do câncer

**MN** – Micronúcleo

**MnSOD** – Produto do gene SOD2

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** – ânion superóxido

**OH<sup>•</sup>** – Radical hidroxila

**PLT** – Plaquetas

**PR** – Palmitato de retinol

**QT** – Quimioterapia

**RDW** – Distribuição de eritrócitos

**RLs** – Radicais Livres

**RNA** – Ácido ribonucleico

**SOD** – Superóxido Dismutase

**SOD1** – Superóxido Dismutase Citoplasmática

**SOD1/CAT1** – Duplo Mutante (Superóxido Dismutase Citoplasmática + Catalase)

**SOD1/SOD2** – Duplo Mutante (Superóxido Dismutase Citoplasmática + Superóxido Dismutase Mitocondrial)

**SOD2** – Superóxido Dismutase Mitocondrial

**SVCT** – Transportador de Vitamina C dependente de Sódio

**VCM** – Volume corpuscular médio

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

**Figura 1.** Divisão esquemática do corpo da dissertação.

**Figura 2.** Estrutura química da Ciclofosfamida.

**Figura 3.** Estrutura química da Doxorubicina.

**Figura 4.** Estrutura química do Palmitato de retinol.

**Figura 5.** Estrutura química do Ácido ascórbico.

**Figura 6.** Teste *Allium cepa*.

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Semeio das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* para determinação do potencial oxidante ou antioxidante de compostos.

**Figura 2.** Modulação (%) do Palmitato de Retinol (PR) e Ácido Ascórbico (AA) em associação sobre a citotoxicidade induzida por ciclofosfamida (CPA: 20 µg/mL), doxorubicina (DOX: 2 µg/mL) e Esquema AC (DOX e CPA: 2/20 µg/mL) em náuplios por meio do Bioensaio de Letalidade em *Artemia salina* (BSLB). ANOVA-*One-way* e pós-teste de *Tukey*. n=30 por tratamento. Valores significantes (MD±DP) de p<0.001\*\*\* para <sup>a</sup> comparado à CPA, <sup>b</sup> à DOX e <sup>c</sup> comparado ao Esquema AC.

### CAPÍTULO II

**Figura 1.** Perfil fotomicrográfico das células sanguíneas de camundongos tratados somente com as vitaminas antioxidantes, assim como, pelos antineoplásicos ciclofosfamida (CPA), doxorubicina (DOX), e esquema AC (CPA + DOX) isolados e associados com estas vitaminas, todas analisadas por ensaio Cometa.

**Figura 2.** Modulação (%) do palmitato de retinol e ácido ascórbico em associação sobre os danos genotóxicos induzidos por ciclofosfamida (CPA: 20 mg/kg), doxorubicina (DOX: 2 mg/kg) e Esquema AC (DOX e CPA: 2/20 mg/kg) em sangue periférico de *Mus musculus* por meio do teste cometa: índice de danos (A) e frequência de danos (B). ANOVA-*One-way* e pós-teste de *Bonferroni*. n=5. Valores significantes de p<0,001 para <sup>a</sup> comparado ao grupo tratado com CPA, para <sup>b</sup> comparado ao grupo tratado com DOX e para <sup>c</sup> comparado ao grupo tratado com o Esquema AC.

**Figura 3.** Modulação (%) do palmitato de retinol e ácido ascórbico em associação sobre os danos genotóxicos induzidos por ciclofosfamida (CPA: 20 mg/kg), doxorubicina (DOX: 2 mg/kg) e Esquema AC (DOX e CPA: 2/20 mg/kg) em medula óssea de *Mus musculus* por meio do teste cometa: índice de danos (C) e frequência de danos (D). ANOVA-*One-way* e pós-teste de *Bonferroni*.  $n=5$ . Valores significantes de  $p<0,001$  para <sup>a</sup> comparado ao grupo tratado com CPA, para <sup>b</sup> comparado ao grupo tratado com DOX e para <sup>c</sup> comparado ao grupo tratado com o Esquema AC.

**Figura 4.** Modulação (%) do palmitato de retinol e ácido ascórbico em associação sobre o número de micronúcleos (MN) induzidos por ciclofosfamida (CPA: 20 mg/kg), doxorubicina (DOX: 2 mg/kg) e Esquema AC (DOX e CPA: 2/20 mg/kg) em medula óssea de *Mus musculus* por meio do teste de micronúcleos. ANOVA-*One-way* e pós-teste de *Bonferroni*.  $n=5$ . Valores significantes de  $p<0,05$  para <sup>a</sup> comparado ao grupo tratado com CPA, <sup>b</sup> comparado ao grupo tratado com DOX e <sup>c</sup> comparado ao grupo tratado com o Esquema AC.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Esquema dos tratamentos dos náuplios (*Artemia salina*) e das cebolas (*Allium cepa*) com os químicos e/ou as vitaminas.

**Tabela 2.** As linhagens de levedura *S. cerevisiae* que foram utilizadas no estudo.

**Tabela 3.** Protocolo experimental em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tabela 4.** Média  $\pm$  desvio padrão (DP) do percentual (%) de mortalidade dos náuplios tratados com os quimioterápicos de forma isolada e em associação com vitaminas antioxidantes (palmitato de retinol e ácido ascórbico) por meio do Bioensaio de Letalidade em *Artemia salina* (BSLB).

**Tabela 5.** Efeitos tóxicos e citotóxicos dos quimioterápicos ciclofosfamida, doxorrubicina e esquema AC e a modulação destes pela associação do palmitato de retinol (PR) com o ácido ascórbico (AA) em células meristemáticas de *Allium cepa*. ANOVA-*One-way* e pós-teste de *Tukey*. Valores de significância, <sup>a</sup>: comparado ao controle negativo (CN); <sup>b</sup>: comparado ao controle positivo (CP); <sup>c</sup>: comparado à ciclofosfamida; <sup>d</sup>: comparado à doxorrubicina; <sup>e</sup>: comparado ao esquema AC.  $p < 0.01$ .

**Tabela 6.** Efeitos mutagênicos dos quimioterápicos ciclofosfamida, doxorrubicina e esquema AC e a modulação destes pela associação do palmitato de retinol (PR) com o ácido ascórbico (AA) em células meristemáticas de *Allium cepa*. ANOVA-*One-way* e pós-teste de *Tukey*. Valores de significância, <sup>a</sup>: comparado ao controle negativo (CN); <sup>b</sup>: comparado ao controle positivo (CP); <sup>c</sup>: comparado à ciclofosfamida; <sup>d</sup>: comparado à doxorrubicina; <sup>e</sup>: comparado ao esquema AC.  $p < 0.01$ .

**Tabela 7.** Inibição de crescimento induzidos por ciclofosfamida, doxorrubicina e esquema AC, e co-tratamento com o palmitato de retinol e ácido ascórbico em associação, em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Dados obtidos pela inibição de crescimento em placas (0-40 mm).

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Esquema dos tratamentos dos animais com os químicos.

**Tabela 2.** Avaliação dos danos genotóxicos induzidos por ciclofosfamida (CPA), doxorrubicina (DOX), e Esquema AC (CPA + DOX), e a modulação destes pelo Palmitato de Retinol (Vitamina A) associado ao Ácido Ascórbico (Vitamina C) em células sanguíneas de *Mus musculus* por meio do ensaio Cometa.

**Tabela 3.** Avaliação da ação antimutagênica e anticitotóxica do Palmitato de Retinol (Vitamina A) e Ácido Ascórbico (Vitamina C) em associação frente a ação tóxica induzida

por ciclofosfamida (CPA), doxorrubicina (DOX), e Esquema AC (CPA + DOX) em células de medula óssea não tumorais de *Mus musculus* por meio do teste de micronúcleos (MN).

**Tabela 4.** Parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Mus musculus* tratados com os antineoplásicos ciclofosfamida (CPA: 20mg/Kg), doxorrubicina (DOX: 2mg/Kg) e esquema AC (CPA e DOX: 20/2 mg/kg) e a modulação destes pelo Palmitato de Retinol (100 UI/kg) em associação com o Ácido Ascórbico (2 µM/Kg). ANOVA-*one-way* e pós-teste de *Tukey*. Significância de <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparado ao CN; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com CPA; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com DOX e <sup>d</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com o Esquema AC. Todos comparados em relação ao mesmo parâmetro.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	17
<b>ABSTRACT</b>	18
<b>INTRODUÇÃO</b>	19
<b>OBJETIVOS</b>	22
<b>2.1 Gerais</b>	22
<b>2.2 Específicos</b>	22
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	23
<b>3.1 Câncer</b>	23
<b>3.2 Estresse oxidativo e o papel das espécies reativas no câncer</b>	24
<b>3.3 Os antineoplásicos</b>	26
3.3.1 Ciclofosfamida	27
3.3.2 Doxorrubicina	29
3.3.3 Esquema AC	30
<b>3.4 Efeitos colaterais do tratamento quimioterápico</b>	30
<b>3.5 Palmitato de Retinol</b>	32
<b>3.6 Ácido Ascórbico</b>	34
<b>3.7 Modelos de estudo para o monitoramento de fármacos</b>	36
3.7.1 Bioensaios de letalidade em <i>Artemia salina</i> (BSLB)	36
3.7.2 Bioensaio <i>Allium cepa</i>	37
3.7.3 Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
3.7.4 Ensaio cometa	39
3.7.5 Teste de micronúcleos	40
<b>REFERÊNCIAS</b>	42

## CAPÍTULO I

<b>A ASSOCIAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO COM O PALMITATO DE RETINOL MODULA DANOS TOXICOGENÉTICOS INDUZIDOS POR QUIMIOTERÁPICOS</b>	55
<b>RESUMO</b>	57
<b>ABSTRACT</b>	58
<b>1 Introdução</b>	59
<b>2 Materiais e Métodos</b>	61

2.1 Obtenção e preparo das substâncias	61
2.2 Bioensaios de letalidade em <i>Artemia salina</i> (BSLB)	61
2.3 Teste <i>Allium cepa</i>	62
2.4 Linhagens de leveduras utilizadas	63
2.5 Teste do disco central em <i>S. cerevisiae</i>	64
2.6 Modulação dos danos oxidativos e citotóxicos da CPA, DOX e esquema AC pela influência do palmitato de retinol em associação com o ácido ascórbico	66
2.7 Análise estatística	66
<b>3 Resultados</b>	67
3.1 Avaliação da citotoxicidade dos quimioterápicos e os efeitos modulatórios do PR em associação com o AA perante os antineoplásicos por meio do teste de <i>A. salina</i>	67
3.2 Avaliação toxicogenética dos antineoplásicos e os efeitos modulatórios do PR em associação com o AA frente aos quimioterápicos por meio do teste de <i>A. cepa</i>	68
3.3 Avaliação dos danos oxidativos induzidos pelos antineoplásicos e os efeitos modulatórios do PR em associação com o AA frente aos quimioterápicos em <i>S. cerevisiae</i>	73
<b>4 Discussão</b>	75
<b>5 Conclusão</b>	78
<b>6 Referências</b>	79

## CAPÍTULO II

<b>DANOS TOXICOGENÉTICOS INDUZIDOS POR ANTINEOPLÁSICOS EM <i>Mus musculus</i> SÃO MODULADOS PELA ASSOCIAÇÃO DO PALMITATO DE RETINOL COM O ÁCIDO ASCÓRBICO</b>	83
<b>RESUMO</b>	85
<b>ABSTRACT</b>	86
<b>1 Introdução</b>	87
<b>2 Materiais e Métodos</b>	89
2.1 Preparo dos fármacos e das vitaminas	89
2.2 Tratamento dos animais com os químicos	89
2.3 Teste cometa em sangue periférico e medula óssea de camundongos <i>Mus musculus</i>	90
2.4 Teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongos <i>Mus musculus</i>	91
2.5 Cálculo da relação eritrocítica em medula óssea	91



2.6 Modulação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos da CPA, DOX e esquema AC pela influência do palmitato de retinol em associação com o ácido ascórbico	92
2.7 Parâmetros hematológicos e bioquímicos	92
2.8 Análise estatística	92
<b>3 Resultados</b>	93
3.1 Avaliação do efeito antigenotóxico do palmitato de retinol em associação com o ácido ascórbico frente à CPA, DOX e esquema AC	93
3.2 Avaliação da capacidade antimutagênica e anticitotóxica do PR em associação com o AA frente aos mecanismos tóxicos da CPA, DOX e esquema AC	96
3.3 Análise hematológica e bioquímica do PR associado com o AA frente a alterações induzidas pela CPA, DOX e esquema AC	98
<b>4 Discussão</b>	101
<b>5 Conclusão</b>	104
<b>6 Referências</b>	105
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	110
<b>ANEXOS</b>	111

**Associação do palmitato de retinol e ácido ascórbico frente aos danos toxicogenéticos de antineoplásicos em diferentes sistemas testes. LEONARDO DA ROCHA SOUSA.** Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa. 140p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF, Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2017.

## RESUMO

O uso de antioxidantes durante a quimioterapia ainda apresenta controvérsias, devido aos riscos de modular a eficácia das terapias oncológicas. O objetivo do estudo foi verificar os possíveis efeitos da associação entre o palmitato de retinol e o ácido ascórbico diante dos danos toxicogenéticos de antineoplásicos em diferentes sistemas testes, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, *Allium cepa*, *Artemia salina* e *Mus musculus* com aplicação de biomarcadores citogenéticos e análises hematológicas e bioquímicas. O palmitato de retinol (100 UI/mL) em co-tratamento com o ácido ascórbico (2 µM/mL) foi testado frente a ciclofosfamida (20 µg/mL), doxorrubicina (2 µg/mL) e esquema AC (20/2 µg/mL) em *S. cerevisiae*, *A. cepa* e *A. salina*. As doses em *Mus musculus* foram: ácido ascórbico (2 µM/kg); palmitato de retinol (100 UI/kg); ciclofosfamida (20 mg/kg); doxorrubicina (2 mg/kg) e esquema AC (20/2 mg/kg). Em *S. cerevisiae* os danos oxidativos citoplasmáticos e mitocondriais induzidos pelos antineoplásicos foram significativamente modulados pela associação entre os antioxidantes, assim como os efeitos tóxicos e citotóxicos em *A. cepa* e *A. salina*. Em *Mus musculus* a associação do palmitato de retinol com o ácido ascórbico diminuiu significativamente o índice e a frequência de danos ao DNA bem como os efeitos aneugênicos e/ou clastogênicos e citotóxicos em células não neoplásicas de medula óssea e sangue periférico. As alterações bioquímicas e hematológicas induzidas pelos antineoplásicos também foram minimizadas. Os dados apontam que a associação dos antioxidantes em estudo apresenta significantes efeitos antitóxicos/anticitotóxicos, antígeno tóxicos e antimutagênicos protegendo os organismos de instabilidades genéticas. Entretanto, esses efeitos, se observados em células tumorais podem comprometer a eficácia das terapias oncológicas, pela modulação toxicogenética dos antineoplásicos.

**Palavras-chave:** Antineoplásicos; Ácido ascórbico; Danos toxicogenéticos; Palmitato de retinol; Terapias oncológicas.

**Association of retinol palmitate and ascorbic acid against toxicogenic damages induced by antineoplastic agents in different test systems. LEONARDO DA ROCHA SOUSA.** Advisor: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa. 140p. Masters dissertation. Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences - PPGCF, Federal University of Piauí - UFPI, 2017.

### ABSTRACT

The use of antioxidants during chemotherapy is still controversial because the risks of modulating the efficacy of cancer therapies. Therefore, the aim of the study was to verify the effects of the association of retinol palmitate and ascorbic acid on the toxicogenic damages of antineoplastics in *Saccharomyces cerevisiae*, *Allium cepa*, *Artemia salina* and *Mus musculus* with application of cytogenetic biomarkers, and hematological and biochemical analyzes. Retinol palmitate (100 IU/mL) in co-treatment with ascorbic acid (2  $\mu$ M/mL) was tested against cyclophosphamide (20  $\mu$ g/mL), doxorubicin (2  $\mu$ g/mL) and AC scheme (20/2 mg/mL) in *S. cerevisiae*, *A. cepa* and *A. salina*. The doses in *Mus musculus* were: ascorbic acid (2  $\mu$ M/kg); Retinol palmitate (100 IU/kg); Cyclophosphamide (20 mg/kg); Doxorubicin (2 mg/kg) and AC scheme (20/2 mg/kg). In *S. cerevisiae* the cytoplasmic and mitochondrial oxidative damage induced by antineoplastic agents were significantly modulated by the association between antioxidants, as well as toxic and cytotoxic effects in *A. cepa* and *A. salina*, as well as the mutagenic effects in *A. cepa*. In *Mus musculus* the association of retinol palmitate with ascorbic acid significantly decreased the rate and frequency of DNA damage as well as aneugenic and/or clastogenic and cytotoxic effects in non-neoplastic cells of bone marrow and peripheral blood. The biochemical and hematological changes induced by antineoplastic agents were also minimized. The data indicate that the association of antioxidants in the study has significant antitoxic/anticytotoxic, antigenotoxic and antimutagenic effects protecting organisms from genetic instabilities. However, these effects if observed in non-tumor cells may compromise the efficacy of cancer therapies by the toxicogenic modulation of antitumor mechanisms of antineoplastic agents.

**Keywords:** Ascorbic acid; Antineoplastic agents; Toxicogenic damages; Retinol palmitate; Oncology therapies.

## 1 INTRODUÇÃO

---

Os antineoplásicos utilizados na quimioterapia acarretam danos ao DNA e podem elevar o nível de estresse oxidativo, podendo culminar na morte de células cancerosas por apoptose. A quimioterapia ainda é uma das principais formas de se tratar o câncer, na qual são utilizadas drogas citotóxicas que geram danos ao DNA, culminando com a morte de células cancerosas, e também, drogas citostáticas que interferem na síntese de DNA e na mitose, interrompendo a reprodução das células e levando-as a um estágio de senescência. Essas drogas são capazes de causar o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, culminando na indução de danos celulares pelas espécies reativas de oxigênio (EROS) e favorecendo o aumento da geração de radicais livres (POLJSAK; ŠUPUT; MILISAV, 2013). Uma gama de químicos são usados de forma isolada ou em associação durante a terapia do câncer (FREEDMAN; PATRIDGE, 2011; SWIFT; GOLSTEYN, 2014). A ciclofosfamida (CPA), por exemplo, é um importante quimioterápico utilizado no tratamento do câncer, pois induz elevado número de apoptoses (DAI et al., 2013; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007) que, dentre outros, está relacionado à ação de espécies reativas de oxigênio (FARSHID, TAMADDONFARD, RANJBAR, 2013).

Existem relatos de que vitaminas antioxidantes, administradas em altas doses, podem ser uma opção terapêutica ao lado da quimioterapia, com vantagem demonstrada pela redução do tamanho do tumor e/ou aumento da longevidade (DRISKO; CHAPMAN; HUNTER, 2003; CONKLIN, 2000). Por outro lado, antioxidantes, em baixas doses, também têm o potencial para reduzir a produção de radicais livres de quimioterápicos, o que pode levar a redução da morte de células cancerosas (SALGANIK, 2001). Assim, o uso de nutrientes antioxidantes, tais como as vitaminas A e C, durante a quimioterapia, são bastante controversos, pois por um lado podem afetar a eficiências das drogas e por outro pode ser utilizado em conjunto com a terapia de antineoplásicos para reduzir seus efeitos oxidativos, especialmente em células não neoplásicas, e melhorar as condições dos pacientes além de aumentar sua sobrevida. Ainda não existe um consenso se os efeitos dessas vitaminas são benéficos durante o tratamento do câncer (HEINE-BRÖRING et al., 2015; XU et al., 2013).

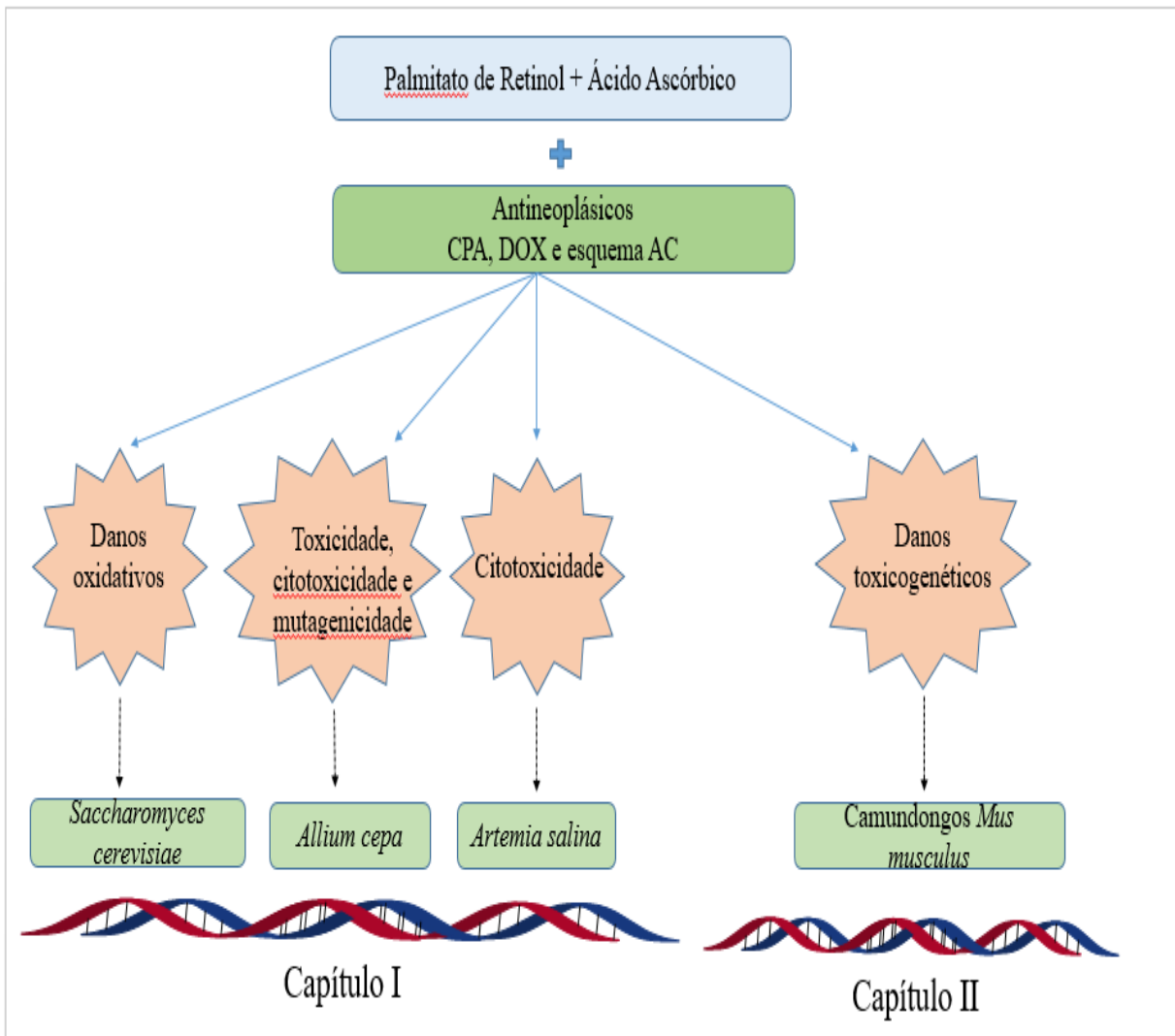
Biomarcadores citogenéticos de danos oxidativos em *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pombe* são importantes para mensurar os mecanismos de alterações na fidelidade de replicação, sensibilidade a lesões no DNA, bem como os mecanismos de

respostas celulares a esses danos (SKONECZNA; KANIAK; SKONECZNY, 2015). A resposta celular a danos oxidante/antioxidante ao DNA desses fungos é semelhante à resposta de células de mamíferos e 30% dos genes relacionados a doenças humanas apresentam genes homólogos funcionais em leveduras (DE LA TORRE-RUIZ; PUJOL; SUNDARAN, 2015). Além disso, análises para detecção de danos ao material genético, geralmente, são realizadas com aplicação de diversos testes não clínicos, em estudos *in vitro* e *in vivo*, a exemplo dos testes cometa, micronúcleos, *Allium cepa*, *Artemia salina*, aberrações cromossômicas e mutações de genes em roedores (GAJARDO; BEARDMORE, 2012).

As agências reguladoras e a comunidade científica têm aceitado o Teste de Micronúcleos, em medula óssea de camundongos, como ferramenta apropriada para avaliar a segurança de um produto (VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2007). Além disso, as análises dos valores normais e os possíveis desvios do número de células e as taxas dos componentes não celulares do sangue, os quais são analisados através de parâmetros hematológicos e bioquímicos, permitem observar a extensão da homeostase, as alterações resultantes de processos patológicos e da singularidade dos dados obtidos a partir de procedimentos experimentais (BRANCO et al., 2011).

Diante da necessidade de compreender os possíveis efeitos interativos palmitato de retinol (PR) em co-tratamento com o ácido ascórbico (AA) frente às ações toxicogênicas dos antineoplásicos, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos desses antioxidantes frente aos danos toxicogênicos dos antineoplásicos ciclofosfamida (CPA), doxorubicina (DOX) e esquema AC (CPA+DOX) por meio a aplicação de biomarcadores citogenéticos *in vivo* em *S. cerevisiae*, *Allium cepa*, *Artemia salina* e em células não tumorais de medula óssea e de sangue periférico de *Mus musculus*. A presente dissertação (**Figura 1**) está organizada em dois capítulos sendo um estudo não-clínico da atividade do PR em co-tratamento com o AA frente aos danos citotóxicos, mutagênicos e oxidativos induzidos por quimioterápicos em *Artemia salina*, *Allium cepa* e *S. cerevisiae* (**Capítulo I**) assim como os seus efeitos frente aos danos toxicogênicos dos antineoplásicos em *Mus musculus* através do teste cometa, teste de micronúcleos e testes hematológicos e bioquímicos (**Capítulos II**).

**Figura 1.** Desenho esquemático da dissertação “A associação do palmitato de retinol e ácido ascórbico frente aos danos toxicogénéticos de antineoplásicos em diferentes sistemas testes”



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da associação do palmitato de retinol (PR) e o ácido ascórbico (AA) sobre os danos toxicogénicos induzidos pelos antineoplásicos ciclofosfamida (CPA) e doxorubicina (DOX) e esquema AC.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos antioxidantes do PR + AA frente aos danos oxidativos induzidos pela CPA, DOX e esquema AC em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, proficientes e mutadas em defesas antioxidantes para a superóxido dismutase e catalase;
- Verificar os efeitos do PR + AA na toxicidade, citotoxicidade e em alterações ao material genético induzidas pelos antineoplásicos CPA, DOX e esquema AC em *Allium cepa* e *Artemia salina*;
- Avaliar os possíveis efeitos do PR + AA frente aos danos toxicogénicos da CPA, DOX e esquema AC em células de medula óssea e de sangue periférico em camundongos *Mus musculus* por meio dos testes *in vivo* de cometa e micronúcleos;
- Determinar a influência do PR + AA sobre as alterações hematológicas e bioquímicas induzidas pelos antineoplásicos em *Mus Musculus*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

---

#### 3.1 Câncer

O câncer é definido como o crescimento descontrolado de células que podem invadir e se espalhar para locais distantes do corpo, gerando consequências graves para a saúde, além de ser uma das principais causas de morte a nível mundial (LOURO, 2000). O câncer pode surgir a partir de células que adquiriram mutações genéticas em genes que controlam o ciclo celular, o crescimento celular, a morte celular e o reparo do DNA (MCCARTHY, 2010), resultando em modificações progressivas por alterações na proliferação, diferenciação e na interação das células com o meio extracelular (COTRAN et al., 2000). As mutações podem ser causadas por agentes genotóxicos, ou seja, que afetam a integridade estrutural do DNA, resultando na quebra das fitas de DNA, instabilidade cromossômica e anormalidades nas enzimas de reparo, as quais contribuem para a carcinogênese (PAZ-Y-MIÑO et al., 2012; OMABE; OKOROOCHA, 2011). Essa patologia se tornou um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, causando mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos dez milhões de casos novos anuais de câncer, cinco milhões e meio são diagnosticados nos países em desenvolvimento (INCA, 2017).

Os cânceres constituem a enorme carga da sociedade uma vez que cerca de 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes ocorreram em 2012 em todo o mundo. Em países menos desenvolvidos, representam cerca de 57% dos casos e 65% das mortes (TORRE et al., 2015). O câncer é uma das 100 doenças mais severas e para intervenção terapêutica em estudos clínicos ainda são necessários estudos em animais com uso de modelos experimentais de câncer em ratos, bem como em linhagens celulares humanas para a descoberta de mecanismos de ação de novos fármacos, com busca de compostos naturais e /ou sintéticos que possam melhorar a terapia e qualidade de vida de pacientes com câncer. Cabe enfatizar que existem similaridades entre animais e humanos quanto ao comportamento biológico, resposta à terapia e a agentes citotóxicos (CEKANOVA; RATHORE, 2014).



As alterações que geram mutações são causadas por agentes físicos e químicos do meio ambiente ou produtos da própria célula levando ao processo de carcinogênese em três estágios (iniciação, promoção e progressão), gerando um acúmulo de mutações no DNA, principalmente em genes envolvidos na ordem dos eventos do ciclo de divisão celular, que são responsáveis por consertar erros de replicação do material genético ou diferenciação celular (BELIZÁRIO, 2002).

Com o crescente aumento populacional e o envelhecimento contínuo da população, o perfil epidemiológico do câncer tem sofrido alterações, afetando significativamente o impacto das neoplasias no cenário mundial (VERAS; 2007). O estilo de vida da sociedade moderna contribui para aumentar a exposição da população a alguns fatores ambientais, nutricionais, químicos e hormonais potencialmente carcinogênicos (SILVA et al., 2004). Mesmo na ausência de qualquer exposição significativa de agentes exógenos, as células de mamíferos acabam mantendo milhares de lesões no DNA pró-mutagênicas todos os dias, onde atividades metabólicas normais estão associadas com a hidrólise, desaminação, alquilação e oxidação, acabando por infligir danos às bases nitrogenadas, quebras de cadeia simples, rupturas de filamentos duplos e entre cadeias de ligação cruzada (HASTY et al., 2003; BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006). Nesse sentido, o reparo dos erros ou a apoptose são necessários para manter a integridade do material genético, pois na ausência ou perda da capacidade de reparo a essas atividades há resultados genotóxicos onde as células que acumulam vários danos no DNA e não entram em apoptose acabam por perpetuar os danos quando há replicação de seu material genético gerando um processo que resulta em câncer (KLAPACZ et al., 2016).

### **3.2 Estresse oxidativo e o papel das espécies reativas no câncer**

As espécies reativas encontram-se relacionadas com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, aterosclerose, câncer e AIDS, bem como no processo de envelhecimento (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). A produção de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas (BARBOSA et al., 2010; GARCIA-SOUZA; OLIVEIRA, 2014). A contínua produção de radicais livres em processos metabólicos resulta no desenvolvimento de

mecanismos de defesa antioxidante que tem o objetivo de limitar os níveis intracelulares de radicais livres e controlar a ocorrência de danos decorrentes (BARBOSA et al., 2010).

O estresse oxidativo é causado pela produção de radicais livres, que são espécies químicas que contém um ou mais elétrons desemparelhados e têm sido implicados na patogênese de muitas doenças. São instáveis e podem reagir com diversos compostos celulares (FREEMAN, 2012). Os elétrons livres que caracterizam o radical estão, geralmente, nos átomos de oxigênio, enxofre e nitrogênio, culminando no surgimento das chamadas espécies reativas. Dentre estas, destacam-se as espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs), as derivadas de nitrogênio (ERNs) resultantes da decomposição do óxido nítrico (NO); e as derivadas de enxofre (EREs), formadas a partir de reações de tióis com EROs. Por sua vez, as EROs incluem o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), oxigênio singlete ( $O^2$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) e o radical hidroperoxila ( $HO^2\bullet$ ) (ABDALLA; FAINE, 2008; CAROCHO; FERREIRA, 2012). As espécies reativas são formadas em concentrações fisiológicas e degradada durante o metabolismo aeróbico normal nas células. No entanto, o aumento da produção descontrolada destas espécies pode resultar em danos oxidativos de biomoléculas, tais como lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico, interrompendo assim a função celular podendo induzir apoptose ou necrose (GARCIA-SOUZA; OLIVEIRA, 2014).

