



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

**Efeitos do ácido ascórbico nos danos citogenéticos e oxidativos da ciclofosfamida,
doxorrubicina e esquema AC em Sarcoma 180 e em *Saccharomyces cerevisiae***

MARCUS VINÍCIUS OLIVEIRA BARROS DE ALENCAR

Teresina – Piauí

2015

MARCUS VINÍCIUS OLIVEIRA BARROS DE ALENCAR

**Efeitos do ácido ascórbico nos danos citogenéticos e oxidativos da ciclofosfamida,
doxorubicina e esquema AC em Sarcoma 180 e em *Saccharomyces cerevisiae***

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.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante

Teresina – Piauí

2015

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

A368e Alencar, Marcus Vinicius Oliveira Barros de.
Efeitos do ácido ascórbico nos danos citogenéticos e oxidativos da ciclofosfamida, doxorrubicina e esquema AC em Sarcoma 180 e em *Saccharomyces cerevisiae* / Marcus Vinicius Oliveira Barros de Alencar. – Teresina, 2015.
128 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2015.
Orientadora: Profª. Drª. Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante.
Bibliografia

1. Antineoplásicos. 2. Ácido ascórbico. 3. Quimioterapia. I. Título. II. Teresina – Universidade Federal do Piauí.

CDD 616.994

MARCUS VINÍCIUS OLIVEIRA BARROS DE ALENCAR**Efeitos do ácido ascórbico nos danos citogenéticos e oxidativos da ciclofosfamida, doxorubicina e esquema AC em Sarcoma 180 e em *Saccharomyces cerevisiae***

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.

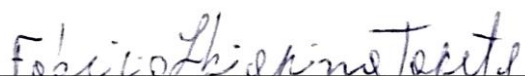
Aprovada em 11/03/2015

BANCA EXAMINADORA



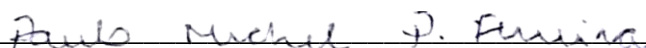
Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante (Orientadora)

Departamento de Bioquímica e Farmacologia – UFPI



Prof. Dr. Fabrício Ibiapina Tapety (Examinador Externo)

Departamento de Anatomia – FACIME – UESPI



Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira (Examinador Interno)

Departamento de Biofísica e Fisiologia – UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

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

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

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

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus Cristo, porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas, glória pois a Ele eternamente;

Aos meus pais, Valmir Rodrigues de Alencar e Débora Oliveira Barros de Alencar (*in memoriam*), meus exemplos em verdade, gravidade e sinceridade, demonstrados com muito amor;

Aos meus irmãos, Felipe Alencar e Daniele Alencar, pela união, apoio e compreensão mesmo nos momentos mais difíceis pelos quais passamos;

À Universidade Federal do Piauí, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes;

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Piauí, na pessoa do Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Piauí pelo empenho em compartilhar seus conhecimentos e dirimir prontamente as mais capciosas dúvidas;

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante, por me despertar ao mundo científico e pela paciência e profundo conhecimento dedicados a esta dissertação;

Aos colegas da turma 2014 do PPGCF – UFPI, pelos momentos agradáveis e tenebrosos nas disciplinas;

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica (LAPGENIC), em especial ao Júnior Gomes, Kátia Machado, Keylla Machado, Márcia Fernanda, Adailson Júnior, Ana Maria, Stefhânia Coelho, Rai Pablo e Francisco Silva;

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX), em especial à Amanda Almeida e Rusbene Bruno;

Ao Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas, pelo auxílio a tempo e fora de tempo dedicados para a excelência deste estudo;

Aos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

“A doença é a zona noturna da vida, uma cidadania mais onerosa. Todos que nascem têm dupla cidadania, no reino dos sãos e no reino dos doentes. Apesar de todos preferirmos só usar o passaporte bom, mais cedo ou mais tarde nos vemos obrigados, pelo menos por um período, a nos identificarmos como cidadãos desse outro lugar.”

(Susan Sontag)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Genética do câncer	19
3.2 Terapia do câncer	21
3.3 Os antineoplásicos CPA, DOX e esquema AC	24
3.4 Estresse oxidativo e os antioxidantes	26
3.5 O ácido ascórbico e seu efeito na quimioterapia	29
3.6 Danos citogenéticos e seus biomarcadores	32
3.7 Sarcoma 180 como modelo de estudos farmacológicos	36
3.8 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo para estudos farmacológicos	37
REFERÊNCIAS	39
4 CAPÍTULO I: Ácido ascórbico, efeitos antioxidantes e pró-oxidantes: meta-análise de perspectivas para a eficácia na quimioterapia	49
Sumário	50
Summary	51
4.1 Introdução	53
4.2 Materiais e Métodos	55
4.2.1 Estratégia da pesquisa.....	55
4.2.2 Seleção dos estudos.....	55
4.2.3 Extração de dados.....	55
4.2.4 Cálculo do risco relativo com intervalo de confiança de 95%.....	56
4.2.5 Análise estatística.....	56
4.3 Resultados	56
4.3.1 Análise da associação do ácido ascórbico como agente antitumoral.....	57
4.4 Discussão	64
4.5 Conclusão	68
REFERÊNCIAS	69
5 CAPÍTULO II: O ácido ascórbico modula danos citogenéticos induzidos pela ciclofosfamida e doxorrubicina em Sarcoma 180	76

Resumo	77
Abstract	78
5.1 Introdução	79
5.2 Materiais e Métodos	81
5.2.1 Preparo das substâncias	81
5.2.2 Cultivo <i>in vivo</i> de Sarcoma 180	81
5.2.3 Viabilidade celular por meio do teste de exclusão por azul de Tripán	81
5.2.4 Cálculos da modulação do AA frente aos danos citogenéticos dos antineoplásicos em Sarcoma 180	82
5.2.5 Avaliação de danos citogenéticos induzidos pelos antineoplásicos CPA, DOX e AC em sangue periférico de camundongos em exposição <i>ex vivo</i>	82
5.2.6 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese	83
5.2.7 Parâmetros que foram considerados na análise	83
5.2.8 Características das células apoptóticas e necróticas	84
5.2.9 Características dos micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares	85
5.2.10 Análise estatística	85
5.3 Resultados	86
5.3.1 Estudo da viabilidade celular em linhagens de células tumorais de Sarcoma 180 por meio do teste de exclusão por azul de Tripán	86
5.3.2 Avaliação de danos citogenéticos da CPA, DOX e AC em culturas de células tumorais (Sarcoma 180), e dos efeitos do AA em co-tratamento com os antineoplásicos	87
5.3.3 Modulação (%) de danos citogenéticos da CPA, DOX e do AC pelo ácido ascórbico, em culturas de células tumorais (Sarcoma 180)	88
5.3.4 Avaliação de danos citogenéticos da CPA, DOX e AC em células não tumorais de sangue periférico expostas <i>ex vivo</i> aos antineoplásicos	93
5.4 Discussão	96
5.5 Conclusão	99
REFERÊNCIAS	100
6 CAPÍTULO III: Atividade oxidante dos antineoplásicos ciclofosfamida e doxorrubicina e os efeitos antioxidantes do ácido ascórbico em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	105
Resumo	106
Abstract	107
6.1 Introdução	108
6.2 Materiais e Métodos	110
6.2.1 Preparo das substâncias	110
6.2.2 Linhagens utilizadas	110
6.2.3 Teste do disco central em <i>S. cerevisiae</i>	111
6.2.4 Avaliação do AA na modulação de danos oxidativos induzidos pelos antineoplásicos	111
6.2.5 Análise estatística	112
6.3 Resultados	112

6.3.1 Avaliação de danos oxidativos induzidos pelos antineoplásicos CPA, DOX e AC e pelo co-tratamento com AA em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	112
6.3.2 Percentuais de inibição de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> pela CPA, DOX e AC em comparação com os danos oxidativos induzidos pelo AA e H ₂ O ₂	114
6.3.3 Efeitos modulatórios do AA frente aos danos oxidativos induzidos pela CPA, DOX e AC, em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	114
6.4 Discussão	118
6.5 Conclusão	120
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - UFPI	126
ANEXO B – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO AO JORNAL <i>TUMOR BIOLOGY</i>	127
ANEXO C – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO AO JORNAL <i>YEAST</i>	128

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$\text{A}^{\cdot-}$	Radical ascorbato
AA	Ácido ascórbico
AC	Esquema quimioterápico composto por Ciclofosfamida + Doxorubicina
ATP	Trifosfato de adenosina
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bid	<i>Human BH3 interacting-domain death agonist</i>
CAT	Catalase
CPA	Ciclofosfamida
CuZnSOD	Superóxido dismutase cobre-zinco
CYP2B6	<i>Cytochrome P450, Family 2, Subfamily B, Polypeptide 6</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorubicina
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FAC	5-Fluorouracil + Adriamicina + Ciclofosfamida
Fe^{2+}	Ferro Ferroso
Fe^{3+}	Ferro Férrico
g/L	grama por litro
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
mM	milimolar
mmol/L	milimol/litro
MnSOD	Superóxido dismutase manganês
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
$\text{OH}^{\cdot-}$	Íon hidroxila
OH^{\cdot}	Radical hidroxila
p53	<i>protein p53</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dismutase

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Delineamento experimental do estudo citogenético e oxidativo dos antineoplásicos e dos efeitos do AA.	17
Figura 2. Desenvolvimento de neoplasias, agente endógenos e exógenos, bem como danos oxidativos que alteram a estrutura do material genético.	22
Figura 3. Estrutura química da CPA.	24
Figura 4. Estrutura química da DOX.	25
Figura 5. Geração de espécies reativas de oxigênio por meio da reação de Fenton.	27
Figura 6. Mecanismos moleculares em resposta às espécies reativas de oxigênio.	28
Figura 7. Estrutura química do ácido ascórbico.	30
Figura 8. Mecanismo de ação do ácido ascórbico, como uma pró-droga antineoplásica.	32
Figura 9. Mecanismos externos e internos para indução de apoptose.	34
Figura 10. Os vários destinos possíveis de células expostas a agentes citotóxicos/genotóxicos.	36

CAPÍTULO I

Figura 1. Fluxograma da avaliação, exclusão e análise das publicações sobre os efeitos do ácido ascórbico, como pró-oxidante e/ou antioxidante frente aos antineoplásicos.	57
Figura 2. <i>Forest plot</i> da associação entre as doses do ácido ascórbico e seu efeito antitumoral, em estudos clínicos realizados entre 1985 – 2013.	59
Figura 3. Modelos não clínicos que foram indicados por autores citados nas revisões analisadas, para atividades pró-oxidantes do AA.	63
Figura 4. Modelos não clínicos que foram indicados por autores citados nas revisões analisadas, para atividades antioxidantes do AA.	64

CAPÍTULO II

Figura 1. Efeitos dos antineoplásicos CPA, DOX e AC na viabilidade de células de Sarcoma 180 avaliada por meio do teste de exclusão por azul de Tripan.	86
Figura 2. Percentuais dos efeitos do ácido ascórbico na modulação dos danos citogenéticos induzidos pela ciclofosfamida em culturas de células tumorais de Sarcoma 180.	89

Figura 3. Percentuais dos efeitos do ácido ascórbico na modulação dos danos citogenéticos induzidos pela doxorrubicina em culturas de células tumorais de Sarcoma 180.	90
Figura 4. Percentuais dos efeitos do ácido ascórbico na modulação dos danos citogenéticos induzidos pelo AC, em culturas de células tumorais de Sarcoma 180.	91
Figura 5. Análise da toxicidade dos antineoplásicos CPA, DOX e AC em Sarcoma 180.	92
Figura 6. Perfil fotomicrográfico das células de Sarcoma 180 expostas aos antineoplásicos e ao ácido ascórbico. Nos dois primeiros quadrantes CPA, logo abaixo DOX, seguido por AC.	94
Figura 7. Danos citogenéticos induzidos pela CPA, DOX e AC em linfócitos de sangue periférico de camundongos expostos <i>ex vivo</i> aos antineoplásicos.	95

CAPÍTULO III

Figura 1. Posicionamento das linhagens utilizadas no ensaio com <i>S. cerevisiae</i> .	111
Figura 2. Estudo comparativo entre os percentuais de inibição de crescimento de linhagens de <i>S. cerevisiae</i> expostas aos antineoplásicos em relação aos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico.	115
Figura 3. Danos oxidativos induzidos pela ciclofosfamida e doxorrubicina em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	116
Figura 4. O ácido ascórbico na modulação dos danos oxidativos induzidos pela ciclofosfamida em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> proficiente e mutadas em enzimas superóxido dismutase e catalase.	116
Figura 5. O ácido ascórbico na modulação dos danos oxidativos induzidos pela doxorrubicina em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> proficiente e mutadas em enzimas superóxido dismutase e catalase.	117
Figura 6. O ácido ascórbico na modulação dos danos oxidativos induzidos pelo esquema AC em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> proficiente e mutadas em enzimas superóxido dismutase e catalase.	118

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Características dos estudos abordando o ácido ascórbico como agente antitumoral, administrado de forma concomitante aos antineoplásicos. 58

Tabela 2. Principais drogas antineoplásicas, citadas em 33 artigos de revisão de estudos clínicos e não clínicos, que relataram sobre a importância do AA, como modulador de antineoplásicos (antioxidantes) e como agente antitumoral (pró-oxidantes). 60

Tabela 3. Principais doses do ácido ascórbico citadas em 33 artigos de revisão que relataram sobre a importância do AA, como modulador de e como agente antitumoral. 61

Tabela 4. Mecanismos moleculares propostos para as atividades antioxidantes/oxidantes do AA e apontados em periódicos científicos, citados em 33 artigos de revisão, que relataram sobre a importância do AA, como modulador de drogas antineoplásicas e como agente antitumoral em modelos clínicos e não clínicos. 62

CAPÍTULO II

Tabela 1. Danos citogenéticos induzidos pelos antineoplásicos ciclofosfamida, doxorrubicina e de sua associação, bem como a modulação do AA em células tumorais de Sarcoma 180 por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese. 87

CAPÍTULO III

Tabela 1. Descrição das linhagens de *S. cerevisiae* usadas no estudo. 110

Tabela 2. Estresse oxidativo induzido por ciclofosfamida, doxorrubicina e pela sua associação, e co-tratamento com o ácido ascórbico, em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Dados obtidos pela inibição de crescimento em placas (0-40 mmm). 113

Efeitos do ácido ascórbico nos danos citogenéticos e oxidativos da ciclofosfamida, doxorrubicina e esquema AC em Sarcoma 180 e em *Saccharomyces cerevisiae*. MARCUS VINÍCIUS OLIVIERA BARROS DE ALENCAR. Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. 128p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2015.

RESUMO

O câncer suscita eventos moleculares, genéticos e epigenéticos para sua iniciação, que presumem mutações. Os antineoplásicos induzem danos ao DNA, que levam à apoptose e/ou necrose, especialmente pelas espécies reativas de oxigênio. É comum o consumo de alimentos ricos em vitaminas, especialmente vitamina C, durante terapias. O presente estudo objetiva avaliar os níveis de danos citogenéticos e oxidativos da ciclofosfamida, doxorrubicina e do esquema AC, em modelos de células tumorais de Sarcoma 180, linfócitos de camundongos, e em *Saccharomyces cerevisiae*, e os efeitos do ácido ascórbico. A ciclofosfamida e doxorrubicina foram preparadas em solução salina 0.9%, em 20 e 2 mg/mL, respectivamente, mantendo-se as mesmas concentrações no esquema AC. O ácido ascórbico foi solubilizado em tampão fosfato até 2 μmol . Todos os antineoplásicos induziram significantes danos citogenéticos do tipo apoptose>micronúcleos>necrose>pontes em Sarcoma 180 e em linfócitos de camundongos. No entanto, o ácido ascórbico modulou em 70% (apoptose e micronúcleos) e 32% para necrose. A doxorrubicina induziu significantes danos citogenéticos (apoptose>necrose >micronúcleos) que foram modulados em 70% para apoptoses, 40% para necrose e 21% para micronúcleos. Em AC, os mesmos danos foram significantes e as modulações do ácido ascórbico foram de 60% para apoptose, 42% para necrose e micronúcleos. Não foram observadas significâncias para brotos e pontes, exceto para pontes induzidas pela ciclofosfamida, sem modulação pelo ácido ascórbico. Os antineoplásicos induziram significantes danos oxidativos em todas as linhagens de *S. cerevisiae*. Entretanto, o ácido ascórbico modulou significativamente os danos oxidativos induzidos pela ciclofosfamida em 50% para as linhagens testadas; e em 70% para superóxido dismutase selvagem. Os danos oxidativos induzidos pela doxorrubicina foram modulados em 62%. Correlações positivas ($P<0,001$) foram observadas entre os danos citogenéticos e danos oxidativos. Em Sarcoma 180 e em *S. cerevisiae*, os danos citogenéticos e oxidativos dos antineoplásicos foram modulados pelo ácido ascórbico, sugerindo que, provavelmente, o ácido ascórbico, como antioxidante, pode interferir na eficácia dos antineoplásicos.

Palavras-chave: Antineoplásicos; Ácido Ascórbico; Quimioterapia; Antioxidante.

ABSTRACT

Cancer raises molecular, genetic and epigenetic events for his initiation, which assume mutations. Antineoplastic induce DNA damage, leading to apoptosis and/or necrosis, especially by reactive oxygen species. The consumption of foods rich in vitamins, especially vitamin C during therapies is frequently performed. This study aimed to evaluate the levels of cytogenetic and oxidative damage of cyclophosphamide, doxorubicin, and AC, in tumor cell models of Sarcoma 180, mouse lymphocytes, and *Saccharomyces cerevisiae*, and the effects of ascorbic acid. The cyclophosphamide and doxorubicin were prepared in 0.9% saline, to 20 and 2 mg/mL, respectively, maintaining the same concentration in scheme AC. Ascorbic acid was solubilized in phosphate buffer to 2 μ mol. All antineoplastic induced significant cytogenetic damage type apoptosis>micronuclei>necrosis>bridges in Sarcoma 180 and mouse lymphocytes. However, ascorbic acid modulated at 70% (apoptosis and micronucleus) and 32% necrosis. Doxorubicin induced significant cytogenetic damage (apoptosis>necrosis>micronucleus) that were modulated by 70% for apoptosis, 40% to necrosis and 21% for micronuclei. In AC, the same damage was significant and the modulations of ascorbic acid were 60% for apoptosis, 42% to necrosis and micronuclei. No significance was observed for nuclear buds and nucleoplasmic bridges, except for bridges induced by cyclophosphamide, without modulation by ascorbic acid. Antineoplastic induced significant oxidative damage in all strains of *S. cerevisiae*. However, ascorbic acid significantly modulated oxidative damage induced by cyclophosphamide in 50% of the tested strains; and 70% for wild-superoxide dismutase. The oxidative damage induced by doxorubicin have been modulated by 62%. Positive correlation ($P<0.001$) was observed between the cytogenetic damage and oxidative damage. In Sarcoma 180 and *S. cerevisiae*, the cytogenetic and oxidative damage of anticancer were modulated by ascorbic acid, suggesting that ascorbic acid, probably, as an antioxidant, may interfere with the effectiveness of anticancer drugs.