Quando as espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERNS) excedem as capacidades de desintoxicação, pode ocorrer danos oxidativos em lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas. Se este dano for irreparável, a célula vai sofrer morte celular, sob a forma de apoptose ou necrose, dependendo da extensão do dano. A hidroxila reativa ( $OH\bullet$ ) é a EROS mais reativa para o DNA, e pode danificar o material genético via adição de H ou de alceno (COOKE et al., 2003).

O processo de estresse oxidativo leva a resultados que podem ser bastante danosos às células, variando bastante entre organismos, tipos celulares e até mesmo entre células de um mesmo tecido, devido à diversificada capacidade antioxidante das células (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006). Há evidências de que o estresse oxidativo pode ser um mecanismo de fator de risco/patogênico (GRAHAME; SCHLESINGER, 2012) estando envolvido em mais de 100 doenças, como a sua causa ou consequência (POLJŠAK et al. 2011).

Existem diversos mecanismos que podem levar à carcinogênese, onde um deles é a produção excessiva de radicais livres e espécies reativas de oxigênio. EROS estão associadas a danos na fita ou alterações nas bases nitrogenadas, ou ainda, modificações de desoxirribose, as quais podem gerar danos como apoptose e mutações (BERTOLOZZO et al., 2010). Além disso, as EROS podem: 1) induzir danos ao DNA no estágio de iniciação, por meio da indução de mutações, alterações na estrutura e mau funcionamento dos mecanismos do DNA; 2) contribuir para expressão anormal de genes, bloqueio da comunicação celular e modificações nos sistemas de sinalização, promovendo o aumentando da proliferação celular durante o estágio de promoção; ou, 3) podem participar nos estágios de progressão do câncer, por meio da promoção de novas mutações (REUTER et al., 2010; SOSA et al., 2016). O estresse oxidativo também acelera a erosão dos telômeros e promove o envelhecimento biológico. O encurtamento dos telômeros, em si, parece ser uma causa de aumento das taxas de morbidade e mortalidade, tanto diretamente, com a função do tecido normalmente declinando gradualmente e, indiretamente, com o acúmulo de células senescentes acelerando o desenvolvimento de patologias (GRAHAME; SCHLESINGER, 2012).

Para evitar e combater os efeitos deletérios causados por radicais livres, o organismo desenvolve mecanismos de defesas antioxidantes, enzimáticas ou não enzimáticas, capazes de retardar ou retardar a oxidação de um substrato por radicais livres, mantendo a homeostase do status redox (equilíbrio nos processos de oxidação e redução) do organismo (RACCHI, 2013). As principais defesas antioxidantes enzimáticas são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Pxs), responsáveis por reduzir  $H_2O_2$  em água ( $H_2O$ ) e oxigênio (PAMPLONA; COSTANTIN et al., 2011). Os antioxidantes não enzimáticos incluem compostos de baixo peso molecular, como a vitamina C (ácido ascórbico), a vitamina A (retinóides, carotenoides e palmitato de retinol), a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e a glutathiona (GSH) que são capazes de neutralizar os radicais livres oriundos das EROs (PORTANTIOLO et al., 2014; BIRBEN et al., 2012).

### **3.3 Os antineoplásicos**

Uma das principais maneiras de se tratar o câncer é através da quimioterapia, na qual são utilizadas drogas citotóxicas, que geram danos ao DNA, culminando com a morte de células cancerosas, e drogas citostáticas, que interferem na síntese de DNA e na mitose, interrompendo a reprodução das células e levando-as a um estágio de senescência

(FREEDMAN; PATRIDGE, 2011). A quimioterapia tem um papel de destaque na eficiência do tratamento oncológico, tanto nos casos de neoadjuvância pré-cirúrgicos, como terapia adjuvante pós-cirúrgico (SHIN et al., 2017; CRUZ-MERINO et al., 2016). Uma gama de químicos, aplicados para estas finalidades, são usados de forma isolada ou em associação terapêutica, denominados quimioterápicos ou antineoplásicos (SWIFT; GOLSTEYN, 2014).

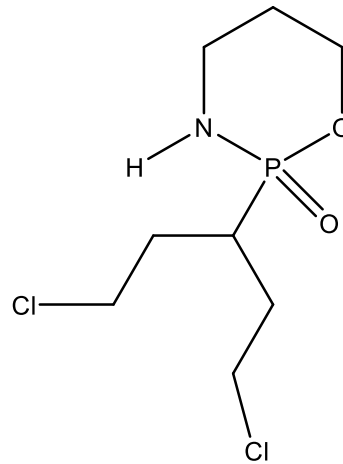
Os antineoplásicos são substâncias citotóxicas que atuam no processo de proliferação celular, e tem como objetivos a indução de apoptose em células neoplásicas (BASU et al., 2015; DAI et al., 2013). Os quimioterápicos podem ser classificados em agentes alquilantes, antimetabólitos, compostos de platina, antibióticos, produtos vegetais, hormônios e análogos e agentes diversos (MALUF; ERDTMANN, 2000). Os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer incluem Doxorubicina, Cisplatina, 5-Fluorouracil e Ciclofosfamida (GALLUZZI et al., 2012; CHENNURU; SALEEM, 2013; WANG et al., 2015), todavia, devido a não-seletividade destas drogas, as mesmas podem afetar células normais, levando a surgimento de inúmeros e agressivos efeitos adversos nos pacientes durante a quimioterapia (DE ALMEIDA et al., 2005).

A resistência aos quimioterápicos está sendo o maior problema no tratamento do câncer e seu entendimento se faz necessário para desenvolver mecanismos moleculares mais eficazes no combate as defesas desenvolvidas pelas células tumorais (GÖNENÇ et al., 2013). Os diferentes tipos de genótipo humano junto com as mutações tumorais são fatores importantes nos estudos de antineoplásicos, tanto nos seus mecanismos de ação como nos riscos que eles trazem a saúde do indivíduo (HANIGAN et al., 2013).

### 3.3.1 *Ciclofosfamida*

A ciclofosfamida é um agente alquilante citotóxico, cujos metabólitos, tais como a mostarda de fosforamida, reagem diretamente com o DNA e proteínas, produzindo *crosslinks*, efetuando seu efeito antineoplásico (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008; JAIN; JAIN, 2012) (**Figura 2**). Durante os esforços para modificar a estrutura química da mostarda de nitrogênio para conseguir maior seletividade para as células cancerosas, acabaram por sintetizar a ciclofosfamida em 1958 (ARNOLD; BOURSEAUX; BROCK, 1958). A ciclofosfamida foi um dos primeiros agentes racionalmente concebidos para seletivamente matar as células cancerosas (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009).

**Figura 2:** Estrutura química da ciclofosfamida.



**Fonte:** Adaptado de Sánchez-Suárez et al. (2008).

A ciclofosfamida, pertence ao grupo dos agentes alquilantes, uma classe de moléculas citotóxicas, que possuem, em comum, uma habilidade de tornar-se compostos eletrofílicos fortes, que formam ligações covalentes com os grupos do DNA. O mecanismo de ação consiste na acilação com substituição nucleofílica (SN1 ou SN2) do DNA, preferencialmente a 7N-guanina, 6O-guanina e 3N-citosina (KOROKOLVAS; KOROKOLVAS; CUNHA, 2002; HAUBITZ et al., 2002).

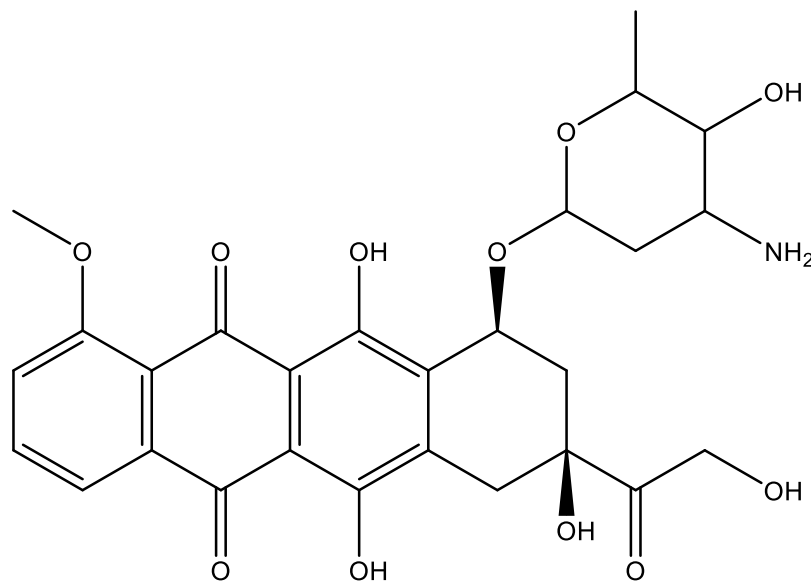
Por ser um agente alquilante não-específico é capaz de induzir vários tipos de danos ao DNA, dentre eles danos oxidativos, mutações genéticas e aberrações cromossômicas (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008; DHESI et al., 2013; NAITO et al., 2015). A alta toxicidade da droga está relacionada, principalmente, à geração de radicais livres em tecidos normais e órgãos, levando ao processo de estresse oxidativo (ROY; CHAKRABORTY; BHATTACHARYA, 2014). Para a minimização dos efeitos adversos induzidos pela toxicidade de ciclofosfamida, são adotados protocolos de combinação da droga com substâncias antioxidantes e citoprotetivas (BASU et al., 2015). A ciclofosfamida é uma das poucas drogas com uma ampla indicação no tratamento do câncer. Embora seja eficaz como agente único em neoplasias malignas, geralmente é usado em combinação com outros agentes antineoplásicos (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009). Estudos demonstraram que a ciclofosfamida induz estresse oxidativo em ratos, o qual pode ser combatido pela administração de antioxidantes estereoespecíficos (WEI et al., 2012). Além disso, o estresse oxidativo e os danos ao DNA induzidos por ciclofosfamida podem ser minimizados com a

administração oral de um composto de organoselênio com propriedades antioxidantes (ROY; CHAKRABORTY; BHATTACHARYA, 2014).

### 3.3.2 Doxorubicina

A quimioterapia permanece um dos melhores tratamentos para vários tipos de câncer, mas geralmente é dificultada pela distribuição desfavorável do medicamento o que resulta em efeitos secundários graves (KUMAR et al., 2017). Uma série de fármacos anticancerígenos, incluindo a doxorubicina (DOX) (**Figura 3**), exerce os seus efeitos induzindo apoptose. A principal via apoptótica dos fármacos anticancerígenos atua através da perda da integridade da membrana mitocondrial (KAUFMANN; EARNSHAW, 2000).

**Figura 3.** Estrutura química da doxorubicina.



Fonte: De Carvalho, 2017.

A doxorubicina é um antineoplásico da classe das antraciclinas, onde as propriedades gerais dos fármacos nesta classe incluem: a interação com o DNA numa variedade de modos diferentes incluindo a intercalação, a quebra da cadeia de DNA (DRUGBANK, 2017; BENYETTOU et al., 2015) e a inibição com a enzima topoisomerase II (DRUGBANC, 2017; MIZUTANI et al., 2005). As antraciclinas estão entre as drogas antitumorais mais importantes disponíveis, como por exemplo, a doxorubicina, que atua na inibição da topoisomerase I e II, responsáveis pela separação das cadeias duplas de DNA durante a replicação, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) e conduzindo danos ao DNA, morte celular por

apoptose, estimulação da ligação a p53-DNA, ativação da cascata de caspase, e reticulação do DNA (MINOTTI et al., 2004, CORTES-FUNES; CORONADO, 2007). Danos no DNA relacionados a topoisomerase II é seguido por parada do crescimento em G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> e morte celular programada (ATTIA; BAKHEET, 2013).

A doxorrubicina é amplamente utilizada para o tratamento de vários tumores sólidos (DRUGBANK, 2017) bem como pode também inibir a atividade da polimerase, afetar a regulação da expressão genética e produzir danos através de radicais livres incorporados ao DNA. A DOX possui um efeito antitumoral contra um amplo espectro de tumores, sejam eles enxertados ou espontâneos. (DRUGBANK, 2017).

### 3.3.3 Esquema AC

O tratamento moderno do câncer compreende cada vez mais a quimioterapia combinada, e às vezes, em associação com outros métodos de tratamento, incluindo terapias alvo, terapias gênicas e imunoterapia (MIOIA; PERVELLINI, 2000; LUTTERBECK; MACHADO; KUMMERER, 2015). Em geral, os quimioterápicos são empregados em associações visando à utilização de menores doses e buscando o sinergismo entre esses fármacos, favorecendo uma relação de risco/benefício mais favorável ao paciente. (MALDONADO; LIMPER; JETT, 2012). Os esquemas quimioterápicos existentes mais aplicáveis em terapias oncológicas são: FAC (5- Fluorouracil + Doxorrubicina + Ciclofosfamida), AC-T (Ciclofosfamida + Doxorrubicina + Taxol ou Paclitaxel) e AC (Doxorrubicina + Ciclofosfamida) (GOMES JÚNIOR et al., 2015).

A combinação de doxorrubicina e ciclofosfamida, esquema AC, é usualmente considerada como uma terapia de primeira linha em pacientes com câncer de mama recém-diagnosticados (SALEEM et al., 2016) e apresenta aplicação terapêutica no tratamento neoadjuvante de cânceres, tornando-se um padrão terapêutico em pacientes com estadiamento tumoral avançado (VRIENS et al., 2013).

## 3.4 Efeitos colaterais do tratamento quimioterápico

A terapêutica do câncer por ser restrita, individualizada, complexa e diferenciada, acarreta em grandes déficits à saúde pública como um todo, seja pela árdua adesão dos pacientes, complicações e altos custos do tratamento, ou por conta dos agressivos efeitos

adversos (alopecia, distúrbios dietéticos, circulatórios, toxicidade sanguínea, hepática, cardíaca entre outros) que culminam em um maior sofrimento do paciente oncológico (TYKWINSKA et al., 2013; LQUBAL et al., 2014; TANG et al., 2014).

A quimioterapia, um dos principais tratamentos do câncer, utiliza substâncias químicas que atuam eletivamente em células em mitose, visando destruir células cancerosas. Infelizmente, os radicais livres produzidos com essa terapia são muitas vezes uma fonte de efeitos colaterais graves, tais como a nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, leucopenia, trombopenia entre outros (BADAJATIA et al. 2010, SPENCER et al. 2005). A grande dificuldade no tratamento de câncer por agentes quimioterápicos se deve a grande semelhança existente entre as células neoplásicas e células normais, o que compromete a ação seletiva dos antineoplásicos, levando ao surgimento de efeitos adversos (DE ALMEIDA et al., 2005). No estudo de novas drogas, o desenvolvimento de antineoplásicos com modos de ação mais seletivos a células tumorais são priorizados, uma vez que os mecanismos mais comuns são a indução de danos ao DNA e apoptose, características estas que também são responsáveis por causar efeitos colaterais no indivíduo (LEE et al., 2012).

Os antineoplásicos garante um melhor prognóstico ao paciente, todavia, ainda causam efeitos comprometedores em sistemas essenciais em razão da falta de seletividade tecidual (ARAN et al., 2016; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). Os quimioterápicos apresentam potencial toxicogenético às células cancerosas e não cancerosas, a exemplo da ciclofosfamida (CPA) (BASU et al., 2015; ZHU et al., 2015) e da doxorubicina (DOX) (TACAR; SRIAMORNSAK; DASSA, 2012; BAMODU et al., 2015) o que leva a efeitos colaterais graves (TANG et al., 2014).

O tratamento com a ciclofosfamida pode causar efeitos adversos como náuseas e vômitos que são comuns da administração de ciclofosfamida e são mais proeminentes com dosagens intermediárias e alta. A alopecia reversível também é comum, especialmente com altas dosagens de ciclofosfamida. A diarreia é incomum com a administração oral de ciclofosfamida, mas pode ocorrer após terapêutica com doses elevadas (JAYACHANDRAN et al., 2008). Além disso, o tratamento com CPA em doses cumulativas poder levar a um aumento da incidência de câncer (MOLLOY; LANGFORD, 2008).

A administração direta de DOX no organismo, a baixa absorção celular e a distribuição de forma irregular, resultam em efeitos secundários indesejáveis e toxicidade para



as células normais (ARYA et al., 2009). Devido a não seletividade da DOX, esta pode também induzir apoptose em células normais, levando a quadros de toxicidade no cérebro, fígado, rins e coração (MAKSIMENKO et al., 2014). Estudos demonstram que a utilização da doxorubicina pode levar a geração exacerbada de ERO's, os quais podem mediar os mecanismos de cardiotoxicidade nos pacientes tratados (VINCENT et al., 2013).

Os antineoplásicos são tóxicos a diversos sistemas biológicos. Sendo assim, variações dietéticas são recomendadas a pacientes oncológicos a fim de contribuir com os efeitos terapêuticos e reduzir os efeitos colaterais e adversos oriundos do tratamento quimioterápico (VRIENS et al., 2013; MADEDDU et al., 2016). Devido aos efeitos colaterais dos quimioterápicos, a prescrição de suplementação vitamínica com a vitamina C (ácido ascórbico) e a vitamina A (palmitato de retinol) está sendo muito utilizada ultimamente (DE CARVALHO et al. 2017; SUBRAMANI et al., 2014). Entretanto, esta suplementação pode ocasionar um efeito antagônico aos efeitos dos antineoplásicos, interferindo em sua ação e eficácia (WANG; WANG; YU, 2014), ou podendo atuar intensificando enzimas de reparo de DNA (WEAKLEY et al., 2010). Estudos *in vitro* e em animais sugerem que os antioxidantes, a exemplo das vitaminas A e C, em altas doses aumentam os efeitos dos antineoplásicos (PATHAK et al., 2005). O AA administrado por via intravenosa apresenta redução significativa de efeitos colaterais induzidos por antineoplásicos (VOLLBRANCTH et al., 2011), mas a suplementação de antioxidantes durante a quimioterapia diminui os efeitos do tratamento (GREENLEE et al., 2012).

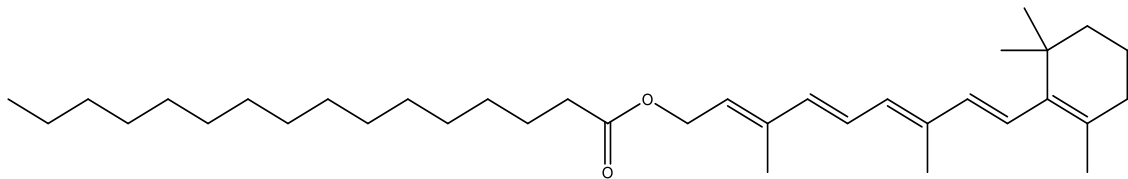
As vitaminas A, C e E são capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio, oriundas entre o desequilíbrio, entre as defesas antioxidantes e o estresse oxidativo provocado por doenças como o câncer ou pelo seu tratamento. Desta forma, os antioxidantes, como o ácido ascórbico, por exemplo, podem auxiliar tanto na prevenção do câncer ou no seu tratamento, através da redução dos efeitos colaterais relacionadas à quimioterapia (PORTANTIOLO et al., 2014).

### **3.5 Palmitato de retinol**

A vitamina A representa um grupo de compostos retinóides lipossolúveis, incluindo o retinol, ácido retinóico e ésteres de retinil, sendo essencial para a função celular normal, incluindo a reprodução e o desenvolvimento (**Figura 4**). O éster de retinol, palmitato de retinol e o ácido palmítico desempenham um papel importante na fisiologia biogênica

(SKLAN, 1987; DE CARVALHO, 2017). A ação fisiológica da vitamina A é exercida principalmente através de suas formas ativas, identificadas como all-trans e ácido 9-cis retinóico, onde estes ácidos retinóicos se ligam especificamente a receptores do ácido retinóico (RARs) e receptores retinóides 'X' (RXRs) (MANGELSDORF; UMESONO; EVANS, 1994).

**Figura 4:** Estrutura química do palmitato de retinol.



Fonte: De Carvalho, 2017.

O palmitato de retinol,  $C_{36}H_{60}O_2$ , (**Figura 6**) é um análogo alcoólico da vitamina A, que induz a síntese de elastina e colágeno no tecido cutâneo, retardando o envelhecimento cutâneo precoce, o que justifica sua aplicabilidade em produtos farmacêuticos de estética e cosmética corporal. Tendo em vista que a estrutura química básica dos derivados e metabólitos do retinol é a mesma, e os seus ésteres, como o palmitato de retinol, apresentam uma maior estabilidade na presença de luz e oxigênio. O PR é conhecido por seus potentes efeitos antioxidantes no combate aos radicais livres (NIH, 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

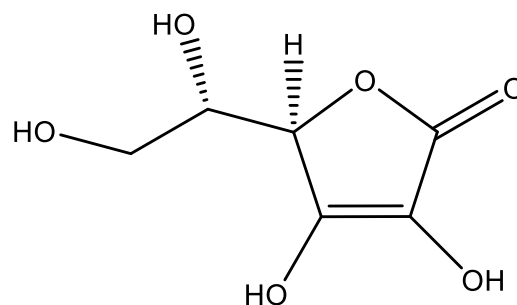
A suplementação de vitaminas antioxidantes, como os derivados ou precursores da vitamina A, entre eles, retinol, palmitato de retinol e carotenoides são comumente introduzidos em consonância aos esquemas quimioterápicos (RAHAL et al., 2014). A adequação suplementar de vitamina A está associado com a regulação da peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes (CHA; YU; SEO, 2016).

O palmitato de retinol tem a capacidade de modulação do estresse oxidativo e redução de danos citogenéticos frente ao tratamento de antineoplásicos como a doxorrubicina, ciclofosfamida e o esquema AC se mostrando um importante modulador de danos frente aos antineoplásicos (DE CARVALHO et al., 2017).

### 3.6 Ácido ascórbico

A vitamina C (**Figura 5**) é uma lactona antioxidante solúvel em água (MAMEDE et al., 2012) com um papel predominantemente protetor (CHATTERJEE, 1973). Apesar do fato da maioria dos mamíferos poderem sintetizar ascorbato, os seres humanos, juntamente com outros primatas, morcegos e cobaias, são incapazes de produzir vitamina C como resultado de uma mutação no gene que codifica a L-gulono-1,4- Lactona oxidase, a última enzima na via biossintética do ácido ascórbico (AA) (CHATTERJEE, 1973). O organismo humano não é capaz de sintetizar o AA endogenamente e, portanto, deve ser obtido a partir de fontes exógenas (MAMEDE et al, 2012; MAMEDE et al., 2011), tais como frutas, verduras ou na sua forma industrializada (KUO, 2013; STINCO et al., 2014). Esta vitamina participa de processos fisiológicos importantes, como promoção da absorção do ferro, formação de colágeno, cicatrização de feridas, efeitos anti-inflamatórios e potencializa a resposta inflamatória (CHEN et al., 2016). A deficiência desta vitamina pode levar à deformação de ossos ou outros tecidos duros do organismo (EL-SHAFEI; SALEH, 2016).

**Figura 5:** Estrutura química do ácido ascórbico.



Fonte: ChemBioDraw, 2016.

O papel potencial de antioxidantes dietéticos como o ácido ascórbico dentre outros, para reduzir a atividade das reações induzidas por radicais livres tem atraído atenção (CHAWDA, 2011). Embora controverso, segundo Coklin 2004, a administração de antioxidantes não reduz o efeito antitumoral de agentes citotóxicos. Além disso, outros estudos mostram um aumento da sobrevivência dos animais coadministrados com

antioxidantes em comparação com a sobrevivência dos animais que receberam a quimioterapia sozinhos (HAQ; NIGAR; REHMAN, 2017).

O AA tem sido relatado como um eficaz protetor contra danos oxidativos causados por vários compostos (HUY; HE; HUY, 2008), mas por outro lado, também foi observado que o potencial efeito citotóxico do ácido ascórbico é devido sua capacidade de aumentar o estresse oxidativo (DU et al., 2012) e sua aplicabilidade contra células tumorais se deve ao fato que estas possuem uma redução nas defesas antioxidantes de catalase e superóxido dismutase (LI; SCHELLHORN, 2007), aumento nos transportadores de glicose (GLUT), que transportam o desidroascorbato para o meio intracelular (GONZÁLEZ et al., 2005), o que reduz ainda mais as defesas antioxidantes, além do fato dessas células possuírem mitocôndrias sensíveis aos radicais peróxido (CHEN et al., 2007). O AA pode ser absorvido por diferentes tipos de células, por meio de transportadores de vitamina C dependentes de sódio (SVCT-1 e SVCT-2) ou por ácido desidroascórbico, sendo acumulado via transportadores facilitadores de glicose independentes de sódio (GLUTs), seguindo de sua redução intracelular (AZZOLINI et al., 2013).

O uso dessa vitamina no tratamento do câncer começou a ser avaliada em 1970 sendo administrada por via venosa resultando em citotoxicidade tumoral (FRÖMBERG et al., 2011) embora os mecanismos ainda não sejam completamente elucidados. No entanto, sua utilização durante a terapia ainda é controversa, uma vez que o AA pode apresentar diferentes papéis durante os processos oxidativos, agindo como antioxidante ou oxidante (VAN DER REEST; GOTTLIEB, 2016). Segundo Lee (2009), o AA pode: 1) proteger células e tecidos contra efeitos do estresse oxidativo, por via antioxidante, reduzindo a concentração intracelular de EROs; ou, 2) acelerar o metabolismo oxidativo, por via pró-oxidante, ajudando a inibir a proliferação de células tumorais, mas não de células normais.

Doses intravenosas de vitamina C têm sido utilizadas como suplementação dietária durante o tratamento do câncer, uma vez que pode aumentar a circulação periférica e a resposta imunológica (DUCONGE et al., 2007). Quando o AA é administrado oralmente, suas concentrações plasmáticas são fortemente controladas, enquanto que as injeções intravenosas ultrapassam o sistema de absorção intestinal, podendo aumentar sua concentração citoplasmática, a qual pode levar a uma citotoxicidade no tumor (PIRES et al., 2016). A teoria mais aceita pelos estudos mais recentes é que o ácido ascórbico, quando utilizado em baixas doses com os antineoplásicos, apresenta um efeito antioxidante, atenuando assim a ação

destes fármacos (AKOLKAR et al., 2015; WANG et al., 2016). A concentração normal de ácido ascórbico no plasma humano é cerca de 40 a 80  $\mu\text{M}$ , e é nessa concentração que a vitamina C endógena age como antioxidante. (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012).

O ácido ascórbico tem a capacidade de modulação do estresse oxidativo e redução de danos citogenéticos frente ao tratamento de antineoplásicos como a doxorrubicina, ciclofosfamida e o esquema AC se mostrando um importante modulador de danos frente aos antineoplásicos (ALENCAR et al., 2016).

### **3.7 Modelos de estudo para o monitoramento de fármacos**

#### *3.7.1 Bioensaios de letalidade em Artemia salina*

A avaliação de citotoxicidade é indispensável para considerar uma substância ou tratamento seguro. Compostos bioativos são quase sempre tóxicos em altas doses. Portanto, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido durante o fracionamento de extratos. O ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural, já que muitos laboratórios de pesquisa não estão preparados para a realização de ensaios biológicos (RUIZ et al., 2005) se popularizando como bioensaio principalmente a partir da década de 90 (LHLLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006).

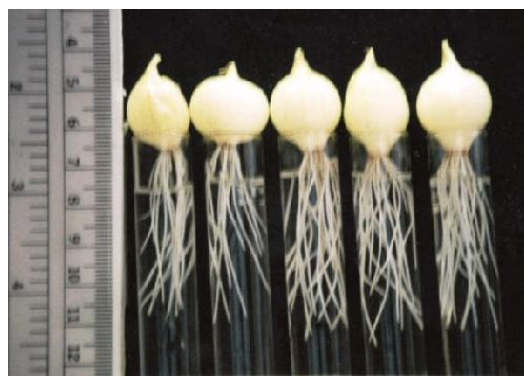
O teste de citotoxicidade com *Artemia salina* é um método simples na pesquisa toxicológica (MEYER ET al., 1982) onde os cistos dos microcrustáceos são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco, possuindo uma boa correlação com testes de toxicidade aguda oral *in vivo* (PARRA et al., 2001), quanto em linhagem de células humanas (CARBALHO et al., 2002). O ensaio determina valores de concentração letal média (CL50), em  $\mu\text{g/mL}$ , de compostos e extratos, sendo que inúmeras substâncias ativas conhecidas apresentam citotoxicidade por este teste (MEYER et al., 1982).

### 3.7.2 Bioensaio *Allium cepa*

Sistemas testes vegetais são de grande importância na avaliação de riscos de genotoxicidade sendo enfatizado que apesar das diferenças entre os metabolismos de plantas e animais, há também similaridades, e que a ativação de pró-mutagênicos em plantas possui alta relevância, pois seres humanos consomem plantas tratadas com agentes químicos (FISKEJO, 1994). Os estudos citogenéticos de espécies vegetais informam a respeito de possíveis alterações cromossômicas nas plantas devido à presença de agentes mutagênicos na sua composição ou decorrentes do seu metabolismo. O estudo dos mutagênicos em núcleos eucarióticos vem sendo observado através de métodos citológicos. A mutação pode resultar da ação de compostos químicos, ambientais e radioativos e da estabilidade intrínseca dos ácidos nucleicos (BAGATINI; DA SILVA; TEDESCO, 2007).

Existe uma variedade de plantas que são utilizadas para ensaios de toxicidade, no entanto uma das mais conhecidas e bem estabelecidas plantas utilizadas em bioensaios citogenéticos é o *Allium cepa*. A cebola pode germinar facilmente e as raízes coletadas são simples de armazenar. Os fatores macroscópicos e microscópicos podem ser avaliados nessa espécie sem muito esforço (LIMAN, 2013). Finalmente, é importante observar que existe uma relação entre os resultados obtidos a partir de bioensaios de plantas e outros sistemas de ensaio (FIRBAS; AMON, 2013; MAITI et al., 2016), o que aumenta a sua utilidade (**Figura 6**).

**Figura 6:** Teste *Allium cepa*.



Fonte: FIRBAS; AMON, 2013.

Plantas superiores, como *Allium cepa*, têm sido amplamente utilizadas em testes de genotoxicidade para detectar e avaliar a influência de substâncias em um organismo (ARYA; MUKHERJEE, 2014). O Programa Internacional de Segurança Química (IPCS –

*International Programme on Chemical Safety*) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP – *United Nations Environment Programme*) certificaram o bioensaio de *Allium cepa* como um método padrão para o monitoramento genotóxico de poluentes ambientais (RAJESHWARI et al., 2016).

Bioensaios com *A. cepa* se mostram bastante econômicos, além de bem sensíveis, e os resultados apresentam uma boa correlação com sistemas de testes de mamíferos (HEMACHANDRA; PATHIRATNE, 2016). As razões para escolher *A. cepa* como um modelo *in vivo* para avaliar os efeitos tóxicos são devido suas raízes poderem crescer em contato direto com qualquer substância de interesse, possuírem um número estável de cromossomos e cariótipos, mostrar uma fase mitótica clara, a ocorrência de danos cromossômicos espontâneos ser rara, mostrar uma resposta rápida aos materiais genotóxicos, apresentar diversidade de morfologia cromossômica e ser considerado como um teste de baixo custo (RAJESHWARI et al., 2016; TEDESCO E LAUGHINGHOUSE IV, 2012).

Na investigação de aberrações cromossomais, cebolas comuns da espécie *A. cepa* constituem sistemas testes bastante adequados para estimar os efeitos nocivos de químicos, em função de suas excelentes condições cromossômicas (ABU; EZEUGWU, 2011). A influência de substâncias genotóxicas pode ser determinada pela análise do tipo e frequências de células com metáfase, anáfase e telófase aberrantes, e também pela determinação de micronúcleos nas células em interfase (EL-SHAHABY et al., 2003).

### 3.7.3 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Por serem organismos eucariontes unicelulares simples, de fácil manuseio, fácil cultivo e rápida multiplicação celular, as leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* são padronizadas como modelos de pesquisa para análise de propriedades tóxicas e/ou oxidantes em várias substâncias como medicamentos e extratos (HOSTETTER; OSBORN; DE ROSE, 2012).