Keywords: Antineoplastic Agents; Ascorbic Acid; Chemotherapy; Antioxidant.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das maiores causas de morte no Brasil e no mundo. Em 2014, foram 156.060 casos novos para o sexo masculino e 137.490 para o sexo feminino (INCA, 2014). No Brasil, os tipos mais incidentes, na ordem de frequência, são os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon, reto e estômago, para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide, para o sexo feminino (INCA, 2013).

O maior problema da quimioterapia é o desenvolvimento de resistência, sendo necessário a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na geração de fenótipos resistentes (GÖNENÇ et al., 2013). As variações genéticas na população humana, bem como as mutações em tumores devem ser consideradas em estudos sobre o uso concomitante de medicações, que representa fatores de risco para as respostas celulares da quimioterapia (HANIGAN et al., 2013). Portanto, compreender o modo de ação de fármacos antitumorais é importante para o desenvolvimento de novas drogas, uma vez que a atividade antitumoral é mediada pela capacidade de indução de danos ao DNA e desencadear a apoptose. Assim, a seleção de quimioterápicos deve ser baseada na citotoxicidade para o tipo de célula tumoral, com baixa toxicidade para células e tecidos normais (LEE et al., 2012).

Uma grande maioria de pacientes em quimioterapia faz suplementação com vitaminas, especialmente com o ácido ascórbico (AA), o que pode ocasionar efeitos antagônicos aos antineoplásicos (SUBRAMANI et al., 2014; GROBER, 2009), reduzindo a eficácia destes fármacos, neutralizando radicais livres (WANG; WANG; YU, 2014; CHAMBIAL et al., 2013; D'ANDREA, 2005), como também regulando enzimas de reparo de DNA e de fatores pós-transcricionais (WEAKLEY et al., 2010; LEE et al., 2002).

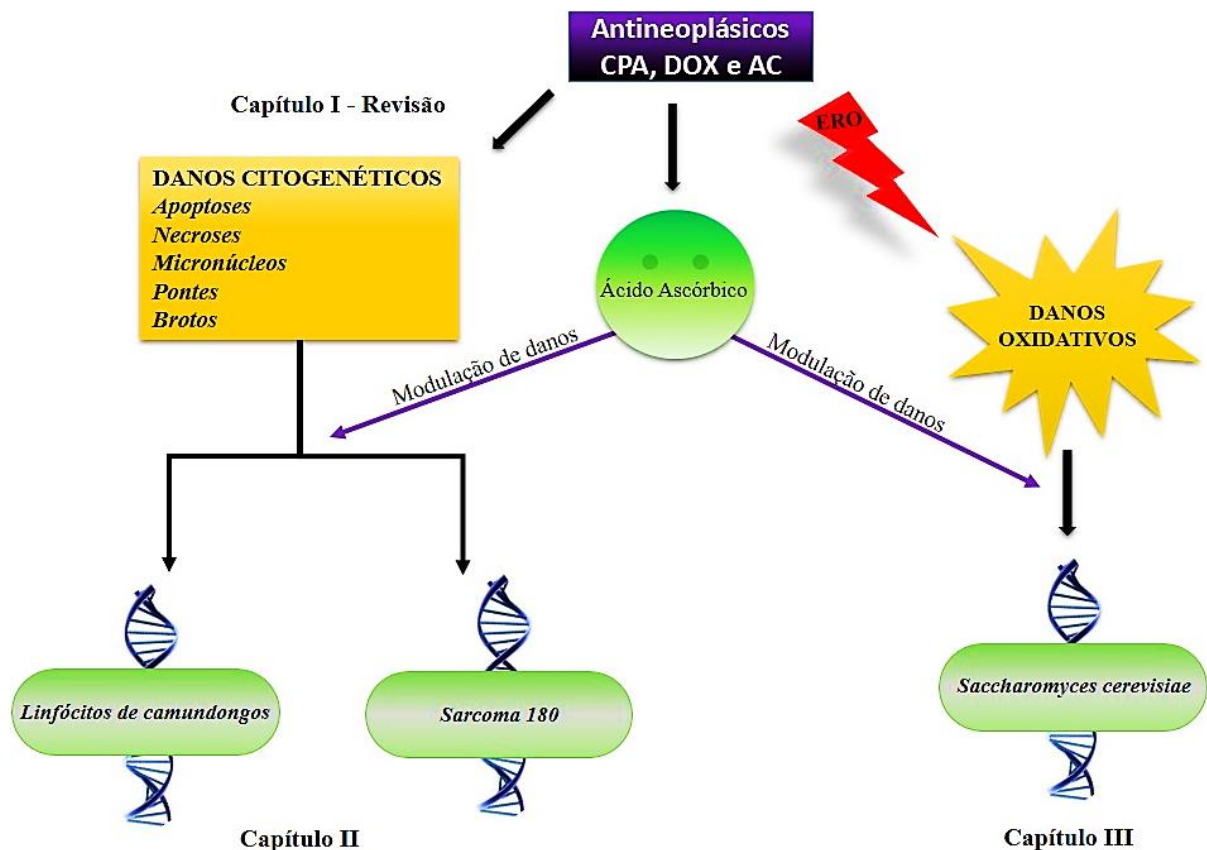
O uso clínico de antioxidante, durante a quimioterapia ainda vem sendo bastante discutido devido as controvérsias sobre o seu potencial de reduzir a eficácia citotóxica de quimioterápicos tais como a ciclofosfamida e o 5-fluorouracil (SUBRAMANI et al., 2014; D'ANDREA, 2005). Contudo, em altas doses, podem ter efeitos anticâncer incluindo inibição de metástase, do crescimento do tumor e de metaloproteinases, angiogênese e indução de apoptose (NIEDZWIECKI et al., 2010).

Biomarcadores para a avaliação de danos citogenéticos e oxidativos são comumente usados em diversas pesquisas não clínicas, a exemplos dos modelos de células tumorais tais como o Sarcoma 180, que são similarmente adaptáveis em relação à genética funcional de estudos *in vivo* (TAYLOR et al., 2011; FRAPOLLI et al., 2010). O uso de leveduras também é

muito utilizado em estudos farmacológicos de resistência a drogas, dentre elas as antitumorais (PEREGO; JIMENEZ; GATTI, 2000; NITISS; WANG, 1988).

Neste sentido, o presente estudo tem o intuito de contribuir para o entendimento dos danos citogenéticos e oxidantes dos antineoplásicos ciclofosfamida (CPA), doxorubicina (DOX) e de suas interações no Esquema AC (Adriamicina® + Ciclofosfamida) em Sarcoma 180, linfócitos de sangue periférico de camundongos e em *S. cerevisiae*. Os efeitos do AA na modulação de danos da CPA, DOX e AC foram analisados (**Figura 1**). Assim, esta dissertação apresenta uma revisão de meta análise sobre o papel antioxidante e oxidante do AA frente aos antineoplásicos (**Capítulo I**); os efeitos citogenéticos dos antineoplásicos em Sarcoma 180 e em linfócitos, bem como a modulação de danos pelo AA (**Capítulo II**); e os danos oxidativos dos antineoplásicos e ações antioxidantes do AA em *S. cerevisiae* (**Capítulo III**).

Figura 1. Delineamento experimental do estudo citogenético e oxidativo dos antineoplásicos e dos efeitos do AA.



Fonte: Pesquisa direta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Analisar o papel do ácido ascórbico (vitamina C) na modulação de danos citogenéticos e oxidativo, induzidos pelos antineoplásicos ciclofosfamida (CPA), doxorubicina (DOX), bem como por suas interações, como ocorre no esquema quimioterápico AC, em modelos de células tumorais de Sarcoma 180 e em *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e mutadas quanto às defesas antioxidantes enzimáticas e avaliar os danos citogenéticos dos quimioterápicos em linfócitos de sangue periférico de camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Elaborar um artigo de meta-análise sobre as controvérsias científicas em relação às ações farmacológicas do ácido ascórbico como antioxidante e/ou pró-oxidante, enfatizando os modelos de estudo;
- Evidenciar os possíveis danos citogenéticos (apoptose, necrose, micronúcleos, pontes e brotos), induzidos pela CPA, DOX e AC no modelo de Sarcoma 180;
- Avaliar os efeitos modulatórios do ácido ascórbico frente aos danos citogenéticos induzidos pela CPA, DOX e AC, em modelos de células tumorais (Sarcoma 180);
- Verificar os possíveis danos citogenéticos (apoptose, necrose, micronúcleos, pontes e brotos) induzidos pela CPA, DOX e AC, em linfócitos de sangue periférico de camundongos expostos *ex vivo* aos antineoplásicos;
- Determinar os possíveis efeitos oxidativos dos quimioterápicos CPA, DOX e AC em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*;
- Avaliar os efeitos modulatórios do ácido ascórbico frente aos danos oxidativos induzidos pela CPA, DOX e AC em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Genética do câncer

A carcinogênese é uma consequência de múltiplas etapas que envolvem mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos, tendo como os principais grupos de genes envolvidos neste processo: proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo do DNA (WEAKLEY et al., 2010; DANTAS et al., 2009).

O câncer representa a 2^a maior causa de morte em todo o mundo constituindo um importante problema de saúde pública. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) até 2030, serão esperados cerca de 27 milhões de casos novos de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas atingidas pela doença (INCA, 2014; INCA 2013). É uma patologia causada por uma série de mutações genéticas que conferem às células algumas características especiais, como: capacidade ilimitada de proliferação, perda de resposta a fatores de inibição de crescimento, evasão de apoptose (morte celular programada), capacidade de invadir outros tecidos corpóreos (metástases) e produção de novos vasos sanguíneos (angiogênese) (ARAÚJO; GALVÃO, 2010).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são um dos fatores de risco para a carcinogênese, podendo, assim, desempenhar um papel de iniciação e progressão tumoral. Os radicais livres induzem danos oxidativos diretos e indiretos ao DNA contribuindo para a mutagênese, que é essencial para a iniciação do processo tumoral (DIZDAROGLU; JARUGA, 2012; SASTRE-SERRA et al., 2010). Além de danos ao DNA, os radicais livres podem induzir danos em diferentes tipos de biomoléculas, incluindo as proteínas, lipídios, carboidratos e aminoácidos (GÖNENÇ et al., 2013).

As possíveis maneiras como os fatores de riscos ao câncer influenciam no surgimento de neoplasias estão relacionadas ao desbalanceamento da produção e eliminação de EROs capazes de induzir danos oxidativos ao DNA. EROs podem interagir com o DNA de forma a produzir alterações em genes importantes, como os responsáveis por codificar enzimas de reparo do DNA e/ou controle do ciclo celular, tendo como iminente resultado a modulação da ação dos mesmos (GARCÍA-QUISPE et al., 2012).

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de radicais livres e/ou espécies reativas não radicais é resultante do metabolismo de oxigênio. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora. O sistema de defesa

antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais. Este sistema, usualmente, é dividido em enzimático (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e não-enzimático, a exemplo das vitaminas e compostos antioxidantes (BARBOSA et al., 2010).

A genotoxicidade é um termo coletivo que se refere a qualquer processo que afeta a integridade estrutural do DNA. Este campo multidisciplinar de pesquisa tem como objetivo detectar compostos capazes de causar danos ao DNA, na expectativa de compreender as consequências biológicas de agentes genotóxicos e seu envolvimento na alteração dos mecanismos moleculares do material genético, onde estas consequências podem levar a processos cancerígenos (MINO; CUMBAL; SANCHEZ, 2012).

Os efeitos genotóxicos são caracterizados pela capacidade de um agente promover alterações no DNA de uma célula, sendo que estas alterações são ou não passíveis de correção pelo sistema de reparo celular. Quando estas alterações não são devidamente reparadas pelo sistema celular, podem levar a mutações, cujos efeitos podem ser desde a inviabilidade celular até o desenvolvimento de processos carcinogênicos (DIZDAROGLU; JARUGA, 2012).

As alterações genotóxicas são as que mais causam prejuízos ao material genético como a quebra de fita simples ou dupla, lesão cromossomal e outras. Entretanto, em curto prazo e do ponto de vista de um único organismo, a alteração genética é quase sempre prejudicial, especialmente em organismos multicelulares (SWIFT; GOLSTEYN, 2014).

Estas alterações vão se acumulando com a idade nos tecidos, sugerindo que o elevado nível de danos ao DNA pode acelerar o declínio fisiológico e proporcionar o aparecimento de doenças não limitadas ao câncer. Altos níveis de danos ao DNA podem induzir caminhos de sinalização tais como a apoptose, que resulta em depleção do sistema celular (SWIFT; GOLSTEYN, 2014; ROOS; KAINA, 2013; FREITAS; MAGALHÃES, 2011).

A mutagenicidade é atribuída à indução permanente de alterações no DNA, que pode ser resultado de mudanças hereditárias. As mutações podem alterar um único gene, bloquear os genes e causar perda de cromossomos. Mutações de ponto alteram a sequência do gene e são as alterações mais frequentes ao DNA. Podem ser divididas em substituições de pares de bases, deleções e inserções (SŁOCZYŃSKA et al., 2014). Diferentes substâncias químicas podem ser consideradas mutagênicas e esta mutagenicidade pode ser executada por diversos mecanismos de ação, tais como: a) reação direta com o DNA nuclear; b): incorporação ao DNA durante a replicação celular; c): interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisão incorreta da célula (MATSUMOTO et al., 2006).

As mutações gênicas envolvem substituição, deleção ou adição de pares de base. Enquanto isto, as mutações cromossômicas podem ser classificadas de acordo com o tipo de

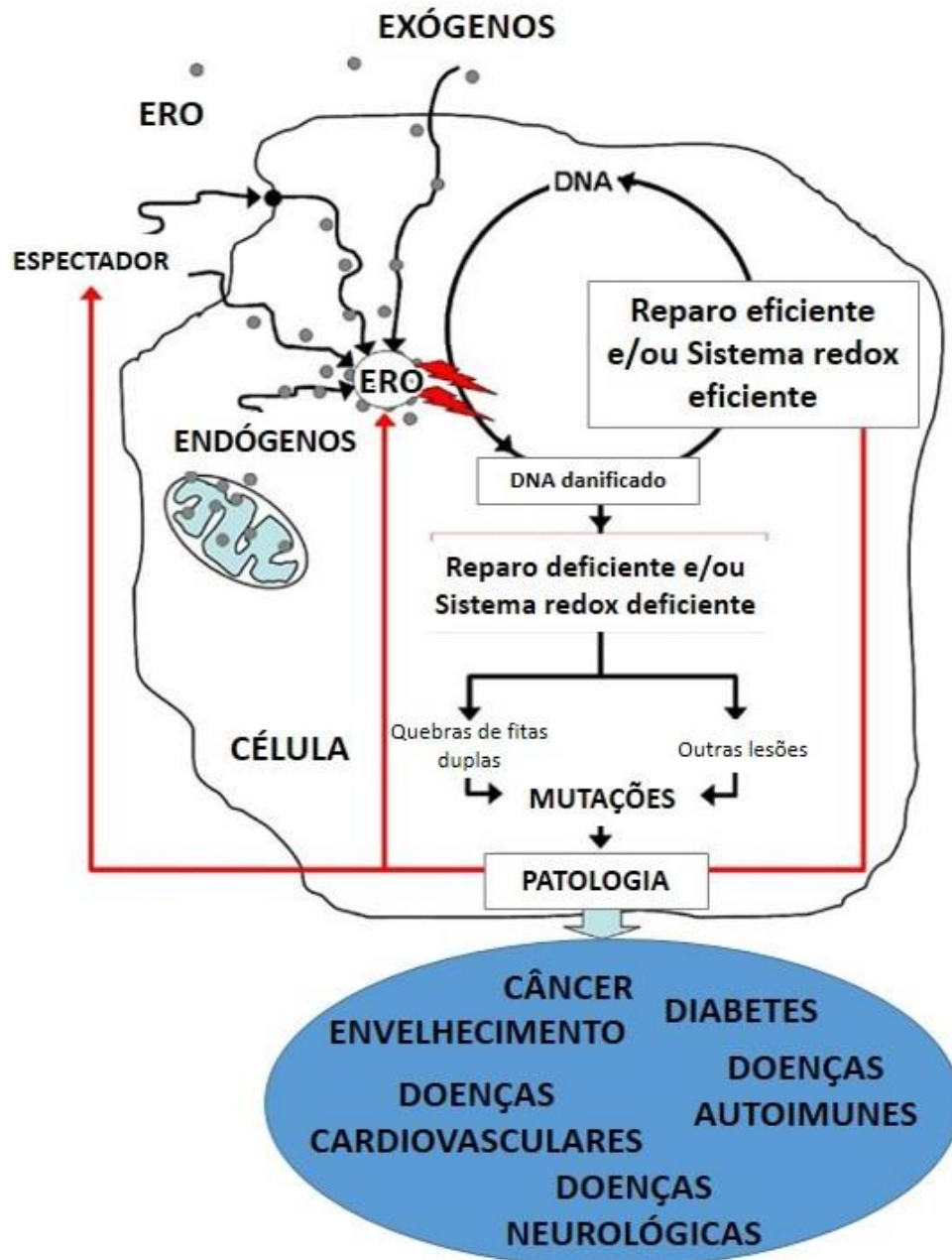
dano, sendo as estruturais, as que envolvem deleção, duplicação, translocação, ou inversão de partes de cromossomos (aneuploidia), e também os indivíduos ou espécies com números cromossômicos (n) múltiplos do comum da espécie ou do gênero (euploidia) (BIANCOTTI et al., 2010), que podem ser fatores de risco para as respostas celulares da quimioterapia (HANIGAN et al., 2011).

Em células normais, a exposição crônica aos ERO e/ou deficiência nos processos de reparação do DNA ou na maquinaria redox, podem resultar em lesões persistentes ao DNA. Estas lesões acumuladas podem desenvolver mutações pontuais ou aberrações cromossômicas via formação de quebras de fita dupla de DNA, que por fim originam doenças como o câncer (SEDELNIKOVA et al., 2010) (**Figura 2**).