A *Saccharomyces cerevisiae* tem sido amplamente utilizada como modelo eucariótico no estudo da elucidação de mecanismos metabólicos, por conta da semelhança da sua maquinaria celular e dos processos metabólicos desempenhados pela levedura, e da fácil manipulação genética (KARATHIA et al., 2011; GONZALEZ-PEREZ et al., 2012; TONGUL; TARHAN, 2016). Além disso, existe uma grande semelhança entre o sistema de

defesas antioxidantes da levedura e o sistema de eucariotos superiores (GIANNATTASIO et al., 2013). Por este motivo, o modelo biológico de *S. cerevisiae* tem sido amplamente utilizado em estudos do mecanismo de resposta celular a condições de estresse, como também do perfil oxidante/oxidativo de diversos compostos naturais e sintéticos (AZAD et al., 2013; HÖFERL et al., 2014; ODRIOZOLA-SERRANO et al., 2016).

No teste de *S. cerevisiae* são utilizadas linhagens proficientes ou mutadas em suas defesas antioxidantes, comumente utilizadas na avaliação da atividade de compostos, naturais ou sintéticos, frente aos mecanismos de defesa antioxidante destes organismos. Tendo em vista que a existência de enzimas antioxidantes são funcionalmente semelhantes à de humanos, a extrapolação de resultados comparativos quanto a segurança na liberação do uso de fármacos e a consolidação de protocolos terapêuticos torna-se mais eficaz (OLIVEIRA et al., 2014). Antioxidantes não enzimáticos, como polifenóis, o ácido ascórbico e o palmitato de retinol são compostos que também podem proteger as células da levedura contra agentes oxidantes, mas os mecanismos que levam a esta resposta ainda não estão bem esclarecidos (DE CARVALHO et al. 2017; GAMERO-SANDEMETRIO et al., 2014).

#### 3.7.4 Ensaio cometa

O ensaio cometa é uma técnica importante no campo de pesquisa para decifrar mecanismos genéticos e processos relacionados com danos no DNA/reparação subjacentes. Esta técnica pode ser utilizada como uma técnica sensível para avaliar os danos de DNA induzidos por condições de estresse (SANTOS; POURRUT; OLIVEIRA, 2015). Com alta sensibilidade para detectar genotoxicidade, o ensaio cometa pode detectar ampla variedade de compostos com potencial genotóxico desconhecido e também detectar um nível baixo de genotoxicidade de compostos genotóxicos já conhecidos afim de evitar resultados falso negativos (KAWAGUCHI et al., 2010). Cabe enfatizar que o ensaio cometa é um teste simples, barato, rápido e sensível na caracterização de danos ao DNA, sendo, portanto, amplamente utilizado como um biomarcador genotóxico (DEUTSCHMANN et al., 2016). Além disso, este teste requer uma baixa quantidade de células por amostras e apresenta uma alta sensibilidade para detectar níveis pequenos de danos ao DNA (GANAPATHY et al., 2016). Uma das vantagens mais importantes do ensaio do cometa é que os danos do DNA podem ser medidos em qualquer tipo de célula (SASAKI et al., 2000; DE LAPUENTE et al., 2015).



A técnica do ensaio cometa tradicionalmente utiliza suspensões de células, que são incorporadas em agarose sobre uma lâmina e levada ao microscópio. As células são expostas a lise por exposição a soluções de detergente e sal elevado (AZQUETA; LORENZO; COLLINS, 2009) permitindo a remoção de membranas e componentes celulares solúveis, deixando um DNA nucleóide super-enrolado (AZQUETA et al., 2011). Após serem submetidas a eletroforese, os fragmentos de DNA migram para o ânodo, formando a cauda do cometa, onde a quantidade de quebras na cadeia é em geral proporcional à quantidade de DNA na cauda, respectivamente, para o DNA remanescente na cabeça (HOVHANNISYAN, 2010). Após realização do teste, as células são exibidas em forma de cometas, os quais são escorados quantitativamente e qualitativamente, e são mais exuberantes quanto maior o dano (GLEI; SCHNEIDER; SCHLÖRMANN, 2016).

O efeito genotóxico de diversas substâncias e drogas utilizadas na quimioterapia tem sido testado por meio do teste cometa. Logeshwaran et al. (2016) demonstraram o efeito genotóxico de produtos utilizados no combate a incêndios por meio do teste cometa em células meristemais de raízes de *Allium cepa*. Ghassemi-Barghi e colaboradores (2016) realizaram a análise da fragmentação de DNA em células HepG<sub>2</sub> por meio do teste cometa. O efeito genotóxico dos antineoplásicos azidotimidina, acetilaminofluoreno, isobutiraldeído e cisplatina também foi verificado por teste cometa em células hepáticas e do estômago de ratos machos em um estudo realizado por Kraynak et al. (2016).

### 3.7.5 Teste de micronúcleos

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 (FENECH, 2011; PEJCHAL et al., 2011).

Os micronúcleos são expressos em células em divisão que contêm rupturas cromossômicas sem centrômeros (fragmentos acêntricos) e/ou cromossomos inteiros que não conseguem viajar para os polos do fuso durante a mitose. Durante a telófase, um invólucro

nuclear se forma ao redor dos cromossomos e fragmentos atrasados, que se desenrolam e assumem gradualmente a morfologia de um núcleo interfásico, com a exceção de que são menores que os núcleos principais na célula. Dessa forma, a presença do micronúcleo fornece um índice conveniente e confiável de quebra de cromossomos e perda de cromossomos (SUNDARARAJAN; NATARAJAN; KANCHANA, 2017). A marcação de MN pode ser realizada facilmente em diferentes tipos de células relevantes para a biomonitorização humana: linfócitos, fibroblastos e células epiteliais esfoliadas, sem qualquer passo adicional de cultura in vitro (FENECH, 2000). Além disso, há evidências ligando frequência de micronúcleos em linfócitos periféricos de indivíduos saudáveis, com o risco de câncer (BONASSI et al., 2007).

## REFERÊNCIAS

- ABU, N.E.; MBA, K. Mutagenicity testing of pharmaceutical effluents on *Allium cepa* root tip meristems. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 3, p.44-51, 2011.
- AKOLKAR, G.; BAGCHI, A.; JASSAL, D.; SINGAL, P. Vitamin C reduces doxorubicin-induced nitrosative stress by regulation of nitric oxide synthase. **Canadian Journal of Cardiology**, n. 10, v. 31, p: S66, 2015.
- ALENCAR, M. V. O. B.; ISLAM, MD. T.; ROCHA, L. M. C.; QUEIROZ, J. L.; SILVA, M. B. S.; MATA, A. M. O. F. et al. Ascorbic Acid Modulates Doxorubicin and Cyclophosphamide-Induced Cytogenetic Damages in Sarcoma 180 Cells. **International Archives of Medicine**, v. 9, n. 181, 2016.
- ARAN, V.; VICTORINO, A. P.; THULER, L. C.; FERREIRA, C. G. Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. **Clinical Colorectal Cancer**, In Press, Corrected Proof, 2016.
- ARNOLD, H.; BOURSEAUX, F.; BROCK, N. Chemotherapeutic action of a cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B 518-ASTA) in experimental tumours of the rat. **Nature**, v. 181, n. 4613, p. 931-931, 1958.
- ARYA, S.; GRAILER, J. J.; PILLA, S.; STEEBER, D. A.; GONG, S. Doxorubicin conjugated gold nanoparticles as water-soluble and pH-responsive anticancer drug nanocarriers. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 42, p. 7879-7884, 2009.
- ARYA, S.; MUKHERJEE, A. Sensitivity of *Allium cepa* and *Vicia faba* towards cadmium toxicity. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 14, p. 447-458, 2014.
- ATTIA, S. M.; BAKHEET, S. A. Effect of dihydrokainate on the capacity of repair of DNA damage and apoptosis induced by doxorubicin. **Mutagenesis**, v. 28, p. 257–261, 2013.
- AZAD, G. K.; SINGH, V. TOMAR, R. S. Assessment of the Biological Pathways Targeted by Isocyanate Using N-Succinimidyl N-Methylcarbamate in Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.
- AZQUETA, A.; LORENZO, Y.; COLLINS, A. R. In vitro comet assay for DNA repair: a warning concerning application to cultured cells. **Mutagenesis**, p. gep009, 2009.
- AZQUETA, A.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. R. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1, p. 41-45, 2011.
- AZZOLINI, C.; FIORANI, M.; CERIONI, L.; GUIDARELLI, A.; CANTONI, O. Sodiumdependent transport of ascorbic acid in U937 cell mitochondria. **IUBMB Life**, v. 65, p. 149–53, 2013.

BAGATINI, M. D.; DA SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de Allium cepa como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revis brasileira de farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 444-447, Sept. 2007.

BAMODU, O. A.; HUANG, W. C.; TZENG, D. T.; WU, A.; WANG, L. S.; YEH, C. T.; CHAO, T. Y. Ovatodiolide sensitizes aggressive breast cancer cells to doxorubicin, eliminates their cancer stem cell-like phenotype, and reduces doxorubicin-associated toxicity. **Cancer Letters**, v. 364, p. 125–134, 2015.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BASU, A.; BHATTACHARJEE, A.; SAMANTA, A.; BHATTACHARYA, S. Prevention of cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and genotoxicity: Effect of an l-cysteine based oxovanadium (IV) complex on oxidative stress and DNA damage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 747–757, 2015.

BELIZÁRIO, J. E. O próximo desafio reverter o câncer. **Ciência hoje**, v. 31, n. 184, p. 50-57, 2002.

BENYETTOU, F.; REZGUI, R.; RAVAUX, F.; JABER, T.; BLUMER, K.; JOUIAD, M. L.; MOTTE, L.; OLSEN, J.C.; PLATAS-IGLESIAS, C.; MAGZOUN, M.; TRABOLSI, A. Synthesis of silver nanoparticles for the dual delivery of doxorubicin and alendronate to cancer cells. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 36, p. 7237-7245, 2015.

BERRA, C. M.; C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340, 2006.

BERTOLOZZO, E. L.; FREIRE-MAIA, D. V.; LERCO, M. M.; PLÁCIDO, M. S.; HENRY, M. A. C. D. A. Avaliação dos danos do DNA na mucosa esofágica e sangue periférico de portadores da doença do refluxo gastroesofágico. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (ABCD)**, p. 217-221, 2010.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M. P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M. R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625-631, 2007.

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 17, 2002.

- CEKANOVA, M.; RATHORE, K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations Drug Design, **Development and Therapy** 2014;8 1911–1922.
- CHA, J. H.; YU, Q. M.; SEO, J. S. Vitamin A supplementation modifies the antioxidant system in rats. **Nutrition research and practice**, v. 10, n. 1, p. 26-32, 2016.
- CHATTERJEE, I. B. Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. **Science**, v. 182, n. 4118, p. 1271-1272, 1973.
- CHAWDA, H. S. Prospective study of antioxidants, its mechanism and potential role in cancer. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Science**, v. 2, p. 888-894, 2011.
- CHEN, Q.; ESPEY, M. G.; SUN, A. Y.; LEE, J. H.; KRISHNA, M. C.; SHACTER, E.; CHOYKE, P. L.; POOPUT, C.; KIRK, K. L.; BUETTNER, G. R.; LEVINE, M. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 21, p. 8749-8754, 2007.
- CHEN, Y.; ZHENG, H.; ZHANG, J.; WANG, L.; JIN, X.; GAO, W. Protective effect and potential mechanisms of Wei-Chang-An pill on high-dose 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 90, p. 200-211, 2016.
- CHENNURU, A; SALEEM, M. T. Antioxidant, lipid lowering and membrane stabilization effect of sesamol against doxorubicin- induced cardiomyopathy in experimental rats. **BioMed Research International**, v. 20, n. 13, p. 205-220, 2013.
- CHEON, DJ, ORSULIC, S. Mouse models of cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:95–119.
- CONKLIN, Kenneth A. Cancer chemotherapy and antioxidants. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 11, p. 3201S-3204S, 2004.
- COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 10, p. 1195-1214, 2003.
- CORTÉS-FUNES, H.; CORONADO, C. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. **Cardiovascular Toxicology**, v. 7, n. 2, p. 56-60, 2007.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1400p.
- CRUZ-MERINO, L.; CHIESA, M.; CABALLERO, R.; ROJO, F.; PALAZÓN, N.; CARRASCO, F.H.; SÁNCHEZ-MARGALET, V. Breast Cancer Immunology and Immunotherapy: Current Status and Future Perspectives. **International Review of Cell and Molecular Biology**, 2016.
- DAI, R.Y.; ZHAO, X. F.; LI, J. J.; CHEN, S. K.; ZHANG, C. Y.; DUAN, C. Y.; LIU, Y. P.; FENG, C. H.; XIA, X. M.; LI, H.; WANG, H. Y. Implication of transcriptional repression in compound C-induced apoptosis in cancer cells. **Cell Death & Disease**, v.4, n.10, p. 9-15, 2013.

DE ALMEIDA, V.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, n. 1, p. 118-129, 2005.

DE CARVALHO, R. M.; AGUIAR, R. P.; ISLAM, M. T.; DE ALENCAR, M. V.; DA MATA, A. M.; BRAGA, A. L.; JÚNIOR, J. J.; SOUSA, L. D.; DE LIMA, R. M.; PAZ, M. F.; SOUSA, J. M.; MELO-CAVALCANTE, A. A. Cytogenotoxicological defense of retinyl palmitate in the front damage of antineoplastics. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 2017.

DE LAPUENTE, J.; LOURENÇO, J.; MENDO, S. A.; BORRÀS, M.; MARTINS, M. G.; COSTA, P. M.; PACHECO, M. The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. **Frontiers in genetics**, v. 6, 2015.

DEUTSCHMANN, B.; KOLAREVIC, S.; BRACK, W.; KAISAREVIC, S.; KOSTIC, J.; KRACUN-KOLAREVIC, M. Longitudinal profile of the genotoxic potential of the River Danube on erythrocytes of wild common bleak (*Alburnus alburnus*). **Science of The Total Environment**, 2016.

DHESI, S.; CHU, M. P.; BLEVINS, G.; PATERSON, I.; LARRATT, L.; OUDIT, G. Y.; KIM, D. H. Cyclophosphamide-Induced Cardiomyopathy: A Case Report, Review, and Recommendations for Management. **Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports**, v. 1, p. 1–7, 2013.

DU, J.; CULLEN, J. J.; BUETTNER, G. R. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1826, n. 2, p. 443-457, 2012.

DUCONGE, J.; MIRANDA-MASSARI, J. R.; GONZÁLEZ, M. J.; TAYLOR, P. R.; RIORDAN H. D.; RIORDAN, N. H. et al. Vitamin C pharmacokinetics after continuous infusion in a patient with prostate cancer. **Ann Pharmacother**, v. 41, n. 6, p.1082–1083, 2007.

EL-SHAHABY, O.; MIGID, H. M. A.; SOLIMAN, M.; MASHALY, I. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium* chromosome aberration assay. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v 6, p. 23-28, 2003.

EMADI, A.; JONES, R. J.; BRODSKY, R. A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 6, n. 11, p. 638-647, 2009.

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.

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

FIRBAS, P.; AMON, T. Allium chromosome aberration test for evaluation effect of cleaning municipal water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. **J Bioremed Biodegrad**, v. 4, n. 4, p. 189-193, 2013.

FISKESJÖ, Geirid. Allium test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology**, v. 9, n. 3, p. 235-241, 1994.

FREEDMAN, R. A.; PARTRIDGE, A. H. Adjuvant therapies for very young women with early stage breast cancer. **Breast**, v. 20, n. 3, p. 146-149, 2011.

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 chemotherapy and pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 1157-1166, 2011.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**, v. 31, n. 5, p. 1869-1883, 2012.

GANAPATHY, S.; MURALEEDHARAN, A.; SATHIDEVI, P. S.; CHAND, P.; RAJKUMAR, R. P. Comet: An automated tool for the detection and quantification of DNA damage using comet assay image analysis. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 133, p. 143-154, 2016.

GARCIA-SOUZA, L. F.; OLIVEIRA, M. F. Mitochondria: biological roles in platelet physiology and pathology. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 50, p. 156-160, 2014.

GIANNATTASIO, S.; GUARAGNELLA, N.; ŽDRALEVICAND, M.; MARRA, E. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. **Frontiers in microbiology**, v. 4, n. 33, 2013.

GLEI, M.; SCHNEIDER, T.; SCHLÖRMANN, W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. **Archives of Toxicology**, 2016.

GOMES JÚNIOR, A. L.; PAZ, M. F. C. J.; DA SILVA, L. M. S.; CARVALHO, S. C. C.; SOBRAL, A. L. P.; MACHADO, K. C. et al. Serum Oxidative Stress Markers and Genotoxic Profile Induced by Chemotherapy in Patients with Breast Cancer: A Pilot Study. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-11, 2015.

GONENC, A.; HACISEVKI, A.; TAVIL, Y.; CENGEL, A.; TORUN, M. Oxidative stress inpatients with essential hypertension: a comparison of dippers and non-dippers. **European Journal of Internal Medicine**, v. 24, n. 2, p. 139-144, 2013.

GONZÁLEZ, M. J.; MIRANDA-MASSARI, J. R.; MORA, E. M.; GUZMÁN, A.; RIORDAN, N. H.; RIORDAN, H. D.; CASCIARI, J. J.; JACKSON, J. A.; ROMÁN-FRANCO, A. Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. **Integrative cancer therapies**, v. 4, n. 1, p. 32-44, 2005.

GRAHAME, T. J.; SCHLESINGER, R. B. Oxidative stress-induced telomeric erosion as a mechanism underlying airborne particulate matter-related cardiovascular disease. **Particle and fibre toxicology**, v. 9, n. 1, p. 21, 2012.

GREENLEE, H.; KWAN, M. L.; KUSHI, L. H.; SONG, J.; CASTILLO, A.; WELTZIEN, E.; QUESENBERRY, C. P., JR.; CAAN, B. J. Antioxidant supplement use after breast cancer diagnosis and mortality in the Life After Cancer Epidemiology (LACE) cohort. **Cancer**, v. 118, n. 8, p. 2048-2058, 2012.

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, 2013.

HAUBITZ, M. et al. Cyclophosphamide pharmacokinetics and dose requirements in patients with renal insufficiency. **Kidney International**, v. 61, n. 15, p. 1495-1501, 2002.

HÖFERL, M.; STOILOVA, I.; SCHMIDT, E.; WANNER, J.; JIROVETZ, L.; TRIFONOVA, D. et al. 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, p. 81-98, 2014.

HOSTETTER, A. A.; OSBORN, M. F.; DE ROSE, V. J. Characterization of RNA-Pt Adducts Formed from Cisplatin Treatment of *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS Chem Biol**, v. 7, n. 1, p. 218-225, 2012.

HOVHANNISYAN, G. G. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. **Molecular cytogenetics**, v. 3, n. 1, p. 17, 2010.

INCA. **Câncer**: O que é Câncer? Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: 10 maio 2017.

JAIN, R.; JAIN, S. K. Effect of *Buchanania lanzan* Spreng. Bark extract on cyclophosphamide induced genotoxicity and oxidative stress in mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 187-191, 2012.

JAYACHANDRAN, N. V.; CHANDRASEKHARA, P. K.; THOMAS, J.; AGRAWAL, S.; NARSIMULU, G. Cyclophosphamide-associated complications: we need to be aware of SIADH and central pontine myelinolysis. **Rheumatology**, v. 48, n. 1, p. 89-90, 2009.

KARATHIA, H.; VILAPRINYO, E.; SORRIBAS, A.; ALVES, R. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

KAUFMANN, Scott H.; EARNSHAW, William C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Experimental cell research**, v. 256, n. 1, p. 42-49, 2000.

KAWAGUCHI, S.; NAKAMURA, T.; YAMAMOTO, A.; HONDA, G.; SASAKI, Y. F. Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity? **Journal of nucleic acids**, 2010.



KLAPACZ, J.; POTTENGER, L. H.; ENGELWARD, B. P.; HEINEN, C. D.; JOHNSON, G. E.; CLEWELL, R. A.; CARMICHAEL, P. L.; ADELEYE, Y.; ANDERSEN, M. E. contributions of DNA repair and damage response pathways to the non-linear genotoxic responses of alkylating agents. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 767, p. 77-91, 2016.

KOROKOLVAS, A.; KOROKOLVAS, F.F.A.C.; CUNHA, B.C.A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

KRAYNAKA, A. R.; BARNUMA, J. E.; CUNNINGHAMA, C. L.; NGB, A.; YKORUKA, B. A.; BENNETA, B. Alkaline comet assay in liver and stomach, and micronucleus assay in bone marrow, from rats treated with 2-acetylaminofluorene, azidothymidine, cisplatin, or isobutyraldehyde. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 786-788, p. 77-86, 2016.

KUMAR, S.; MEENA, V. K.; HAZARI, P. P.; SHARMA, R. K. PEG coated and doxorubicin loaded multimodal Gadolinium oxide nanoparticles for simultaneous drug delivery and imaging applications. **International Journal of Pharmaceutics**, 2017.

KUO, J. The multifaceted biological roles of vitamin C. **Nutrition & Food Science**, v. 3, n. 5, 2013.

LEE, C.; RAFFAGHELLO, L.; BRANDHORST, S.; SAFDIE, F.M.; BIANCHI, G.; MARTIN-MONTALVO, A. et al. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 124, p. 124-127, 2012.

LEE, W. J. The Prospects of Vitamin C in Cancer Therapy. **Immune Netw**, v. 9, n. 5, p. 147-152, 2009.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, p. 158-163, 2006.

LI, Yi; SCHELLHORN, Herb E. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 10, p. 2171-2184, 2007.

LIMAN, R. Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by Allium and Comet assay. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 269-273, 2013.

LOGESHWARAN, P.; SIVARAM, A. K.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of Class B firefighting foam products: Tridol-S 3% AFFF and Tridol-S 6% AFFF to *Allium cepa*. **Environmental Technology & Innovation**, v. 6, p. 185-194, 2016.

LOURO, I.D. Oncogenética. **Rev Soc Bras Canc**, n.11, p.36-42, 2000.

LQUBAL, M. A. KHAN, M.; KUMAR, P.; KUMAR, A.; AJAI, K. Role of Vitamin E in Prevention of Oral Cancer:-A Review. **J. Clin. Diagnostic Res**, v. 8, n. 10, p. 5-7, 2014.

LUTTERBECK, C. A.; MACHADO, E. L.; KUMMERER, K. Photodegradation of the antineoplastic cyclophosphamide: a comparative study of the efficiencies of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/TiO<sub>2</sub> processes. **Chemosphere**, v. 120, n.7, p. 538-546, 2015.

MADEDDU C.; DEIDDA, M.; PIRAS, A.; CADEDDU, C.; DEMURTAS, L.; PUZZONI, M.; PISCOPO, G.; SCARTOZZI, M.; MERCURO, G. Pathophysiology of cardiotoxicity induced by nonanthracycline chemotherapy. **Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 17, 2016.

MAITI, S.; SASMAL, K.; SINHA, S. S.; SINGH, M. Analysis of cytotoxicity and genotoxicity on *E. coli*, human blood cells and *Allium cepa* suggests a greater toxic potential of hair dye. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 124, p. 248-254, 2016.

MAKSIMENKO, A.; DOSIO, F.; MOUGIN, J.; FERRERO, A.; WACK, S.; REDDY, L. H. A unique squalenoylated and nonpegylated doxorubicin nanomedicine with systemic long-circulating properties and anticancer activity. **PNAS USA**, p. 217–226, 2014.

MALDONADO, F.; LIMPER, A. H.; JETT, J. R. **Pulmonary toxicity associated with antineoplastic therapy: cytotoxic agents**. Uptodate.com [Internet]. 2012 [cited 2016 Nov 16; last updated: Mar 29, 2012].

MALUF, S.W.; ERDTMANN, B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. **Mutation Research**, v.471, n. 5, p.21-27, 2000.

MAMEDE, A. C.; TAVARES, S. D.; ABRANTES, A. M.; TRINDADE, J.; MAIA, J. M.; BOTELHO, M. F. The role of vitamins in cancer: a review. **Nutrition and cancer**, v. 63, n. 4, p. 479-494, 2011.

MAMEDE, A. C.; ABRANTES, A. M.; PIRES, A. S.; TAVARES, S. D.; SERRA, M. E.; MAIA, J. M.; BOTELHO, M. F. Radiolabelling of ascorbic acid: a new clue to clarify its action as an anticancer agent? **Current radiopharmaceuticals**, v. 5, n. 2, p. 106-112, 2012.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

MINOTTI, G. et al. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 2, p. 185-229, 2004.

MIZUTANI, H.; TADA-OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; KOJIMA, M.; KAWANISHI, S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life sciences**, v. 76, n. 13, p. 1439-1453, 2005.

MOLLOY, E. S.; LANGFORD, C. A. Balancing efficacy and cancer risk of cyclophosphamide for patients with Wegener's granulomatosis. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 4, n. 7, p. 340-341, 2008.

NAITO, T.; BABA, T.; TAKEDA, K.; SASAKI, S.; NAKAMOTO, Y.; MUKAIDA, N. High-dose cyclophosphamide induces specific tumor immunity with concomitant recruitment of LAMP1/CD107a-expressing CD4-positive T cells into tumor sites. **Cancer Letters**, v. 366, p. 93–99, 2015.

NIH. U.S. Department of Health and Human Services. National Toxicology Program. **Photocarcinogenesis Study of Retinoic Acid and Retinyl Palmitate in SKH-1 Mice**. National Institutes of Health, NTP TR 568, n. 12-5910, 2012.

ODRIOZOLA-SERRANO, I.; PUIGPINÓS, J.; OMS OLIU, G.; HERRERO, E.; MARTÍN-BELLOSO, O. Antioxidant activity of thermal or non-thermally treated strawberry and mango juices by *Saccharomyces cerevisiae* growth based assays. **Food Science and Technology**, v. 74, p. 55–61, 2016.

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

OLIVEIRA, M. B.; PRADO, A. H.; BERNEGOSSI, J.; SATO, C. S.; BRUNETTI, I. L.; SCARPA, M. A. Topical Application of Retinyl Palmitate-Loaded Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for the Treatment of Skin Aging. **BioMed Research International**, 2014.

OMABE, M.; OKOROOCHA, A. E. Molecular Basis of Cancer Initiation. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 229–238, 2011.

PAMPLONA, R.; COSTANTINI, D. et al Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, p. 843-863, 2011.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PATHAK, A. K.; BHUTANI, M.; GULERIA, R.; BAL, S.; MOHAN, A.; MOHANTI, B. K.; SHARMA, A.; PATHAK, R.; BHARDWAJ, N. K.; PRASAD, K. N.; KOCHUPILLAI, V. Chemotherapy alone vs. chemotherapy plus high dose multiple antioxidants in patients with advanced non small cell lung cancer. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 16-21, 2005.

PAZ-Y-MIÑO, C.; CUMBAL, N.; SANCHEZ, M. E. Genotoxicity Studies Performed in the Ecuadorian Population. **Molecular Biology International**, 2012.

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.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, n. 2, p. 89-96, 2008.

PIRES, A. S.; MARQUES, C. R.; ENCARNAC, J. C.; ABRANTES, A. M.; MAMEDE, A. C.; LARANJO, M. et al. Ascorbic acid and colon cancer: An oxidative stimulus to cell death depending on cell profile. **European Journal of Cell Biology**, v. 95, n. 6-7, P. 208-218, 2016.

POLJŠAK, B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2011, 2011.

PORTANTIOLO, T. N.; VALE, I. A. V.; BERGMANN, R. B.; ABID, 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.

RACCHI, M. L. Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus and Citrus spp.* **Antioxidants**, v. 2, p. 340-369, 2013.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **Nutrition and Cancer**, v. 2014, p. 7612-7624, 2014.

RAJESHWARI, A.; ROY, B.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Cytogenetic evaluation of gold nanorods using *Allium cepa* test. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 6, n. 109, p. 209-219, 2016.

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.

ROY, S. S.; CHAKRABORTY, P.; BHATTACHARYA, S. Intervention in cyclophosphamide induced oxidative stress and DNA damage by a flavonyl-thiazolidinedione based organoselenocyanate and evaluation of its efficacy during adjuvant therapy in tumor bearing mice. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 73, p. 195-209, 2014.

RUIZ, A. L. T. G.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, A. F.; FARIA, A. D.; AMARAL, M. C. E.; SERRANO, D. R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, p. 98-102, 2005.

SALEEM, Z.; AHMAD, M.; HASHMI, F. K.; SAEED, H.; AZIZ, M. T. Impairment of liver synthetic function and the production of plasma proteins in primary breast cancer patients on doxorubicin-cyclophosphamide (AC) protocol. **Pak. J. Pharm. Sci**, v. 29, n. 5, p. 1555-1563, 2016.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, P.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; GALLEGOS-HERNÁNDEZ, F.; PEÑARROJA-FLORES, R.; TOLEDO-GARCÍA, J.; BRAVO, J. L.; DEL CASTILLO, E.

R.; BENÍTEZ-BRIBIESCA, L. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. **Mutation Research**, v. 640, p. 8 – 15, 2008.

SANTOS, C. L. V.; POURRUT, B.; DE OLIVEIRA, J. M. P. F. The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. **Frontiers in genetics**, v. 6, 2015.

SASAKI, Y. F.; SEKIHASHI, K.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; SAGA, A.; ISHIDA, K.; TSUDA, S. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and US NTP Carcinogenicity Database. **Critical reviews in toxicology**, v. 30, n. 6, p. 629-799, 2000.

SHIN, W. J.; NOH, H. J.; NOH, Y. N.; KIM, S.; UMA, S.H.; LIM, Y. T. Hyaluronic acid-supported combination of water insoluble immunostimulatory compounds for anti-cancer immunotherapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 1–10, 2017.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, p. 7-30, 2016.

SILVA, A. E. D.; SERAKIDES, R.; FERREIRA, E.; MORAES, J. R. C.; OCARINO, N. D. M.; CASSALI, G. D. Efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich sólido em camundongos fêmeas castradas e não castradas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, p. 867-74, 2004.

SKLAN, D. Vitamin A in human nutrition. **Progress in food & nutrition science**, v. 11, n. 1, p. 39-55, 1986.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M. E. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376-390, 2013.

STINCO, C.M.; BARONI, M.V.; NARANJO, R.D.D.P.; WUNDERLIN, D.A.; HEREDIA, F.J.; MELENDEZ-MARTÍNEZ, A.J. et al. Hydrophilic antioxidant compounds in orange juice from different fruit cultivars: composition and antioxidant activity evaluated by chemical and cellular based (*Saccharomyces cerevisiae*) assays. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 37, p. 1–10, 2015.

SUBRAMANI, T.; YEAP, S.K.; HO, W.Y.; HO, C.L. OMAR, A.R.; AZIZ, S.A. et al. Vitamin C suppresses cell death in MCF-7 human breast cancer cells induced by tamoxifen. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 2, p. 305-313, 2014.

SUNDARARAJAN, S. K.; NATARAJAN, P. S. KANCHANA, R. Micronucleus Assay in Urothelial Cells in Cancer Cervix. **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, v. 11, n. 3, 2017.

SWIFT, L. H.; GOLSTEYN, R. M. Genotoxic Anti-Cancer Agents and Their Relationship to DNA Damage, Mitosis, and Checkpoint Adaptation in Proliferating Cancer Cells. **Int. J. Mol. Sci**, v. 15, p. 3403-3431, 2014.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 157–170, 2012.

TANG, J. E.; WANG, R. J.; ZHONG, H.; YU, B.; CHEN, Y. Vitamin A and risk of bladder cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 12, n. 130, 2014.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. **Bioindicator of genotoxicity: the Allium cepa test**. Intech Open Access Publisher, 2012.

TONGUL, B.; L. TARHAN. Oxidant and antioxidant status in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to antifungal ketoconazole. **Process Biochemistry**, 2016.

TYKWINSKA, K.; LAUSTER, R.; KNAUS, P.; ROSOWSKI, M. Growth and Differentiation Factor 3 Induces Expression of Genes Related to Differentiation in a Model of Cancer Stem Cells and Protects Them from Retinoic Acid-Induced Apoptosis. **PLoS One**, v. 8, 2013.

VAN DER REEST, J.; GOTTLIEB, E. Anti-cancer effects of vitamin C revisited. **Cell Research**, v. 26, p. 269-270, 2016.

VERAS, R. Forum. Population aging and health information from the National Household Sample Survey: contemporary demands and challenges. Introduction. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 10, p. 2463-2466, 2007.

VINCENT, D. T.; IBRAHIM, Y. F.; ESPEY, M. G.; SUZUKI, Y. J. The role of antioxidants in the era of cardio-oncology. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 72, n. 6, p. 1157–1168, 2013.

VRIENS, B. E. P. J.; AARTS, M. J. B.; VRIES, B.; VAN GASTEL, S. M.; WAL, J.; SMILDE, T. J.; VAN WARMERDAM, L. J. C.; BOER, M.; VAN SPRONSEN, D. J.; BORM, G. F.; TJAN-HEIJNEN, V. C. G. Doxorubicin/cyclophosphamide with concurrent versus sequential docetaxel as neoadjuvant treatment in patients with breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 49, p. 3102–3110, 2013.

WANG, F. et al. Effects of antibiotic antitumor drugs on nucleotide levels in cultured tumor cells: an exploratory method to distinguish the mechanisms of antitumor drug action based on targeted metabolomics. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 3, p. 223-230 2015.

WANG, H.L.; CUI, X.H.; YU, H.L.; WU, R. et al.. Synergistic effects of polydatin and vitamin C in inhibiting cardiotoxicity induced by doxorubicin in rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 2016.

WANG, Y.; WANG, X.; YU, Z. Vitamin C and E intake and risk of bladder cancer: a metaanalysis of observational studies. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 11, p. 4154-4164, 2014.

WEAKLEY, S.M.; JIANG, J.; KOUGIAS, P.; LIN, P.H.; YAO, Q.; BRUNICARDI, F. C. et al. Role of somatic mutations in vascular disease formation. **Expertise Review in Molecular Diagnose**, v. 10, n. 1, p. 173-185, 2010.

WEI, X.; SU, F.; SU, X.; HU, T.; HU, S. Stereospecific antioxidant effects of ginsenoside Rg3 on oxidative stress induced by cyclophosphamide in mice. **Fitoterapia**, v. 83, p. 636–642, 2012.

WHO. **Cancer**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/index.html>>. Acesso em: 1 maio 2017.

ZHU, B.; ZHENG, Y.; ZHANG, Y.; CAO, Y.; ZHANG, L.; LI, X.; LIU, T.; JIAO, Z.; WANG, Q.; ZHAO, Z. Protective effect of L-carnitine in cyclophosphamide-induced germ cell apoptosis. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 16, n. 9, p.780-787, 2015.

*Capítulo I*

---

**A ASSOCIAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO COM O PALMITATO DE RETINOL  
MODULA DANOS TOXICOGENÉTICOS INDUZIDOS POR QUIMIOTERÁPICOS  
EM CÉLULAS NÃO TUMORAIS**



## A ASSOCIAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO COM O PALMITATO DE RETINOL MODULA DANOS TOXICOGENÉTICOS INDUZIDOS POR QUIMIOTERÁPICOS

Leonardo da Rocha Sousa<sup>1,2,3</sup>; Rosália Maria Tôrres de Lima<sup>2,3</sup>; Antônio Lima Braga<sup>1,3</sup>; Ag-  
Anne Pereira Melo de Meneses<sup>1,3</sup>; José Victor de Oliveira Santos<sup>1,3</sup>; Narcia Mariana Fonseca  
Nunes<sup>1</sup>; Antonielly Campinho Reis<sup>3</sup>; Jadson Texeira e Silva<sup>3</sup>; Rai Pablo Sousa de Aguiar<sup>3</sup>;  
MD. Torequl Islam<sup>3</sup>; Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva<sup>4</sup>; Ana Amélia de Carvalho Melo  
Cavalcante<sup>3,4</sup>; João Marcelo de Castro e Sousa<sup>3,4</sup>

---

1 Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí - UFPI

2 Docente do Instituto Federal do Piauí - IFPI

3 Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica - LAPGENIC - Universidade Federal do Piauí - UFPI

4 Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí - UFPI

## RESUMO

Na terapia oncológica, a quimioterapia têm sido um dos principais tratamentos, todavia pode causar um aumento nos níveis de estresse oxidativo acarretando danos ao DNA que afeta não somente as células tumorais, mas também as células não tumorais, culminando em efeitos colaterais graves. Diante disso, a utilização de vitaminas vem sendo indicada para minimizar os efeitos adversos da quimioterapia, embora existam controvérsias sobre suas interferências na eficácia deste tipo de tratamento. O estudo verificou a ação do palmitato de retinol (PR) associado com o ácido ascórbico (AA) frente aos danos oxidativos, tóxicos, citotóxicos e mutagênicos da ciclofosfamida (CPA), doxorrubicina (DOX) e esquema de ambos associados (AC), por meio do uso de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficientes e mutadas quanto às defesas antioxidantes, através do teste de *Allium cepa* e pelo bioensaio em *Artemia salina*, utilizando as concentrações de 2 µM/mL e 100 UI/mL de ácido ascórbico e palmitato de retinol, respectivamente. As concentrações dos antineoplásicos foram de 20 µg/mL para a ciclofosfamida, 2 µg/mL para a doxorrubicina e de 20/2 µg/mL para o esquema AC. Os danos oxidativos ao DNA citoplasmático e mitocondrial das linhagens *SodWT*, *Sod1Δ*, *Sod2Δ*, *Sod1Δ/sod2Δ*, *Cat1Δ* e *Sod1Δ/Cat1Δ* induzidos pelos antineoplásicos foram significativamente modulados pelas vitaminas associadas (PR + AA). De forma similar, a toxicidade, citotoxicidade e a mutagenicidade induzida pelos antineoplásicos em meristemas de raízes de *Allium cepa* expostas, assim como a citotoxicidade ocasionada em *Artemia salina* também foram modulados pela associação das vitaminas combinadas (PR + AA) nas concentrações testadas. Em virtude das modulações observadas, os dados sugerem que durante a meia-vida dos antineoplásicos, a utilização de vitaminas antioxidantes, como PR e AA, pode influenciar a eficácia dos efeitos dos quimioterápicos.

**Palavras-chave:** Antineoplásicos; *Allium cepa*; *Artemia salina*; *Saccharomyces cerevisiae*; Vitaminas.

## ABSTRACT

In cancer therapy, chemotherapy has been one of the main treatments, but it can cause an increase in the levels of oxidative stress causing damage to the DNA that affects not only the tumor cells, but also the non-tumor cells, culminating in serious side effects. Therefore, the use of vitamins has been indicated to minimize the adverse effects of chemotherapy, although there are controversies about their interference in the efficacy of this type of treatment. The study verified the action of retinol palmitate (PR) associated with ascorbic acid (AA) against oxidative, toxic, cytotoxic and mutagenic damages of cyclophosphamide (CPA), doxorubicin (DOX) and scheme of both partners (AC), through the use of proficient and mutated *Saccharomyces cerevisiae* strains for antioxidant defenses, through the *Allium cepa* test and also by *Artemia* bioassay. Where all concentrations of ascorbic acid and retinol palmitate were 2  $\mu$ M/mL and 100 IU/mL, respectively. The concentrations of the antineoplastic drugs were 20  $\mu$ g/mL for cyclophosphamide, 2  $\mu$ g/mL for doxorubicin, and 20/2  $\mu$ g/mL for the AC scheme. The oxidative damages to the cytoplasmic and mitochondrial DNAs of the anti-neoplastic-induced SodWT, Sod1 $\Delta$ , Sod1 $\Delta$ /sod2 $\Delta$ , Cat1 $\Delta$  and Sod1 $\Delta$ /Cat1 $\Delta$  lines were significantly modulated by the associated vitamins (PR + AA). Similarly, toxicity, cytotoxicity, and antineoplastic-induced mutagenicity in exposed *Allium cepa* root meristems, as well as cytotoxicity in *Artemia salina* were also modulated by the association of the combined vitamins (PR + AA) at the concentrations tested. Because of the damage reported in non-tumor cells, the data suggest that during the half-life of antineoplastics, the use of antioxidant vitamins, such as PR and AA, may compromise the efficacy of chemotherapeutic.

**Keywords:** Antineoplastic agents; *Allium cepa*; *Artemia salina*; *Saccharomyces cerevisiae*; Vitamins.

## 1 Introdução

A contínua produção de radicais livres em processos metabólicos resulta no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante que tem o objetivo de limitar os níveis intracelulares de radicais livres e controlar a ocorrência de danos recorrentes. No entanto, quando essas defesas não são capazes de evitar a ação das espécies reativas de oxigênio, essa deficiência resulta em lesões ao material genético, sendo estas precursoras de diversas patologias, como o câncer (Shami; Moreira, 2004).

A quimioterapia é uma das principais formas de tratamento do câncer e, é comumente empregada em associação com diferentes drogas, visando a redução de toxicidade e aumento da eficiência terapêutica (Michaels et al., 2016). A quimioterapia ainda é uma das terapias de maior consenso quando se refere ao alcance da cura, controle ou apenas a redução do câncer (Fuh et al., 2015).

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, a vitamina C (ácido ascórbico), 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) e a vitamina A (palmitato de retinol) que também tem sido utilizado na prevenção do câncer, devido à estas propriedades antioxidantes que podem prevenir a oxidação que induz a apoptose (De Carvalho, 2017).

Algumas pesquisas destacam que substâncias nutracêuticas, como as vitaminas, contrastam com o tratamento padrão de drogas antineoplásicas por agirem através de múltiplos alvos no ciclo celular, melhorando o quadro dos pacientes e tornando o tratamento menos dispendioso (Gupta et al., 2010). Efeitos indiretos da nutrição envolvem mudanças na bioquímica tumoral como a inflamação, estresse oxidativo e fatores de crescimento (Nowell; Ahn; Ambrosone, 2004). O cuidado com a nutrição está relacionado com a redução da mortalidade causada pelo câncer e aumento da sobrevivência de pacientes (Lee et al., 2015).

Micronutrientes antioxidantes, como a vitamina A (palmitato de retinol), conhecido pelo controle sobre a diferenciação e proliferação celular (Altucci; Gronemeyer, 2001) e a vitamina C (ácido ascórbico) pela sua potente capacidade antioxidante (Traber; Stevens,

2011) estão relacionados na recidiva do CA melhorando o prognóstico dos pacientes. No entanto, ainda há controvérsias em relação ao uso dessas substâncias durante o tratamento do câncer, visto que a capacidade antioxidante de algumas substâncias podem reduzir o efeito dos antineoplásicos, diminuindo a produção de radicais livres e redução da morte de células cancerosas (Salganik, 2001).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos antioxidantes da associação do palmitato de retinol (PR) com o ácido ascórbico (AA) na modulação da toxicidade/citotoxicidade induzidas pelos antineoplásicos ciclofosfamida, doxorubicina e esquema de ambos associados (AC) em ensaios *in vitro e in vivo*.

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Obtenção e preparo das substâncias

Os antineoplásicos Ciclofosfamida e Doxorrubicina foram obtidos pela empresa SIGMA, como o nome comercial de Adriamicina e Genuxal, respectivamente. O palmitato de retinol e o ácido ascórbico foram obtidos na farmácia de manipulação ART PHARMA em Teresina - PI. As diluições da ciclofosfamida, doxorrubicina e esquema de associação AC foram preparadas em solução fisiológica 0,9% (estéril) até a concentração final de 20 µg/mL, 2 µg/mL e 20/2 µg/mL respectivamente, escolhidas conforme Freedman e Partridge (2011).

A solubilização do palmitato de retinol na concentração de 100 UI/mL, foi obtida em solução fisiológica 0,9% acrescida de DMSO à 10%. Já o ácido ascórbico foi previamente diluído em tampão fosfato estéril até a concentração final de 2 µmol/mL. A associação de ambas as vitaminas (PR + AA) foram preparadas da mesma maneira, mantendo-se as mesmas concentrações da forma isolada, e, ao utilizá-las, foram administradas simultaneamente.

### 2.2 Bioensaios de letalidade em *Artemia salina* (BSLB)

Para a preparação da *A. salina*, os cistos do microcrustáceo foram adquiridos no mercado central de Teresina-PI, Brasil. Esta foi uma rápida modificação do método descrito por Meyer et. al. (1982). Foram incubados cistos do microcrustáceo (*Artemia salina*) em becker contendo uma mistura 50:50 de solução salina (água do mar artificial: 23,0 g de NaCl, 11,0 g de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 4 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,3 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,7 g de KCl em 1 L de água destilada e ajustado para pH 8,5 utilizando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1N) e água mineral sob arejamento constante durante 48 h a 27 ± 3° C. Após incubação, os náuplios ativos livres de conchas do microcrustáceo foram recolhidos a partir da porção mais iluminada da câmara de incubação e utilizados para o ensaio. Dez náuplios foram retirados por meio de uma pipeta de Pasteur e inseridos em cada tubo de ensaio contendo 4,5 mL da solução salina. Em cada experimento, adicionou-se 0,5 mL da amostra teste a 4,5 mL de solução de salina, mantendo a mesma temperatura de eclosão, sob a luz, os náuplios sobreviventes foram contados. Foram utilizados três tubos para cada tratamento. A mortalidade de *A. salina* foi contada após 24h e 48h de exposição às substâncias testadas onde os grupos experimentais estão na **Tabela 1**.

### 2.3 Teste *Allium cepa*

O teste *Allium cepa* foi realizado com base no protocolo descrito por Fiskesjo (1985). As cebolas foram mantidas em contato direto com os antineoplásicos nos períodos de 24, 48 e 72h em temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , ambiente escuro e troca da solução a cada 6h em virtude do tempo de meia vida das drogas. As concentrações testadas de CPA, DOX e esquema AC foram  $20 \mu\text{g/mL}$ ,  $2 \mu\text{g/mL}$  e  $20/2 \mu\text{g/mL}$  respectivamente; a concentração das vitaminas associadas (PR + AA) usada no co-tratamento com as drogas foi de  $100 \text{UI/mL}$  para o PR e  $2 \mu\text{M/mL}$  para o AA; para o controle negativo (CN) foi utilizada água de torneira como tratamento e para o controle positivo (CP) foi utilizado sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ )  $0,0006 \text{mg/ml}$  diluído em água destilada (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Esquema dos tratamentos dos náuplios (*Artemia salina*) e das cebolas (*Allium cepa*) com os químicos e/ou as vitaminas.

Grupos	Tratamentos	Nº de <i>Artemias</i> #	Nº de cebolas #
Grupo I	CN (água)	n= 30	n= 5
Grupo II	CP ( $\text{CuSO}_4$ )		
Grupo III	PR $100 \text{UI/mL}$		
Grupo IV	AA $2 \mu\text{M/mL}$		
Grupo V	PR + AA		
Grupo VI	CPA $20 \mu\text{g/mL}$		
Grupo VII	DOX $2 \mu\text{g/mL}$		
Grupo VIII	AC $20/2 \mu\text{g/mL}$		
Grupo IX	CPA + PR + AA		
Grupo X	DOX + PR + AA		
Grupo XI	AC + PR + AA		

# n=30/grupo para *A. salina* e # n=5/grupo para *A. cepa*. ----- Significa que esse grupo não há para *A. salina*

Após o tratamento, as raízes germinadas maiores de 2 cm ou danificadas foram descartadas. As demais raízes foram retiradas e fixadas por 24h em uma solução de Carnoy (3:1). Em seguida, as raízes foram lavadas com água destilada (3 banhos de 5 minutos cada), fez-se a hidrólise das raízes com HCl (1N) a  $60^\circ\text{C}$  por 11 minutos e repetiu-se o banho. As estruturas basófilas foram coradas mergulhando-as no reativo de Schiff por 2 horas e depois lavadas com água corrente.

Para a montagem da lâmina, a região apical da raiz foi retirada com um bisturi e adicionada uma gota de carmin acético 2% para a coloração da região nuclear cobrindo-a com uma lamínula. Realizou-se uma leve pressão sobre a lamínula com um lápis borracha para o esmagamento da raiz. As estruturas foram observadas com o aumento de 400x no microscópico óptico e foram contadas 5.000 células por concentração testada (1.000 células/lâmina). O potencial mutagênico foi avaliado por meio de análise de alterações cromossômicas e de micronúcleos nas células meristemáticas de *A. cepa*. O potencial citotóxico foi determinado pelo índice mitótico (IM). O IM de cada bulbo foi definido como o número de células em divisão por 1000 células.

#### 2.4 Linhagens de leveduras utilizadas

Seis linhagens de leveduras foram utilizadas para avaliar atividades antioxidantes do palmitato de retinol em associação com o ácido ascórbico. A linhagem selvagem utilizada não apresentava nenhuma mutação nas enzimas de defesa contra substâncias oxidativas, enquanto que as outras cinco linhagens selecionadas apresentavam defeitos em pelo menos uma enzima antioxidativa. A linhagem EG118 é mutada na enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD – produto do gene SOD1), a EG110 é mutada na SOD mitocondrial (MnSOD – produto do gene SOD2); a EG133 possui uma mutação em duas enzimas a SOD1 e SOD2; a EG223 mutada em CAT1 e EG mutada em SOD1 e CAT1 (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** As linhagens de levedura *S. cerevisiae* que foram 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 todos os outros marcadores como EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG110 (Sod2Δ)	sod2:TRP1 todos outros marcadores como EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG133 (Sod1ΔSod2Δ)	sod1:URA3 sod2:TRP1 duplo mutante/todos outros marcadores como EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG223 (Cat1Δ)	EG103, exceto cat1:TRP1	Edith Gralla, L Angeles
EG (Sod1ΔCat1Δ)	EG103, exceto sod:URA3 e cat1:TRP1	Edith Gralla, L Angeles

Fonte: Adaptado de Oliveira et al., 2014.



### 2.5 Teste do disco central em *S. cerevisiae*

Todos os experimentos foram realizados através do teste do disco central em *S. cerevisiae*, onde as culturas de leveduras foram distribuídas sobre a técnica de co-tratamento. 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). Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem das placas de Petri em um movimento contínuo (**Figura 1**), para ambos os lados da placa, contendo em seu centro um disco de papel de filtro estéril, ao qual foi acrescentado, nas distintas placas, 10 µL das concentrações de cada antineoplásico e 10 µL das vitaminas associadas (AA + PR) para realização do co-tratamento. Para correlação estatística com os resultados dos grupos testes, dois grupos controle foram utilizados sendo 10 µL de uma solução contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mMol) utilizado como controle positivo e 10 µL de solução salina (0,9%), como controle negativo (**Tabela 3**). O período de exposição aos antineoplásicos foi definido com base no período correspondente à meia-vida dos fármacos, aproximadamente: 7 h para ciclofosfamida e 48 h para doxorubicina (BRESSAN et al., 2010). Após 48 h de incubação em estufa a 34 °C, os halos de inibição de crescimento das linhagens, em milímetros, foram mensurados desde a margem do disco de papel-filtro até o início do crescimento celular. Os valores tabelados e submetidos à análise estatística variaram de 0 mm (crescimento completo) a 40 mm (ausência de crescimento), que corresponde à medida do raio da placa de Petri. Todos os testes foram realizados em duplicata.

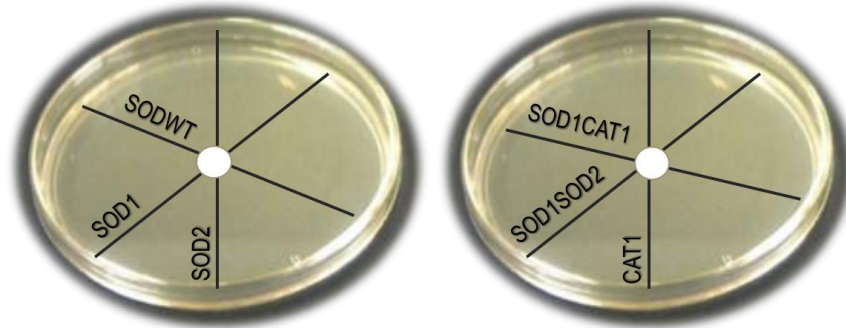
**Tabela 3.** Protocolo experimental em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tratamentos	Procedimentos
<i>Sem Tratamento</i>	Grupo I - Adição de 10 µL de solução fisiológica (0,9%), como controle negativo, a fim de avaliar os danos oxidativos espontâneos às linhagens de leveduras, com posterior direcionamento à estufa por 48 h.
<i>Peróxido de Hidrogênio</i>	Grupo II - Adição de 10 µL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10mMol), como controle positivo, sobre o disco central em placas de Petri, com posterior direcionamento à estufa por 48 h.
<i>Tratamento</i>	Grupo III - Adição de 10 µL do PR (100 UI/mL); Grupo IV - Adição de 10 µL do AA (2 µM/mL); Grupo V – Adição de 10 µL das vitaminas associadas (PR + AA); Grupo VI – Adição de 10 µL do antineoplásico CPA (20 µg/mL); Grupo VII – Adição de 10 µL da DOX (2 µg/mL); Grupo VIII - Adição de 10 µL do esquema AC (20/2 µg/mL); Todos os grupos foram adicionados sobre o disco central em placas de Petri, com posterior direcionamento à estufa por 48h.
<i>Co-tratamento</i>	Grupo IX - Adição de 10 µL das vitaminas associadas (PR + AA) + 10 µL do antineoplásico CPA (20 µg/mL); Grupo X - Adição de 10 µL das vitaminas associadas (PR + AA) + 10 µL do antineoplásico DOX (2 µg/mL); Grupo XI - Adição de 10 µL das vitaminas associadas (PR + AA) + 10 µL do esquema AC (20 µg/mL); Todos os grupos foram adicionados sobre o disco central em placas de Petri, com posterior direcionamento à estufa por 48h.

Legenda: CPA - ciclofosfamida; DOX – doxorubicina; AC: Esquema AC (CPA + DOX).

As seis linhagens das leveduras são semeadas em meios de cultura, líquidos ou sólidos, neste tipo de estudo (**Figura 1**). As linhagens são: EG118 que foi mutada em laboratório para torna-se deficiente no sistema enzimático quanto à enzima superóxido dismutase citoplasmática (gene *SOD1*); EG110 não apresenta a *SOD* mitocondrial (gene *SOD2*); EG133 é mutada para as duas enzimas, caracterizada pela ausência da *SOD1* e *SOD2*; EG223 é proficiente em defesa antioxidante para a enzima catalase (*CAT1*); EG mutada em *SOD1* e *CAT1* e EG103 corresponde à linhagem selvagem (*SODWT*), portanto é proficiente nas enzimas mitocondriais e citoplasmáticas.

**Figura 1:** Semeio das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* para determinação do potencial oxidante ou antioxidante de compostos.



### **2.6 Modulação dos danos oxidativos e mutagênicos da CPA, DOX e esquema AC pela influência do palmitato de retinol em associação com o ácido ascórbico**

Os valores do percentual de modulação das vitaminas associadas (PR + AA) sobre os danos oxidativos e citotóxicos induzidos pelos antineoplásicos ciclofosfamida e doxorrubicina, bem como associados no esquema AC foram calculados, em porcentagem, de acordo com a fórmula:  $M (\%) = (A - B + (PR + AA)) / A \times 100$ . Nota: “A” representa os valores para cada tipo de dano induzido pelos antineoplásicos, e “B + (PR + AA)” representa os valores dos danos toxicogênicos induzidos pelos antineoplásicos quando associados às vitaminas (PR + AA).

### **2.7 Análise estatística**

Os resultados foram considerados significantes a partir de uma correlação positiva de 95%. Foram aplicados a Análise de Variância (ANOVA) e Bonferroni como *post hoc* teste, por meio do programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego California USA).

### 3 Resultados

#### 3.1 Avaliação da citotoxicidade dos quimioterápicos e os efeitos modulatórios do PR em associação com o AA perante os antineoplásicos por meio do teste de *A. salina*

A mortalidade foi contada após uma exposição de 24 e 48h, indicando que as vitaminas isoladas ou ainda associadas (PR + AA) nas doses testadas permaneceram não citotóxicas, comparados ao controle negativo, em ambos os tempos. Por outro lado, os antineoplásicos isolados promoveram significantes percentuais de mortalidade ( $p < 0,001$ ) destacando a CPA, DOX e AC após 48h de exposição cuja letalidade foi de  $36.66 \pm 0.57$ ,  $40.00 \pm 1.00$  e  $46.66 \pm 0.58$ , respectivamente. Além disso, As vitaminas associadas (PR + AA) em co-tratamento com os antineoplásicos, diminuíram as taxas de mortalidade, onde a porcentagem foi de  $3.33 \pm 0.57$ ,  $10.00 \pm 0.00$  e  $10.00 \pm 0.00$  quando em co-tratamento com a CPA, DOX e esquema AC em 24h, respectivamente, e  $13.33 \pm 0.58$ ,  $16.66 \pm 0.58$  e  $16.66 \pm 0.57$  quando em co-tratamento com a CPA, DOX e esquema AC em 48h, respectivamente (**Tabela 4**).

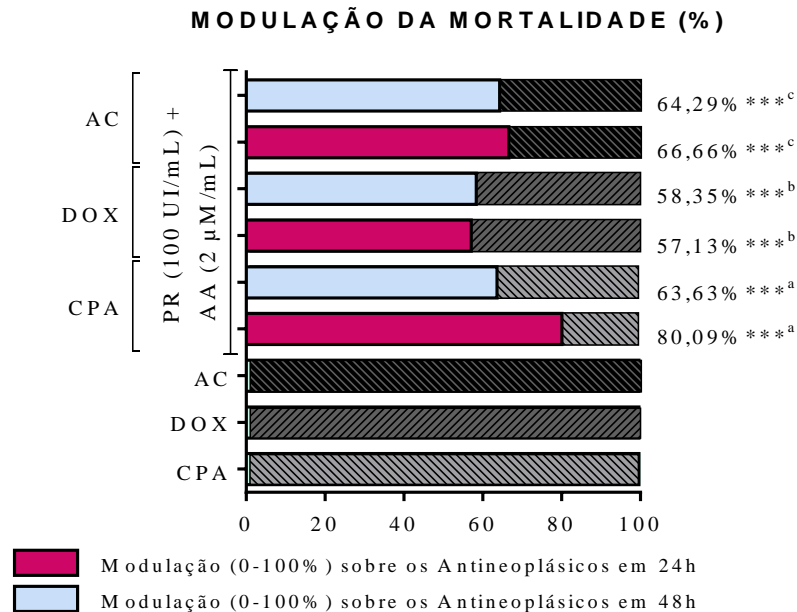
**Tabela 4.** Média  $\pm$  desvio padrão (DP) do percentual (%) de mortalidade dos náuplios tratados com os quimioterápicos de forma isolada e em associação com vitaminas antioxidantes (palmitato de retinol e ácido ascórbico) por meio do Bioensaio de Letalidade em *Artemia salina* (BSLB).

Tratamento	% de Mortalidade dos Náuplios	
	24h	48h
CN	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
PR	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
AA	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
PR + AA	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
CPA	16.66 $\pm$ 0.57**a	36.66 $\pm$ 0.57***a
CPA + PR + AA	3.33 $\pm$ 0.57*b	13.33 $\pm$ 0.58***ab
DOX	23.33 $\pm$ 0.57***a	40.00 $\pm$ 1.00***a
DOX + PR + AA	10.00 $\pm$ 0.00*ac	16.66 $\pm$ .58***ac
Esquema AC	30.00 $\pm$ 1.00***a	46.66 $\pm$ 0.58***a
Esquema AC+PR+AA	10.00 $\pm$ 0.00***ad	16.66 $\pm$ 0.57***ad

CN: controle negativo (solução de NaCl 0,9%). PR: Palmitato de Retinol (100 UI/mL). AA: Ácido Ascórbico (2  $\mu$ M/mL). Ciclofosfamida (CPA: 20  $\mu$ g/mL). Doxorubicina (DOX: 2  $\mu$ g/mL). Esquema AC (CPA e DOX: 20/2  $\mu$ g/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de Boferroni n=30 por tratamento. Valores significantes (MD $\pm$ DP) de  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.001^{***}$  para <sup>a</sup> comparado ao grupo CN, <sup>b</sup> à CPA, <sup>c</sup> à DOX e <sup>d</sup> ao Esquema AC.

Na avaliação anticitotóxica das vitaminas associadas (PR + AA) em *Artemia salina*, as mesmas modularam de forma significativa ( $p < 0,001$ ) a ação de mecanismos citotóxicos dos antineoplásicos sobre os náuplios, tanto no tempo de 24h quanto em 48h. (**Figura 2**).

**Figura 2.** Modulação (%) do Palmitato de Retinol (PR) e Ácido Ascórbico (AA) em associação sobre a citotoxicidade induzida por ciclofosfamida (CPA: 20 µg/mL), doxorubicina (DOX: 2 µg/mL) e Esquema AC (DOX e CPA: 2/20 µg/mL) em náuplios por meio do Bioensaio de Letalidade em *Artemia salina* (BSLB). ANOVA-*One-way* e pós-teste de *Tukey*. n=30 por tratamento. Valores significantes (MD±DP) de  $p<0.001$ \*\*\* para <sup>a</sup> comparado à CPA, <sup>b</sup> à DOX e <sup>c</sup> comparado ao Esquema AC.



### 3.2 Avaliação toxicogenética dos antineoplásicos e os efeitos modulatórios do PR em associação com o AA frente aos quimioterápicos por meio do teste de *A. cepa*

A avaliação macroscópica relacionada ao crescimento de raízes, indicativo de toxicidade, apontou que a CPA, a DOX e o esquema AC, nos três tempos de exposição, induziram efeitos tóxicos assim como o controle positivo (CP) quando comparados ao controle negativo, pela significativa ( $p<0,01$ ) diminuição do tamanho das raízes, com inibição do crescimento normal das mesmas. Entretanto, não foram observados dados significantes para esse parâmetro em relação às vitaminas isoladas ou ainda associadas (PR + AA), que, por sua vez, não apresentaram atividade tóxica assim como o controle negativo. Em relação aos antineoplásicos isolados, ao esquema AC e o co-tratamento com as vitaminas associadas (PR + AA), observou-se que houve uma modulação significativa ( $p<0,001$ ) da toxicidade pelo aumento do tamanho das raízes (**Tabela 5**).

Os dados relativos ao índice mitótico, em meristemas de raízes de *A. cepa*, mostraram que as raízes expostas aos antineoplásicos inibiram significativamente ( $p<0,01$ ) a divisão

celular em relação ao controle negativo, indicando atividade citotóxica em todos os tempos de exposição. A citotoxicidade não foi observada nas vitaminas isoladas ou ainda em associação (PR + AA). A associação do PR + AA em co-tratamento com os antineoplásicos modularam significativamente ( $p < 0,01$ ) a atividade citotóxica dos quimioterápicos. Além disso, houve a modulação da citotoxicidade representada pelo aumento do índice mitótico proveniente do co-tratamento do PR em associação com o AA em relação à ciclofosfamida à doxorubicina e ao esquema AC (**Tabela 5**).

**Tabela 5:** Efeitos tóxicos e citotóxicos dos quimioterápicos ciclofosfamida, doxorubicina e esquema AC e a modulação destes pela associação do palmitato de retinol (PR) com o ácido ascórbico (AA) em células meristemáticas de *Allium cepa*. ANOVA-One-way e pós-teste de Tukey. Valores de significância, <sup>a</sup>: comparado ao controle negativo (CN); <sup>b</sup>: comparado ao controle positivo (CP); <sup>c</sup>: comparado à ciclofosfamida; <sup>d</sup>: comparado à doxorubicina; <sup>e</sup>: comparado ao esquema AC.  $p < 0.01$ .