3.2 Terapia do câncer

Os principais tratamentos antineoplásicos têm por objetivo induzir a morte das células cancerosas por apoptose, evitando processos inflamatórios indesejáveis advindos da necrose. Os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer incluem os alquilantes polifuncionais, os antimetabólitos, os antibióticos antineoplásicos e os inibidores mitóticos (FUCHS; ELLINGER, 2010; KUMAR et al., 2005). As drogas utilizadas no tratamento de neoplasias, de maneira geral, apresentam atividade citotóxica (FREEDMAN; PATRIDGE, 2011). A carcinogenicidade de muitos agentes quimioterápicos também é parcialmente dependente de sua capacidade de induzir danos mutagênicos e clastogênicos ao DNA, incluindo adutos de DNA, erros de replicação, quebras e ligações cruzadas (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008).

Figura 2. Desenvolvimento de neoplasias, agente endógenos e exógenos, bem como danos oxidativos que alteram a estrutura do material genético.



Fonte: Adaptado de Sedelnikova et al. (2010).

O tratamento da neoplasia pode ser realizado com aplicação de esquemas quimioterápicos, os quais consistem em um grupo de aproximadamente 300 drogas que atuam em nível celular a fim de impedir o crescimento e a proliferação de células mutantes. A ciclofosfamida (CPA), uma destas drogas, é amplamente usada no tratamento de tumores, atuando pela interação de seu metabólito secundário, mostarda fosforamida com muitas estruturas moleculares intracelulares, incluindo os ácidos nucleicos. Sua ação citotóxica se

deve, principalmente, ao entrecruzamento da cadeia de DNA e RNA, assim como à inibição da síntese de proteínas (FARSHID; ESMAEL; RANJBAR, 2013; REZVANFAR et al., 2008).

Os quimioterápicos se constituem em substâncias citotóxicas que atuam direta ou indiretamente no processo de proliferação celular, tendo como objetivo a indução de apoptose. De acordo com sua finalidade, a quimioterapia poderá ser classificada, como: adjuvante, neoadjuvante, primária, paliativa, monoquimioterapia e poliquimioterapia (FREEDMAN; PARTRIDGE, 2011; SPENCE; JOHNSTON, 2003).

Os quimioterápicos apresentam diversos mecanismos de ação e são classificados em: agentes alquilantes (ciclofosfamida, clorambucila, melfalana, mecloretamina); nitrosureias (carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina); triazenos (procarbazina, dacarbazina); derivados da platina (cisplatina, carboplatina, oxaliplatina); antimetabólitos, como os antagonistas do ácido fólico (metotrexato, perimetrexato, raltitrexato), os análogos da pirimidina (citarabina, 5-fluorouracil, gencitabina, tegafur, 5-azatidina), os análogos da purina (mercaptopurina, tioguanina, cladribina) e os antagonistas da adenosina (pentostatina, fludarabina); os agentes inibidores dos microtúbulos, como os alcaloides da vinca (vincristina, vimblastina) e os taxanos (paclitaxel, diocetaxel); os antibióticos, como as antraciclinas (dactinomicina, doxorubicina, daunorrubicina, idarubicina) e os inibidores das topoisomerasas (irinotecano, topotecano, etoposídeo, teniposídeo) (DE FALCO; DE LUCA, 2010).

Os antineoplásicos são adotados de acordo com o tipo de tumor, agregando também as características individuais de cada paciente. Por isso, o conhecimento dos principais aspectos da utilização de antineoplásicos é muito importante, tanto para uma melhor eficácia terapêutica, quanto para um procedimento mais seguro (BROWMAN et al., 2001). A quimioterapia é comumente bem tolerada, entretanto resultados de tratamentos que induzem necroses são preditivas para riscos de metástase, e esta informação pode ser útil para terapias sistêmicas (MACDERMED et al., 2010).

Um dos fármacos bastante utilizado no tratamento do câncer é a CPA, um antineoplásico de ação alquilante que tem seu uso consagrado também na nefrite lúpica. Como agente alquilante, atua impedindo a separação dos dois filamentos do DNA na dupla hélice espiralada, fenômeno este indispensável para a replicação. Porém, os alquilantes também afetam as células em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico (GOESSLER et al., 2011). Outro fármaco de importante uso em terapias quimioterápicas é a doxorubicina (DOX). A DOX é uma droga antitumoral utilizada, principalmente, no tratamento de câncer de mama e linfomas. Seu mecanismo de ação inclui interação com a enzima Topoisomerase II, parada do ciclo celular em G2, além de geração de radicais livres dentro da célula (CHENNURU; SALEEM, 2013).

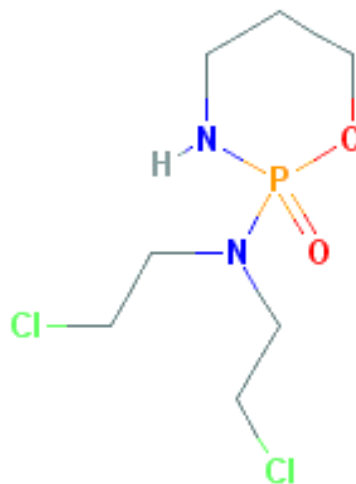
3.3 Os antineoplásicos CPA, DOX e esquema AC

A CPA é um agente alquilante bifuncional, que faz parte da família das mostardas nitrogenadas, capaz de induzir vários tipos de danos ao DNA, dentre eles, mutações genéticas e aberrações cromossômicas (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008; FRIIS et al, 1997). Como agente citotóxico de ação imunossupressora, a CPA tem grande importância na terapia contra o câncer uma vez que é a peça fundamental para regimes de quimioterapia curativa em mais de 50% dos pacientes pediátricos de câncer recém-diagnosticados e tem seu uso consagrado na nefrite lúpica, especialmente na classe proliferativa difusa (JOY et al., 2012).

Metabolicamente ativada pela enzima microsossomal CYP2B6, a CPA, por meio da formação do metabólito ativo mostarda fosforamida, induz morte celular por formação de adutos de DNA, Estes adutos são relevantes por conta da sua capacidade para bloquear a replicação do DNA e a associação com a citotoxicidade (JOHNSON et al., 2012; KENNEDY et al., 2010).

A CPA (**Figura 3**) é comumente utilizada no tratamento de tumores e doenças malignas com células B, como linfoma e mieloma, e doenças não malignas como artrite reumatoide, tendo como efeito colateral comum a cistite hemorrágica, a qual pode vir a ocorrer devido a ação de espécies reativas de oxigênio (FARSHID; TAMADDONFARD, RANJBAR, 2013).

Figura 3. Estrutura química da CPA.

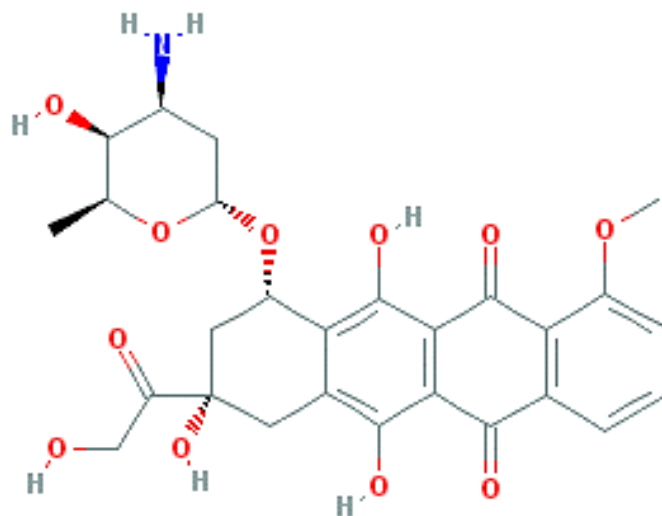


Fonte: Adaptado de Sánchez-Suárez et al. (2008).

A DOX é um dos principais fármacos antitumorais em uso na clínica e possui amplo espectro de atividade contra vários tumores sólidos e hematológicos, estando portanto, comumente presente em vários esquemas terapêuticos (KAN et al., 2014).

Na tentativa de reduzir os efeitos colaterais da DOX (**Figura 4**) e para melhorar a sua eficácia anticancerígena, vários nanocarreadores de doxorubicina e daunorrubicina foram desenvolvidos, incluindo micelas, dendrímeros, sólido-lipídico e nanopartículas de polímero. Os lipossomas são, as mais estudadas nanoformulações de doxorubicina e são os únicos produtos nanocarreadores que chegaram ao mercado (PERCHE; TORCHILIN, 2012).

Figura 4. Estrutura química da DOX.



Fonte: Adaptado de Kan et al. (2014).

A DOX é uma das mais eficientes drogas anticâncer, mas seu uso clínico é limitado pelos seus efeitos adversos, tais como a indução de cardiotoxicidade por peroxidação lipídica (CHENNURU; SALEEM, 2013; JOHNKENNEDY; IFEOMA, 2012). Este quimioterápico pode também gerar radicais livres e apresentar bases oxidadas e metiladas no DNA de linfócitos humanos. Existem dois mecanismos diferentes de geração de EROs pela doxorubicina: ciclagem redox, através do qual produz quinona e os radicais de oxigênio e um tipo de reação de Haber-Weiss catalisada pelo complexo de Fe-doxorubicina, por meio do qual são gerados radicais OH^{\bullet} (KASAPOVIC et al., 2010).

O tratamento quimioterápico pode ser feito com aplicação dos protocolos FAC (doxorubicina + fluorouracil + ciclofosfamida) e/ou AC (doxorubicina + ciclofosfamida). As

doses destas medicações mais comuns são respectivamente 500/50/500 (mg/m²) e 60/600 (mg/m²), com ciclo de 21 dias (GUIMARÃES, 2012). O protocolo AC tem aplicação terapêutica no tratamento neoadjuvante no câncer de mama, no qual a paciente realiza a quimioterapia antes da cirurgia, com o objetivo de reduzir o tamanho do tumor. Este esquema mostrou ser tão efetivo quanto a quimioterapia pós-operatória, com relação à sobrevida de pacientes com câncer de mama primário operável (FISHER et al., 1990). A identificação da variedade de respostas à terapia do câncer requer conhecimento de variáveis incluindo medicações concomitantes, o que pode alterar o metabolismo e a farmacocinética da quimioterapia (HANIGAN et al., 2011).

3.4 Estresse oxidativo e os antioxidantes

O peróxido de hidrogênio, o radical hidroxil ou o superóxido são constantemente gerados e eliminados nos sistemas biológicos (DICKINSON; CHANG, 2011). O estresse oxidativo é um fenômeno comum no corpo em condições fisiológicas normais. O elevado nível de espécies reativas de oxigênio é minimizado por várias enzimas que participam da homeostase (RAHAL et al., 2014; HALLIWELL, 2006). Inúmeras pesquisas revelam que as EROs produzidas, primariamente nas mitocôndrias, apresentam riscos para vários caminhos de sinalização celular. Muitos fatores de riscos estão associados ao estresse oxidativo, tais como as doenças crônicas, incluindo o câncer, infecções virais e bacterianas (ABDOLLAHI; SHETAB-BOUSHEHRI, 2012; GUPTA; HEVIA; PATCHVA, 2012).

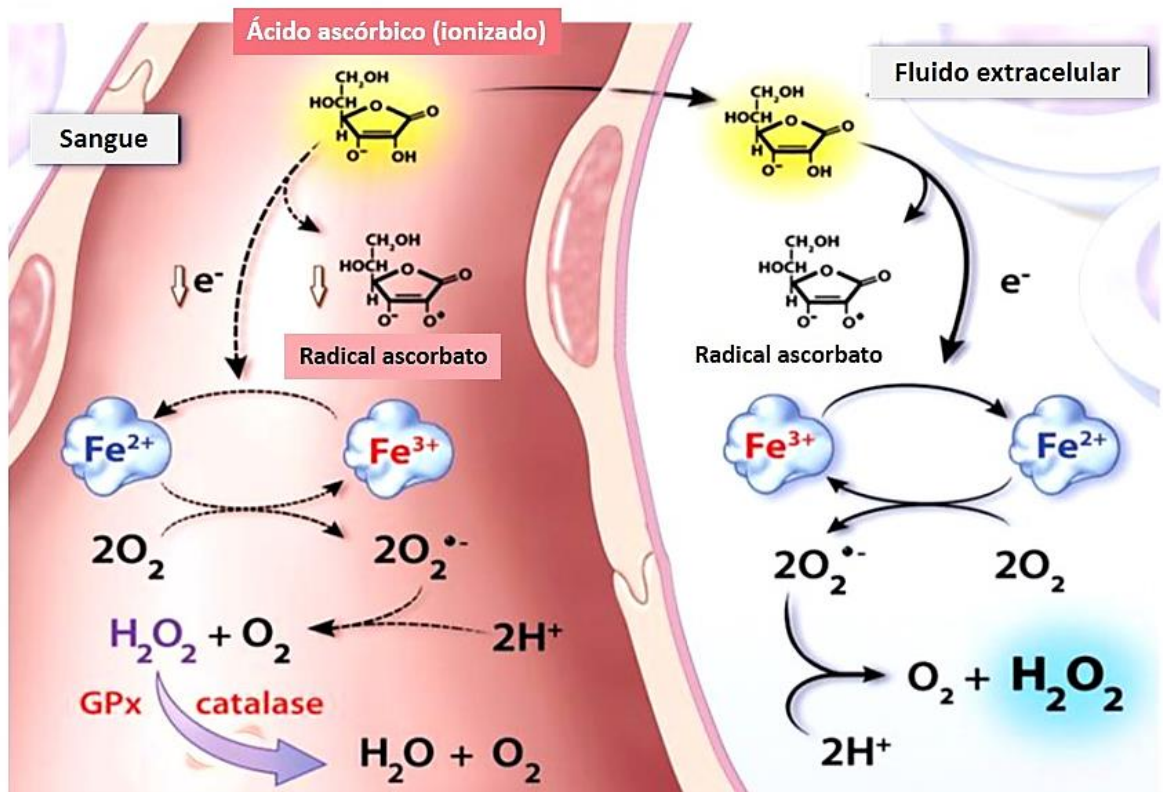
Existem relatos de alterações entre os níveis de oxidação e as defesas antioxidantes em pacientes com sarcomas, nos quais ocorre o aumento de peroxidação lipídica e decréscimo dos níveis de catalase, superóxido dismutase e tióis (NATHAN et al., 2011). A produção excessiva de radicais livres pode acarretar em danos oxidativos, alterações nas bases nitrogenadas ou, ainda, modificações de desoxirribose, podendo gerar danos como apoptose e mutações (MENDONÇA; CARIOCA; MAIA, 2014; BARBOSA et al., 2010).

Os radicais livres ativam o citocromo C o qual ativa a família Bcl-2 (Bid e Bax) e resulta na liberação da proteína carreadora de elétrons citocromo C para o citoplasma e ativação da caspase 9 e conseqüentemente das caspases 3, 6 e 7, promovendo, assim, a apoptose (DELBRIDGE; VALENTE; STRASSER, 2012; DU et al., 2010).

Os radicais livres, principalmente o radical superóxido, são produzidos em maior quantidade em células cancerosas do que em células normais. Este procedimento sugere um mecanismo de defesa do organismo, pois as EROs, como o superóxido, são fontes de peróxido de hidrogênio, que, eventualmente, decompõem-se formando água e oxigênio. O oxigênio, por

sua vez, reduz a neovascularização e a metástase. Deste modo, o câncer é uma condição que é acompanhada por redução de oxigênio intracelular. Portanto, seria eficaz no tratamento do câncer drogas que proporcionem o aumento do peróxido de hidrogênio intracelular e facilitem sua decomposição. Entretanto, o peróxido de hidrogênio pode ser convertido em radical hidroxila por meio da reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{}^\bullet\text{OH}$) (**Figura 5**). Logo, para combater o câncer é necessário um composto que possa produzir “radicais livres que não combatam radicais livres” (ABDOLLAHI; SHETAB-BOUSHEHRI, 2012).

Figura 5. Geração de espécies reativas de oxigênio por meio da reação de Fenton.

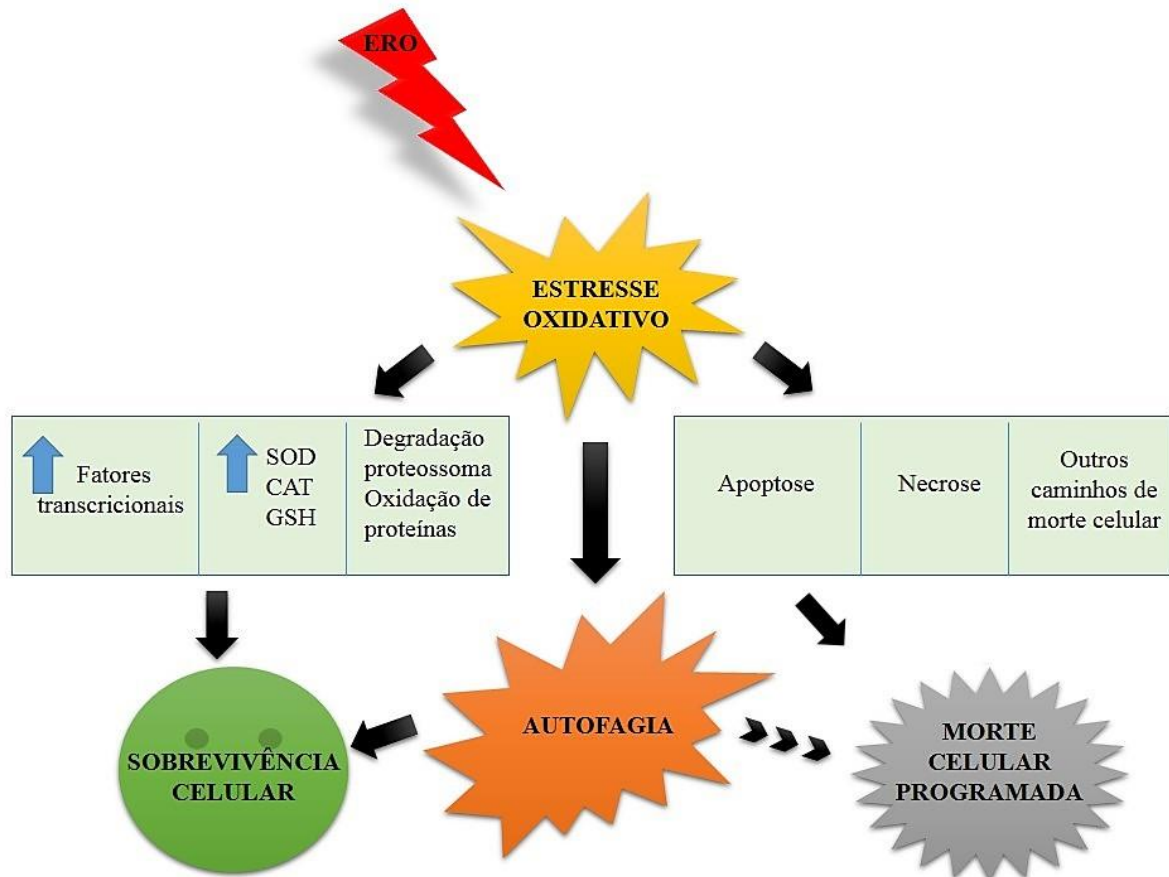


Fonte: Adaptado de Levine et al. (2011).