Tratamento	TE	TR	Fases da mitose					IM (%)
			Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	
CN		45,8 ± 5,9	489 ± 10,1	402 ± 13,5	44 ± 6,8	33 ± 5,9	32 ± 7,1	51,1 ± 4,7
CP		14,2 ± 3,2 <sup>a</sup>	910 ± 18,7 <sup>a</sup>	38 ± 5,4 <sup>a</sup>	20 ± 5,3 <sup>a</sup>	17 ± 4,8	15 ± 3,9 <sup>a</sup>	9 ± 4 <sup>a</sup>
PR 100 UI/mL		35,6 ± 4,2 <sup>b</sup>	537 ± 21,2 <sup>b</sup>	368 ± 16,7 <sup>b</sup>	39 ± 4,7 <sup>b</sup>	30 ± 3,9	26 ± 2,9	46,3 ± 6,4 <sup>b</sup>
AA 2 µM/mL		34,6 ± 3,2 <sup>b</sup>	502 ± 16,8 <sup>b</sup>	403 ± 14,6 <sup>b</sup>	43 ± 3,7 <sup>b</sup>	33 ± 3,1	19 ± 2,8	49,8 ± 6,1 <sup>b</sup>
PR + AA		33,4 ± 3,2 <sup>b</sup>	541 ± 19,8 <sup>b</sup>	378 ± 15,2 <sup>b</sup>	33 ± 2,8 <sup>b</sup>	27 ± 3,6	21 ± 2,9	45,9 ± 4,5 <sup>b</sup>
CPA 20 µg/mL	24hs	14,8 ± 3,9 <sup>a</sup>	893 ± 22,2 <sup>a</sup>	43 ± 8,7 <sup>a</sup>	25 ± 2,3 <sup>a</sup>	18 ± 1,8 <sup>a</sup>	21 ± 2,0	10,66 ± 1,2 <sup>a</sup>
DOX 2 µg/mL		15 ± 5 <sup>a</sup>	879 ± 16,2 <sup>a</sup>	41 ± 2,1 <sup>a</sup>	41 ± 0,9 <sup>b</sup>	23 ± 1,1	16 ± 1,0	12,18 ± 0,8 <sup>a</sup>
AC 20/2 µg/mL		13 ± 4,4 <sup>a</sup>	889 ± 15,6 <sup>a</sup>	33 ± 1,2 <sup>a</sup>	44 ± 1,1 <sup>b</sup>	19 ± 2,1 <sup>a</sup>	15 ± 3,1	11,1 ± 1,3 <sup>a</sup>
CPA + PR + AA		23 ± 4,4 <sup>a</sup>	784 ± 15,5 <sup>abcde</sup>	120 ± 2,3 <sup>abcde</sup>	35 ± 3,0	36 ± 1,5 <sup>ce</sup>	25 ± 0,8	21,7 ± 3,1 <sup>abcde</sup>
DOX + PR + AA		29,4 ± 2,6 <sup>abcde</sup>	747 ± 13,2 <sup>abcde</sup>	121 ± 3,3 <sup>abcde</sup>	49 ± 1,2 <sup>bc</sup>	48 ± 2,4 <sup>abcde</sup>	35 ± 1,6 <sup>bcde</sup>	25,2 ± 4,5 <sup>abcde</sup>
AC + PR + AA		31 ± 2,2 <sup>abcde</sup>	794 ± 15,7 <sup>abcde</sup>	128 ± 2,7 <sup>abcde</sup>	28 ± 1,1 <sup>ade</sup>	29 ± 1,6	11 ± 1,0 <sup>a</sup>	20,6 ± 0,6 <sup>abcde</sup>
CN		53,6 ± 5,4	483 ± 13,4	420 ± 16,7	41 ± 8,8	29 ± 5,8	27 ± 4,9	51,76 ± 6,1
CP		19 ± 3,9 <sup>a</sup>	913 ± 17,2 <sup>a</sup>	40 ± 6,2 <sup>a</sup>	18 ± 3,9 <sup>a</sup>	16 ± 4,1	13 ± 2,9 <sup>a</sup>	8,76 ± 1,4 <sup>a</sup>
PR 100 UI/mL		44 ± 10,8 <sup>b</sup>	527 ± 16,9 <sup>b</sup>	372 ± 11,2 <sup>b</sup>	42 ± 3,3 <sup>b</sup>	35 ± 2,2 <sup>b</sup>	24 ± 2,8	47,3 ± 4,9 <sup>b</sup>
AA 2 µM/mL		45,8 ± 5,4 <sup>b</sup>	544 ± 20,4 <sup>b</sup>	389 ± 12,3 <sup>b</sup>	28 ± 2,3	25 ± 1,9	14 ± 2,2	45,5 ± 3,4 <sup>b</sup>
PR + AA		46 ± 5,4 <sup>b</sup>	552 ± 15,7 <sup>b</sup>	397 ± 9,7 <sup>b</sup>	23 ± 1,8 <sup>a</sup>	16 ± 2,0	12 ± 1,1 <sup>a</sup>	44,7 ± 2,7 <sup>b</sup>
CPA 20 µg/mL	48hs	21,6 ± 5,9 <sup>a</sup>	885 ± 21,1 <sup>a</sup>	54 ± 4,1 <sup>a</sup>	28 ± 1,1	21 ± 1,7	12 ± 0,9 <sup>a</sup>	11,5 ± 1,5 <sup>a</sup>
DOX 2 µg/mL		21,4 ± 4,8 <sup>a</sup>	910 ± 16,8 <sup>a</sup>	40 ± 2,5 <sup>a</sup>	27 ± 1,4	14 ± 1,0 <sup>a</sup>	9 ± 0,8 <sup>a</sup>	9 ± 0,7 <sup>a</sup>
AC 20/2 µg/mL		18,2 ± 3,8 <sup>a</sup>	899 ± 21,2 <sup>a</sup>	43 ± 1,1 <sup>a</sup>	32 ± 2,1	14 ± 1,0 <sup>a</sup>	12 ± 1,1 <sup>a</sup>	10,16 ± 1,6 <sup>a</sup>
CPA + PR + AA		34 ± 3,6 <sup>abcde</sup>	757 ± 16,4 <sup>abcde</sup>	134 ± 6,7 <sup>abcde</sup>	44 ± 2,0 <sup>bcd</sup>	37 ± 1,2 <sup>bcde</sup>	28 ± 1,3 <sup>bcde</sup>	24,32 ± 1,3 <sup>abcde</sup>
DOX + PR + AA		42,2 ± 2,2 <sup>abcde</sup>	778 ± 13,3 <sup>abcde</sup>	131 ± 2,9 <sup>abcde</sup>	40 ± 1,8 <sup>bcd</sup>	30 ± 1,1 <sup>bde</sup>	21 ± 0,6	22,2 ± 2,5 <sup>abcde</sup>
AC + PR + AA		42,6 ± 3,3 <sup>abcde</sup>	810 ± 14,4 <sup>abcde</sup>	119 ± 1,7 <sup>abcde</sup>	35 ± 1,5 <sup>b</sup>	25 ± 0,7	11 ± 1,6 <sup>a</sup>	19 ± 1,1 <sup>abde</sup>
CN		67 ± 2,0	477 ± 11,2	430 ± 18,9	38 ± 8,8	26 ± 10,4	29 ± 6,9	52,3 ± 2,6
CP		23,8 ± 4,1 <sup>a</sup>	892 ± 20,1 <sup>a</sup>	43 ± 6,9 <sup>a</sup>	29 ± 4,1	19 ± 4,9	17 ± 3,1	10,8 ± 3,1 <sup>a</sup>
PR 100 UI/mL		64 ± 11,4 <sup>b</sup>	531 ± 15,6 <sup>b</sup>	410 ± 10,0 <sup>b</sup>	29 ± 2,7	18 ± 2,4	12 ± 1,8 <sup>a</sup>	46,9 ± 2,3 <sup>b</sup>
AA 2 µM/mL		66 ± 8,9 <sup>b</sup>	541 ± 10,9 <sup>b</sup>	363 ± 11,1 <sup>b</sup>	34 ± 1,8	33 ± 2,0	29 ± 2,1	45,9 ± 4,1 <sup>b</sup>
PR + AA		65,8 ± 4,2 <sup>b</sup>	555 ± 11,1 <sup>a</sup>	360 ± 8,7 <sup>a,b</sup>	39 ± 1,1	25 ± 0,7	21 ± 0,5	44,5 ± 2,7 <sup>b</sup>
CPA 20 µg/mL	72hs	27,8 ± 7,7 <sup>a</sup>	909 ± 20,2 <sup>a</sup>	43 ± 1,3 <sup>a</sup>	25 ± 1,7 <sup>a</sup>	12 ± 0,8	11 ± 1,0 <sup>a</sup>	9,11 ± 1,2 <sup>a</sup>
DOX 2 µg/mL		30,4 ± 4,3 <sup>a</sup>	908 ± 15,9 <sup>a</sup>	45 ± 1,7 <sup>a</sup>	31 ± 1,1	8 ± 0,6 <sup>ab</sup>	8 ± 0,6 <sup>ab</sup>	9,2 ± 0,7 <sup>a</sup>
AC 20/2 µg/mL		22,6 ± 3,8 <sup>a</sup>	915 ± 19,9 <sup>a</sup>	38 ± 1,2 <sup>a</sup>	27 ± 0,8	11 ± 0,8	9 ± 1,2 <sup>ab</sup>	8,5 ± 0,6 <sup>a</sup>
CPA + PR + AA		48 ± 2,8 <sup>abcde</sup>	810 ± 19 <sup>abcde</sup>	107 ± 3,8 <sup>abcde</sup>	47 ± 1,2 <sup>b</sup>	21 ± 1,0 <sup>de</sup>	24 ± 1,6 <sup>cde</sup>	19,8 ± 1,4 <sup>abcde</sup>
DOX + PR + AA		51,2 ± 1,7 <sup>abcde</sup>	799 ± 14,8 <sup>abcde</sup>	118 ± 4,1 <sup>abcde</sup>	32 ± 1,6	26 ± 1,0 <sup>de</sup>	25 ± 1,8 <sup>cde</sup>	20,1 ± 2,3 <sup>abcde</sup>
AC + PR + AA		52,4 ± 1,6 <sup>abcde</sup>	811 ± 16,6 <sup>abcde</sup>	114 ± 3,1 <sup>abcde</sup>	34 ± 1,4	23 ± 1,2 <sup>de</sup>	18 ± 1,1	18,9 ± 1,7 <sup>abcde</sup>

CPA: Ciclofosfamida; DOX: Doxorubicina; Esquema AC (CPA + DOX); TR: Tamanho de raiz; IM: Índice mitótico.

Em relação à avaliação da mutagenicidade, foi observado que CP, os grupos que utilizaram apenas os antineoplásicos de forma isolada (CPA, DOX e esquema AC) em todos os tempos de exposição e o grupo do esquema AC em co-tratamento com a associação do PR + AA nos tempos de 24 e 72h foram estatisticamente significantes em relação ao controle negativo. Cabe ressaltar que as vitaminas isoladas ou ainda em associação (PR + AA) não induziram mutagenicidade em raízes de *A. cepa* em relação ao controle negativo. Nesse sentido, foi possível observar que o co-tratamento com as vitaminas associadas (PR + AA) modulou a mutagenicidade pela redução do número de aberrações cromossômicas em relação à ciclofosfamida em 58% (24 hr), 62% (48 hr), 68% (72hr), à doxorubicina 57% (24 hr), 58% (48 hr), 57% (72hr) e ao esquema AC 11% (24hr), 67% (48 hr), 20% (72 hr). Dentre as alterações cromossômicas (ACs) induzidas pelos antineoplásicos observadas nas células, destacam-se micronúcleos, fragmentos, pontes, atrasos e cromossomos soltos. As ACs identificadas em meristemas de raízes de *A. cepa* expostas aos antineoplásicos, foram moduladas pela associação do PR + AA, sugerindo que podem apresentar mecanismos de inibição de agentes aneugênicos e/ou clastogênicos (**Tabela 6**).



**Tabela 6:** Efeitos mutagênicos dos quimioterápicos ciclofosfamida, doxorrubicina e esquema AC e a modulação destes pela associação do palmitato de retinol (PR) com o ácido ascórbico (AA) em células meristemáticas de *Allium cepa*. ANOVA-*One-way* e pós-teste de *Tukey*. Valores de significância, <sup>a</sup>: comparado ao controle negativo (CN); <sup>b</sup>: comparado ao controle positivo (CP); <sup>c</sup>: comparado à ciclofosfamida; <sup>d</sup>: comparado à doxorrubicina; <sup>e</sup>: comparado ao esquema AC.  $p < 0.01$ .

Tratamento	TE	Tipos de alterações cromossômicas (AC)					Total de ALCR
		Micronúcleos	c-metáfases	Pontes	Cromossomos soltos	Atrasos	
CN	24 hs	1,0 ± 0,6	1,4 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,2	4,2 ± 1,5
CP		5,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	4,8 ± 1,0 <sup>a</sup>	5,8 ± 1,5 <sup>a</sup>	10,2 ± 2,2 <sup>a</sup>	10,6 ± 2,2 <sup>a</sup>	36,8 ± 2,2 <sup>a</sup>
PR 100 UI/mL		1,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	5,5 ± 2,1 <sup>b</sup>
AA 2 µM/mL		0,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,5 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	6,1 ± 1,4 <sup>b</sup>
PR + AA		1,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	1,8 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	6,4 ± 1,7 <sup>b</sup>
CPA 20 µg/mL		3,4 ± 1,2	2,6 ± 1,1	2,8 ± 1,6	4,4 ± 1,4 <sup>a,b</sup>	5,6 ± 1,6 <sup>a</sup>	18,9 ± 1,2 <sup>ab</sup>
DOX 2 µg/mL		3,8 ± 1,4	3,2 ± 1,3	2,2 ± 0,6 <sup>b</sup>	5,0 ± 1,2 <sup>a,b</sup>	7,2 ± 1,5 <sup>a</sup>	21,4 ± 1,4 <sup>ab</sup>
AC 20/2 µg/mL		4,2 ± 1,0 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,9	2,4 ± 0,9	5,4 ± 1,6 <sup>a</sup>	6,4 ± 1,8 <sup>a</sup>	22,1 ± 1,9 <sup>ab</sup>
CPA + PR + AA		1,2 ± 0,3 <sup>be</sup>	1,0 ± 0,2 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,2 <sup>bde</sup>	2,2 ± 0,4 <sup>abd</sup>	2,6 ± 1,1 <sup>bde</sup>	7,9 ± 1,8 <sup>bde</sup>
DOX + PR + AA		1,8 ± 0,8 <sup>de</sup>	1,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,3 <sup>bc</sup>	1,8 ± 0,9 <sup>bcd</sup>	3,2 ± 1,0 <sup>bd</sup>	9,1 ± 1,4 <sup>bde</sup>
AC + PR + AA	3,8 ± 1,5	3,4 ± 0,5	2,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	4,4 ± 1,3 <sup>a,b</sup>	5,8 ± 1,4 <sup>a</sup>	19,5 ± 1,1 <sup>ab</sup>	
CN	48 hs	1,0 ± 0,3	1,4 ± 0,7	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,1	4,9 ± 1,6
CP		5,8 ± 2,1 <sup>a</sup>	4,8 ± 1,1 <sup>a</sup>	4,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	8,8 ± 2,6 <sup>a</sup>	8,6 ± 2,6 <sup>a</sup>	32,4 ± 2,1 <sup>a</sup>
PR 100 UI/mL		1,8 ± 0,7 <sup>b</sup>	1,8 ± 0,3	1,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	7,5 ± 1,7 <sup>b</sup>
AA 2 µM/mL		1,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,9 ± 1,0 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	6,9 ± 1,7 <sup>b</sup>
PR + AA		1,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,3	1,8 ± 0,5 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	7,4 ± 1,3 <sup>b</sup>
CPA 20 µg/mL		4,4 ± 1,8 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,8	1,6 ± 0,7	5,2 ± 2,2 <sup>a</sup>	4,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	17,8 ± 2,1 <sup>ab</sup>
DOX 2 µg/mL		3,2 ± 1,1	2,6 ± 1,1	1,8 ± 0,2	4,4 ± 2,1	6,8 ± 2,1 <sup>a</sup>	18,9 ± 0,9 <sup>ab</sup>
AC 20/2 µg/mL		5,6 ± 1,1 <sup>a</sup>	4,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	4,0 ± 1,3 <sup>a</sup>	5,6 ± 1,9 <sup>a</sup>	5,6 ± 1,6 <sup>a</sup>	25,2 ± 1,1 <sup>a</sup>
CPA + PR + AA		0,8 ± 0,2 <sup>bcd</sup>	0,8 ± 0,3 <sup>bcd</sup>	1,0 ± 0,4 <sup>be</sup>	1,8 ± 0,4 <sup>bce</sup>	2,2 ± 0,8 <sup>bde</sup>	6,7 ± 1,1 <sup>cde</sup>
DOX + PR + AA		1,2 ± 0,5 <sup>be</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>be</sup>	1,0 ± 0,4 <sup>be</sup>	1,4 ± 0,5 <sup>bcd</sup>	3,2 ± 0,9 <sup>b</sup>	7,9 ± 0,8 <sup>cde</sup>
AC + PR + AA	1,8 ± 0,7 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,4 <sup>be</sup>	1,0 ± 0,3 <sup>be</sup>	2,2 ± 0,7 <sup>b</sup>	1,8 ± 0,5 <sup>bcd</sup>	8,1 ± 1,4 <sup>cde</sup>	
CN	72 hs	1,4 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,2	1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,3	5,6 ± 1,2
CP		8,0 ± 2,4 <sup>a</sup>	6,6 ± 1,6 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	8,2 ± 2,5 <sup>a</sup>	11,2 ± 2,6 <sup>a</sup>	37,8 ± 1,9 <sup>a</sup>
PR 100 UI/mL		1,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,5 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	6,8 ± 2,5 <sup>b</sup>
AA 2 µM/mL		1,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,8 ± 0,5 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	7,4 ± 1,6 <sup>b</sup>
PR + AA		1,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	1,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	2,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	8,3 ± 2,1 <sup>b</sup>
CPA 20 µg/mL		4,8 ± 1,8 <sup>ab</sup>	2,6 ± 0,9	1,8 ± 0,8	4,8 ± 1,5 <sup>a</sup>	5,8 ± 1,1 <sup>a</sup>	19,8 ± 0,9 <sup>ab</sup>
DOX 2 µg/mL		3,6 ± 1,5 <sup>b</sup>	2,4 ± 1,2 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,4 ± 2,0	8,8 ± 2,2 <sup>a</sup>	20,9 ± 0,7 <sup>ab</sup>
AC 20/2 µg/mL		4,4 ± 1,1 <sup>a,b</sup>	4,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	3,2 ± 1,9 <sup>a</sup>	5,0 ± 2,1 <sup>a</sup>	4,6 ± 1,0 <sup>a</sup>	21,2 ± 1,2 <sup>ab</sup>
CPA + PR + AA		0,8 ± 0,2 <sup>bcd</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>bcd</sup>	1,0 ± 0,5 <sup>be</sup>	1,6 ± 0,4 <sup>bde</sup>	2,2 ± 0,8 <sup>bcd</sup>	6,3 ± 1,5 <sup>bcd</sup>
DOX + PR + AA		1,4 ± 0,3 <sup>bce</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>be</sup>	1,6 ± 0,3	1,8 ± 0,5 <sup>bce</sup>	3,0 ± 0,9 <sup>bd</sup>	8,9 ± 1,6 <sup>bcd</sup>
AC + PR + AA	2,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,9 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,8	3,8 ± 1,3 <sup>bd</sup>	16,8 ± 1,3 <sup>ab</sup>	

CPA: Ciclofosfamida; DOX: Doxorrubicina; Esquema AC (CPA + DOX); ALCR: Alterações cromossômicas.

### ***3.3 Avaliação dos danos oxidativos induzidos pelos antineoplásicos e os efeitos modulatórios do PR em associação com o AA frente aos quimioterápicos em *S. cerevisiae****

A CPA, a DOX e o esquema AC e os seus respectivos co-tratamento com as vitaminas associadas (PR + AA) induziram danos oxidativos significantes ( $p < 0,001$ ) em todas as linhagens testadas, quando comparados com o controle negativo (solução salina). Todavia, quando ambas as vitaminas foram associadas aos antineoplásicos os danos oxidativos induzidos pelos mesmos foram modulados significativamente ( $p < 0,001$ ) (**Tabela 7**).

As vitaminas conjugadas (PR + AA) modularam os efeitos oxidativos dos quimioterápicos CPA, DOX e esquema AC em todas as linhagens testadas, proficientes e mutadas em defesas antioxidantes para as enzimas superóxido dismutase e catalase. Para melhor elucidar a modulação das vitaminas, os dados apresentados na **Tabela 7** foram plotados em percentuais de modulação (%M) das vitaminas conjugadas (PR + AA) perante os danos oxidativos induzidos pelos antineoplásicos. O cálculo foi realizado conforme descrito no item 2.6 da metodologia.

Verificou-se que as vitaminas associadas modularam os danos oxidativos induzidos com percentuais acima de 50%, para CPA e DOX, respectivamente, em todas as linhagens de *S. cerevisiae* testadas. Já para o esquema AC a redução dos danos oxidativos induzidos foi menor se comparado com a CPA e a DOX. Todavia, a modulação das vitaminas associadas sobre o esquema AC ainda foi significante ( $p < 0,001$ ) para todas as linhagens (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Inibição de crescimento induzidos por ciclofosfamida, doxorubicina e esquema AC, e o co-tratamento com o palmitato de retinol e ácido ascórbico em associação (CPA+PR+AA, DOX+PR+AA, AC+PR+AA) em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Dados obtidos pela inibição de crescimento em placas (0-40 mm).

Tratamentos	Linhagens <sup>#</sup>					
	<i>SODWT</i>	<i>Sod1Δ</i>	<i>Sod2Δ</i>	<i>Sod1Sod2Δ</i>	<i>CatΔ</i>	<i>Sod1CatΔ</i>
Salina	0.75 ± 0.50	1.50 ± 0.57	1.25 ± 0.50	2.00 ± 0.81	1.25 ± 0.50	1.50 ± 0.57
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	22.5 ± 1.29 <sup>***a</sup>	24.25 ± 1.70 <sup>***a</sup>	23.0 ± 2.16 <sup>***a</sup>	25.75 ± 1.50 <sup>***a</sup>	23.25 ± 1.70 <sup>***a</sup>	24.5 ± 1.29 <sup>***a</sup>
PR	1.25 ± 0.50 <sup>***e</sup>	1.75 ± 0.50 <sup>***e</sup>	1.50 ± 0.57 <sup>***e</sup>	2.00 ± 0.81 <sup>***e</sup>	1.75 ± 0.95 <sup>***e</sup>	2.25 ± 0.50 <sup>***e</sup>
AA	1.00 ± 0.81 <sup>***e</sup>	1.75 ± 0.50 <sup>***e</sup>	1.25 ± 0.50 <sup>***e</sup>	2.25 ± 0.50 <sup>***e</sup>	1.50 ± 0.57 <sup>***e</sup>	2.00 ± 0.81 <sup>***e</sup>
PR + AA	1.25 ± 0.95 <sup>***e</sup>	2.00 ± 0.81 <sup>***e</sup>	1.75 ± 0.50 <sup>***e</sup>	2.25 ± 0.95 <sup>***e</sup>	1.50 ± 1.00 <sup>***e</sup>	2.25 ± 0.95 <sup>***e</sup>
CPA	18.5 ± 1.29 <sup>***a</sup>	20.25 ± 1.70 <sup>***a</sup>	19.5 ± 1.29 <sup>***a</sup>	23.0 ± 2.16 <sup>***a</sup>	20.0 ± 1.41 <sup>***a</sup>	21.5 ± 1.73 <sup>***a</sup>
CPA+PR+AA	5.75 ± 0.95 <sup>***abe</sup>	7.00 ± 1.41 <sup>***abe</sup>	6.75 ± 1.25 <sup>***abe</sup>	9.25 ± 1.25 <sup>***abe</sup>	6.50 ± 1.29 <sup>***abe</sup>	8.00 ± 1.62 <sup>***abe</sup>
	(68,91 ± 4,01)	(65,43 ± 10,41)	(65,38 ± 4,61)	(59,78 ± 5,81)	(67,50 ± 7,16)	(62,79 ± 5,95)
DOX	15.25 ± 1.70 <sup>***ae</sup>	17.5 ± 1.29 <sup>***ae</sup>	16.5 ± 1.29 <sup>***a</sup>	19.0 ± 2.44 <sup>***a</sup>	16.75 ± 1.25 <sup>***a</sup>	18.0 ± 1.63 <sup>***a</sup>
DOX+PR+AA	5.00 ± 0.81 <sup>***ace</sup>	6.50 ± 1.29 <sup>***ace</sup>	6.25 ± 0.95 <sup>***ace</sup>	8.50 ± 1.29 <sup>***ace</sup>	6.00 ± 0.81 <sup>***ace</sup>	7.50 ± 1.29 <sup>***ace</sup>
	(67,24 ± 3,55)	(62,84 ± 6,89)	(61,62 ± 8,55)	(54,01 ± 13,05)	(63,93 ± 6,07)	(57,74 ± 10,53)
AC	20.25 ± 1.50 <sup>***a</sup>	22.0 ± 1.41 <sup>***a</sup>	21.25 ± 1.89 <sup>***a</sup>	24.25 ± 1.70 <sup>***a</sup>	21.25 ± 1.25 <sup>***a</sup>	23.75 ± 2.62 <sup>***a</sup>
AC+PR+AA	10.50 ± 2.08 <sup>***ade</sup>	13.00 ± 1.41 <sup>***ade</sup>	12.25 ± 1.70 <sup>***ade</sup>	14.75 ± 1.70 <sup>***ade</sup>	12.50 ± 1.73 <sup>***ade</sup>	14.00 ± 1.41 <sup>***ade</sup>
	(47,42 ± 13,74)	(43,95 ± 10,35)	(31,15 ± 10,14)	(37,62 ± 16,19)	(40,98 ± 9,39)	(39,62 ± 11,41)

<sup>#</sup>Os valores correspondem a Média ± Desvio padrão das medidas dos halos de inibição de crescimento das linhagens. AA: Ácido Ascórbico (2 µM). CPA: Ciclofosfamida (20 µg/mL). DOX: Doxorubicina (2 µg/mL). AC (20 µg/mL; 2 µg/mL): ciclofosfamida + doxorubicina. ANOVA-*one-way* e pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância para <sup>\*\*\*a</sup> p<0.001 comparado à salina, <sup>\*\*\*b</sup> p<0.001 comparado à CPA, <sup>\*\*\*c</sup> p<0.001 comparado à DOX e <sup>\*\*\*d</sup> p<0.001 comparado ao esquema AC, <sup>\*\*\*e</sup> p<0.001 comparado ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os valores entre parênteses representam a Média ± Desvio Padrão do percentual de modulação (% M) dos antineoplásicos.

#### 4 Discussão

O uso de antioxidantes durante a quimioterapia ainda vem sendo bastante discutido, devido às várias controvérsias sobre o seu potencial de reduzir a eficácia citotóxica de quimioterápicos (Tokarski et al., 2013; Bichsel et al., 2013). A mortalidade dos microcrustáceos, o efeito citotóxico e mutagênico em *A. cepa*, além dos danos oxidativos em *S. cerevisiae* observados no presente estudo, possivelmente se deu pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROS), e/ou efeitos pró oxidativos, induzidos pelos antineoplásicos CPA, DOX e esquema AC, culminando em paradas no ciclo celular (citotoxicidade) e alterações no material genético (mutagenicidade). Todavia, as vitaminas associadas (PR + AA) modularam esses danos/efeitos em células não tumorais.

A ciclofosfamida pode gerar danos ao DNA, tendo grande potencial para causar lesão por estresse oxidativo através da formação de radicais livres (Tripathi; Jena, 2010; Liu et al., 2012). A liberação destes radicais também é promovida pela doxorrubicina, geralmente levando a apoptose. Este antineoplásico favorece a formação de radicais livres, além de promover a diminuição dos antioxidantes intracelulares, os quais são responsáveis pela prevenção de danos por radicais livres, aumentando, desta forma, os efeitos tóxicos (Minott et al., 2004). Estudos apontam que compostos antioxidantes inibem a ação citotóxica da DOX entre 10 a 30%, devido à inibição do radical superóxido produzido pelo antineoplásico. Os antioxidantes, a exemplo das vitaminas A e C, podem prevenir a formação ou capturar radicais livres pela ação da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase evitando reações oxidativas (Sindhi et al., 2013; Tremante et al., 2015).

Estudos com linhagens celulares mostram que o ácido ascórbico pode modular os efeitos citotóxicos de outros quimioterápicos como 5-fluorouracil e vincristina por mecanismos associados à captura de radicais livres, redução de quebra de cadeias de DNA, por combinação com proteínas formando selenoproteínas, por quelar metais e reparo de aberrações ao DNA (Moss, 2006; Prasad; Kumar, 1999; Cameron; Pauling, 1976). A vitamina A e seus derivados, como o palmitato de retinol, apresentam potente efeito terapêutico em várias doenças devido sua ação antioxidante (Persaud et al., 2016) além de funções biológicas como o crescimento, diferenciação e a integridade epitelial (Hanse et al., 2013), onde o papel citoprotetor dos antioxidantes é comumente observado em estudos *in vitro* e *in vivo* (Panchuk et al., 2014).

Estudos *in vitro*, de células humanas MCF-7 em exposição ao AA, indica que o composto causa atenuação de antineoplásicos podendo afetar a resposta terapêutica (Subramani et al., 2014). A combinação da ciclofosfamida com o AA produz uma redução dos níveis de GSH, tornando células tumorais mais susceptíveis a morte celular induzida pela ciclofosfamida (Prasad et al., 2010). Essa associação também produz um efeito protetivo contra a citotoxicidade do antineoplásico nas células reprodutivas, digestivas e renais, diminuindo os efeitos adversos e melhorando a qualidade de vida do paciente que reagem melhor à terapia (Gurgen et al., 2013; Farshid et al., 2013).

Os dados corroboram com Alencar et al., (2016) e De Carvalho et al., 2017, onde em estudos semelhantes utilizando as vitaminas ácido ascórbico e palmitato de retinol, respectivamente, nas mesmas concentrações do presente estudo, verificou que os quimioterápicos isolados induziram expressivos danos oxidativos em todas as linhagens de leveduras testadas. Os mesmos ainda verificaram que o co-tratamento dos antineoplásicos com o AA ou ainda com o PR isolados ocasionou significativa modulação dos danos oxidativos derivados da CPA, DOX e esquema AC em todas as linhagens de *S. cerevisiae* testadas. Todavia, nosso estudo observou que a modulação dos danos oxidativos induzidos pelos antineoplásicos foi quantitativamente maior, possivelmente, devido à associação das duas vitaminas (PR + AA) em relação ao co-tratamento dos quimioterápicos somente com o ácido ascórbico ou ainda com o palmitato de retinol, sugerindo um possível efeito aditivo e/ou sinérgico no que se refere à atividade antioxidante das vitaminas associadas (PR + AA).

Os nutrientes com antioxidantes pode atuar na prevenção e no tratamento do câncer minimizando parte dos efeitos colaterais das terapias, já que agem frente a danos oxidativos e neutraliza os radicais livres (De Carvalho et al., 2017; Alencar et al., 2016; Banala; Kanarti, 2015; Shao et al., 2016). Dessa forma, os derivados e precursores da vitamina A, tais como o palmitato de retinol, bem como o ácido ascórbico, vêm sendo aplicados em terapias oncológicas por meio de suplementações vitamínicas (Alencar et al., 2016; Felisbino et al., 2014; Rahal et al., 2014).

As vitaminas antioxidantes são importantes para a homeostase corporal (Alabdali; Al-Ayadi; El-Ansary, 2014; Chang; Sheen; Lei, 2015) além de serem compostos eficientes na estabilização de moléculas instáveis, importantes para a prevenção de danos oxidativos. Segundo o Consenso Nacional de Nutrição ao paciente oncológico, os antioxidantes, como a vitamina C (ácido ascórbico) e a vitamina A (palmitato de retinol) podem ser considerados

antioxidantes por inibir ou atrasar a oxidação, diminuindo a concentração de radicais livres no organismo e, assim, atuando na prevenção do câncer (Bucioli et al., 2011; Greenlee, 2012; Celik et al., 2013). Em contrapartida, quando utilizados em outro momento tal como em co-tratamento com quimioterápicos, possivelmente podem ter efeitos moduladores diante desses fármacos como observados no presente trabalho em células não neoplásicas.

Em resumo, os dados podem ser explicados pela prevenção da desordem do estresse oxidativo entre as moléculas antioxidantes e pró-oxidantes através das vitaminas antioxidantes como a vitamina A que é capaz de neutralizar radicais livres no ambiente intracelular (Portantiolo et al., 2014, De Carvalho et al. 2017) e o ácido ascórbico, comumente conhecido como um antioxidante quando usado em baixas doses (Mastrangelo et al., 2015, Luanpitpong et al., 2012; Tsai-Turton et al., 2007).

#### 4 Conclusão

A associação do palmitato de retinol e ácido ascórbico em co-tratamento com os antineoplásicos modularam os danos citotóxicos, mutagênicos e oxidativos, induzidos pelos quimioterápicos CPA, DOX e esquema AC, sugerindo um potencial antioxidante perante aos antineoplásicos quando em estudo com células não tumorais. Assim, ressalta-se a necessidade de novos estudos em linhagens tumorais e tumores para um melhor entendimento acerca dos mecanismos de ação das vitaminas associadas (PR + AA) e os possíveis efeitos da administração concomitante na terapia do câncer. Este aspecto deve ser considerado já que a utilização de vitaminas antioxidantes em baixas concentrações durante a quimioterapia, pelo observado no presente estudo, pode ter o potencial de comprometer a eficácia do tratamento.

## Referências

- Alabdali, A., Al-Ayadhi, L., El-Ansary, A., 2014. A key role for an impaired detoxification mechanism in the etiology and severity of autism spectrum disorders. **Behav. Brain Funct.** v. 10, n. 14.
- Al-Asmari, A.K., Khan, A.Q., Al-Quasim, A.M., Al-Yousef, Y., 2015. 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.
- Alencar, M. V. O. B., Islam, MD. T., Rocha, L. M. C., Queiroz, J. L., Silva, M. B. S., Mata, A. M. O. F., 2016. Ascorbic Acid Modulates Doxorubicin and Cyclophosphamide-Induced Cytogenetic Damages in Sarcoma 180 Cells. **International Archives of Medicine.** v. 9, n. 181.
- Altucci, L., Gronemeyer, H., 2001. The promise of retinoids to fight against cancer. **Nature Reviews Cancer.** v. 1, p.181–193.
- Banala, R. R., Kanarti, P. R., 2015. An oxidative stress marker in sodium fluoride (NaF) induced oxidative damage in developing rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience.** v. 47, p. 298-303.
- Bichsel, K.J., Gogia, N., Malouff T., Pena, Z., Forney, E., Hammiller, B., Watson, P., Hansen, L.A., 2013. Role for the epidermal growth factor receptor in chemotherapy-induced alopecia. **PLoS ONE.** v.8, n.7, p. 12-23.
- Bucioli, S. A., De Abreu, L., Valenti, V. E., Leone, C., Vannucchi, H., 2011. Effects of vitamin E supplementation on renal non-enzymatic antioxidants in young rats submitted to exhaustive exercise stress. **BMC Complement. Altern. Med.** v. 11, n. 133.
- Bressan, A. L., Silva, R. S., Fontenelle, E., Gripp, A. C., 2010. Imunossupressores na Dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia.** v. 85, n.1, p. 9-22.
- Cameron, E., Pauling, L., Leibovitz, B., 1979. Ascorbic acid and cancer: a review. **Cancer Research.** v. 39, p. 663-669.
- Celik, V. K., Eken, I. E., Yildiz, G., Yilmaz, M. B., Gurlek, A., Aydin, H., 2013. Vitamin E and antioxidant activity; its role in slow coronary flow. **Cardiovasc. J. Afr.** v. 24, p. 360–363.
- Chang, H., Sheen, L., Lei, Y., 2015. The protective role of carotenoids and polyphenols in patients with head and neck cancer. **Journal of the Chinese Medical Association.** v. 78, p. 89–95.
- De Carvalho, R. M., Aguiar, R. P., Islam, M. T., De Alencar, M. V., Da Mata, A. M., Braga, A. L., Júnior, J. J., Sousa, L. D., De Lima, R. M., Paz, M. F., Sousa, J. M., Melo-Cavalcante, A. A., 2017. Cytogenotoxicological defense of retinyl palmitate in the front damage of antineoplastics. **Experimental and Toxicologic Pathology.** v. 69, p. 293-297.



Farshid, A. A., Tamaddonfard, E., Ranjbar, S., 2013. Oral administration of vitamin C and histidine attenuate cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Indian journal of pharmacology**. v. 45, n. 2, p. 126-129.

Felisbino, S., Moreno, V., Batista, A. A., Silveira-Lacerda, E., 2014. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium (II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PLoS ONE**. v. 9, n. 10, p. 105-125.

Fiskesjō, G., 1985. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112.

Freedman, R. A., Partridge, A. H., 2011. Adjuvant therapies for very young women with early stage breast cancer. **Breast**. v. 20, n. 3, p. 146-149.

Fuh, K. C., Secord, A. A., Bevis, K. S., Hu, W., Elngard, A., Blansit, K., 2015. Comparison of Bevacizumab Alone or with Chemotherapy in Recurrent Ovarian Cancer Patients. **Gynecologic Oncology**.

Gupta, S. C., Kim, J. H., Prasad, S., Aggarwal, B. B., 2010. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. **Cancer Metastasis Reviews**. v. 29, p. 405–434.

Gurgen, S.G., Erdogan, D., Elmas, C., Kaplanoglu, G. T., 2013. Chemoprotective effect of ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, and selenium on cyclophosphamide-induced toxicity in the rat ovary. **Nutrition**. v. 29, p. 777-784.

Greenlee, H., Kwan, M. L., Kushi, L. H., Song, J., Castillo, A., Weltzien, E., Quesenberry, C. P. Jr., Caan, B. J., 2012. Antioxidant supplement use after breast cancer diagnosis and mortality in the Life After Cancer Epidemiology (LACE) cohort. **Cancer**. v. 118, n. 8, p. 2048-2058.

Hansen, L. A., Sigman, C. C., Andreola, F., Ross, S. A., Kelloff, G. J., De Luca, L. M., 2000. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. **Carcinogenesis**. v. 21, n. 7, p. 1271-1279.

Lee, G. Y., Lee, J. J., Lee, S. M., 2015. Antioxidant and Anticoagulant Status Were Improved by Personalized Dietary Intervention Based on Biochemical and Clinical Parameters in Cancer Patients. **Nutrition and cancer**. v. 67, n. 7, p. 1083-1092.

Liu, Q., Peng, Y. B., Qi, L. W., Cheng, X. L., Xu, X. J., Liu, L. L., Liu, E. H., Li, P., 2012. The Cytotoxicity Mechanism of 6-Shogaol-Treated HeLa Human Cervical Cancer Cells Revealed by Label-Free Shotgun Proteomics and Bioinformatics Analysis. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 3, n. 8, p. 541-550.

Luanpitpong, S., Chanvorachote, P., Nimmannit, U., Leonard, S. S., Stehlik, C., Wang, L., Rojanasakul, Y., 2012. Mitochondrial superoxide mediates doxorubicin-induced keratinocyte apoptosis through oxidative modification of ERK and Bcl-2 ubiquitination. **Biochemical pharmacology**. v. 83, n. 12, p. 1643-1654.

- Mastrangelo, D., Massai, L., Lo Coco, F., Noguera, N. I., Borgia, L., Fioritoni, G., Berardi, A., Iacone, A., Muscettola, M., Pelosi, E., Castelli, G., Testa, U., Di Pisa, F., Grasso, G., 2015. Cytotoxic effects of high concentrations of sodium ascorbate on human myeloid cell lines. **Annals of hematology**. v. 94, n. 11, p. 1807-1816.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R. Putman, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., Mclaughlin, J. L., 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**. v. 45, p. 31-34.
- Michaels, A.Y., Keraliya, A.R., Tirumanil, S.H., Shinagarel, A.B., Ramaiya, N.H., 2016. Systemic treatment in breast cancer: a primer for radiologists. **Insights Imaging**. v. 7, p. 131-144.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L., 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacology Review**. v. 56, n. 5, p. 185-229.
- Moss, R.W., 2006. Should patients undergoing chemotherapy and radiotherapy be prescribed antioxidants? **Integrative Cancer Therapies**. v. 5, n. 1, p. 63-82.
- Nowell, S. A., Ahn, J., Ambrosone, C. B., 2004. Genenutrient interactions in cancer etiology. **Nutrition Reviews**. v.62, p. 427-438.
- Oliveira, G. L. S., Oliveira, F.R.A.M., De Alencar, M.V.O.B., Gomes-Júnior, A.L., Souza, A.A., Melo-Cavalcante, A.A.C., Freitas, R.M., 2014. Evaluation of antioxidante capacity of the aqueous extract of *Cynarascolymus* L. (Asteraceae) in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 7, n. 5, p. 136-147.
- Oliveira, M. B., Prado, A. H., Bernegossi, J., Sato, C. S., Brunetti, I. L., Scarpa, M. A., 2014. Topical Application of Retinyl Palmitate-Loaded Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for the Treatment of Skin Aging. **BioMed Research International**.
- Panchuk, R., Skorokhyd, N., Chumak, V., Stoika, R., 2014. Specific antioxidant compounds differentially modulate cytotoxic activity of doxorubicin and cisplatin: In vitro and in vivo study. **Croatian Medical Journal**. v. 55, n. 3, p. 206-217.
- Persaud, S. D., Park S. W., Ishigami-Yuasa, M., Koyano-Nakagawa, N., Kagechika, H., Wei, L. N., 2016. All trans-retinoic acid analogs promote cancer cell apoptosis through non-genomic Crabp1 mediating ERK1/2 phosphorylation. **Scientific reports**. v. 6.
- Portantiolo, T. N., Vale, I. A. V., Bergmann, R. B., Abid, R. T., 2014. 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.
- Prasad, K.N., Kumar A., 1999. High doses of multiple antioxidant vitamins: essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy. **Journal of American College of Nutrition**. v. 18, n. 4, p.13-25.

Prasad, S.B., Rosangkima, G., Nicol, B.M., 2010. Cyclophosphamide and ascorbic acid-mediated ultrastructural and biochemical changes in Dalton's lymphoma cells in vivo. **European Journal of Pharmacology**. n. 645, v. 1-3, p.47-54.

Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **Nutrition and Cancer**. v. 2014, p. 7612-7624.

Salganik, R. I., 2001. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 20, n. sup5, p. 464-472.

Shami, N. J. I. E., Moreira, E. A., 2004. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr**. v. 17, n. 2, p. 227-36.

Shao, L., Zhu, X., Yang, Y., Jin, J., Liu, H., Han, D., Xie, S., 2016. Effects of dietary vitamin A on growth, hematology, digestion and lipometabolism of on-growing gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). **Aquaculture**. v. 460, p. 83-89.

Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bahtnagar, S., Kumari, R., Dhaka, N., 2013. Potencial applications of antioxidants – a review. **Journal of Pharmacy Research**. v. 2013, p. 828-835.

Subramani, T., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Ho, C. L., Omar, A. R., Aziz, S. A., Rahman, N. M., Alitheen, N. B., 2014. Vitamin C suppresses cell death in MCF-7 human breast cancer cells induced by tamoxifen. **Journal of cellular and molecular medicine**. v. 18, n. 2, p. 305-313.

Traber, M. G., Stevens, J. F., 2011. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. **Free Radical Biology & Medicine**. v.51, p.1000–1013.

Tremante, E., Santarelli, L., Monaco, E. L., Sampaoli, C., Ingegnere, T., Guerrieri, R., Tomasetti, M., Giacomini., 2015. P. Sub-apoptotic dosages of pro-oxidant vitamin cocktails sensitize human melanoma cells to NK cell lysis. **Oncotarget**. 6 (31): p. 31039–31049.

Tripathi, D. N, Jena, G.B., 2010. Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF-κB during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat. **Journal of Pineal Research**. v. 48, n. 4, p. 324-331.

Tokarski, S., Rutkowski, M., Godala, M., Mejer, A., Kowalski, J., 2013. The impact of ascorbic acid on the concentrations of antioxidative vitamins in the plasma of patients with non-small cell lung cancer undergoing first-line chemotherapy. **Polski merkuriusz lekarski**. v. 35, n. 207, p. 136-140.

Torres, M.A. Jhingran, A., Thames, H.D., Levenback, C.F., Bodurka, D.C., 2008. 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.

Tsai-Turton, M., Luong, B. T., Tan, Y., Luderer., 2007. U. Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. **Toxicological science**. v. 98, n. 1, p. 216-230.

*Capítulo II*

---

**DANOS TOXICOGENÉTICOS INDUZIDOS POR ANTINEOPLÁSICOS EM *Mus musculus* SÃO MODULADOS PELA ASSOCIAÇÃO DO PALMITATO DE RETINOL COM O ÁCIDO ASCÓRBICO**

Artigo submetido à revista **Archives of Toxicology**. Fator de impacto 5.4. Qualis A1 na área de Farmácia.

**DANOS TOXICOGENÉTICOS INDUZIDOS POR ANTINEOPLÁSICOS EM *Mus musculus* SÃO MODULADOS PELA ASSOCIAÇÃO DO PALMITATO DE RETINOL COM O ÁCIDO ASCÓRBICO**

Leonardo da Rocha Sousa<sup>1,2,3</sup>; Rosália Maria Tôrres de Lima<sup>2,3</sup>; Antônio Lima Braga<sup>1,3</sup>; Ag-  
Anne Pereira Melo de Meneses<sup>1,3</sup>; José Victor de Oliveira Santos<sup>1,3</sup>; Ricardo Melo de  
Carvalho<sup>1,3</sup>; Jadson Texeira e Silva<sup>3</sup>; Antonielly Campinho Reis<sup>3</sup>; Márcia Jardim Paz<sup>3</sup>; Rai  
Pablo Sousa de Aguiar<sup>3</sup>; Narcia Mariana Fonseca Nunes<sup>3</sup>; MD. Torequl Islam<sup>3</sup>; Felipe  
Cavalcanti Carneiro da Silva<sup>4</sup>; Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante<sup>3,4</sup>; João Marcelo de  
Castro e Sousa<sup>3,4</sup>

---

1 Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí - UFPI

2 Docente do Instituto Federal do Piauí - IFPI

3 Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica - LAPGENIC - Universidade Federal do Piauí - UFPI

4 Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí – UFPI

## RESUMO

O câncer é um problema de saúde pública mundial, devido ao seu elevado índice de mortalidade. Várias drogas são utilizadas no tratamento desta patologia, entre elas estão a ciclofosfamida (CPA) e a doxorubicina (DOX). Todavia, esses antineoplásicos causam muita toxicidade em células não tumorais, devido ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS). Nesse sentido, o presente estudo avaliou os possíveis efeitos antigenotóxicos, antimutagênicos e anticitotóxicos do palmitato de retinol associado ao ácido ascórbico frente aos efeitos tóxicogenéticos induzidos pela ciclofosfamida (20 mg/kg), doxorubicina (2 mg/kg), e esquema AC (CPA - 20 mg/kg + DOX - 2 mg/kg) em camundongos *Mus musculus*, por meio do ensaio cometa, teste de micronúcleos, testes hematológicos e testes bioquímicos em células não tumorais de medula óssea e sangue periférico. Para tanto, 100 animais saudáveis, divididos igualmente por gênero, receberam a administração por via intraperitoneal das substâncias testadas. Após o período de meia-vida dos fármacos, foi feita a retirada de sangue da cauda dos animais. Posteriormente, os animais foram eutanasiados para a retirada de sangue através de punção cardíaca e punção da medula óssea nos ossos femurais. Os quimioterápicos induziram aumentos significativos do índice e frequência de danos, efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos pelo aumento de micronúcleos, assim como apresentaram citotoxicidade pela interferência sobre a relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos em células de medula óssea de *Mus musculus* saudáveis bem como pela promoção de mielossupressão, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. No entanto, o palmitato de retinol, na concentração de 100 UI/Kg, associado com o ácido ascórbico, na concentração de 2 µM/Kg, reduziram significativamente as ações toxicogenéticas dos quimioterápicos, modulando os seus efeitos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos. Os resultados sugerem que as vitaminas associadas (PR + AA) interferem sobre os mecanismos de ação dos antineoplásicos em células não tumorais.

**Palavras-chave:** Ácido ascórbico; Palmitato de retinol; Efeitos toxicológicos; Ciclofosfamida; Doxorubicina.

## ABSTRACT

Cancer is a worldwide public health problem because of its high mortality rate. Several drugs are used in the treatment of this pathology, among them are cyclophosphamide (CPA) and doxorubicin (DOX). However, these antineoplastics cause a lot of toxicity in non-tumor cells, due to the increased generation of reactive oxygen species (EROS). In this sense, the present study evaluated the possible antigenotoxic, antimutagenic and anticytotoxic effects of ascorbic acid-associated retinol palmitate against the toxicogenic effects induced by cyclophosphamide (20 mg/kg), doxorubicin (2 mg/kg), and AC (CPA - 20 mg/kg + DOX - 2 mg/kg) in *Mus musculus* mice, by means of the comet assay, micronucleus test, hematological tests and biochemical tests in non-tumor cells of bone marrow and peripheral blood. To this end, 100 healthy animals, equally divided by gender, received intraperitoneal administration of the substances tested. After the half-life of the drugs, blood was withdrawn from the tail of the animals. Subsequently, the animals were euthanized for blood withdrawal through cardiac puncture and bone marrow puncture in the femoral bones. The chemotherapeutics induced significant increases in the index and frequency of damage, clastogenic and/or aneugenic effects due to the increase of micronuclei, as well as cytotoxicity due to interference on the relationship between polychromatic and normochromatic erythrocytes in bone marrow cells of healthy *Mus musculus* as well as the promotion Myelosuppression, nephrotoxicity and hepatotoxicity. However, retinol palmitate at a concentration of 100 IU/kg, associated with ascorbic acid, at a concentration of 2  $\mu$ M/kg, significantly reduced the toxicogenic actions of chemotherapeutic agents, modulating their genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects. The results suggest that the associated vitamins (PR + AA) interfere on the mechanisms of action of antineoplastics in non-tumor cells.

**Keywords:** Ascorbic acid; Retinol palmitate; Toxicological effects; Cyclophosphamide; Doxorubicin.

## 1 Introdução

O câncer (CA) é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, e de acordo com os Centros para Controle e Prevenção de Doenças (CDC), até o ano 2025, mais de 19 milhões de novos casos de câncer são esperados anualmente em todo o mundo. O câncer é uma doença resultante de mecanismos patológicos complexos em que as células sofrem alterações nos processos de divisão celular que levam a mutações, instabilidades genômicas e alterações epigenéticas (Merlo et al., 2006).

A melhor compreensão do câncer ao longo dos anos levou ao desenvolvimento de agentes quimioterapêuticos que atuam principalmente através da interferência da síntese de DNA e mitose, levando a inibição da divisão celular ou morte celular (Freedman e Patridge, 2011). A quimioterapia clássica continua a ser um dos principais tratamentos para uma variedade de tumores, mas a falta de especificidade e o uso desfavorável de drogas geralmente resultam em efeitos colaterais graves (Kumar et al., 2017). De Almeida et al. (2005) postulam que a grande dificuldade no tratamento do câncer por agentes quimioterápicos é por causa da grande semelhança entre células tumorais e células não neoplásicas, o que compromete a seletividade das drogas.

As perspectivas de incorporação de vitaminas antioxidantes no tratamento do câncer são otimistas, uma vez que essas substâncias, dependendo da dose e via de administração, podem atuar promovendo a biogênese mitocondrial. Em células normais, as vitaminas devem ter uma atividade antioxidante, enquanto que nas células tumorais com defeitos mitocondriais, o aumento da biogênese pode promover níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio que matam seletivamente as células cancerígenas (Bonner e Arbiser, 2014).

Entre as vitaminas antioxidantes, a vitamina A e seus derivados, como o palmitato de retinol (PR), são um grupo de compostos lipossolúveis com estruturas similares que desempenham um papel importante em múltiplos processos biológicos (Das et al., 2014) e podem exercer importantes efeitos quimiopreventivos (Mahdavi et al., 2006). Devido à sua capacidade de promover o desenvolvimento embrionário normal e exercer efeitos sobre a diferenciação celular, são essenciais para todas as fases da vida, desde a embriogênese até a idade adulta (Rochette-Egly, 2015). De acordo com Pathak et al. (2005), a vitamina A pode proteger as células do dano oxidativo do DNA, com implicações significativas na



carcinogênese. Além disso, retinoides são eficazes na terapia de quimioprevenção e diferenciação para câncer de vários órgãos (Hansen et al., 2000).

Outra vitamina comumente utilizada é o ácido ascórbico (AA), também conhecido como vitamina C, cujo papel no risco, progressão e terapia do câncer ainda não foi totalmente elucidado (Cortes-Jofré et al., 2012; Harris et al., 2014; Wilson et al., 2014). O AA é um nutriente essencial que atua como uma coenzima em várias reações enzimáticas (Mastrangelo et al., 2015) e é muitas vezes deficiente em pacientes com câncer (Mayland et al., 2001; Anthony e Schorah, 2005). A vitamina C pode estar envolvida em uma combinação de várias funções e pode atuar como um potente antioxidante que neutraliza os radicais livres (Padayatty e Levine, 2001), além de interferir na terapia do câncer (Heaney et al., 2008).

Uma vez que a quimioterapia clássica é altamente tóxica, a prescrição de antioxidantes tem sido uma alternativa para reduzir os efeitos colaterais comuns dessas drogas. No entanto, antioxidantes como vitamina A (palmitato de retinol) e vitamina C (ácido ascórbico) podem alterar os mecanismos essenciais na terapia do câncer, reduzindo o efeito dos medicamentos em células tumorais ou agindo como terapia adjuvante com efeitos sinérgicos/aditivos. Portanto, este estudo procurou avaliar os efeitos da combinação das vitaminas antioxidantes A e C, com as terapêuticas contra o câncer utilizando a ciclofosfamida (CPA), a doxorubicina (DOX) e o esquema AC (associação de ciclofosfamida e doxorubicina) em danos toxicogênicos induzidos pelas drogas.

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Preparo dos fármacos e das vitaminas

Os antineoplásticos Ciclofosfamida e Doxorubicina foram obtidos da Merck (New Jersey, EUA), sob o nome comercial Adriamycin e Genuxal, respectivamente. O palmitato de retinol e o ácido ascórbico foram obtidos da ART PHARMA (Teresina, Brasil).

Os fármacos foram diluídos em solução salina estéril (0,9%) até a concentração final de 20 mg/kg para a ciclofosfamida (CPA) e 2 mg/kg para a doxorubicina (DOX) de acordo com Freedman e Partridge (2011). Para o esquema AC (20/2 mg/kg), a combinação de ambos os fármacos foi preparada da mesma maneira, mantendo as mesmas concentrações isoladamente. O Palmitato de Retinol (PR) foi solubilizado em solução salina estéril (0,9%) e acrescido de DMSO a 10%, para administração de 100 UI/kg por via intraperitoneal. O ácido ascórbico foi previamente diluído em tampão fosfato estéril até a concentração final de 2  $\mu$ M. A combinação de ambas as vitaminas (PR + AA) foi preparada da mesma maneira, mantendo-se as mesmas concentrações isoladamente.

### 2.2 Tratamento dos animais com os químicos

Os experimentos *in vivo* foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI, sob documento de aprovação com o número 081/14. Foram utilizados para os experimentos 100 camundongos (*Mus musculus*), da linhagem Swiss, albinos, com igual número de machos e fêmeas, pesando entre 25 a 30 g, com aproximadamente 2 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias - CCA da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a  $22 \pm 1$  °C, com livre acesso à ração tipo pellets (Purina®) e água, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas cada. Os animais foram divididos em grupos de 10, sendo 5 de cada gênero, e cada grupo foi submetido a um tratamento diferente (**Tabela 1**). O período de exposição aos antineoplásticos foi definido com base na meia-vida dos fármacos, aproximadamente: 7 h para CPA e 48 h para DOX.

**Tabela 1.** Esquema dos tratamentos dos animais com os químicos e/ou as vitaminas.

Grupos	Tratamentos	Nº de animais #
<i>Controle Negativo</i>	Sem tratamento	<i>n = 10</i>
<i>Controle Positivo</i>	CPA: 20 mg/kg	
	DOX 2 mg/kg	
	Esquema AC: 20/2 mg/kg	
<i>Grupos teste</i>	AA 2 µmol/kg	
	PR 100 UI/kg	
	PR + AA	
	CPA + PR + AA	
	DOX + PR + AA	
	AC + PR + AA	

# n=10/grupo, com igual proporção de gêneros (5 animais machos e 5 fêmeas).

### 2.3 Teste cometa em sangue periférico e medula óssea de camundongos *Mus musculus*

Os antineoplásicos CPA, DOX e o esquema AC bem como as vitaminas antioxidantes (PR + AA) foram administrados por via intraperitoneal. Após os testes, os animais foram eutanasiados pela administração de pentobarbital sódico (150 mg/kg). O teste cometa foi realizado segundo Hartmann et al., (2003) e Uno et al., (2015), para avaliação de danos genotóxicos em sangue periférico obtido por meio de punção caudal bem como pela obtenção de células da medula óssea de camundongos *Mus musculus*. Os dois ossos fêmurais de cada roedor foram retirados e lavados internamente com soro bovino fetal (20%), para lavagem da medula óssea. 10 µL das amostras de medula óssea foi misturado a 90 µL de agarose *low melting* (com baixo ponto de fusão) a 0,75% sob uma temperatura de 37°C. O homogenato foi disposto sobre lâminas de pré-cobertura com agarose sob ponto de fusão normal a 0,75%, cobertas com lamínulas (24 x 60 mm), e mantidas em temperatura ambiente até a solidificação. Retirou-se a lamínula e mergulhou-se a lâmina em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) a 4°C e protegida da luz, por 72 horas. Em seguida, realizou-se a corrida de eletroforese com a solução de eletroforese (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13), sob banho de gelo para a manutenção da temperatura em torno de 4°C, por 20 minutos, para o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios alcalino-lábeis. A eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA, por 20 minutos na presença de luminárias com baixo comprimento de onda. Posteriormente, as lâminas foram retiradas da cuba de eletroforese e mergulhadas na solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos; e expostas por

10 minutos, à solução fixadora (Ácido tricloroacético 15%, Sulfato de zinco heptahidratado 5%, e Glicerol 5%). Após secas, as lâminas foram coradas com solução de Nitrato de prata (0,02%) e lavadas com água destilada por 3 vezes. Adicionou-se a solução de parada (ácido acético) por 5 minutos, lavou-se as lâminas 3 vezes com água destilada, sendo estas deixadas em bandejas para secagem em temperatura ambiente.

Para cada grupo,  $n = 10$ , sendo 5 animais machos e 5 fêmeas, foram fotografadas 100 células por lâmina, sendo 2 lâminas por animal. A avaliação foi realizada a partir da análise do tamanho e intensidade de degradação e arraste do material genético, onde 5 classes de danos foram identificadas: classe 0, material genético sem dano ou intacto; classe 1, classe 2; classe 3; até o máximo de dano, classe 4. Por fim, calculou-se o índice de dano (ID), variando de 0 a 400, segundo a fórmula:  $\Sigma 0 \times (C0) + 1 \times (C1) + 2 \times (C2) + 3 \times (C3) + 4 \times (C4)$ . Nota: “C0” representa o número de núcleos em Classe 0, “C1” representa o número de núcleos em Classe 1, “C2” representa o número de núcleos em Classe 2, “C3” representa o número de núcleos em Classe 3 e “C4” representa o número de núcleos em Classe 4, em 100 núcleos avaliados por lâmina sendo o teste realizado em duplicata. Também foi calculada a frequência de dano (FD), variando de 0 a 100%, segundo a fórmula:  $FD (\%) = 100\% - \text{danos de classe 0 (C0)}$ .

#### **2.4 Teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongos *M. musculus***

Após a eutanásia dos animais, os dois ossos fêmurais de cada roedor foram retirados e lavados internamente com soro bovino fetal (20%), para lavagem da medula óssea. Em seguida, 25  $\mu\text{L}$  da suspensão celular foram direcionados a lâminas de vidro para fixação e coloração com Giemsa 10%. A análise microscópica sob o aumento de 1000 vezes considerou os danos genéticos (MN) presentes em 1000 células policromáticas/lâmina, sendo o teste realizado em duplicata.

#### **2.5 Cálculo da relação eritrocítica em medula óssea**

O cálculo para análise da citotoxicidade dos tratamentos foi aplicado por meio da quantificação do número de eritrócitos normocromáticos (ENC) e policromáticos (EPC) em medula óssea de camundongos por meio da avaliação de 400 eritrócitos por tratamento (Furtado et al., 2008). A análise foi realizada em microscópio óptico sob o uso de óleo de imersão e aumento de 1000 vezes. O teste foi realizado em duplicata. A fórmula aplicada foi: Relação eritrocítica:  $EPC / ENC + EPC$ .

## ***2.6 Modulação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos da CPA, DOX e esquema AC pela influência do palmitato de retinol e ácido ascórbico***

A modulação do PR em associação com o AA sobre os danos ao material genético induzidos pelos antineoplásicos CPA, DOX e esquema AC foram calculados, em porcentagem, de acordo com a fórmula:

$$\text{Modulação (\%)} = \frac{X - (Y + (AA + PR))}{X} \cdot 100$$

Legenda: “X” representa os valores para cada tipo de danos induzidos pelos quimioterápicos, e “Y + (AA+PR)” representa os valores dos danos toxicogênicos induzidos pelos quimioterápicos quando em co-tratamento com às vitaminas (AA + PR).

## ***2.7 Parâmetros hematológicos e bioquímicos***

Para análise hematológica, as amostras foram coletadas em tubos de ensaios com anticoagulante EDTA e foram rapidamente analisados os seguintes parâmetros: hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos como o Volume Corpuscular Médio (VCM), a Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), a distribuição de hemácias (RDW), leucócitos e plaquetas. Os ensaios foram realizados no Analisador Hematológico automático Mindray Modelo BC-2800 (EUA). Para análise bioquímica, as amostras de sangue total foram coletadas e armazenadas em tubos de ensaios e depois centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos. Logo após, foram dosados os seguintes parâmetros: uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Os ensaios foram realizados no Analisador Bioquímico Bioplus semiautomático Modelo BIO-2000 IL (BR).

## ***2.8 Análise estatística***

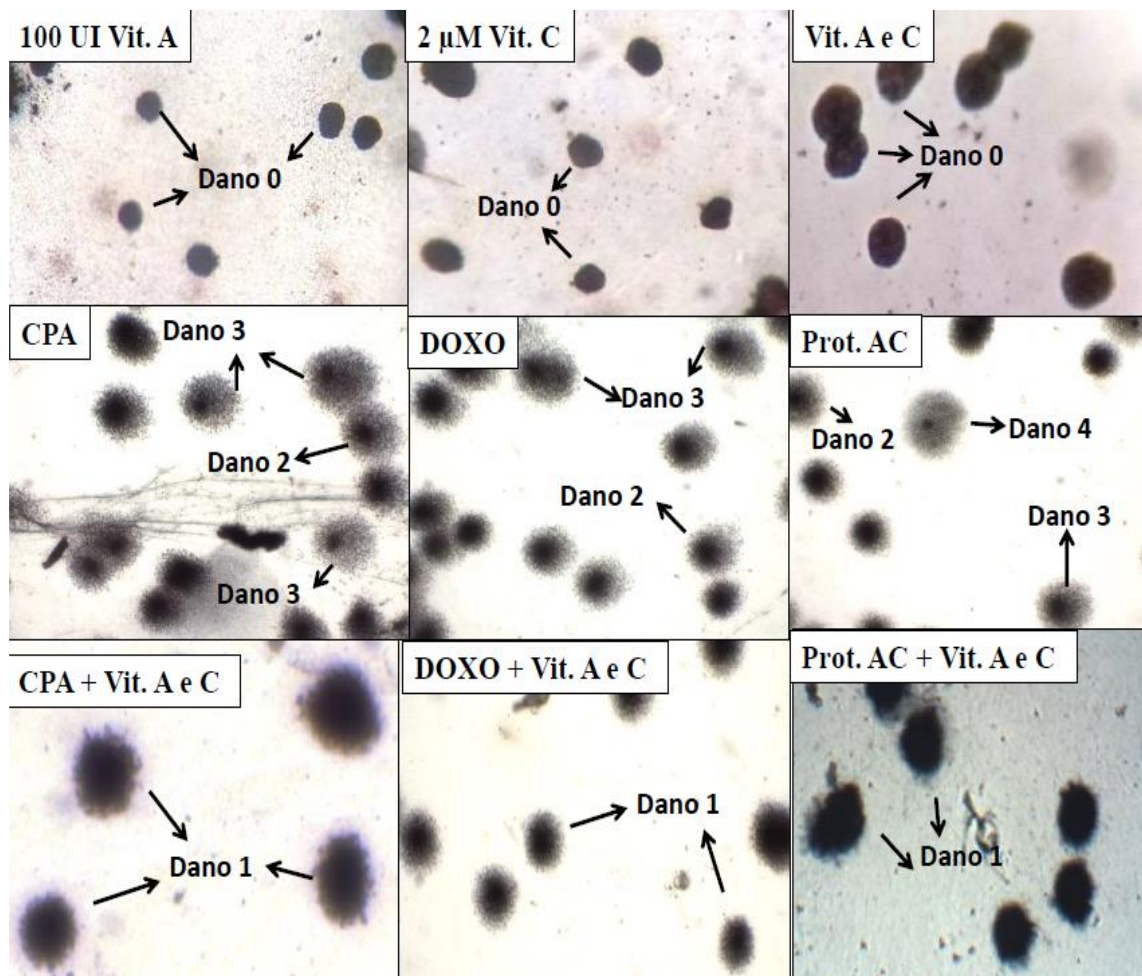
Os resultados foram considerados significantes a partir de uma correlação positiva de 95%. Foram aplicados a Análise de Variância (ANOVA) e *Tukey* como *post hoc* teste, por meio do programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego California USA).