Como enfatizado, anteriormente, estresse oxidativo induz a acumulação de radicais livres tais como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), H_2O_2 e o radical OH^\bullet que em leveduras ativam fatores transcricionais aumentando a expressão de genes que codificam as enzimas antioxidantes tais como a catalase e a glutatona reduzida (GSH). Estes mecanismos degradam proteossomas e atuam em caminhos citoprotetivos de autofagias, podendo também mediar a morte programada, apoptose e necrose (**Figura 6**). As deleções de enzimas antioxidantes tais como a superóxido dismutase manganês (MnSOD) e cobre-zinco (CuZnSOD) causa aumento de proteínas oxidase que favorecem o uso destas linhagens em estudos de danos oxidativos. Existem evidências de

que as leveduras respondem aos estresses oxidativos usando diferentes estratégias, tais como a detoxificação de ERO, autofagia, degradação e morte celular (FARRUGIA; BALSZAN, 2012).

Figura 6. Mecanismos moleculares em resposta às espécies reativas de oxigênio.



Fonte: Adaptada de Farrugia; Balszan (2012).

Considerando que as EROs são importantes mecanismos de ação dos antineoplásicos, a suplementação de alimentos antioxidantes tem mostrado efeitos protetivos contra o câncer, como relatados em diferentes estudos *in vivo* e *in vitro*. Os conhecimentos sobre espécies reativas de oxigênio e câncer são limitados (SAMOYLENKO et al., 2013).

Os alimentos antioxidantes, entre eles as vitaminas C (ácido ascórbico), carotenoides (vitamina A) e vitamina E (tocoferol), são, segundo o Consenso Nacional de Nutrição ao paciente oncológico, recomendados seguindo doses preconizadas pelo “*Dietary Reference Intake*”. Isso porque são capazes de atrasar ou inibir a oxidação, diminuindo a concentração de radicais livres no organismo e, assim, atuando na prevenção do câncer. Porém, estas substâncias também possuem a capacidade de se transformarem em pró-oxidantes, favorecendo o estresse oxidativo e promovendo até mesmo a carcinogênese (INCA, 2014).

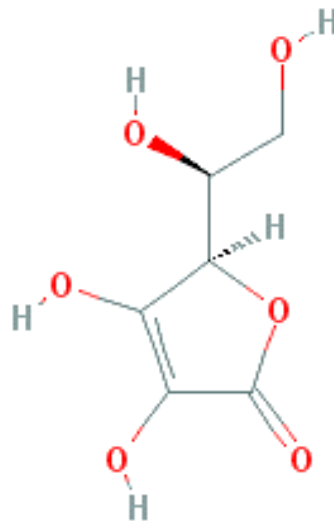
Os antioxidantes biológicos são definidos como substâncias que quando presentes em baixas concentrações, quando comparado com o substrato, previne a oxidação do substrato. Os efeitos dos antioxidantes, tais como vitamina C, tocoferol e carotenoides podem inibir os efeitos de uma variedade de drogas citotóxicas (5-fluorouracil, doxorrubicina e vincristina) em diversas culturas e linhagens celulares (MOSS, 2006; PRASAD; KUMAR, 1999), podendo diminuir os efeitos tóxicos em sistemas celulares (BLOCK; KOCH, 2007) por mecanismos relacionados a ataque e 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 (ação da vitamina C) (CAMERON; PAULING, 1976).

Muitos pacientes em tratamento de câncer utilizam micronutrientes e suplementos de ácido ascórbico para minimizar os efeitos colaterais do tratamento. Além disso, existem muitas concordâncias sobre os efeitos dos antioxidantes em decrescer os efeitos oxidativos das quimioterapias. No entanto, também aumentam as evidências dos benefícios dos antioxidantes em altas concentrações, como pró-oxidantes para os efeitos citotóxicos. Neste sentido, é importante explorar o uso de antioxidantes e de outros micronutrientes suplementares, como estratégia educativa sobre as potencialidades, efeitos benéficos e danos negativos, como os efeitos antagonísticos aos antineoplásicos. Este aspecto será discutido no próximo item.

3.5 O ácido ascórbico e seu efeito na quimioterapia

O ácido ascórbico (AA) (**Figura 7**) tem sido usado na prevenção e tratamento do câncer. E as mitocôndrias podem ter papel principal na progressão tumoral. As mitocôndrias geram ATP, que tem importância para a regulação de apoptose, produção e regulação de espécies reativas de oxigênio. Neste sentido, alto conteúdo de ácido ascórbico pode aumentar a produção de ATP induzindo apoptose em linhagens de células tumorais, por via pró-oxidante; por outro lado, em baixas concentrações, o ácido ascórbico apresenta papel antioxidante podendo prevenir a oxidação, um dos fatores para indução de apoptose (GONZÁLEZ et al., 2010).

Figura 7. Estrutura química do ácido ascórbico.



Fonte: Adaptado de Chen et al. (2007).

O AA é requerido para humanos por ser um co-fator para as enzimas prolina hidroxilase e lisina hidroxilase, que exercem papel para a formação do colágeno, como também para o fator transcricional que regula muitos genes envolvidos no crescimento de tumores e na apoptose. Como antioxidante, protege contra o estresse oxidativo, por sequestro de espécies reativas de oxigênio, apresenta papel na sintase endotelial para o óxido nítrico e na regulação da pressão sanguínea (TRABER; ETEVENS, 2011).

Efeitos farmacológicos do AA no decréscimo da progressão tumoral em modelos clínicos para terapia com gemcitabine foram evidenciados em biópsias de pacientes com adenocarcinomas (WELSH et al., 2013). Existem relatos dos efeitos do AA no decréscimo da toxicidade neurológica, de medula óssea, hepática, pancreática, renal, genitália, bem como adjuvante na quimioterapia (CARR; VISSERS, 2013; WELSH et al., 2013; ICHIM et al., 2011).

O AA é geralmente usado durante a quimioterapia por aumentar imunidade, especialmente por suplementação durante o tratamento com tamoxifeno, que induz efeitos citotóxicos, apoptose por ativação de pro-caspases, e citostático em pacientes com câncer de mama. Estudo *in vitro*, de células humanas de câncer de mama MCF-7 em exposição ao AA, relevaram atenuação do antineoplásico podendo afetar a resposta terapêutica (SUBRAMANI et al., 2014).

Estudos anteriores em células tumorais oriundas de linfomas também apontam para a hipótese de que o AA antagoniza os efeitos das espécies reativas de oxigênio geradas pelas

drogas antineoplásicas, por diminuir a apoptose induzida por estas drogas por mecanismos associados à despolarização de membranas mitocondriais (HEANEY et al., 2008).

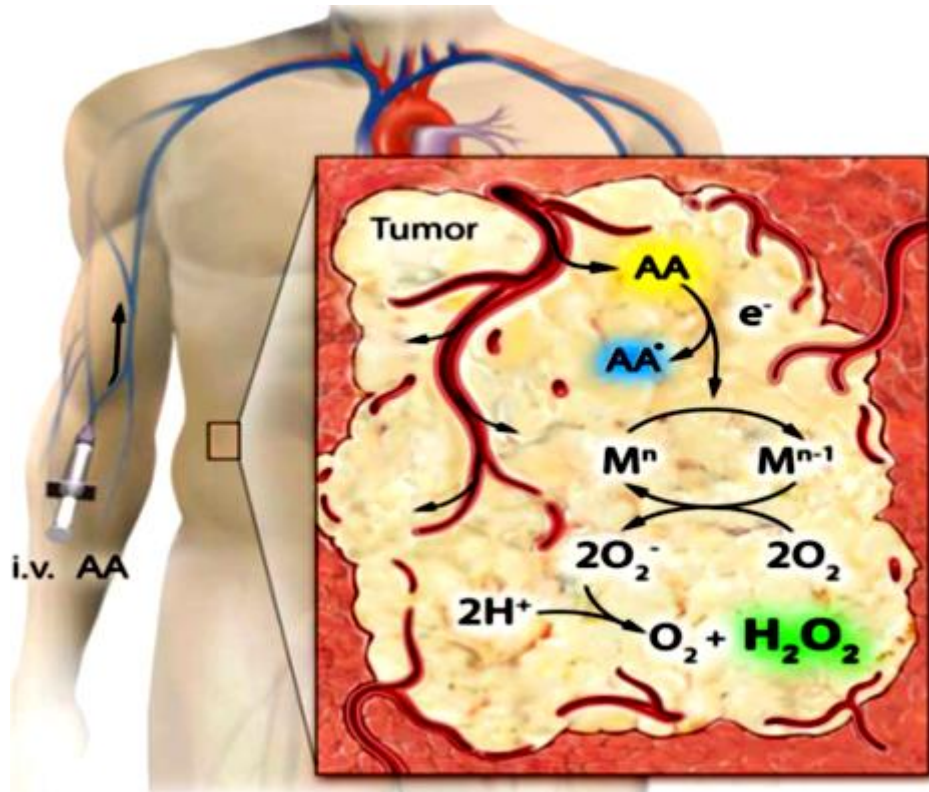
Como discutido anteriormente, o AA, como antioxidante, em baixas concentrações, pode inibir os efeitos dos antineoplásicos. O AA é um nutriente essencial como um antioxidante, mas também pode gerar peróxido de hidrogênio de forma dose dependente (< 4 mM) de citotoxicidade em uma variedade de células em estudos *in vitro*, sem causar danos em células normais. Em camundongos, uma única dose de ascorbato produz peróxido de hidrogênio, podendo ser usado em tumores agressivos e de péssimo prognóstico (CHEN et al., 2008; CHEN et al., 2007).

Entretanto, estudos recentes apontam que em linhagens celulares de câncer de mama de humanos, tratadas com mitoxantrone, indicam que o AA combinado com este antineoplásico pode apresentar algum grau de atividade antineoplásica, influenciando na apoptose, ciclo celular e na sinalização celular, aumentando a citotoxicidade do antineoplásico (GUERREIRO et al., 2014) pela formação de peróxido de hidrogênio, especialmente quando injetado por via intravenosa (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012; DU et al., 2010).

Estudos farmacocinéticos do ácido ascórbico em altas doses por via intravenosa em pacientes em monoterapia de tumores sólidos, com administração de 1g/L intravenosa de 4 em 4 horas durante 4 semanas, indicam ação anticâncer do AA (STEPHENSON et al., 2013; HEAD, 1998). As altas doses do AA despolarizam o potencial de membrana das mitocôndrias e libera o citocromo c para o citosol e promove a apoptose (KIM et al., 2010; LEE et al., 2008).

Os efeitos pró-droga do AA foram discutidos em relação a sua distribuição do sangue para o tumor, quando administrado por via intravenosa. O ascorbato é oxidado e libera o radical $A^{\cdot-}$, catalisado por uma metaloproteína, que doa elétron para formar o radical superóxido e peróxido de hidrogênio (**Figura 8**) (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012; NIEDZWIECKI et al., 2010; CHEN et al., 2008).

Figura 8. Mecanismo de ação do ácido ascórbico, como uma pró-droga antineoplásica.



Fonte: Adaptado de Chen et al. (2008).

As concentrações de AA no plasma e nos tecidos podem ser controladas por absorção, acumulação nos tecidos e reabsorção renal. No plasma, não pode exceder a 100 mmol/L, pois pode apresentar ação pró-droga e formar peróxido de hidrogênio. Há relatos de que altas doses de AA (1 mM) aumenta a apoptose de células de Sarcoma 180 em camundongos, em co-tratamento com paclitaxel, melhorando os efeitos do antineoplásico (PARK et al., 2012).

O AA exibe significantes atividades anticâncer em doses elevadas, e pode ser usado sozinho ou em combinação com outras drogas, com mínimos efeitos em células normais. Nas concentrações de 0,5 a 5 mM causa completa perda de viabilidade celular em linhagens celulares NSCLC de câncer de pulmão; e em tratamentos combinados, apresenta efeitos sinérgicos para apoptose (VUYURI et al., 2013), como também em melanomas B16FO e câncer de mama 4T1 em camundongos (CHA et al., 2013).

3.6 Danos citogenéticos e seus biomarcadores

A ação mutagênica é importante para avaliação de compostos, incluindo substâncias e candidatos a fármaco, pois mutágenos são capazes de provocar alterações no material genético e as mutações são as bases para a carcinogênese. Os efeitos de alguns mutágenos podem ser modulados por substâncias antimutagênicas. Assim, as pesquisas em modelos animais são

necessárias para os estudos de mutagenicidade e de antimutagenicidade (SŁOCZYŃSKA et al., 2014).

As maiores fontes e tipos de danos ao DNA como também os mecanismos de reparo estão associados com o envelhecimento, podendo levar à disfunção celular. Danos ao DNA (genotoxicidade) e mutações (mutagenicidade) vão se acumulando nos tecidos com a idade, sugerindo que o elevado nível de danos ao DNA pode acelerar o declínio fisiológico e proporcionar o aparecimento de doenças não limitadas ao câncer (FREITAS; MAGALHÃES, 2011).

O termo apoptose e morte celular foram empregados para explicar a morte celular programada, os dois termos são frequentemente utilizados como sinônimos. Apoptose é um mecanismo que pode ser induzido por uma miríade de estímulos externos que não monitora os processos de desenvolvimento. A divisão e a morte celular são rigorosamente controladas para conservar a homeostase dos tecidos multicelulares. Os corpos apoptóticos, eventualmente, são reconhecidos e eliminados por fagocitose, por macrófagos ou outras células vizinhas (MORIWAKI; CHAN, 2013).

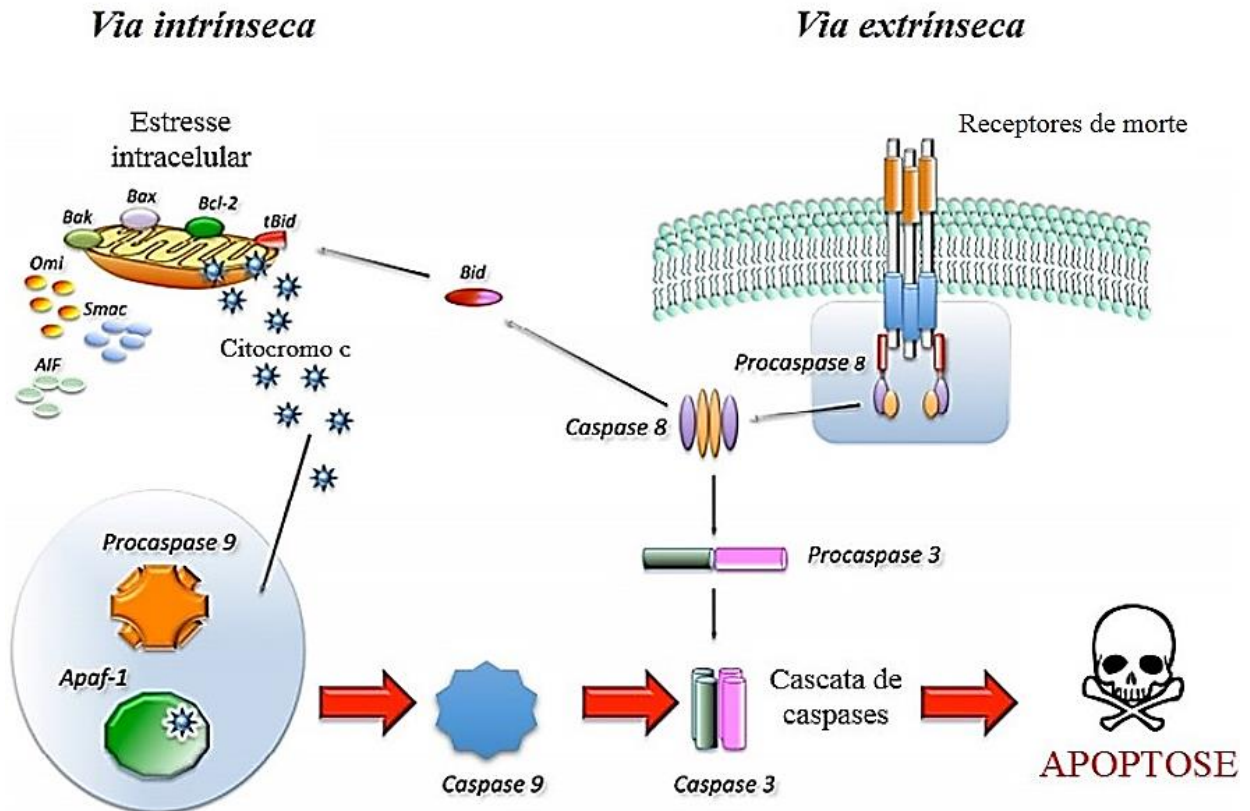
Bioquimicamente, a apoptose é acompanhada por acontecimentos tais como a externalização de fosfatidilserina no folheto exterior da membrana plasmática, o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial com subsequente liberação de proteínas que residem normalmente no espaço intermembranar, e ativação de uma família de proteases de cisteína denominadas caspases (GUICCIARDI et al., 2013).

Defeitos para o mecanismo de apoptose imortalizam células epiteliais, aumentam a tumorigênese e suscitam autofagia, que age como amortecedor do estresse metabólico e promove necrose *in vivo* e *in vitro*. A necrose é associada com inflamação e é um indicativo de um fenótipo agressivo do tumor (HIRAOKA, 2010). Assim, a autofagia pode funcionar na supressão do tumor. A necrose resulta em lise celular e está associada com prognósticos ruins. A autofagia promove sobrevivência celular em tumores sólidos e pode coordenar a inativação da apoptose e promover necrose (MOQUIN; CHAN, 2010; KURT et al., 2006).

Diferentes caminhos para morte celular têm sido observados (**Figura 9**), dentre eles, a apoptose reconhecida pela fragmentação nuclear, com ativação das caspases e ausência de processo inflamatório; a autofagia caracterizada pela presença de grandes vacúolos que induz uma resposta inflamatória; e a necrose, que não é controlada, caracterizada por rupturas de membranas e também induz uma resposta inflamatória. A apoptose tem papel importante nos processos biológicos, e muitas ainda são as controvérsias que suscitam pesquisas, mas existem relatos de que as espécies reativas de oxigênio exercem papel central nos mecanismos redox envolvidos na sinalização e controle da apoptose no citosol e nas mitocôndrias que liberam o

citocromo c, que são eventos iniciais da apoptose. As enzimas antioxidantes, a exemplo da S-glutationa, exerce um papel no sítio catalítico das cisteínas que podem ativar e inativar as caspases envolvidas na apoptose (SUZANNE; STELLER, 2013).