### 3 Resultados

#### 3.1 Avaliação do efeito antígeno-tóxico do palmitato de retinol em associação com o ácido ascórbico frente à CPA, DOX e esquema AC

A genotoxicidade da CPA, DOX e esquema AC foi demonstrada pelo aumento significativo ( $p < 0,001$ ) do índice de danos e da frequência de danos (ID/FD) quando comparado aos animais não tratados com os quimioterápicos. No entanto, quando o PR foi associado com o AA, as vitaminas (PR + AA) em co-tratamento com os antineoplásicos, reduziram significativamente a genotoxicidade dos fármacos nas células da medula óssea e nas células de sangue periférico, tanto para animais machos como para fêmeas (**Figura 1, Tabela 2**).

**Figura 1.** Perfil fotomicrográfico das células sanguíneas de camundongos tratados somente com as vitaminas antioxidantes, assim como, pelos antineoplásicos ciclofosfamida (CPA), doxorubicina (DOX), e esquema AC (CPA + DOX) isolados e associados com estas vitaminas, todas analisadas por ensaio Cometa.



**Tabela 2.** Avaliação dos danos genotóxicos induzidos por ciclofosfamida (CPA), doxorrubicina (DOX), e Esquema AC (CPA + DOX), e a modulação destes pelo Palmitato de Retinol (Vitamina A) associado ao Ácido Ascórbico (Vitamina C) em células sanguíneas de *Mus musculus* por meio do ensaio Cometa.

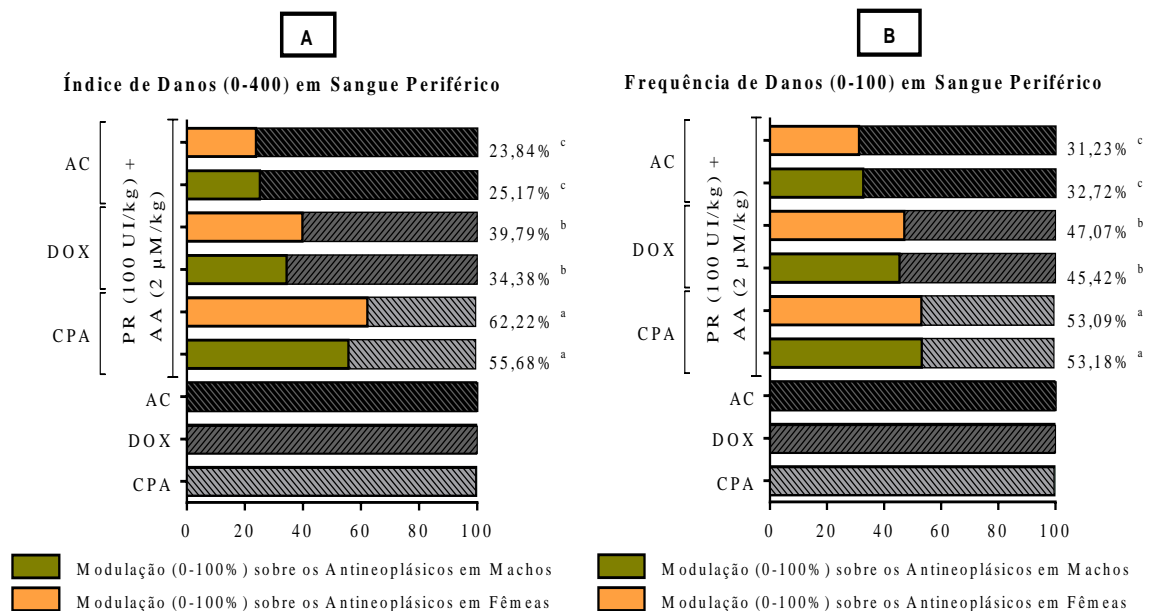
		<i>Danos Genotóxicos</i> #			
		<i>Medula Óssea</i>		<i>Sangue Periférico</i>	
	<i>Tratamentos</i>	<i>Índice de Dano (0-400)</i>	<i>Frequência de Dano (100%)</i>	<i>Índice de Dano</i>	<i>Frequência de Dano</i>
<i>Machos</i>	CN	15.5 ± 3.2	7.8 ± 1.7	17.3 ± 2.1	8.5 ± 2.1
	PR 100 UI/mL/kg	20.8 ± 2.9	10.1 ± 2.2	18.3 ± 2.1	9.7 ± 1.6
	AA 2 µM/mL/Kg	22 ± 3.2	11.5 ± 2.4	20 ± 3.2	11.1 ± 1.6
	PR + AA	23.8 ± 5.4	10.8 ± 3.3	20.5 ± 1.8	9.2 ± 1.9
	CPA	259.5 ± 4.5***a	94 ± 2.6***a	262 ± 4.6***c	90.2 ± 2.1***a
	CPA + PR + AA	90.3 ± 6.4***a,b	44.5 ± 2.8***a,b	116.1 ± 4.6***c	47.2 ± 1.8***a,b
	DOX	263 ± 7.2***a	94.2 ± 3.7***a	286.5 ± 4.8***c	91.8 ± 2.2***a
	DOX + PR + AA	110.3 ± 6.3***a,c	51.5 ± 3.1***a,c	188 ± 4.1***a	53.2 ± 2.1***a,c
	AC	310.6 ± 7.3***a	93.8 ± 4.3***a	262.6 ± 5.3***c	89.2 ± 1.7***a
	AC + PR + AA	152.3 ± 4.9***a,d	63.1 ± 3.9***a,d	196.5 ± 6.1***c	65.6 ± 2.6***a,d
<i>Fêmeas</i>	CN	16.3 ± 4.1	8 ± 2.3	15.8 ± 3.1	9.6 ± 1.4
	PR 100 UI/mL/kg	21.6 ± 2.8	8.6 ± 2.1	17.6 ± 2.7	8.0 ± 0.9
	AA 2 µM/mL/Kg	25.8 ± 3.3	10.1 ± 1.9	20 ± 1.6	8.6 ± 1.1
	PR + AA	27.5 ± 2.4	11 ± 2.3	19 ± 2.3	10.1 ± 1.3
	CPA	293.1 ± 6.3***a	93.8 ± 4.2***a	292.5 ± 4.5***c	91.7 ± 3.1***a
	CPA + PR + AA	120.3 ± 4.3***a	44 ± 4.1***a,b	110.5 ± 6.6***c	41.0 ± 2.3***a,b
	DOX	260.3 ± 7.1***a	95.6 ± 3.1***a	297.5 ± 7.7***c	92.3 ± 2.2***a
	DOX + PR + AA	120.8 ± 4.8***a	50.6 ± 3***a,c	179.1 ± 5.4***c	53.1 ± 2.7***a,c
	AC	255.5 ± 6.5***a	93.9 ± 4.1***a	252.5 ± 4.5***c	91.6 ± 2.8***a
	AC + PR + AA	166.6 ± 5.9***a	64.5 ± 4.5***a,d	192.3 ± 4.1***c	66.0 ± 3.5***a,d

CN: Controle Negativo (sem tratamento). PR: Palmitato de Retinol (100 UI/mL/Kg). AA: Ácido Ascórbico (2 µM/mL/Kg). CPA (20 mg/kg). DOX (2 mg/kg). Esquema AC (CPA e DOX: 20/2 mg/kg). ANOVA-One-way e pós-teste de Tukey n=5. Valores significantes (MD±DP) de p<0.001\*\*\* para <sup>a</sup> comparado ao grupo CN, <sup>b</sup> à CPA, <sup>c</sup> à DOX e <sup>d</sup> ao Esquema AC.

Os efeitos do PR em associação com AA modularam significativamente os danos ao DNA de antineoplásicos em células de sangue periférico de camundongos, independentemente do gênero do animal. Em animais machos, o índice de danos (ID) variou de 25,17% a 55,68% no co-tratamento das vitaminas associadas (PR + AA) com o esquema AC e com a CPA, respectivamente. Para as fêmeas, a variação foi de 23,84% a 62,22% no co-tratamento das vitaminas associadas (PR + AA) com o esquema AC e com a CPA,

respectivamente. Para a frequência de danos (FD), a modulação das vitaminas associadas (PR + AA), em camundongos machos, variou de 32,72% a 53,18% no co-tratamento das vitaminas associadas (PR + AA) com o esquema AC e com a CPA, respectivamente. Para as fêmeas, a modulação da FD variou de 31,23% a 53,09% no co-tratamento das vitaminas associadas (PR + AA) com o esquema AC e com a CPA, respectivamente (**Figura 2**).

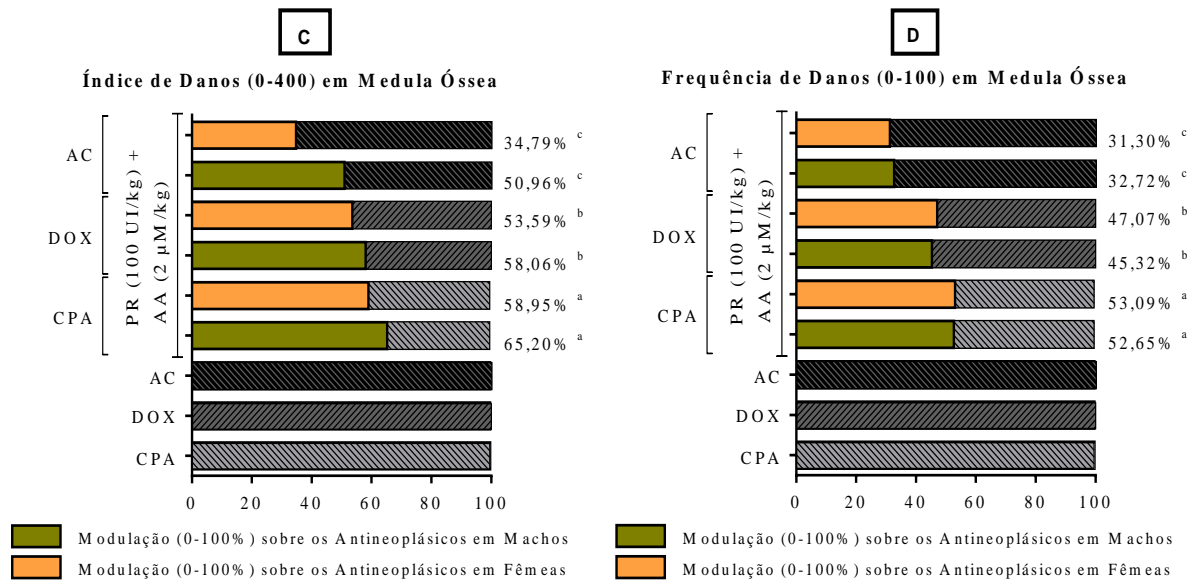
**Figura 2.** Modulação (%) do palmitato de retinol em associação com o ácido ascórbico sobre os danos genotóxicos induzidos por ciclofosfamida (CPA: 20 mg/kg), doxorubicina (DOX: 2 mg/kg) e Esquema AC (DOX e CPA: 2/20 mg/kg) em sangue periférico de *Mus musculus* por meio do teste cometa: índice de danos (A) e frequência de danos (B). ANOVA-*One-way* e pós-teste de *Tukey*.  $n=5$ . Valores significantes de  $p<0,001$  para <sup>a</sup> comparado ao grupo tratado com CPA, para <sup>b</sup> comparado ao grupo tratado com DOX e para <sup>c</sup> comparado ao grupo tratado com o Esquema AC.



Analisando as células da medula óssea, as vitaminas associadas (PR + AA) modularam significativamente os danos ao DNA dos quimioterápicos em ambos os sexos. Em animais machos, a modulação do ID pelo PR + AA variou de 50,96% no co-tratamento com o esquema AC a 65,20% no co-tratamento com a CPA. Para as fêmeas, a variação foi de 34,79%, no co-tratamento com o esquema AC, a 58,95% no co-tratamento com a CPA. Em relação a FD, para camundongos machos, a modulação das vitaminas associadas (PR + AA) variou de 32,72%, no co-tratamento com o esquema AC a 52,65% no co-tratamento com a CPA. Para as fêmeas, a modulação da FD pelas vitaminas associadas variou de 31,30% no co-tratamento com o esquema AC a 53,09% no co-tratamento com a CPA (**Figura 3**).



**Figura 3.** Modulação (%) do palmitato de retinol e ácido ascórbico em associação sobre os danos genotóxicos induzidos por ciclofosfamida (CPA: 20 mg/kg), doxorubicina (DOX: 2 mg/kg) e Esquema AC (DOX e CPA: 2/20 mg/kg) em medula óssea de *Mus musculus* por meio do teste cometa: índice de danos (C) e frequência de danos (D). ANOVA-*One-way* e pós-teste de *Tukey*.  $n=5$ . Valores significantes de  $P<0,001$  para <sup>a</sup> comparado ao grupo tratado com CPA, para <sup>b</sup> comparado ao grupo tratado com DOX e para <sup>c</sup> comparado ao grupo tratado com o Esquema AC.



### 3.2 Avaliação da capacidade antimutagênica e anticitotóxica do PR em associação com o AA frente aos mecanismos tóxicos da CPA, DOX e esquema AC

A administração isolada dos antineoplásicos reduziu significativamente a relação eritrocítica (EPC/EPC + ENC) bem como aumentou o número de micronúcleos (MN). No entanto, quando o PR e o AA foram associados, houve um aumento significativo na relação eritrocítica e redução significativa da formação de MN em células de medula óssea de camundongos machos e fêmeas, indicando seus possíveis efeitos anticitotóxicos, antineogênicos e anticlastogênicos (**Tabela 3**).

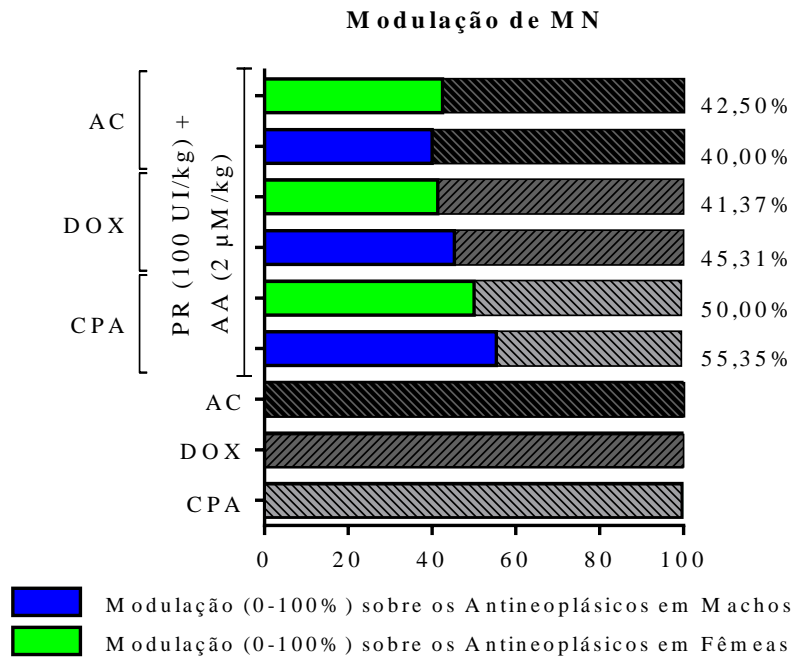
**Tabela 3.** Avaliação da ação antimutagênica e anticitotóxica do Palmitato de Retinol (Vitamina A) e Ácido Ascórbico (Vitamina C) em associação frente à ação tóxica induzida por ciclofosfamida (CPA), doxorubicina (DOX), e Esquema AC (CPA + DOX) em células de medula óssea não tumorais de *Mus musculus* por meio do teste de micronúcleos (MN).

<i>Mutagenicidade e Citotoxicidade</i> #			
	<i>Tratamentos</i>	<i>Micronúcleos</i>	<i>EPC/EPC+ENC</i>
<i>Machos</i>	Sem tratamento	1,80 ± 0,37	0,84 ± 0,01
	PR 100 UI/kg	2,00 ± 0,32	0,82 ± 0,01
	AA 2 µM/kg	2,20 ± 0,44	0,82 ± 0,01
	PR + AA	2,00 ± 0,70	0,83 ± 0,01
	CPA 20 mg/kg	11,20 ± 0,58 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,01 <sup>a</sup>
	CPA + PR + AA	5,00 ± 1,00 <sup>a,b</sup>	0,71 ± 0,01 <sup>a,b</sup>
	DOX 2 mg/kg	12,80 ± 0,66 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,01 <sup>a</sup>
	DOX + PR + AA	7,00 ± 1,00 <sup>a,c</sup>	0,68 ± 0,01 <sup>a,c</sup>
	AC 2/20 mg/kg	16,00 ± 0,70 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,01 <sup>a</sup>
	AC + PR + AA	9,60 ± 0,89 <sup>a,d</sup>	0,70 ± 0,01 <sup>a,d</sup>
<i>Fêmeas</i>	Sem tratamento	1,40 ± 0,25	0,85 ± 0,01
	PR 100 UI/kg	2,20 ± 0,20	0,83 ± 0,01
	AA 2 µM/kg	2,00 ± 0,70	0,82 ± 0,01
	PR + AA	2,00 ± 0,70	0,83 ± 0,01
	CPA 20 mg/kg	10,40 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>a</sup>
	CPA + PR + AA	5,20 ± 0,83 <sup>a,b</sup>	0,70 ± 0,02 <sup>a,b</sup>
	DOX 2 mg/kg	11,60 ± 0,51 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,02 <sup>a</sup>
	DOX + PR + AA	6,80 ± 0,83 <sup>a,c</sup>	0,69 ± 0,02 <sup>a,c</sup>
	AC 2/20 mg/kg	16,00 ± 1,05 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,01 <sup>a</sup>
	AC + PR + AA	9,20 ± 0,83 <sup>a,d</sup>	0,69 ± 0,01 <sup>a,d</sup>

# CN: Controle Negativo (sem tratamento). PR: Palmitato de Retinol (100 UI/mL/Kg). AA: Ácido Ascórbico (2 µM/mL/Kg). CPA (20 mg/kg). DOX (2 mg/kg). Esquema AC (DOX e CPA: 2/20 mg/kg). Relação entre o número de eritrócitos policromáticos e a soma de eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) em 400 células analisadas (EPC/EPC+ENC). ANOVA-One-way e pós-teste de *Tukey*. *n*=5. Valores significantes (MD±DP) de *P*<0,05 para <sup>a</sup> comparado ao grupo sem tratamento, <sup>b</sup> à CPA, <sup>c</sup> à DOX e <sup>d</sup> ao Esquema AC.

A modulação das vitaminas associadas (PR + AA) frente aos efeitos mutagênicos induzidos pelos antineoplásicos variou de 40,00% a 55,35% nos animais machos enquanto que nas fêmeas essa variação foi de 41,37% a 50,00%, (**Figura 4**).

**Figura 4.** Modulação (%) do palmitato de retinol e ácido ascórbico em associação sobre o número de micronúcleos (MN) induzidos por ciclofosfamida (CPA: 20 mg/kg), doxorubicina (DOX: 2 mg/kg) e Esquema AC (DOX e CPA: 2/20 mg/kg) em medula óssea de *Mus musculus* por meio do teste de micronúcleos. ANOVA-*One-way* e pós-teste de *Tukey*.  $n=5$ . Valores significantes de  $P<0,05$  para <sup>a</sup> comparado ao grupo tratado com CPA, <sup>b</sup> comparado ao grupo tratado com DOX e <sup>c</sup> comparado ao grupo tratado com o Esquema AC.



### 3.3 Análise hematológica e bioquímica do PR associado com o AA frente a alterações induzidas pela CPA, DOX e esquema AC

Para avaliar a segurança da terapia antineoplásica em co-tratamento com as vitaminas associadas (PR + AA), os níveis plasmáticos de uréia, creatinina, AST e ALT (parâmetros bioquímicos) e níveis de eritrócitos, leucócitos e plaquetas (parâmetros hematológicos) foram avaliados.

Em relação aos parâmetros hematológicos, observou-se leucopenia ( $p<0,05$ ), com presença de neutropenia, em todos os grupos tratados com os quimioterápicos isolados ou em co-tratamento com as vitaminas associadas (PR + AA), quando comparado ao grupo controle negativo (CN), mas não nos grupos tratados com as vitaminas isoladas ou em combinação (PR + AA). Observou-se também linfopenia significativa ( $p<0,05$ ) (diminuição da contagem de linfócitos) no grupo tratado com o esquema AC isolado bem como nos grupos do esquema AC e da DOX em co-tratamento com as vitaminas associadas quando comparado ao CN. Além disso, houve uma linfocitose significativa ( $p<0,05$ ) (aumento do número de linfócitos)

no grupo da CPA em co-tratamento com as vitaminas associadas (PR + AA) em comparação com o CN (**Tabela 4**).

Quanto aos parâmetros bioquímicos, houve alterações significativas nos níveis de uréia, bem como nas enzimas hepáticas AST e ALT nos grupos tratados com os antineoplásicos isolados ou em co-tratamento com as vitaminas associadas. O uso de PR em associação com o AA não conseguiu reduzir significativamente os níveis de ureia, creatinina e AST causados pelos quimioterápicos. No entanto, houve uma redução significativa da ALT no grupo tratado com a CPA e a DOX em co-tratamento com as vitaminas associadas (PR + AA). Os dados sugerem que houve uma diminuição da nefrotoxicidade e da hepatotoxicidade dos antineoplásicos quando os mesmos foram co-tratados com as vitaminas associadas (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Mus musculus* tratados com os antineoplásicos ciclofosfamida (CPA: 20mg/Kg), doxorubicina (DOX: 2mg/Kg) e esquema AC (CPA e DOX: 20/2 mg/kg) e a modulação destes pelo Palmitato de Retinol (100 UI/kg) em associação com o Ácido Ascórbico (2 µM/Kg). ANOVA-*one-way* e pós-teste de *Tukey*. Significância de <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparado ao CN; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com CPA; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com DOX e <sup>d</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com o Esquema AC. Todos comparados em relação ao mesmo parâmetro.

Parâmetros	Tratamento									
	CN	PR	AA	PR + AA	CPA	DOX	AC	PR+AA+CPA	PR+AA+DOX	PR+AA+AC
<b>Hematológico</b>										
GB	4496±388	4330±450	4648±611	4568±609	2356±236 <sup>a</sup>	2066±173 <sup>ab</sup>	1690±182 <sup>abc</sup>	3525±295 <sup>abc</sup>	3305±180 <sup>abc</sup>	3133±319 <sup>abcd</sup>
Neu	2498±376	2445±342	2406±204	2608±426	574±200 <sup>a</sup>	488±99.2 <sup>a</sup>	351±99.8 <sup>a</sup>	1446±381 <sup>abcd</sup>	815±139 <sup>acd</sup>	609±138 <sup>ad</sup>
Lin	1671±137	1006±274	1894±496	1589±321	1673±299	1449±215	1245±254 <sup>ab</sup>	2155±236 <sup>ab</sup>	1078±237 <sup>ab</sup>	993±163 <sup>ad</sup>
Mon	250±60.8	207±54.9	247±87.7	290±91.9	60.8±31.1	93±47.2	76.3±48.7	192±133	133±84.0	103±47.6
Eos	21.3±4.54	18±6.51	32.6±7.47	21.6±5.33	22.5±12.6	13.8±3.60	7±2.44	15.5±6.12	10.6±3.14	7.5±4.80
Bas	55.1±5.87	53.1±12.2	67.5±16.2	58.3±11.1	25.8±15.5	21.6±9.60	11±9.20	48.1±26.9	27.6±7.25	26±8.98
GV	8.35±0.86	8.27±0.41	7.98±0.67	8.58±0.85	7.18±0.65	7.40±1.00	7.29±1.04	7.87±0.92	7.72±0.90	7.73±0.84
Hb	13.4±1.57	13.8±1.75	13.4±0.62	14.5±1.64	12.5±0.68	12.2±1.26	12.6±2.01	13.05±1.71	13.2±0.98	13.5±1.13
Ht	45.5±7.11	42±4.97	44±1.77	47.4±5.31	36.7±1.59	35.9±1.73	37.3±1.36	39±4.57	41.6±2.84	41.3±5.08
VCM	55.1±1.66	53.35±1.22	55.6±6.39	55.2±1.91	53.3±5.52	53.5±2.22	51.9±1.53	53.8±2.09	54.8±2.89	52.6±1.32
HCM	17.1±0.31	17.2±0.33	16.9±1.00	17.4±1.39	17.5±0.64	17.3±0.71	17.2±0.25	17.5±0.62	17.4±0.59	17.3±0.37
CHCM	32±1.51	32.9±2.76	33.1±1.43	31.7±1.65	32.9±1.87	29.3±5.81	31.2±1.41	32.6±1.63	31.6±1.06	33.3±1.31
RDW	13.9±0.28	14.0±0.68	13.9±0.56	14.0±0.30	13.7±0.39	13.8±0.44	13.5±0.38	13.7±0.31	13.8±0.31	14.1±0.27
PLT	798±118	792±25	761±125	773±136	731.63±63	713±62	725±56	746±33	749±50	740±65
<b>Bioquímico</b>										
Ureia	35.1±2.31	37.0±3.16	38.1±2.89	36.3±1.75	69.5±6.31 <sup>a</sup>	72.1±8.30 <sup>a</sup>	67.1±7.75 <sup>a</sup>	55.0±6.22 <sup>abc</sup>	59.0±5.21 <sup>ac</sup>	53.6±4.54 <sup>abcd</sup>
Creatinina	0.48±0.08	0.50±0.08	0.50±0.07	0.53±0.12	1.63±0.16	1.58±0.17	1.66±0.17	1.18±0.19	1.26±0.28	1.13±0.21
AST (TGO)	110±7.53	113.3±12.9	108.8±16.4	112.5±11.8	166.8±14.1 <sup>a</sup>	161.8±8.03 <sup>a</sup>	169.1±9.02 <sup>a</sup>	128.6±7.06 <sup>abcd</sup>	134.3±9.07 <sup>abcd</sup>	139.3±8.98 <sup>abcd</sup>
ALT (TGP)	57±7.34	60.5±8.52	62.3±11.03	59.6±6.25	85.3±7.63 <sup>a</sup>	88.8±4.62 <sup>a</sup>	90.8±5.52 <sup>a</sup>	66.5±5.24 <sup>bcd</sup>	68.8±8.23 <sup>bcd</sup>	72.5±5.46 <sup>acd</sup>

Legenda: CN= controle negativo (sem tratamento); PR= palmitato de retinol (100 UI/Kg); AA= ácido ascórbico (2 µM/Kg); CPA= ciclofosfamida (20mg/Kg); DOX= doxorubicina (2mg/Kg); Esquema AC= CPA e DOX (20/2 mg/kg); GB= glóbulos brancos totais/µL; Neu= neutrófilos/µL; Lin= linfócitos/µL; Mon= monócitos/µL; Eos= eosinófilos/µL; Bas= basófilos/µL; GV= glóbulos vermelhos x 10<sup>6</sup>/µL; Hb= hemoglobina (g/dL); Ht= hematócrito (%); VCM= Volume corpuscular médio (fL); HCM= Hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL); RDW= Distribuição de eritrócitos (%); PLT= plaquetas x 10<sup>3</sup>/µL; Uréia (mg/dL); Creatinina (mg/dL); AST= Aspartato aminotransferase (U/L); ALT= Alanina aminotransferase (U/L).

#### 4 Discussão

O palmitato de retinol em associação com o ácido ascórbico foi eficiente na modulação dos efeitos genotóxicos observados entre os tipos e a intensidade do dano nuclear causado pelos quimioterápicos. Os mecanismos de ação dessas vitaminas podem estar associados à sua interferência no estresse oxidativo induzido pela quimioterapia e na apoptose. De Carvalho et al. (2017), utilizando os mesmos antineoplásicos em co-tratamento com palmitato de retinol, observou que os biomarcadores citogenéticos avaliados pelo teste cometa foram eficientes na detecção de danos toxicogénicos induzidos pela CPA, DOX e esquema AC em camundongos. No presente estudo, foi possível observar que o índice de danos e a frequência de danos diminuíram significativamente quando os antineoplásicos foram co-tratados com o PR em associação com AA.

As vitaminas associadas impedem o estresse oxidativo causado pelos radicais livres e protegem o DNA da peroxidação das lipoproteínas, uma vez que os radicais livres interagem fortemente com os grupos nucleofílicos (Broustats e Lieberman, 2014). Marcato et al. (2015) introduziram alguns compostos derivados da estrutura do retinol que foram utilizados para modular vários processos biológicos, incluindo a funcionalidade do ciclo celular, diferenciação celular, proliferação, bem como apoptose, que são respostas fisiológicas comuns ao dano genotóxico. Além disso, Moss (2006) sugeriu que as vitaminas antioxidantes podem inibir os efeitos de uma variedade de drogas citotóxicas, como a DOX, em várias linhagens e culturas celulares e podem diminuir os efeitos tóxicos nos sistemas celulares.

A CPA é um quimioterápico indutor de genotoxicidade conhecido por induzir mutações genéticas, formação de MN e radicais livres (Selvakumar et al., 2006, Zavala-Aguirre et al., 2010). Quando os antineoplásicos são ativados metabolicamente, eles induzem a formação de radicais livres que interagem com moléculas de oxigênio, gerando radicais superóxido. Os radicais superóxido interagem com peróxido de hidrogênio e formam radicais hidroxila, que é altamente reativo aos componentes celulares, como o DNA. Esses processos oxidativos caracterizam o potencial citotóxico e mutagênico da CPA e da DOX (Furtado et al., 2008), e o uso de compostos antioxidantes, como a vitamina A e C, pode bloquear a citotoxicidade de drogas devido à inibição da produção de radicais superóxido. Além disso, essas vitaminas podem

atuar sobre proteínas envolvidas no reparo do DNA ou na ativação de caminhos apoptóticos (Sindhi et al., 2013; Tremante et al., 2015).

A avaliação de células hematopoiéticas em camundongos mostrou a ação protetora do PR em associação com o AA contra os efeitos tóxicos dos antineoplásicos estudados. Esses resultados corroboram com vários estudos que relatam a mielossupressão induzida por drogas quimioterápicas (Astolfi et al., 2013; Cao et al., 2014, Qian et al., 2015). Crawford et al. (2003) sugeriram que a citotoxicidade induzida por quimioterápicos suprime o sistema hematopoiético, causando neutropenia grave, o que torna os pacientes mais suscetíveis a infecções. Além disso, a CPA e a DOX são conhecidos como tóxicos para as células do sangue, o que compromete a homeostase do corpo, levando a um risco aumentado de desordens hematológicas, como leucopenia e neutropenia. Segundo Cencic e Chingwaru (2010) e Alencar et al. (2016) a suplementação de vitaminas pode representar uma alternativa clínico-nutricional para combater a agressividade de agentes antineoplásicos durante a quimioterapia, apesar dos riscos de afetar a eficácia quimioterapêutica.

A quimioterapia clássica pode induzir citotoxicidade pela formação de EROS, culminando no aumento dos níveis plasmáticos de creatinina e uréia. O efeito modulador do PR e AA em quimioterápicos como a cisplatina, 5-FU, DOX e a CPA também foi observado em outros estudos (De Martinis e Bianchi, 2001; Fu et al., 2014; Alencar et al., 2016; De Carvalho et al., 2017). Alguns estudos demonstraram o efeito nefroprotetor do AA em co-tratamento com antineoplásicos em ratos (Ajith et al., 2007, Ajith et al., 2009, Bhattacharyya e Mehtab, 2012). De acordo com Yoshikawa et al. (2006) e De Carvalho et al. (2017), essas vitaminas, em baixas concentrações, desempenham um efeito protetor no DNA, sugerindo que esse efeito está associado à sua propriedade antioxidante, capaz de intervir na formação de EROS, reduzindo a nefrotoxicidade.

Segundo Gürgen et al. (2013), Al-Asmari et al. (2015) e De Carvalho et al. (2017), as vitaminas A e C atuam como antioxidantes pela modulação do estresse oxidativo em células hepáticas de camundongos tratados com 5-FU, CPA e DOX, diminuindo a hepatotoxicidade (Abou-Zeid, 2014). Além disso, o AA atua como um potencial sensibilizador químico de linhagens celulares HEp-2, fibroblastos pulmonares humanos resistentes a 5-FU (Nagy et al., 2003) e linhagens celulares esofágicas (Abdel-

Latif et al., 2005). Estudos indicam que pacientes com adenocarcinomas tratados com gencitabina, a administração do AA promoveu uma diminuição da progressão tumoral (Welsh et al., 2013), com diminuição da toxicidade da medula óssea, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade reduzida (Ichim et al., 2011; Carr et al., 2013).

De acordo com Santos et al. (2007), suplementos vitamínicos, como o PR e o AA, melhoram a sobrevivência global, além de melhorar os parâmetros bioquímicos hepáticos e renais em camundongos tratados com a DOX. Para Al-Asmari et al. (2016), a associação do 5-FU com o AA atenua a produção de radicais livres e mediadores inflamatórios, o que reduz a toxicidade hepática em camundongos. Outros estudos também demonstram que essas vitaminas, quando associadas aos quimioterápicos, utilizados nas terapias oncológicas, como a cisplatina, a DOX e a CPA, diminuem a toxicidade induzida pelos antineoplásicos, sem afetar os efeitos dos quimioterápicos (Fátima et al., 2007; Longcha e Prasad, 2016).



## 5 Conclusão

A associação do palmitato de retinol com o ácido ascórbico modulou os danos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos dos quimioterápicos em células de sangue periférico e de medula óssea de *Mus musculus*.

Nossos resultados sugerem que o PR em associação com o AA possuem ação antigenotóxica, devido aos seus possíveis mecanismos antioxidantes; antimutagênica, devido aos seus efeitos anticlastogênicos e/ou antianeugênicos; anticitotóxica, como evidenciado pela interferência na relação entre eritrócitos normocromáticos e policromáticos; ação mieloprotetora, sugerida pelo aumento do número de leucócitos e neutrófilos; ação hepatoprotetora, devido a diminuição dos níveis séricos de AST e ALT, bem como ação nefroprotetora, sugerida pela diminuição dos níveis plasmáticos de uréia.

O PR + AA melhorou todos os parâmetros avaliados no estudo e, portanto, pode ser considerado como um tratamento alternativo para combater os efeitos colaterais causados por antineoplásicos, uma vez que muitos pacientes interrompem a quimioterapia devido aos efeitos adversos graves causados pelas drogas. No entanto, os mecanismos de ação dessas vitaminas antioxidantes precisam ser melhor elucidados em estudos não clínicos e clínicos para garantir sua segurança, sem comprometer o tratamento do câncer.

## 6 Referências

Abdel-Latif MM, Raouf AA, Sabra K, Kelleher D, Reynolds JV. Vitamin C enhances chemosensitization of esophageal cancer cells *in vitro*. J. Chemother. 2005; 17:539-49.

Abou-Zeid NRA. Ameliorative effect of vitamin C against 5-fluorouracil-induced hepatotoxicity in mice: A light and electron microscope study. J. Basic Appl. Zool. 2014; 4:109-18.

Ajith TA, Abhishek G, Roshny D, Sudheesh NP. Co-supplementation of single and multi doses of vitamins C and E ameliorates cisplatin-induced acute renal failure in mice. Exp. Toxicol. Pathol. 2009; 6:565-71.

Ajith TA, Usha S, Nivitha V. Ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: a comparative study. Clin. Chim. Acta 2007; 375:82-6.

Al-Asmari AK, Khan AQ, Al-Quasim AM, Al -Yousef Y. Ascorbic acid attenuates antineoplastic drug 5-fluorouracil induced gastrointestinal toxicity in rats by modulating the expression of inflammatory mediators. Toxicol. Rep. 2015; 2:908-16.

Al-Asmari AK, Khan AQ, Al-Masri. Mitigation of 5-fluorouracil-induced liver damage in rats by vitamin C via targeting redox-sensitive transcription factors. Human Exp. Toxicol. 2016;1:11.

Alencar MVOB, Islam MDT, Rocha LMC, Queiroz JL, Silva MBS, Mata AMOF. Ascorbic Acid Modulates Doxorubicin and Cyclophosphamide-Induced Cytogenetic Damages in Sarcoma 180 Cells. Int. Arch. Med. 2016; 9:181.

Anthony HM, Schorah CJ. Severe hypovitaminosis C in lung-cancer patients: the utilization of vitamin C in surgical repair and lymphocyte-related host resistance. British J. Cancer. 1982; 46:354-67.

Astolfi L, Ghiselli S, Guaran V, Chicca M, Simoni E, Olivetto E. Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation. Oncol. Rep. 2013; 29:1285-92.

Bhattacharyya S, Mehta P. The hepatoprotective potential of Spirulina and vitamin C supplementation in cisplatin toxicity. Food Function. 2012; 2:164-9.

Bonner MY, Arbiser JL. The antioxidant paradox: what are antioxidants and how should they be used in a therapeutic context for cancer. Future Med. Chem. 2014; 6:1413-22.

Broustas CG, Lieberman HB. DNA Damage Response Genes and the Development of Cancer Metastasis. Radiat. Res. 2014; 181:111-30.

Cao Z, Zhang Z, Huang Z, Wang R, Yang A, Liao L, Du J. Antitumor and immunomodulatory effects of low-dose 5-FU on hepatoma 22 tumor-bearing mice. *Oncol. Lett.* 2014; 7:1260-64.

Carr AC, Vissers MCM. Synthetic or food-derived vitamin c - are they equally bioavailable? *Nutri.* 2013; 5:4284-304.

Cencic A, Chingwaru W. The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health. *Nutri.* 2010; 2:611-25.

Cortés-Jofré M, Rueda JR, Corsini-Munoz G, Fonseca-Cortés C, Caraballoso M, Bonfill Cosp X. Drugs for preventing lung cancer in healthy people. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;10:CD002141. doi: 10.1002/14651858.CD002141.pub2.

Crawford J, Dale DD, Lyman GH. Chemotherapy-Induced Neutropenia: Risks, Consequences, and New Directions for Its Management. *Am. Cancer Soc.* 2003; 15:228-37.

Das BC, Thapa P, Karki R, Das S, Mahapatra S, Liu TC, Torregroza I, Wallace DP, Kambhampati S, Van Veldhuizen P, Verma A, Ray SK, Evans T. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorg. Med. Chem.* 2014; 22:673-83.

De Almeida VL. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quím. Nova.* 2005;28:118-29.

De Carvalho RM, Aguiar RP, Islam MT, Alencar MVOB, Da Mata AM, Braga AL, Júnior JJ, Sousa LDR, De Lima RM, Paz MF, Sousa JM, Melo-Cavalcante AAC. Cytogenotoxicological defense of retinyl palmitate in the front damage of antineoplastics. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2017; 69:293-97.

De Martinis BS, Bianchi MD. Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats. *Pharmacol. Res.* 2001; 44:317-20.

Fatima S, Arivarasu NA, Mahmood R. Vitamin C attenuates cisplatin-induced alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport. *Human Exp. Toxicol.* 2007; 26:419-26.

Freedman RA, Partridge AH. Adjuvant therapies for very young women with early stage breast cancer. *Breast* 2011; 20:146-9.

Fu Y, Yang G, Zhu F, Peng C, Li W, Li H. Antioxidants decrease the apoptotic effect of 5-Fu in colon cancer by regulating Src-dependent caspase-7 phosphorylation. *Cell Death Dis.* 2014;5:983.

Furtado MA, Almeida LCF, Furtado RA, Cunha WR, Tavares DC. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutat. Res.* 2008; 657:150-54.

Gurgen SG, Erdogan D, Elmas C, Kaplanoglu GT. Chemoprotective effect of ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, and selenium on cyclophosphamide-induced toxicity in the rat ovarium. *Nutri.* 2013; 5:777-84.

Hansen LA, Sigman CC, Andreola F, Ross SA, Kelloff GJ, De Luca LM. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* 2000; 21:1271-79.

Harris HR, Orsini N, Wolk A. Vitamin C and survival among women with breast cancer: a meta-analysis. *Eur. J. Cancer.* 2014; 50:1223-31.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 2003; 18:45-51.

Heaney ML, Gardner JR, Karasavvas N, Golde DW, Scheinberg DA, Smith EA, O'Connor OA. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. *Cancer Res.* 2008; 68:8031-38.

Ichim TE, Minev B, Braciak T, Luna B, Hunninghake R, Mikirova NA, Jackson JA, Gonzalez MJ, Miranda-Massari JR, Alexandrescu DT, Dasanu CA, Bogin V, Ancans J, Stevens RB, Markosian B, Koropatnick J, Chen CS, Riordan NH. Intravenous ascorbic acid to prevent and treat cancer-associated sepsis? *J. Translat. Med.* 2011;9:25-38.

Kelley MR, Logsdon D, Fishel ML. Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? *Future Oncol.* 2014; 10:1215-37.

Kim YS, Kim E, Park YJ, Kim Y. Retinoic acid receptor  $\beta$  enhanced the anti-cancer stem cells effect of  $\beta$ -carotene by down-regulating expression of delta-like 1 homologue in human neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2016; 480:254-60.

Kumar S, Meena VK, Hazari PP, Sharma RK. PEG coated and doxorubicin loaded multimodal Gadolinium oxide nanoparticles for simultaneous drug delivery and imaging applications. *Int. J. Pharmaceut.* 2017;527:142-50

Longchar A, Surya BP. Ascorbic acid (vitamin c) ameliorates cisplatin-induced hematotoxicity in tumor-bearing mice. *World J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2016; 5:1870-90.

Mahdavi R, Faramarzi E, Seyedrezazadeh E, Mohammad-Zadeh M, Pourmoghaddam MM. Evaluation of oxidative stress, antioxidant status and serum vitamin C levels in cancer patients. *Biol. Trace Element Res.* 2009; 130:1.

Marcato P, Dean CA, Liu RZ, Coyle KM, Bydoun M, Wallace M. Aldehyde dehydrogenase 1A3 influences breast cancer progression via differential retinoic acid signaling. *Molec. Oncol.* 2015;9:17-31.

Mastrangelo D, Massai L, Lo Coco F, Noguera NI, Borgia L, Fioritoni G, Berardi A, Iacone A, Muscettola M, Pelosi E, Castelli G, Testa U, Di Pisa F, Grasso G. Cytotoxic effects of high concentrations of sodium ascorbate on human myeloid cell lines. *Annals Hematol.* 2015; 94:1807-16.

Mayland CR, Bennett MI, Allan K. Vitamin C deficiency in cancer patients. *Palliat. Med.* 2005; 19:17-20.

Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Male CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev.* 2006; 6:924-34.

Moss RW. Should patients undergoing chemotherapy and radiotherapy be prescribed antioxidants? *Integrat. Cancer Ther.* 2006; 5:63-82.

Nagy B, Mucsi I, Molnar J, Varga A, Thurzo L. Chemosensitizing effect of vitamin C in combination with 5-fluorouracil *in vitro*. *In Vivo* 2003; 17:289-92.

Padayatty SJ, Levine M. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *Canadian Med. Assoc. J.* 2001; 164:353-5.

Pathak SK, Sharma RA, Steward WP, Mellon JK, Griffiths TR, Gescher AJ. Oxidative stress and cyclooxygenase activity in prostate carcinogenesis: targets for chemopreventive strategies. *Eur. J. Cancer* 2005; 41:61-70.

Qian XP, Qian XL, Chen XL, Ge M, Chen DJ, Mao WW. The anti-proliferative effect of 5-fluorouracil on tumor is highly associated with the renewal of peripheral white blood cells. *J. Cancer Ther.* 2015; 6:594-600.

Rochette-Egly C. Retinoic acid signaling and mouse embryonic stem cell differentiation: Cross talk between genomic and non-genomic effects of RA. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molec. Cell Biol. Lipids.* 2015; 1851:66-75.

Santos RV, Batista MLJR, Caperuto EC, Rosa LFC. Chronic supplementation of creatine and vitamins C and E increases survival and improves biochemical parameters after Doxorubicin treatment in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007; 12:1294-9.

Selvakumar E, Prahalathan C, Varalakshmi P, Kumarasamy, P, Saravanan R. Modification of cyclophosphamide-induced clastogenesis and apoptosis in rats by alpha-lipoic acid. *Mutat. Res.* 2006; 606:85-91.

Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N. Potential applications of antioxidants—a review. *J. Pharm. Res.* 2013; 7:828-35.

Tremante E, Santarelli L, Monaco EL, Sampaoli C, Ingegnere T, Guerrieri R, Tomasetti M, Giacomini P. Sub-apoptotic dosages of pro-oxidant vitamin cocktails sensitize human melanoma cells to NK cell lysis. *Oncotarget.* 2015; 6:31039-49.

Uno Y, Kojimab H, Omoric T, Corvid R, Honmab M, Schechtma LM. JaCVAM-organized international validation study of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for detection of genotoxic carcinogens: II. Summary of definitive validation study results. *Mutat. Res/Genetic Toxicol. Environ. Mutagenesis* 2015; 786-88:45-76.

Welsh JL, Wagner BA, Van'terve TJ, Zehr PS, Berg DJ, Halfdanarson TR, Yee NS, Bodeker KL; Du J, Roberts LJ, Driko J, Levine M, Buettner GR, Cullen JJ.

Pharmacological ascorbate with gemcitabine for the control of metastatic and node-positive pancreatic cancer (PACMAN): results from a phase I clinical trial. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2013;71:765-75.

Wilson MK, Baguley BC, Wall C, Jameson MB, Findlay MP. Review of highdose intravenous vitamin C as an anticancer agent. *Asia Pacific J. Clin. Oncol.* 2014; 10:22-37.

Yosshikawa Y, Hizume K, Oda Y, Takeyasu K, Araki Y, Yoshikawa K. Protective Effect of Vitamin C against Double-Strand Breaks in Reconstituted Chromatin Visualized by Single-Molecule Observation. *Biophys. J.* 2006; 90:993-9.

Zavala-Aguirre JL, Torres-Bugarín O, Buelna-Osben HR, Flores-Kehn LP, Ramos-Ibarra ML, Zuniga-Gonzalez G, Ogura T. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities by cyclophosphamide and colchicine in *Xenotoca melanosoma* (Pisces, Goodeidae) from Lake la Alberca in Michoacan, Mexico. *J. Environ. Sci. Health* 2010; 45:75-81.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

A associação do palmitato de retinol com o ácido ascórbico, simultâneo a quimioterapia com ciclofosfamida, doxorrubicina e o esquema AC, modulou os danos oxidativos em linhagens de *S. cerevisiae*, danos citotóxicos em *Artemia salina* bem como efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos em *Allim cepa*, possivelmente, devido a sua ação antioxidante. Também teve ação antígenotóxica em linfócitos de sangue periférico e em medula ossea de *Mus musculus* verificados no teste cometa. Em medula óssea de *Mus musculus*, a associação do PR + AA teve ação antimutagênica evidenciada pela redução no número de micronúcleos bem como ação anticitotóxica, como evidenciada pelo aumento na relação entre eritrócitos normocromáticos e policromáticos. A associação das vitaminas (PR + AA) ainda tiveram uma atividade mieloprotetora, nefroprotetora e hepatoprotetora observadas através de parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Os efeitos modulatórios do palmitato de retinol associado ao ácido ascórbico, frente aos antineoplásicos, devem ser levados em consideração em novos estudos, a fim de elucidar as controvérsias atuais do uso de antioxidantes durante o tratamento do câncer.

## ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - UFPI



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
**COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**  
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceepi@ufpi.edu.br



Teresina, 24 de Novembro de 2014.

Ilma.

**Profa. Dra. ANA AMÉLIA DE CARVALHO MELO CAVALCANTE**  
**Departamento: Bioquímica e Farmacologia- CCS/UFPI**

Senhora Pesquisadora,

Em reunião na presente data (24 de Novembro de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **081/14**, o projeto de pesquisa intitulado **"Efeitos de vitaminas nos danos induzidos ao DNA pelos agentes antineoplásicos Ciclofosfamida e Doxorrubicina"**, sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Novembro/2014 à Fevereiro/2016, e serão usados 150 Camundongos isogênicos *swiss* (75 machos e 75 fêmeas).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,

  
Prof.<sup>a</sup> Ivete L. de Mendonça  
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora



## ANEXO B – CARTA DE PRORROGAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - UFPI



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
Campus Universitário Ministro Petrônio Portata, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceepi@ufpi.edu.br



### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos de vitamina nos danos induzidos ao DNA pelos agentes antineoplásicos ciclofosfamida e Doxorubicina", sob a responsabilidade da Profa. Dra. ANA AMÉLIA DE CARVALHO MELO CAVALCANTE, com Carta de Aprovação deste Comitê sob o nº 081/14, teve a solicitação do Período de Vigência de Abril/ 2016 à Agosto/ 2016 Aprovado por este Comitê.

Atenciosamente,

  
Prof.ª Ivete L. de Mendonça  
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora

**ANEXO C – TRABALHO “ACTION OF THE ASCORBIC ACID AND RETINYL PALMITATE IN THE TOXICITY AND CITOTOXICITY CAUSED BY CYCLOPHOSPHAMIDE, DOXORUBICIN AND PROTOCOL AC IN ALLIUM CEPA” APRESENTADO NO III ENCONTRO ESTRATÉGICO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS E II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FARMÁCIA CLÍNICA REALIZADO EM ABRIL/2017, TERESINA – PI.**



**ANEXO D – TRABALHO “RETINYL PALMITATE AND ASCORBIC ACID MODULATE THE GENOTOXICITY OF CYCLOPHOSPHAMIDE AND DOXORUBICIN” APRESENTADO NO XIII CONGRESSO DA MUTAGEN-BRASIL REALIZADO EM JUNHO/2017, RIBEIRÃO PRETO – SP.**



**XIII CONGRESSO DA MUTAGEN-BRASIL**  
01 A 03 DE JUNHO DE 2017  
RIBEIRÃO PRETO-SP

Realização:



CERTIFICADO

Certificamos que  
**ANA RAFAELA SILVA PEREIRA**  
Apresentou o trabalho  
““RETINYL PALMITATE AND ASCORBIC ACID MODULATE THE GENOTOXICITY OF  
CYCLOPHOSPHAMIDE AND DOXORUBICIN”

Autores: “Ana Rafaela Silva Pereira, Leonardo Rocha de Sousa, Antônio Lima Braga, Ag-Anne Perreira Melo de Menezes, José Victor de Oliveira Santos, Rosália Maria Tôrres de Lima, José Josimar Silva Junior, Felipe Cavalcante Carneiro da Silva, Ana Amélia Carvalho Melo Cavalcante, João Marcelo de Castro e Sousa

Na sessão de Pôsteres do XIII CONGRESSO DA MUTAGEN-BRASIL

No período de 01 a 03 de junho de 2017

Ribeirão Preto – SP, 03 de junho de 2017



Delsy Maria Fávero Salvadori  
Presidente da Associação Brasileira de Nuzagênese e Genômica Ambiental



Raquel Alves dos Santos  
Primeira Secretária

Apoio



**ANEXO E – TRABALHO “ANTIOXIDANT VITAMINS MODULATE DNA-INDUCED DAMAGE BY ANTINEOPLASTIC AGENTS IN VIVO” PREMIADO COMO MELHOR TRABALHO DA ÁREA “MODULAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E NUTRIGENÔMICA” DURANTE A SESSÃO DE PÔSTERES DO XIII CONGRESSO DA MUTAGEN-BRASIL REALIZADO EM JUNHO/2017, RIBEIRÃO PRETO – SP.**



**XIII CONGRESSO DA MUTAGEN-BRASIL**  
01 A 03 DE JUNHO DE 2017  
RIBEIRÃO PRETO-SP

Realização:



CERTIFICADO

Certificamos que  
**EILEN TAINÁ MATOS FERREIRA**

Apresentou o trabalho  
“ANTIOXIDANT VITAMINS MODULATE DNA-INDUCED DAMAGE BY ANTINEOPLASTIC AGENTS *IN VIVO*”

Autores: “Eilen Taina Matos Ferreira, Leonardo Rocha de Sousa, José Josimar Silva Junior, Ricardo Melo Carvalho, Rosália Maria Tôrres de Lima, Antônio Lima Braga, Ag-Anne Perreira Melo de Menezes, Ana Paula Peron, Felipe Cavalcante Carneiro da Silva, Ana Amélia Carvalho Melo Cavalcante, João Marcelo de Castro e Sousa

Na sessão de Pôsteres do XIII CONGRESSO DA MUTAGEN-BRASIL

No período de 01 a 03 de junho de 2017

Ribeirão Preto – SP, 03 de junho de 2017



Delsy Maria Fávero Salvadori  
Presidente da Associação Brasileira de Nutrigênese e Genômica Ambiental



Raquel Alves dos Santos  
Primeira Secretária

Apoio:



**ANEXO F – CARTA DE CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO  
"TOXICOGENETIC DAMAGES INDUCED BY CHEMOTHERAPY AGENTS,  
MODULATED BY RETINOL PALMITATE ASSOCIATED WITH ASCORBIC  
ACID IN MICE" SUBMETIDO A REVISTA ARCHIVES OF TOXICOLOGY  
(QUALIS A1)**

ATOX-D-17-00667 : Submission Confirmation for Toxicogenetic damages induced by chemotherapy agents, modulated by retinol palmitate associated with ascorbic acid in mice



Inbox x

 Editorial Office Arch Tox <em@editorialmanager.com>

10:33 PM (0 minutes ago) ☆

 to me ▾

Dear Mr. Islam,

Your submission entitled "Toxicogenetic damages induced by chemotherapy agents, modulated by retinol palmitate associated with ascorbic acid in mice" has been received by Archives of Toxicology

The submission id is: ATOX-D-17-00667

Please refer to this number in any future correspondence.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://atox.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Beate Graf  
Editorial Office  
Archives of Toxicology

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on [www.springer.com/openchoice](http://www.springer.com/openchoice)). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to [www.springer.com/oafunding](http://www.springer.com/oafunding).

Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

**Archives of Toxicology**  
**Toxicogenetic damages induced by chemotherapy agents, modulated by retinol  
palmitate associated with ascorbic acid in mice**  
--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Toxicogenetic damages induced by chemotherapy agents, modulated by retinol palmitate associated with ascorbic acid in mice
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Corresponding Author:</b>	Mohammed Torequ Islam, PhD (Ongoing) Universidade Federal do Piaui BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal do Piaui
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Leonardo da Rocha Sousa

## **ANEXO G – NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA ARCHIVES OF TOXICOLOGY**

### **Instructions for Authors**

#### **GENERAL REMARKS**

##### **Title page**

The biological system studied must be indicated in the title [in vivo/in vitro humans/animal species, cell line(s), etc.]

##### **Abstract**

It is essential that the abstract contain a brief justification for the study. The biological system studied must be clearly indicated, and applied doses/concentrations of the test compound(s) must be specified. Failure to comply with these essentials in toxicology will result in the immediate rejection of the manuscript.

##### **Text**

In order to comply with Archives of Toxicology's high quality standards, the following criteria are essential for original articles: In the introduction the justification for the study must be clearly explained, and its relevance for toxicology must be clear. It is not sufficient to state that the study was conducted simply because it had never been done before. In the methodological section (Materials and Methods) the scientific procedure must be described in a way that, in principle, would allow others to reproduce the study. The doses/concentrations of test compound(s) must be clearly specified, and a straightforward justification of the dose selection must be provided. If authors perform their experiments according to standard operation procedures (SOPs) or protocols that are more detailed than the conventional Material and Methods section, they are encouraged to publish the SOPs or protocols as electronic supplements. The Introduction and Discussion sections must make the essential points, must be concise and avoid repetitions. Authors should use the option of including Electronic Supplementary Material. Doing so allows them to limit the length of the manuscript and make it more appealing to potential readers without sacrificing scientific information. Authors are encouraged to make the raw data available in an electronic supplement. If genome-wide data is presented, the raw data must be publicly available. The study design must be clear, including the number and type of replicas. Please clearly specify whether or not the results were reproduced in independent experiments. At least three independent experiments are required.

#### **AUTHORSHIP POLICY**

Authorship should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper

#### **TYPES OF PAPERS**

Short reports

Short reports on new results of special interest will be published out of turn as Short communications and will be given top priority in the editorial and production process. Short communications should normally not exceed 2 printed pages (= 1,000 words) including tables, etc. The editors reserve the right to decide what constitutes a Short communication. Editorials - please note: no Abstract required Review Articles

Original Articles

Meeting Reports

Commentaries

Opinion Letters / Editorials

The Archives of Toxicology would like to officially invite our readers to submit letters and guest editorials to our journal. Authors are free to present their opinions on articles recently published in our journal or those published in other journals that would be of general interest to our readers. Moreover, comments on general topics relevant to toxicology are welcome, such as legislation or funding policy. Letters and guest editorials represent personal opinion and will therefore not be peer-reviewed. Nevertheless, the editorial board ask that the submissions adhere to the following standards:

- They should be sound, scientifically-founded and of general interest
- Critical contributions are welcome; however, ad hominem reasoning must be avoided.
- They should be no more than 1 printed page long, without an abstract, figures or tables. We accept a maximum of three references, and ask for short affiliations only (institute and country, no address). If a letter or guest editorial addresses an article published in our journal, the corresponding author of that article will be invited to contribute a response letter. If the response is received within four weeks after the invitation is made, both the original opinion piece and the response letter will be published back to back in the same issue. If however, the response is received later than the allotted four weeks, it will be published as soon as it is technically feasible in a subsequent issue. Eventually, a second round of discussion (letter and response letter) may be arranged if all relevant arguments were not brought forward in the first round.

### Special Issues

- Contributions that are part of a Special Issue must include the following footnote on the title page: "This article is published as part of the Special Issue on [title of the Special Issue]"

### Manuscript length

The maximum number of pages per original research article (including figures, tables and references) should be restricted to 10 printed pages (accounts for 750 words per printed page, figures and tables have to be counted as half a page). For reviews the maximum number should be 20 printed pages.

## MANUSCRIPT SUBMISSION

### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

## Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

## Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

## INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING

### Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

### Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list. If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

### Additional information

Authors should note that Archives of Toxicology complies with the recommendations of the Committee on Publishing Ethics (COPE):

COPE-websiteDetails of the publisher’s procedures concerning duplication, fraud or other unethical procedures (of which Archives of Toxicology is compliant) can be found at: Springer-website.

### Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address (es) of the author(s)



The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author. If available, the 16-digit ORCID of the author(s).

### Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### TEXT

#### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

#### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

#### Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

#### Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

#### Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

### SCIENTIFIC STYLE

Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

### REFERENCES

#### Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples: Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996). This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

#### Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi:10.1007/s00421-008-0955-8 Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi: 10.1007/s001090000086.

Book South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter Brown B, Aaron M (2001). *The politics of nature*. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

#### Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb.

<http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

#### ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

### TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table. Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

### ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

#### Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically. Indicate what graphics program was used to create the artwork. For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

### Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

### Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading etc. If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

### Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing linedrawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

### Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc. Do not include titles or captions within your illustrations.

### Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file. Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm. For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware) Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements) Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

## ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form. Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

### Submission

Supply all supplementary material in standard file formats. Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author. To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

### Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

### Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. A collection of figures may also be combined in a PDF file.

## Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

## Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

## Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

## Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables. Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4". Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

## Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

## Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

## Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that the manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material. Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk).

## ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider: Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity. Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

## ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions. No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism. Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

Adding and/or deleting authors at revision stage may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the role of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request. Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief’s implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author. If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is maintained on the platform, watermarked “retracted” and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author’s institution may be informed.

## COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

## Research involving Human Participants and/or Animals

### Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication. The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the abovementioned guidelines.

### DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

Honoraria for speaking at symposia

Financial support for attending symposia

Financial support for educational programs

Employment or consultation

Support from a project sponsor

Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships  
Multiple affiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest  
Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)  
Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work  
In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research. The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

## RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

### 1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:  
Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:  
“For this type of study formal consent is not required.”

### 2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

## INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.



The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

### Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

### Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

### Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

### Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

### Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

### OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer’s online platform SpringerLink. Open Choice

## ANEXO H – NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA TOXICOLOGY IN VITRO

### GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, Please visit the Preparation section below.

### INTRODUCTION

#### Types of paper

The Journal's main purpose will be the publication of papers reporting and interpreting original toxicological research involving the application or development of in vitro techniques. Brief Communications (2,500 word limit) documenting important new findings warranting expeditious publication will also be considered, as will concise interpretative Reviews of toxicological topics of contemporary significance. Letters to the Editor will be limited to comments on contributions already published in the Journal; if a letter is accepted, a response (for simultaneous publication) will be invited from the authors of the original contribution. Toxicology in Vitro also welcomes Correspondence from the scientific community, especially as they relate to Hot Topics and Debates. These are handled directly by the Editor-in-Chief and may be accompanied by responses.

#### Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present: One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

#### Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

#### Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

## BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing. Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

### Conflict of Interest

Toxicology in Vitro follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission: All third-party financial support for the work in the submitted manuscript. All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript. All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission. Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported. Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued). Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work. As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information will be acknowledged at publication in a Transparency Document. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org>. The form for conflict of interest disclosure can be downloaded here, or at [http://www.icmje.org/coi\\_disclosure.pdf](http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf) (if this link does not display properly in your browser, please right-click the link and select "Save Target As" or "Save Link as" from the popup menu.)

### Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

### Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

More information.

### Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases. For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

### Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information. Elsevier supports responsible sharing Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

### Role of the Funding Source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. All sources of funding should be declared as an acknowledgment at the end of the text. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

### Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

#### Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

#### Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is USD 2600, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

#### Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

#### Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

#### Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. <http://ees.elsevier.com/tiv>

#### Revised versions

The medium of submission for revised papers is electronic, through the Elsevier website (<http://ees.elsevier.com/tiv>). Figures should be submitted as original high quality files of a standard graphics program. Revised versions should be returned within 3 months of the first date of decision. Failure to do so will result in any resubmission being treated as a new version and will therefore carry a new date of receipt.

#### Referees

The Editors require submissions by the authors of the names and addresses of 4 potential reviewers for this submission. The institutional address and e-mail address are required. At least 2 of the referees should be from a different country to the corresponding author's. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

#### Experimental Procedures

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of 24

November 1986 (86/609/EEC) or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines. More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

## PREPARATION

### NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

### References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

### Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections. Please ensure the text of your paper is double-spaced— this is an essential peer review requirement.

### Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

### Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

## REVISED SUBMISSIONS

### Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

## Manuscript Format

Manuscripts should be written in clear and concise English; incomprehensible submissions will be returned to authors for revision. All pages must be numbered, including the Title Page, which should carry the title of the paper, the surnames and initials of the authors, and the names and address of the institutions where the work was done (with the affiliation of each author clearly indicated).

Titles consisting of declarative or interrogative sentences are not acceptable. Please do not add line numbering to your source file as this will be added automatically by the EES system upon building of the PDF.

### Introduction

**Introduction:** A concise and clear statement on the background, purposes and significance of the work.

**Material and methods Materials and Methods:** A detailed description of the experimental design and of any new or improved methods. Well-established methods and techniques may be identified by reference only.

### Results

**Results:** Presented concisely with the aid of tables or figures where appropriate. Duplication between this section and the Discussion must be avoided.

### Discussion

**Discussion:** A succinct interpretation of the data. Extensive literature reviews and highly speculative comments are discouraged.

### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Each author's academic or professional qualifications should also be listed. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Abstract

**Abstract:** A self-contained summary of the objectives, results and significance of the study, not exceeding 200 words. Uninformative sentences such as "the significance of the results is discussed" are not acceptable.

### Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm

using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

#### Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, or, maximum 20 words per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

#### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### Abbreviations

Abbreviations should be used sparingly. Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### Acknowledgements

Acknowledgements: Providing recognition of sources of funding and donations of materials, and including any thanks the authors may wish to accord for advisory, technical or other assistance, since authorship should be limited to those who have made a major contribution to the study and to the preparation of the paper. Authors are advised to obtain approval for the wording of any acknowledgement from those whose help is noted.

#### Nomenclature

The metric system is the standard for all measurements. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, wherever possible, with the aid of CAS Registry and EC numbers.

#### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

#### Artwork

##### Electronic artwork

##### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.



- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

#### Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### Tables

Tables should be intelligible without reference to the text and should be planned to fit the page size of the Journal. The same data may not be reproduced in both a table and a figure. Each table must have a title and on each column there should be a heading that clearly identifies the data therein.

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus,

CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged. A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

#### Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

#### Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/toxicology-in-vitro>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

#### Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

#### Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown.'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB in total. Any single file should not exceed 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content. Supplementary material Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

## RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your

manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

#### Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described. There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page. For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

#### Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to Mendeley Data. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

#### Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, Data in Brief. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

#### MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your MethodsX article.

#### Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

#### AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

#### Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. Full instructions.

#### AFTER ACCEPTANCE

##### Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

##### Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

#### AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.