Figura 9. Mecanismos externos e internos para indução de apoptose.



Fonte: Adaptado de Galluzzi et al. (2008).

Como relatado, a apoptose é um processo que serve como resposta a vários estresses celulares, dentre eles danos ao DNA, que podem ou não estar relacionados à ausência de reparo (NOWSHEEN; YANG, 2012). Além da apoptose e necrose, outros danos citogenéticos (micronúcleos, pontes e brotos) também são de importância para o entendimento dos mecanismos de ação de antineoplásicos. Os micronúcleos (MN) se constituem de uma pequena massa nuclear delimitada por uma membrana e separada do núcleo central, formado por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que não foram incluídos durante a mitose no núcleo principal. A formação do MN ocorre devido a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de fatores ambientais ou de falhas no fuso mitótico (FENECH, 2011; CARRARD et al., 2007; FENECH, 2000).

O teste de micronúcleos é utilizado para detecção da mutagênese do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico. As anormalidades cromossômicas estruturais, tais como

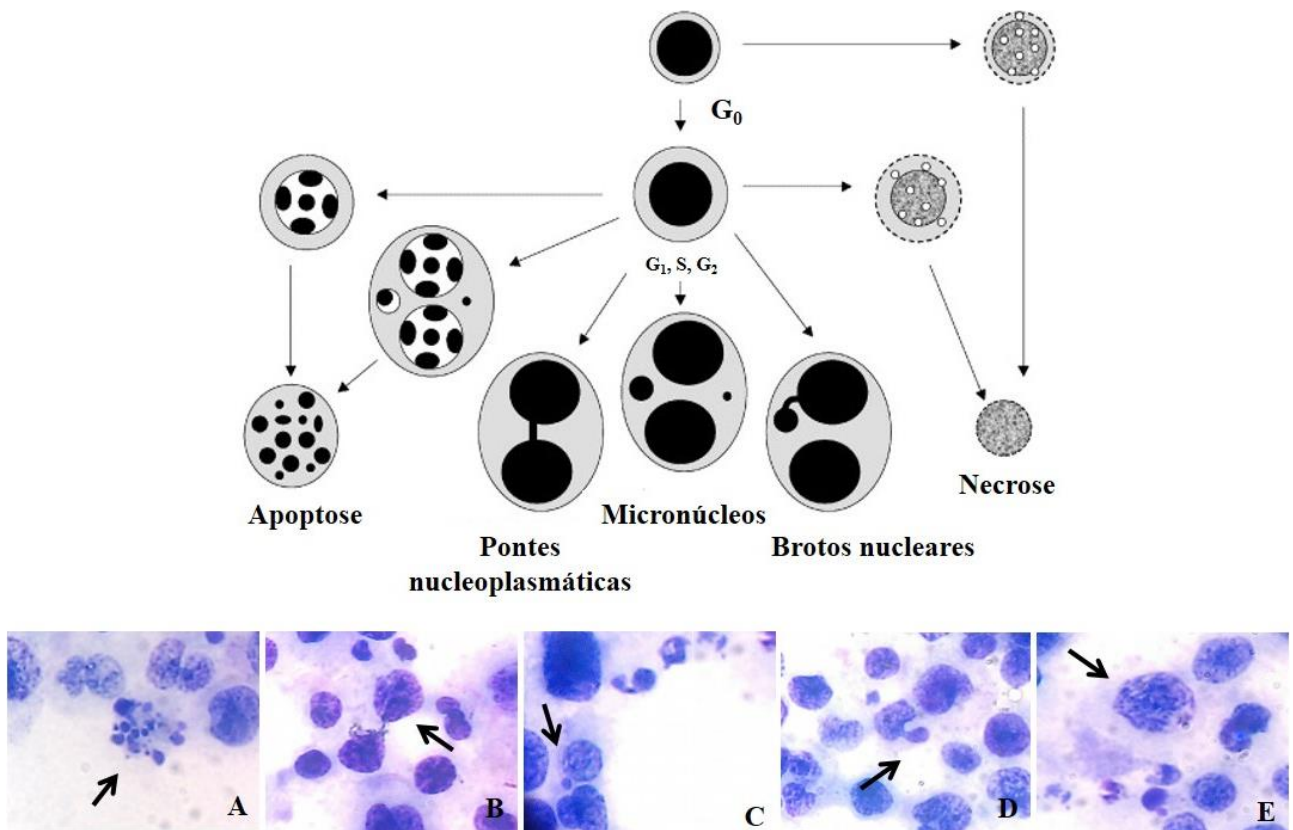
o aumento da quebra de cromossomos ou perda cromossômica estão associadas com um aumento de risco de carcinogênese e na progressão da transformação neoplásica. Detecção de aberrações cromossômicas tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta para indicar danos cancerígenos induzidos ao DNA (HWANG; KIM, 2013).

As estratégias para avaliação de mutágenos pela União Europeia são baseadas em testes *in vivo* e *in vitro*, considerando as variedades de danos genéticos tais como mutações nos genes, danos cromossômicos e aneuploidias (COMBES et al., 2007). Estes testes podem ser feitos em culturas de bactérias e em células de mamíferos, em uma primeira etapa. Posteriormente, os testes *in vivo* em células somáticas devem ser realizados; e depois em células germinativas, quando os resultados forem positivos em etapas anteriores (EASTMOND et al. 2009; VALDIGLESIAS et al. 2010).

Sung et al. (2013) evidenciaram que os micronúcleos são sensíveis indicadores *in vivo* e *in vitro* de dano genético exógeno e endógeno. Eles e outras anomalias nucleares são biomarcadores de eventos genotóxicos e manifestações de instabilidade cromossômica que podem ser vistos em cânceres. A frequência de micronúcleos é muito utilizada em epidemiologia molecular e citogenética para avaliar a presença e a extensão do dano cromossômico em populações humanas expostas a agentes genotóxicos. As aberrações cromossômicas podem ocorrer espontaneamente ou após exposição a agentes genotóxicos, e desempenham um papel importante na patogênese do câncer (CHAKRABORTY et al., 2012).

Outros danos citogenéticos, como as pontes nucleoplasmáticas, podem ser observadas em células binucleadas, isso por causa dos cromossomos dicêntricos, em que os dois centrômeros são puxados para polos opostos durante a anáfase, o que resulta em uma ponte plasmática. Assim, a formação de pontes nucleoplasmáticas fornece um parâmetro de análise de dano cromossômico adicional. Micronúcleos também podem ser formados através de brotamento nuclear na intérfase, quando este processo é incompleto dará origem a brotos nucleares, os quais permanecem presos ao núcleo por uma fina ponte nucleoplasmáticas (FENECH et al., 2011) (**Figura 10**).

Figura 10. Os vários destinos possíveis de células expostas a agentes citotóxicos/genotóxicos.



Legenda: Por meio do ensaio de CBMN é possível avaliar a frequência de apoptoses (A), pontes nucleoplasmáticas (B), micronúcleos (C), brotos nucleares (D) e necroses (E).

Fonte: Adaptado de Fenech; Crott (2002).

Por outro lado, brotos nucleares podem ser formados durante a fase S por DNA amplificado localizado em sítios específicos na periferia do núcleo em células tumorais humanas. Pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares são indicadores promissores no monitoramento do dano genético (FENECH, 2000; SAMPAIO et al., 2012).

3.7 Sarcoma 180 como modelo de estudos farmacológicos

Sarcoma 180 é um tumor originado de camundongos e uma das linhagens de células de maior uso em investigações relacionadas com atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* (FERREIRA et al., 2015; LIMA et al., 2014; XIE et al., 2014). O sarcoma 180, é uma neoplasia pouco diferenciada, descoberta em 1914 no *Godcer Laboratory* (Universidade de Columbia, Nova York). No início foi classificado como carcinoma mamário, a partir de uma massa sólida na região axilar de um camundongo albino. No entanto, após consecutivos transplantes

subcutâneos, foi observado que suas características morfológicas e seu comportamento eram peculiares de um tumor sarcomatoso, sendo então chamado Sarcoma 180 (ITO et al., 1997).

Os sarcomas têm sido tradicionalmente classificados em duas grandes categorias. A primeira são os sarcomas com cariótipo quase diplóide e alterações genéticas simples, incluindo translocações; e a segunda são os tumores com cariótipos complexos e desequilibrados (TAYLOR et al., 2011). Os sarcomas são neoplasias mesenquimais raras originárias em tecidos de suporte, como o neural, cartilaginoso, vascular e tecido adiposo, incluindo também os músculos e os ossos (WICKRAMASINGHE; CLEMENT; SINGH, 2014).

O sarcoma corresponde a cerca de 20% dos cânceres pediátricos, com risco desconhecido. Futuros estudos ainda são necessários para o entendimento dos mecanismos genéticos e influências ambientais (BURNINGHAM et al., 2012).

Modelos com sarcoma são fundamentais para o entendimento da biologia molecular do câncer. Os sarcomas são distinguidos por aberrações moleculares tais como mutações, deleção intergenes, ampliações de genes e translocações (QUESADA; AMATON, 2012). Os sarcomas são um grupo de tumores heterogêneos com diferentes bases genéticas e anomalias citogenéticas e variam de rearranjos genômicos distintos (CONYERS; YOUNG; THOMAS, 2011).

No entanto, um progresso significativo foi feito na classificação, estadiamento e tratamento multimodal destas condições heterogêneas, incluindo: avanços cirúrgicos na preservação funcional, o uso de radioterapia como complemento a outras modalidades, bem como a identificação de terapias sistêmicas ativas para certos subtipos de sarcoma (LIBERAL et al., 2014; OLMOS et al.; 2011).

3.8 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para estudos farmacológicos

Perante o ponto de vista genético e metabólico, é um dos organismos mais usados em testes biológicos. Várias explicações tornam essa levedura um modelo de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo. Seu metabolismo é similar ao dos eucariotos superiores, com mecanismos apropriados de ativação metabólica (citocromo P450) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias (TEIXEIRA; GUARIENT, 2010). A levedura *S. cerevisiae* é um organismo eucarioto abundantemente estudado e considerado igual às células de mamíferos à medida que se refere às macromoléculas, organelas e proteínas com correlação a proteínas humanas, tornando-se um método importante nas pesquisas sobre mutagênese, antimutagênese e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001).

A avaliação da capacidade antioxidante empregando animais de laboratório é, em geral, de difícil execução e necessita de um número elevado de animais para assegurar resultados significativos. Os ensaios realizados com microrganismos são fáceis, rápidos e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas. A avaliação da capacidade antioxidante pode ser realizada pela medida da sobrevivência de células tratadas com o antioxidante e agentes estressores (TEIXEIRA; GUARIENT, 2010).

Os estudos sobre radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Embora existam ensaios químicos relativamente simples para avaliação da capacidade antioxidante, estes não são representativos das condições celulares do homem. E, tendo em vista que antioxidantes assumem papel importante na medicina preventiva, é necessário que as informações sejam obtidas a partir de sistemas biológicos (VIDAL et al., 2010).

Diante do exposto, nos capítulos desta dissertação os danos citogenéticos e oxidativos dos antineoplásicos CPA, DOX e AC em modelos de células tumorais de Sarcoma 180, linfócitos de sangue periférico, bem como em *S. cerevisiae* serão relatados, assim como os efeitos do AA na modulação de danos importantes para a regressão tumoral.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M.; SHETAB-BOUSHEHRI, S. V. Is it right to look for anti-cancer drugs amongst compounds having antioxidant effect. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 61, p. 126-135, 2012.
- ARAÚJO, A.P.S.; GALVÃO, D.C.A. Câncer ósseo: enfoque sobre a biologia do câncer. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 3, p. 359-363, 2010.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse Oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BIANCOTTI, J. C.; NARWANI, K.; BUEHLER, N.; MANDEFRO, B.; GOLAN-LEV, T.; YANUKA, O.; CLARK, A.; HILL, D.; BENVENISTY, N.; LAVON, N. Human embryonic stem cells as models for aneuploid chromosomal syndromes. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 28, n. 9, p. 1530-1540, 2010.
- BLOCK, KI; KOCH, A.C.; MEAD, M.N.; TOTHY, P.K.; NEWMAN, R.A.; GYLLENHAAL, C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. **Cancer Treatment Review**, v. 33, n. 1, p. 407-418, 2007.
- BROWMAN, G. P.; HODSON, D. I.; MACKENZIE, R. J.; BESTIC, N.; ZURAW, L. Choosing a concomitant chemotherapy and radiotherapy regimen for squamous cell head and neck cancer: A systematic review of the published literature with subgroup analysis. **Head & neck**, v. 23, n. 7, p. 579-589, 2001.
- BROWN, G. C.; BORUTAITE, V. Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1777, n. 7-8, p. 877-881, 2008.
- BURNINGHAM, Z.; HASHIBE, M.; SPECTOR, L.; SCHIFFMAN, J.D. The Epidemiology of Sarcoma. **Clinical Sarcoma Research**, v.2, n. 14, p. 113-129, 2012.
- CAMERON, E.; PAULING, L.; LEIBOVITZ, B. Ascorbic acid and cancer: a review. **Cancer Research**, v. 39, p. 663-669, 1979.
- CARR, A.C.; VISSERS, M.C.M. Synthetic or food-derived vitamin c - are they equally bioavailable? **Nutrients**, v. 5, n. 11, p. 4284-4304, 2013.
- CARRARD, V. C.; COSTA, C. H.; FERREIRA, L. A.; LAUXEN, I. S.; RADOS, P.V. Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa. **Revista da Faculdade de Odontologia**, v. 48, n. 1/3, p. 77-81, 2007.
- CHA, J.; ROOMI, W.; IVANOV, V.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. Ascorbate supplementation inhibits growth and metastasis of B16FO melanoma and 4T1 breast cancer cells in vitamin C-deficient mice. **International Journal of Oncology**, v 42, p. 55-64, 2013.
- CHAKRABORTY, S.; STARK, J.M.; SUN, C.L.; MODI, H.; CHEN, W.Y.; O'CONNOR, T.R.; FORMAN, S.J.; BHATIA, S.; BHATIA, R. Chronic myelogenous leukemia stem and

progenitor cells demonstrate chromosomal instability related to repeated breakage-fusion-bridge cycles mediated by increased nonhomologous end joining. **Blood**, v.119, n. 26, p. 6187-6197, 2012.

CHAMBIAL, S.; DWIVEDI, S.; SHUKLA, K.K.; JOHN, P.; SHARMA, P. Vitamin C in disease prevention and cure: an overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 314-328, 2013.

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 Science USA**, v. 104, p. 8749-8754, 2007.

CHEN, Q.; ESPEY, M.G.; SUN, A.Y.; POOPUT, C.; Kirk, K.L.; KRISHNA, M.C. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 105, n. 32, p. 11105-11109, 2008.

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. 2013, p. 934-939, 2013.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free radical biology & medicine**, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.

COMBES, R.; GRINDON, C.; CRONIN, M. T.; ROBERTS, D. W.; GARROD, J. Proposed integrated decision-tree testing strategies for mutagenicity and carcinogenicity in relation to the EU REACH legislation. **Alternatives to laboratory animals**, v. 35, n. 2, p. 267-287, 2007.

CONYERS, R.; YOUNG, S.; THOMAS, D.M. Liposarcoma: molecular genetics and therapeutics. **Sarcoma**, v.1, n. 9, p. 1148-1154, 2011.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular aspects of medicine**, v. 22, n. 4-5, p. 217-246, 2001.

DANTAS, E. L. R.; SÁ, F.H.L.; CARVALHO, S. M. F; ARRUDA, A.P; RIBEIRO, E. M. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 12, n. 5, p. 263-269, 2009.

DE FALCO, M.; DE LUCA, A. Cell cycle as a target of antineoplastic drugs. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 12, p. 1417-1426, 2010.

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

DICKINSON, B. C.; CHANG, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature chemical biology**, v. 7, n. 8, p. 504-511, 2011.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. **Free Radical Research**, v. 46. N. 4, p. 382-398, 2012.

DU, J., CULLEN, J.J.; BUETTNER, G.R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1826, n. 2, p. 443-457, 2012.

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

EASTMOND, D. A.; HARTWIG, A.; ANDERSON, D.; ANWAR, W. A.; CIMINO, M. C.; DOBREV, I.; DOUGLAS, G. R.; NOHMI, T.; PHILLIPS, D. H.; VICKERS, C. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. **Mutagenesis**, v. 24, n. 4, p. 341-349, 2009.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FARRUGIA, G.; BALZAN, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. **Frontiers in oncology**, v. 2, p. 64-76, 2012.

FARSHID, A. A.; TAMADDONFARD, E.; RANJBAR, S. 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, 2013.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 2, n. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation research**, v. 504, n. 1-2, p. 131-136, 2002.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLE, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

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

FIGUEIREDO, N.; CHORA, A.; RAQUEL, H.; PEJANOVIC, N.; PEREIRA, P.; HARTLEBEN, B.; NEVES-COSTA, A.; MOITA, C.; PEDROSO, D.; PINTO, A.; MARQUES, S.; FARIDI, H.; COSTA, P.; GOZZELINO, R.; ZHAO, J. L.; SOARES, M. P.; GAMA-CARVALHO, M.; MARTINEZ, J.; ZHANG, Q.; DORING, G.; GROMPE, M.; SIMAS, J. P.; HUBER, T. B.; BALTIMORE, D.; GUPTA, V.; GREEN, D. R.; FERREIRA, J. A.; MOITA, L. F. Anthracyclines induce DNA damage response-mediated protection against severe sepsis. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 874-884, 2013.

FISHER, B.; BROWN, A. M.; DIMITROV, N. V.; POISSON, R.; REDMOND, C.; MARGOLESE, R. G.; BOWMAN, D.; WOLMARK, N.; WICKERHAM, D. L.; KARDINAL, C. G.; ET AL. Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15. **Journal of clinical oncology**, v. 8, n. 9, p. 1483-1496, 1990.

FORSCHER, C.; MITA, M.; FIGLIN, R. Targeted therapy for sarcomas. **Biologics**, v. 8, p. 91-105, 2014.

FRAPOLLI, R.; TAMBORINI, E.; VIRDIS, E.; BELLO, E.; TARANTINO, E.; MARCHINI, S.; GROSSO F.; SANFILIPPO, R.; GRONCHI, A.; TERCERO, J.C.; D'INCALCI, M. Novel models of myxoid liposarcoma xenografts mimicking the biological and pharmacologic features of human tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 20, p. 4958-4967, 2010.

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.

FREITAS, A. A.; MAGALHÃES, J. P. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. **Mutation Research**, v. 728, n.1-2, p. 12-22, 2011.

FRIIS, L.; VAGHEF, H.; EDLING, C.; HELLMAN, B. No increased DNA damage in peripheral lymphocytes of sewage workers as evaluated by alkaline single cell gel electrophoresis. **Occupational Environmental Medicine**, v. 54, n. 7, p. 494-498, 1997.

FUCHS, R.; ELLINGER, I. Receptor-mediated and fluid-phase transcytosis of horseradish peroxidase across rat hepatocytes. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 6, p. 320-333, 2010.

GALLUZZI, L.; BRENNER, C.; GUIDO, U.; KROEMER, G. Viral control of mitochondrial apoptosis. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 5, p. 18-29, 2008.

GARCÍA-QUIPES, W.; PASTOR, S.; GALOFRÉ, P.; BIARNÉS, J.; CASTELL, J.; VELÁZQUEZ, A. Possible role of the wdr3 gene on genome stability in thyroid cancer patients. **PLoS ONE**, vol. 7, n. 9, p. 288-302, 2012.

GOESSLER, K.F.; RUIZ, R.J.; SIMÃO, A.N.C.; SIQUEIRA, C.P.C.M.; RAMOS, S.P.; POLITO, D.M. Efeito citotóxico provocado por ciclofosfamida na massa corporal e no tecido muscular estriado esquelético de ratos treinados. **Revista de Educação Física/UEM**, v. 22, n. 2, p. 273-281, 2011.

GONENC, A.; HACISEVKI, A.; TAVIL, Y.; CENGEL, A.; TORUN, M. Oxidative stress in patients 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.; ROSARIO-PÉREZ, G.R.; MONTE, C.; RICART, M. Mitochondria, energy and cancer: the relationship with ascorbic acid. **Journal of Orthomolecular Medicine**, v. 25, n. 1, p. 29-38, 2010.

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

- GUERRIERO, E.; SORICE, A.; CAPONE, F.; NAPOLITANO, V.; COLONNA, G.; STORTI, G.; CASTELLO, G.; COSTANTINI, S. Vitamin C effect on mitoxantrone-induced cytotoxicity in human breast cancer cell lines. **PloS ONE**, v. 9, n. 12, p. 115-123, 2014.
- GUICCIARDI, M. E.; MALHI, H.; MOTT, J. L.; GORES, G. J. Apoptosis and necrosis in the liver. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 2, p. 129-138, 2013.
- GUIMARÃES, J.R.Q. **Manual de Oncologia**. 1ed, São Paulo: BBS Editora, 2004.
- GUPTA, S. C.; HEVIA, D.; PATCHVA, S.; PARK, B.; KOH, W.; AGGARWAL, B. B. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 11, p. 1295-1322, 2012.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.
- HANIGAN, M. H.; DELA CRUZ, B. L.; SHORD, S. S.; MEDINA, P. J.; FAZILI, J.; THOMPSON, D. M. Optimizing chemotherapy: concomitant medication lists. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 89, n. 1, p. 114-119, 2011.
- HEAD, K. A. Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. **Alternative medicine review**, v. 3, n. 3, p. 174-186, 1998.
- HEANEY, M. L.; GARDNER, J. R.; KARASAVVAS, N.; GOLDE, D. W.; SCHEINBERG, D. A.; SMITH, E. A.; O'CONNOR, O. A. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. **Cancer research**, v. 68, n. 19, p. 8031-8038, 2008.
- HIRAOKA, N.; INO, Y.; SEKINE, S.; TSUDA, H.; SHIMADA, K.; KOSUGE, T.; ZAVADA, J.; YOSHIDA, M.; YAMADA, K.; KOYAMA, T.; KANAI, Y. Tumour necrosis is a postoperative prognostic marker for pancreatic cancer patients with a high interobserver reproducibility in histological evaluation. **British journal of cancer**, v. 103, n. 7, p. 1057-1065, 2010.
- HWANG, E.S.; KIM, G. H. Safety evaluation of *Chrysanthemum indicum* flower oil by assessing acute oral toxicity, micronucleus abnormalities, and mutagenicity. **Preventive Nutrition and Food Science**. v.18, n. 2, p.111-116, 2013.
- ICHIM, T. E.; MINEV, B.; BRACIAK, T.; LUNA, B.; HUNNINGHAKE, R.; MIKIROVA, N. A.; JACKSON, J. A.; GONZALEZ, M. J.; MIRANDA-MASSARI, J. R.; ALEXANDRESCU, D. T.; DASANU, C. A.; BOGIN, V.; ANCANS, J.; STEVENS, R. B.; MARKOSIAN, B.; KOROPATNICK, J.; CHEN, C. S.; RIORDAN, N. H. Intravenous ascorbic acid to prevent and treat cancer-associated sepsis? **Journal of Translational Medicine**, v. 9, p. 25-38, 2011.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2014**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>. Data de acesso: 13/01/2014. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

INCA. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Situação do câncer no Brasil**. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Data de acesso: 13/01/2014. Rio de Janeiro: INCA; 2013.

ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. **Anticancer Research**, v. 17, n. 9, p. 277-284, 1997.

JOHNKENNEDY, N.; IFEOMA, U.H. Cardioprotective effect of *Gnetum bucholzianum* leaf extract against doxorubicin cardiomyopathy in Wistar rats. **Novel Science**, v. 1, n. 3, p. 61-64, 2012.

JOY, M. S.; LA, M.; WANG, J.; BRIDGES, A. S.; HU, Y.; HOGAN, S. L. Cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide pharmacokinetics in patients with glomerulonephritis secondary to lupus and small vessel vasculitis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 74, n. 3, p. 445-455, 2012.

KAN, S.; CHEUNG, W. M.; ZHOU, Y.; HO, W. S. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by tanshinone IIA in HepG2 human hepatoma cells. **Planta medica**, v. 80, n. 1, p. 70-76, 2014.

KASAPOVIC, J.; PEJIC, S.; STOJILJKOVIC, V.; TODOROVIC, A.; RADOSEVIC-JELIC, L.; SAICIC, Z. S.; PAJOVIC, S. B. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages after chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. **Clinical biochemistry**, v. 43, n. 16-17, p. 1287-1293, 2010.

KIM, S. J.; RIM, K.T.; KANG, M. G.; KIM, J. K.; CHUNG, Y.; H. A Study of micronucleus induction with methyl formate and 2-methylbutane in bone marrow cells of male icr mice. **Safety and Health at Work**, v. 1, n. 1, p. 80-86, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, B.; COTRAN, T. **Pathologic basis of disease**. 7ed. Philadelphia. Elsevier Saunders, 2005.

KURT, D.; MATHEW, R.; BEAUDOIN, B.; KEVIN, B.; ANDERSON, D.; CHEN, G.; MUKHERJEE, G.; CÉLINE, Y.S. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 10, n. 1, p. 51-64, 2006.

LEE, C.; RAFFAGHELLO, L.; BRANDHORST, S.; SAFDIE, F.M.; BIANCHI, G.; MARTIN-MONTALVO, A.; PISTOIA, V.; WEI, M.; HWANG, S.; MERLINO, A.; EMIONITE, L.; DE CABO, R. 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, K. W.; LEE, H. J.; KANG, K. S.; LEE, C. Y. Preventive effects of vitamin C on carcinogenesis. **Lancet**, v. 359, n. 9301, p. 172-184, 2002.

LEE, S.K.; KANG, J.S.; JUNG, J.; HUR, D.Y.; KIM, J.E.; HAHM, E.; BAE, S.; KIM, H.W.; LEE, W.J. Vitamin C suppresses proliferation of the human melanoma cell SK-MEL-2 through the inhibition of cyclooxygenase (COX-2) expression and the modulation of insulin-

like growth factor (IGF-II) production. **Journal of Cell Physiology**, v. 216, n. 3, p. 180-188, 2008.

LEVINE, M.; PADAYATTY, S.J.; ESPEY, M.G. Vitamin C: a concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries. **Advance in Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 78-88, 2011.

LIBERAL, J.M.; BENSON, C.; MESSIOU, C.; FISHER, C.; JUDSON, I. Reversion of hormone treatment resistance with the addition of an mtor inhibitor in endometrial stromal sarcoma. **Case Reports in Medicine**, v. 9, n. 12, p. 34-49, 2014.

LIMA, A.P.; PEREIRA, F.C.; ALMEIDA, M.A.; MELLO, F.M.; PIRES, W.C.; PINTO, T.M.; DELELLA, F.K.; FELISBINO, S.; MORENO, V.; BATISTA, A.A.; SILVEIRA-LACERDA, E. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium(II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 0. 105-125, 2014.

MACDERMED, D. M.; MILLER, L. L.; PEABODY, T. D.; SIMON, M. A.; LUU, H. H.; HAYDON, R. C.; MONTAG, A. G.; UNDEVIA, S. D.; CONNELL, P. P. Primary tumor necrosis predicts distant control in locally advanced soft-tissue sarcomas after preoperative concurrent chemoradiotherapy. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 76, n. 4, p. 1147-1153, 2010.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTII, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MCCUNE, J. S.; SALINGER, D. H.; VICINI, P.; OGLESBY, C.; BLOUGH, D. K.; PARK, J. R. Population pharmacokinetics of cyclophosphamide and metabolites in children with neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. **Journal of clinical pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 88-102, 2009.

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

MINO, C. P.; CUMBAL, N.; SANCHEZ, M. E. Genotoxicity studies performed in the ecuadorian population. **Molecular Biology International**, v. 230, n. 2, p. 1140-1156, 2012.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacology Review**, v. 56, n. 5, p. 185-229, 2004.

MOQUIN, D.; CHAN, F.K. The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. **Trends of Biochemistry Science**, v. 35, n. 8, p. 434-441, 2010.

MORIWAKI, K.; CHAN, F.K.M. RIP3: A molecular switch for necrosis and inflammation. **Genes Development**, v. 56, n. 2, p. 1640-1649, 2013.

MOSS, R.W. Should patients undergoing chemotherapy and radiotherapy be prescribed antioxidants? **Integrative Cancer Therapies**, v. 5, p. 63-82, 2006.

- NATHAN, F.M.; SINGH, V.A.; DHANOA, A.; PALANISAMY, U.D. Oxidative stress and antioxidant status in primary bone and soft tissue sarcoma. **BMC Cancer**, v. 11, n. 382, p. 1124-1137, 2011.
- NIEDZWIECKI, A.; ROOMI, M.W.; KALINOVSKY, T.; RATH, M. Micronutrient synergy - a new tool in effective control of metastasis and other key mechanisms of cancer. **Cancer Metastasis Review**, v. 29, n. 2, p. 529-542, 2010.
- NITISS, J.; WANG, J.C. DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast. **National Academy of Science USA**, v. 85, n. 20, p. 7501-7505, 1988.
- NOWSHEEN, S.; YANG, E.S. The intersection between DNA damage response and cell death pathways. **Experimental Oncology**, 34, n. 3, p. 243-254, 2012.
- OLMOS, D.; MARTINS, A. S.; JONES, R. L.; ALAM, S.; SCURR, M.; JUDSON, I. R. Targeting the insulin-like growth factor 1 receptor in ewing's sarcoma: reality and expectations. **Sarcoma**, v. 11, p. 402-408, 2011.
- PARK, J.H.; DAVIS, K.R.; LEE, G.; JUNG, M.; JUNG, Y.; PARK, J.; YI, S.Y.; LEE, M.A.; LEE, S.; YEOM, C.H. Ascorbic acid alleviates toxicity of paclitaxel without interfering with the anticancer efficacy in mice. **Nutrition Research**. v. 32, n. 4, p. 873-883, 2012.
- PERCHE, F.; TORCHILIN, V. P. Cancer cell spheroids as a model to evaluate chemotherapy protocols. **Cancer biology & therapy**, v. 13, n. 12, p. 1205-1213, 2012.
- PEREGO, P.; JIMENEZ, G.S.; GATTI, L.; HOWELL, S.B.; ZUNINO, F. Yeast mutants as a model system for identification of determinants of chemosensitivity. **Pharmacology Reviews**, v. 52, n. 4, p. 477-492, 2000.
- PRASAD, K.N.; KUMAR A. 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, 1999.
- QUESADA, J.; AMATO, R. The molecular biology of soft-tissue sarcomas and current trends in therapy. **Sarcoma**, v. 12, p. 849-856, 2012.
- RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 14, p. 612-664, 2014.
- REZVANFAR, M.; SADRKHANLOU, R.; AHMADI, A.; SHOJAEI-SADEE, H.; REZVANFAR, M.; MOHAMMADIRAD, A.; SALEHNIA, A.; ABDOLLAHI, M. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. **Human & experimental toxicology**, v. 27, n. 12, p. 901-910, 2008.
- ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. **Cancer letters**, v. 332, n. 2, p. 237-248, 2013.

- SAMOYLENKO, A.; HOSSAIN, J. A.; MENNERICH, D.; KELLOKUMPU, S.; HILTUNEN, J. K.; KIETZMANN, T. Nutritional countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer: from mechanisms to biomarkers and clinical evidence. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 17, p. 2157-2196, 2013.
- SAMPAIO, H.A.C.; OLIVEIRA, N.M.; SABRY, M.O.D.; CARIOCA, A.A.F.; PINHEIRO, L.G.P. Influência do tipo de terapia antineoplásica sobre marcadores antropométricos e dietéticos em mulheres portadoras de câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 2, p. 223-230, 2012.
- SANCHEZ-SUAREZ, P.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; GALLEGOS-HERNANDEZ, F.; PENARROJA-FLORES, R.; TOLEDO-GARCIA, J.; BRAVO, J. L.; DEL CASTILLO, E. R.; BENITEZ-BRIBIESCA, L. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. **Mutation research**, v. 640, n. 1-2, p. 8-15, 2008.
- SASTRE-SERRA, J.; VALLE, A.; COMPANY, M. M.; GARAU, I.; OLIVER, J.; ROCA, P. Estrogen down-regulates uncoupling proteins and increases oxidative stress in breast cancer. **Free radical biology & medicine**, v. 48, n. 4, p. 506-512, 2010.
- SEDELNIKOVA, O.A.; REDON, C.E.; JOHNSTON, W.; BONNER, W. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. **Mutation Research**, v. 704, n. 1-3, p. 152-159, 2010.
- SLOCZYNSKA, K.; POWROZNIK, B.; PEKALA, E.; WASZKIELEWICZ, A. M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal of applied genetics**, v. 55, n. 2, p. 273-285, 2014.
- SPENCE, R.A.J.; JOHNSTON, P.G. **Oncologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- STEPHENSON, C. M.; LEVIN, R. D.; SPECTOR, T.; LIS, C. G. Phase I clinical trial to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of high-dose intravenous ascorbic acid in patients with advanced cancer. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 139-146, 2013.
- SUBRAMANI, T.; YEAP, S. K.; HO, W. Y.; HO, C. L.; OMAR, A. R.; AZIZ, S. A.; RAHMAN, N. M.; ALITHEEN, N. B. 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.
- SUNG, W.K.; ZHENG, H.; LI, S.; CHEN, R.; LIU, X.; LI, Y.; LEE, N.P.; LEE, W.H.; AGGARWAL, A.; HAO, K.; ZHOU, W.; ZHANG, C.; HARDWICK, J.; Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. **Nature Genetics** 44, n. 7, p. 765-769, 2012.
- SUZANNE, M.; STELLER, H. Shaping organisms with apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 20, n. 5, p. 669-675, 2013.
- SWIFT, L. H.; GOLSTEYN, R. M. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 3, p. 3403-3431, 2014.

- TAYLOR, B.S.; BARRETINA, J.; MAKI, R.G.; ANTONESCU, C.R.; SINGER, S.; LADANYI, M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 8, p. 541-557, 2011.
- TEIXEIRA, I.N.A.O.; GUARIENTO, M.E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 6, p. 2845-2857, 2010.
- TRABER, M. G.; STEVENS, J. F. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 5, p. 1000-1013, 2011.
- VALDIGLESIAS, V.; PASARO, E.; MENDEZ, J.; LAFFON, B. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 5, p. 337-351, 2010.
- VIDAL, L. S.; ALVES, A. M.; KUSTER, R. M.; LAGE, C.; LEITÃO, A. C. Genotoxicity and mutagenicity of *Echinodorus macrophyllus* (chapéu-de-couro) extracts. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 549-557, 2010.
- VUYYURI, S. B.; RINKINEN, J.; WORDEN, E.; SHIM, H.; LEE, S.; DAVIS, K. R. Ascorbic acid and a cytostatic inhibitor of glycolysis synergistically induce apoptosis in non-small cell lung cancer cells. **PloS ONE**, v. 8, n. 6, p. 670-681, 2013.
- WANG, Y.; WANG, X.; YU, Z. Vitamin C and E intake and risk of bladder cancer: a meta-analysis 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.; GIBBS, R.A.; CHEN, C. Role of somatic mutations in vascular disease formation. **Expertise Review in Molecular Diagnose**, v. 10, n. 1, p. 173-185, 2010.
- WELSH, J. L.; WAGNER, B. A.; VAN'T ERVE, T. J.; ZEHR, P. S.; BERG, D. J.; HALFDANARSON, T. R.; YEE, N. S.; BODEKER, K. L.; DU, J.; ROBERTS, L. J., 2ND; DRISKO, J.; LEVINE, M.; BUETTNER, G. R.; CULLEN, J. J. Pharmacological ascorbate with gemcitabine for the control of metastatic and node-positive pancreatic cancer (PACMAN): results from a phase I clinical trial. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 71, n. 3, p. 765-775, 2013.
- WICKRAMASINGHE, N. R.; CLEMENT, N.D.; SINGH, A. P. Sarcoma excision and pattern of complicating sensory neuropathy. **Oncology**, v. 12, n. 7, p. 287-296, 2014.
- XIE, Q.J.; CAO, X.L.; BAI, L.; WU, Z.R.; MA, Y.P.; LI, H.Y. Anti-tumor effects and apoptosis induction by Realgar bioleaching solution in Sarcoma-180 cells in vitro and transplanted tumors in mice in vivo. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 6, p. 2883-2898, 2014.

4 CAPÍTULO I: Ácido ascórbico, efeitos antioxidantes e pró-oxidantes: meta-análise de perspectivas para a eficácia na quimioterapia

(Artigo será submetido à *Anticancer Research*)

Qualis B1

Ácido ascórbico, efeitos antioxidantes e pró-oxidantes: meta-análise de perspectivas para a eficácia da quimioterapia

Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar¹, Rai Pablo Lages¹, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata¹ Bernardo José Castro da Silva Vieira¹, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz¹, Rivelilson Mendes de Freitas¹, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina – Brasil.

Sumário

Base do estudo

Ainda existem controvérsias sobre o papel do ácido ascórbico (Vitamina C) durante o tratamento quimioterápico em ensaios clínicos, como também em ensaios não clínicos com modelos tumorais de cânceres humanos. Portanto, é importante entender o limiar do papel oxidante/antioxidante do ácido ascórbico frente às drogas antineoplásicas, como agente de interferência na eficácia do tratamento quimioterápico, como também de sua ação antitumoral.

Objetivo

Avaliar o potencial oxidante do ácido ascórbico como agente antitumoral, bem como seus efeitos antagônicos aos antineoplásicos com base em suas diferentes vias de administração e concentrações.

Métodos

Os artigos científicos foram obtidos das bases de dados *PubMed* e *Web of Knowledge*, com os descritores “*cancer*” combinado com, “*vitamin C*” ou “*ascorbic acid*”. A seleção foi realizada no período de Janeiro a Fevereiro de 2015. Foram encontrados 305 artigos e destes, apenas 23 artigos foram selecionados devido concordâncias com os objetivos do estudo, sendo (16) revisões sistemáticas e (7) artigos de meta-análise, apresentando dados de 18 estudos clínicos e 15 não clínicos. Após plotagem dos dados nos programas estatísticos *SPPS 21* e *Graphpad Prisma 6.0*. Os artigos foram analisados conforme modelo de meta-análise, com intervalo de confiança para 95%.

Resultados

Foram avaliados um total de 33 artigos. Em estudos clínicos randomizados foram apontados 7.781 pacientes relatados em 18 artigos de revisão, com intervalo de 1,20 – 0,44 para o risco relativo, com 95% de confiança e significância para o modelo de meta-análise (0,0154 – 0,0001), em relação à significância para o ácido ascórbico, como pró-oxidantes, com efeitos anti-tumorais, mas em altas concentrações (1 mM – 10 mM) e por via intravenosa. Não foram observadas significâncias em relação às ações antioxidantes frente aos antineoplásicos. Os estudos não clínicos em modelos tumorais (15 artigos) corroboraram com os clínicos. Apenas 04 artigos apontaram os efeitos antioxidantes do AA em baixas concentrações (20 µmol – 2 mM) frente aos antineoplásicos.

Conclusão

Com base nas revisões analisadas o ácido ascórbico é uma droga farmacêutica, em ensaios clínicos, com ação antitumoral, administrado em altas concentrações devido seus efeitos pró-oxidantes, de importância para a regressão tumoral. Estes dados foram também relatados em estudos não clínicos. Entretanto, para o efeito antioxidante do ácido ascórbico a produção científica ainda não tem significância, o que indica a necessidade de novos estudos não clínicos e clínicos.

Summary

Study Base

There is still controversy about the role of ascorbic acid (Vitamin C) during chemotherapy in clinical trials, but also in non-clinical trials with tumor models of human cancers. Therefore, it is important to understand the threshold role of oxidant/antioxidant ascorbic acid in the face of antineoplastic drugs, such interference agent in the effectiveness of chemotherapy, but also on its antitumor action.

Aim

Evaluate the oxidizing potential of ascorbic acid as an antitumor agent, and their antagonistic effects of antineoplastic agents based on their different routes of administration and concentrations.

Methods

The papers were obtained from the databases PubMed and Web of Knowledge, with the key words "cancer" combined with "vitamin C" or "ascorbic acid. The selection was carried out from January to February 2015. We found 305 articles and of these, only 23 articles were selected because of agreements with the objectives of the study: (16) systematic reviews (7) meta-analysis, with data from 18 clinical trials and 15 non-clinical. After plotting the data in the statistical programs SPSS 21.0 and Graphpad Prism 6.0. The articles were analyzed according to meta-analysis model, with a confidence interval to 95%.

Results

We evaluated a total of 33 articles. In randomized clinical trials were scored 7,781 patients reported in 18 review articles, with range from 1.20 to 0.44 for the relative risk with 95% confidence interval and significance to the meta-analysis model (0.0154 to 0,0001) in relation to the significance for ascorbic acid, as pro-oxidants, anti-tumor effects, but at higher concentrations (1 mM-10 mM) intravenously. There were no significance in relation to the antioxidant action in the face antineoplastic. Non-clinical studies in tumor models (15 articles) corroborated with clinical, only 04 articles showed the AA antioxidant effects at low concentrations (20 μ mol - 2 mM) compared to antineoplastic.

Conclusion

Based on the review analyzed ascorbic acid is a pharmaceutical drug in clinical trials with anti-tumor action, administered in high concentrations because of their pro-oxidant effects of importance for tumor regression. These data have also been reported in non-clinical studies. However, for the antioxidant effect of ascorbic acid scientific production has no significance, which indicates the need for new non-clinical and clinical studies.

4.1 Introdução

O papel do ácido ascórbico (vitamina C) no tratamento do câncer ainda permanece controverso e isto é de certa forma devido à falta de reprodutibilidade de estudos clínicos que sugerem efeitos benéficos em pacientes em regime quimioterápico associado à suplementação por ácido ascórbico. Por outro lado, o ácido ascórbico continua a ser utilizado na terapia do câncer, embora, a influência deste na ação de agentes quimioterapêuticos careça de maiores esclarecimentos (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012; GONZALEZ; RIBOLI, 2010; PADAYATTY et al., 2010; HOHHER et al., 2008).

Alguns antineoplásicos, como por exemplo, ciclofosfamida e doxorrubicina podem levar ao aumento intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) (LUANPITPONG et al., 2012; TSAI-TURTON et al., 2007), que podem ser eliminadas pelo ácido ascórbico. Neste sentido, os mecanismos de ação do ácido ascórbico em células cancerosas, tem sido mais claramente definidos por meio de estudos *in vitro* e *in vivo* (TAKEMURA et al., 2010; PERRONE et al., 2009).

Como potente antioxidante, o ácido ascórbico tem levantado questionamentos e preocupação teórica no tocante à modulação da atividade de drogas antineoplásica cujos mecanismos envolvem o aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) (HEANEY et al., 2008). No entanto, alguns estudos apontam que o ácido ascórbico pode potencializar os efeitos de alguns agentes antineoplásicos, tais como a carboplatina e paclitaxel. A citotoxicidade da carboplatina e paclitaxel potencializada pelo ácido ascórbico pode estar relacionada à produção extracelular de peróxido de hidrogênio (MA et al., 2014).

O ácido ascórbico (AA) e ácido desidroascórbico (DHA) são as principais formas fisiológicas de vitamina C. Enquanto que o AA está presente em concentrações muito mais elevadas no soro, o transporte intracelular está restrito a um número limitado de tecidos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Em contraste, o DHA, a forma oxidada da vitamina C, entra nas células por meio de transporte facilitado através dos transportadores de glicose, principalmente GLUT1, e tem uma distribuição substancialmente mais larga (CYR; DOMANN, 2011).

Após o transporte, o DHA é reduzido para AA e é retido intracelularmente (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012). Este mecanismo conduz a acumulação rápida e durável de altas concentrações de ácido ascórbico intracelular (KUIPER et al., 2010). Na célula, o AA e outros antioxidantes intracelulares, tais como a Glutathione agirão para atenuar os efeitos de EROs, sendo os primeiros antioxidantes consumidos em condições de elevados níveis de EROs (TRABER; STEVENS, 2011).

Além disso, o AA é também um doador de elétrons para oito enzimas diferentes e assim desempenha um papel importante numa grande variedade de processos bioquímicos, incluindo a formação de colágeno, biossíntese da norepinefrina e de transportes mitocondriais (MANDL; SZARKA; BÁNHEGYI, 2009). As mitocôndrias, em particular, geram EROs como subprodutos da respiração, tornando o DNA mitocondrial e as proteínas susceptíveis aos efeitos dos danos oxidativos. Neste contexto, o AA pode, assim, desempenhar um papel importante na proteção das mitocôndrias e produtos de tradução contra a ação de EROs (RAHAL et al., 2014).

Evidências epidemiológicas sugerem que alimentos ricos em vitamina C desempenham um papel protetor contra o desenvolvimento do câncer (GROBER, 2009). As concentrações plasmáticas de AA parecem estar inversamente associadas ao risco de câncer (LEVINE; PADAYATTY; ESPEY, 2011; TAKEMURA et al., 2010); No entanto, em ensaios randomizados de larga escala, comparando a suplementação com antioxidantes (vitaminas A, C, E e β -caroteno) isoladamente e combinados não demonstraram quaisquer efeitos protetores (CARR; VISSERS; COOK, 2014).

O fato de que o ácido ascórbico é necessário para manter a função integral de uma variedade de enzimas tem sugerido que o aumento da ingestão de AA poderia otimizar o metabolismo, bem como prevenir o surgimento de câncer e outras doenças degenerativas relacionadas com geração de radicais livres (VERMA, 2012).

A dieta preventiva do câncer ainda necessita de provas científicas. Vários estudos observacionais tem avaliado as associações entre nutrientes individuais e o risco para o câncer. Entretanto, os resultados são inconsistentes (PARROW; LESHIN; LEVINE, 2013). As evidências de quando o AA como suplementação é eficiente na diminuição da ocorrência ou recorrência de câncer é ainda contraditório (WANG; WANG; YU, 2014).

Neste contexto, com o objetivo de obter uma visão geral acerca do papel do ácido ascórbico no tratamento quimioterápico, foi conduzido uma meta-análise avaliando os efeitos do AA como antioxidante e pró-oxidante no tratamento do câncer com antineoplásicos.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Estratégia da pesquisa

Os estudos foram identificados por meio de pesquisa bibliográfica na base de dados *PubMed* e *Web of Knowledge*, bem como pela busca na lista de referências dos artigos selecionados no período de Janeiro a Fevereiro de 2015. Foram utilizados os seguintes termos de pesquisa: “*cancer*” combinado com, “*vitamin C*” ou “*ascorbic acid*”. Os estudos que continham no título ou nas palavras-chave os termos descritos acima foram apreciados.

4.2.2 Seleção dos estudos

Como critérios de inclusão, os estudos tiveram que obedecer às seguintes características: (1) ser de revisão sistemática ou meta-análise (2) a ingestão de vitamina C ou ácido ascórbico como variável de interesse; (3) o câncer também como variável de interesse; (4) apresentar o risco relativo (RR) ou *odds ratio* (OR) com um intervalo de confiança (IC), ou dados suficientes para calculá-los.

Além disso, também foram utilizados os seguintes critérios de exclusão: (1) o RR ou OR com IC de 95% não serem apresentados ou mesmo os dados para calculá-los; (2) ser estudo experimental, prospectivo ou caso controle; e (3) publicações repetidas.

4.2.3 Extração de dados

Os dados de cada estudo que preencheram os critérios de inclusão foram extraídos quanto ao: sobrenome do primeiro autor, ano de publicação, desenho do estudo, quantidade de participantes do estudo, classificação e o estágio do câncer abordado no estudo, esquema de tratamento do câncer, a dose do ácido ascórbico ou vitamina C utilizado e o RR (IC 95%) para cada tipo de estudo.

4.2.4 Cálculo do risco relativo com intervalo de confiança de 95%

O risco relativo também chamado de razão de incidências ou razão de risco, expressa uma comparação matemática da probabilidade do risco de um evento ocorrer entre grupos teste e controles a um determinado fator em estudo. O cálculo é feito a partir da divisão do risco no grupo de expostos pelo risco do grupo de não expostos, utilizando a seguinte fórmula:

$$RR = \frac{a / (a + b)}{c / (c + d)}$$

onde, “a” representa o número de casos no grupo teste com resultado positivo, “b” representa o número de casos no grupo teste com resultado negativo, “c” representa o número de casos no grupo controle com resultado positivo e “d” representa o número de casos no grupo controle com resultado negativo.

4.2.5 Análise estatística

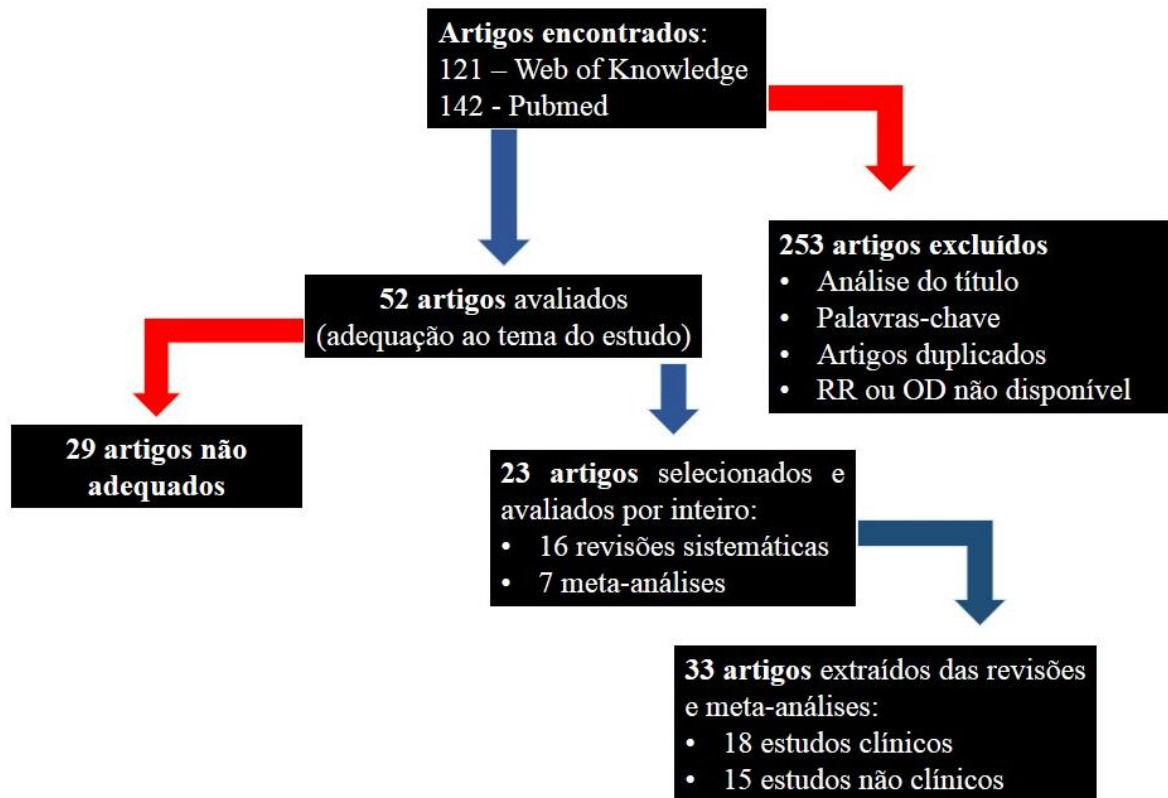
A estatística para associações entre o ácido ascórbico e seus efeitos pró-oxidantes, como também com os efeitos antioxidantes para a terapia do câncer foi realizada com base na heterogeneidade de dados publicados em artigos de revisão, com ênfase para estudos clínicos e não clínicos. A estimativa de significância dos RR foi de 95 %. Para tanto os dados foram agrupados nos Programas Estatísticos SPSS 21.0 e *GraphPad* Prima 6.0. Os dados foram agrupados em *forest plot*.

4.3 Resultados

A estratégia de pesquisa identificou 305 publicações, 121 provenientes da base de dados *Web of Knowledge* e 142 provenientes do *Pubmed*. Duzentos e cinquenta e três artigos foram excluídos por análise do título e palavras-chave que não continham a combinação dos descritores, bem como ausência de dados quanto ao risco relativo e/ou *odds ratio* ou mesmo os dados para calculá-los; Cinquenta e dois artigos foram avaliados por inteiro. Destes, 23 artigos foram selecionados (16 revisões sistemáticas e 7 meta-análise), reportando 33 estudos (18 estudos clínicos e 15 não clínicos). 6 artigos foram selecionados por meio das listas de

referências analisadas nos artigos de revisão. Os passos detalhados da pesquisa estão apresentados na **Figura 1**.

Figura 1. Fluxograma da avaliação, exclusão e análise das publicações sobre os efeitos do ácido ascórbico, como pró-oxidante e/ou antioxidante frente aos antineoplásicos.



Fonte: Pesquisa direta.

4.3.1 Análise da associação do ácido ascórbico como agente antitumoral

A meta análise foi realizada com base científica de 33 artigos. Dezoito estudos clínicos foram avaliados nesta meta-análise para associação entre AA e atividade antitumoral. Em 11 estudos clínicos foram evidenciados associação direta entre o uso do ácido ascórbico (1 – 15 g/L intravenosa), e os efeitos antitumorais em pacientes com diferentes tipos de cânceres, em diferentes estágios, com uso de AA, seguido dos fatores de riscos relativos (RR). Os anos de estudo estão no intervalo de tempo de 1985 – 2013, devido à exclusão de artigos não relacionados ao objeto do presente estudo. Os estudos clínicos estão mais relacionados aos cânceres de pulmão e de mama, com uso de AA nas doses de 1 – 15 g/L. Cabe enfatizar que os dados plotados na **Tabela 1** apresentam fatores de riscos próximo de +1, indicando associação significativa.

Tabela 1. Características dos estudos abordando o ácido ascórbico como agente antitumoral, administrado de forma concomitante aos antineoplásicos.

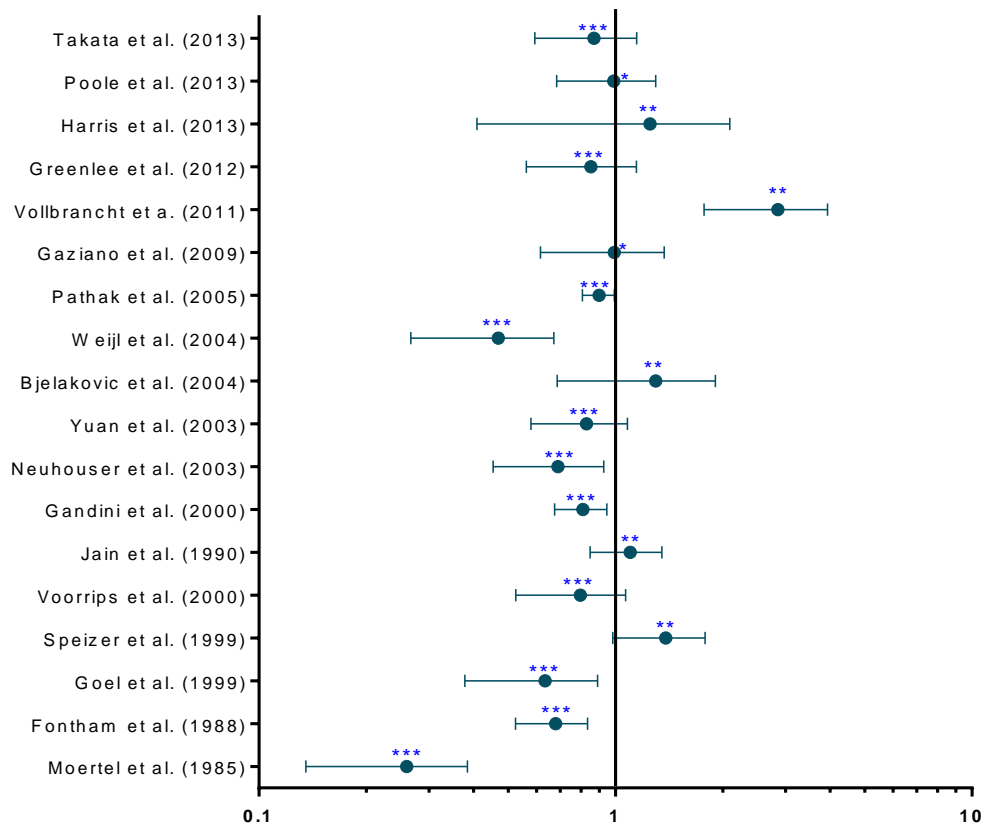
Estudo, ano	Pacientes	Tipo de câncer	Estágio	Uso de AA	RR (IC=95%)
Takata et al. (2013)	359	Pulmão	Diferentes estágios	NR	0.84 (0.61-1.16)
Poole et al. (2013)	272	Mama	I-IV	NR	0.81 (0.72-0.92)
Greenlee et al. (2012)	2264	Mama	II-III	NR	0.73 (0.55-0.97)
Pathak et al. (2005)	136	Pulmão	III-IV	6.1 g	0.90 (0.80-0.97)
Weijil et al. (2004)	48	Testicular, Osteosarcoma, Melanoma	NR	1 g	0.44 (0.28-0.68)
Voorips et al (2000)	939	Pulmão	NR	NR	0.77 (0.54–1.08)
Neuhouser et al. (2003)	742	Pulmão	Diferentes estágios	NR	0.66 (0.47–0.94)
Gandini et al. (2000)	1638	Mama	NR	15 g	0.80 (0.68-0.95)
Fontham et al. (1988)	1253	Pulmão	NR	NR	0.65 (0.50-0.87)
Goel et al. (1999)	30	Mama	III-IV	10 g	0.60 (0.39-0.90)
Moertel et al. (1985)	100	Mama	IV	10 g	0.24 (0.14-0.39)

Legenda: NR: não relatado.

Fonte: Pesquisa direta.

O *forest plot* (**Figura 2**) sumariza os estudos dos artigos de revisão, no que se refere a associação do papel pró-oxidante do ácido ascórbico e os seus efeitos antitumorais em estudos clínicos, em altas concentrações. O ácido ascórbico exibe significantes atividades antitumoral em estudos clínicos em doses farmacológicas, e pode ser usado sozinho e em combinação com outras drogas antineoplásicas, com mínimos efeitos em células normais. Apenas 2 estudos apontaram ausência de associação (RR=1,20; IC 95%= 0,74-1,95), observados nos pontos que estão sobre a reta. Em 5 estudos clínicos, não houve dados significantes (pontos que estão a direita da reta), para os efeitos do ácido ascórbico e atividade antitumoral (RR= 0,77, IC 95%= 0,54-1,08). Entretanto, a meta-análise em foco indica que ácido ascórbico apresenta significativa (RR= 0.82, IC95%= 0.66 – 1.31) associação com efeitos antitumorais, em alta concentração plasmática, para a maioria dos estudos clínicos analisados (11 artigos). Não foram observadas significância em estudos clínicos para a associação entre ácido ascórbico e efeitos antioxidantes frente aos danos induzidos pelos antineoplásicos.

Figura 2. *Forest plot* da associação entre as doses do ácido ascórbico e seu efeito antitumoral, em estudos clínicos realizados entre 1985 – 2013.



Legenda: *ausência de associação; **sem significância de resultados; ***associação com efeitos antitumorais.

Fonte: Pesquisa direta.

Na **Tabela 2** estão sumarizados os principais antineoplásicos relacionados com a administração do ácido ascórbico, como antioxidantes e como pró-oxidante, de estudos clínicos e não clínicos. É importante ressaltar que para as atividades antioxidantes do AA os estudos foram em sua maioria para ensaios não clínicos. A ciclofosfamida, o paclitaxel e irinotecano foram os antineoplásicos com percentuais acima de 90% de concordâncias para os autores apresentados na **Figura 2**.

Tabela 2. Principais drogas antineoplásicas, citadas em 33 artigos de revisão de estudos clínicos e não clínicos, que relataram sobre a importância do AA, como modulador de antineoplásicos (antioxidantes) e como agente antitumoral (pró-oxidantes).

Atividades	Antineoplásico e interações	Dose	% Cumulativo
Antioxidante	Cisplatina	75mg/m ²	32,1
	Paclitaxel	220 mg/m ²	35,7
	Vinorelbina	25 mg/m ²	39,2
	Busulfan	2 mg/m ²	42,9
	Ciclofosfamida	600 mg/m ²	46,4
	Doxorrubicina e 5-FU	2 mg/m ² /2002 mg/m ²	50,0
	Adriamicina	2 a 12 uM	53,6
	Vincristina, Doxorrubicina, MTX e Cisplatina	500 nM/L; 600 nM/L;100 uM; 200 uM	71,4
Pró-oxidante	Cisplatina	75 mg/m ²	65,0
	Ciclofosfamida	600 mg/m ²	66,3
	Doxorrubicina	75 mg/m ²	67,6
	Doxorrubicina, Taxol e 5-FU	0.2 uM; 10 uM	70,8
	Cisplatina e 5-FU	1 a 50 uM; 1 a 1000 uM	71,0
	Irinotecano	7.5 a 60 uM	95,0
	Paclitaxel	0 a 89 uM	92,5
	Ciclofosfamida	200 mg/Kg	95,0

Fonte: Pesquisa direta.

Em relação às doses do ácido ascórbico para os efeitos antitumorais observados e plotados em *forest plot* (**Figura 2**), os dados estão sumarizados na **Tabela 3**, indicando que para a maioria dos estudos clínicos e não clínicos as doses são baixas e são administradas, especialmente por via oral, para suas atividades antioxidantes frente aos antineoplásicos. Como pró-oxidantes, as doses são altas, com administrações intravenosas para a maioria dos relatos dos autores citados na **Figura 2** (estudos clínicos) e na **Figura 3** (não clínicos). Enquanto, que para a ação antioxidante, os autores estão mencionados na **Figura 4**.

Retornando aos dados da **Tabela 3**, concordâncias com percentuais de 100% entre autores foram observadas para o uso antioxidante entre 50 – 600 mg/dia e de 0,1 – 15 g, por administração oral. Mas também foi observada concordância em 100% para a dose de 0,1 – 100

μmol. Estes dados são de estudos clínicos que não apresentaram significância, devido o pequeno número de artigos que relatavam efeitos antioxidantes do AA na modulação de drogas antineoplásicas.

Tabela 3. Principais doses do ácido ascórbico citadas em 33 artigos de revisão que relataram sobre a importância do AA, como modulador e como agente antitumoral.

Atividades	Dose	Administração	% Cumulativo
Antioxidante	0,1-100 μmol	Oral	100
	50-300 mg/dia	Oral	70,0
	7,5- 15 g	Infusão	100
	01-10 g	Oral	36,0
	600 mg/dia	Oral	28,6
Pró-oxidante	0,1 mM	Intravenosa	100
	1 g – 15 g	Intravenosa	65,25
	50 – 100 g	Infusão	76,3
	15- 125 g	Infusão	77,5
	60 g	Parental	37,5
	40 mg/Kg	Oral	51,3

Fonte: Pesquisa direta.

Na **Tabela 4** estão sumarizados os vários mecanismos de ação antioxidante e pró-oxidante do AA em estudos clínicos (18 artigos) e não clínicos (15 artigos). Os percentuais para os mecanismos antioxidantes foram acima de 80% de relatos similares para ambos os tipos de estudo. Dentre eles, a diminuição de radicais livres com consequente redução da citotoxicidade dos antineoplásicos, com concordâncias de até 100%.

Como apresentado na **Figura 2**, para a maioria dos artigos clínicos foi identificada fortes correlações para a associação entre ácido ascórbico e atividade tumoral, por diversos mecanismos moleculares, com percentuais cumulativos de 100 %, especialmente para a geração de citotoxicidade, por indução de radicais livres, com alterações mitocondriais, por inibição de proteossoma, por geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e por aumentar sensibilidade celular. Os mecanismos que envolvem alteração de membrana mitocondrial, maior produção de ERO, bem como para a produção de ATP, foram relatados nos artigos citados e discutidos nas revisões com 100% de percentual cumulativo como mecanismos de ação pró-oxidante.

Outros mecanismos de ação pró-oxidante do AA também podem ser relacionados, como a produção H₂O₂, com percentuais cumulativos acima de 60% em relação aos autores citados nas revisões em análise. Dentre os principais mecanismos de ação do AA, como antioxidante com efeitos sobre os antineoplásicos, indicam suas ações na diminuição dos radicais livres,

redução de toxicidade e citotoxicidade, principalmente por programação da morte celular (Tabela 4).

Tabela 4. Mecanismos moleculares propostos para as atividades antioxidantes/oxidantes do ácido ascórbico apontados em periódicos científicos, citados em 33 artigos, que relataram sobre a importância do ácido ascórbico, como modulador de drogas antineoplásicas e como agente antitumoral em modelos clínicos e não clínicos.

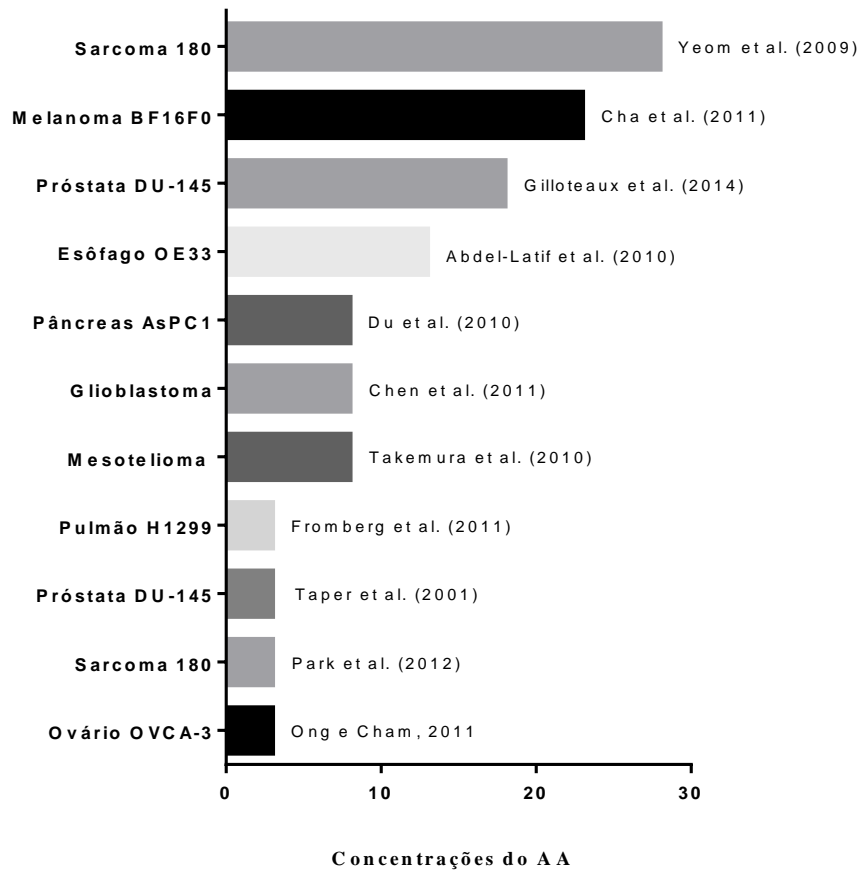
Atividades	Mecanismos moleculares	% Cumulativo
Antioxidante	Diminuição de radicais livres	100,0
	Redução da toxicidade do antineoplásico	79,2
	Diminuição da intensidade de neutropenia	83,3
	Regeneração dos níveis de Glutathione	87,5
	Capacidade antioxidante na mucosa e nervos	91,0
	Diminuição da citotoxicidade do antineoplásico	100
Pró-oxidante	Citotoxicidade específica, sobrevida do paciente.	15,3
	Citotoxicidade por geração de ERO	100
	Citólise e alteração mitocondrial das células neoplásicas	100
	Citotoxicidade por gerar radicais e redução tumoral	37,0
	Geração de H ₂ O ₂ extracelular que reagem com metais	100
	Aumento de H ₂ O ₂ e diminuição de níveis de thiol celular	61,1
	Efeitos sinérgicos com antineoplásicos	54,8
	Aumento de H ₂ O ₂ e alteração de membrana mitocondrial	65,0
	Redução de angiogênese inibindo o crescimento tumoral	66,7
	Citotoxicidade e atividade inibidora do proteossoma	72,2
	Estresse oxidativo independente da via GSH	77,7
	Redução dos níveis de Glutathione e LDH	80,0
	Citotoxicidade pelo aumento de H ₂ O ₂	100,0
	Citotoxicidade por H ₂ O ₂ e diminuição de IL-6	91,0
	Mantém citotoxicidade de células NK	98,0
	Induz apoptose via caspase-8	93,1
	Inibição de mediador de apoptose FAZ	95,0
Aumenta sensibilidade celular	100,0	

Fonte: Pesquisa direta.

Os estudos não clínicos que apontam ação pró-oxidante para o AA, em sua maioria são feitos em Sarcoma 180, e em diversos modelos de tumores sólidos. Cabe enfatizar que neste estudo foi utilizado AA em altas concentrações a exemplo destes efeitos em estudos clínicos (Figura 3). Em Sarcomas, foi observado variação de doses com limite inferior de 1,6 mM a 30 mg/Kg. Os artigos científicos relatam doses similares para modelos de estudos diferentes, a exemplo dos estudos com glioblastoma, pâncreas e mesotelioma, com doses intermediárias em

relação aos estudos com Sarcoma 180. Pequenas doses com ação antitumoral foram observadas em diversos modelos de estudo (Sarcoma 180, Ovário, Próstata e Pulmão).

Figura 3. Modelos não clínicos que foram indicados por autores citados nas revisões analisadas, para atividades pró-oxidantes do AA.

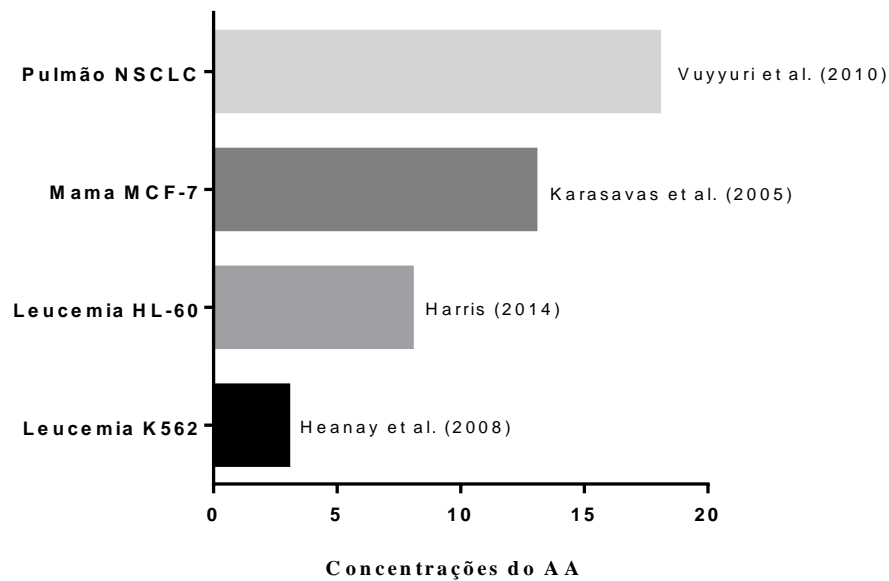


Legenda: os valores das concentrações do AA estão organizados pelos seguintes intervalos - **1 – 5:** 1 a 5 mM; **6 – 10:** 10 mM; **11 – 15:** 20 mM; **16 – 20:** 50 mM; **21 – 25:** 500 mM. **26 – 30:** 30 mg/kg.

Fonte: Pesquisa direta.

Na **Figura 4** estão apresentados em estudos não clínicos, os principais modelos de tumores evidenciados em 33 artigos que apontam para a ação antioxidante do AA diante dos danos oxidativos dos antineoplásicos (**Tabela 2**), quando em baixas concentrações. O número de artigos citados nas revisões, base desta meta análise, em relação à ação antioxidante do AA, diante dos danos induzidos pelos antineoplásicos também ainda são escassos. Cabe também relatar confundimento de doses do AA. Em modelos para o câncer de mama, a dose do AA para ação antioxidante é similar à dose do AA em glioblastoma, para os efeitos do AA como antitumoral.

Figura 4. Modelos não clínicos que foram indicados por autores citados nas revisões analisadas, para atividades antioxidantes do AA.



Legenda: os valores das concentrações do AA estão organizados pelos seguintes intervalos - 1 – 5: 20 μ M; 6 – 10: 25 μ M; 11 – 15: 50 μ M; 16 – 20: 2 a 10 mM.

Fonte: Pesquisa direta.

4.4 Discussão

A identificação da variedade de respostas à terapia do câncer requer o conhecimento de variáveis incluindo medicações concomitantes que podem alterar o metabolismo e a farmacocinética da quimioterapia. Estudos clínicos apontam estas interações medicamentosas (HANIGAN et al., 2011). 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).

Como observado, na **Figura 2**, a maioria dos artigos selecionados para a meta-análise apontam em estudos clínicos com mais de 7.000 pacientes associação significativa entre o AA com seus efeitos antitumorais, com riscos relativos próximos a 1 (RR= 0,77; IC95%= 0,54-1,08). Recentes dados farmacocinéticos também indicam que por via intravenosa o AA age como pró-droga e produz elevado nível no plasma de peróxido de hidrogênio (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012).

Entretanto, o uso clínico 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 tais como a ciclofosfamida e o 5-fluorouracil (TOKARSKI et al., 2013).

O ácido ascórbico em dose-dependente aumenta a concentração de peróxido de hidrogênio, e decresce a viabilidade de células pancreáticas cancerosas. Decresce sobrevivência de clones, mas não apresenta efeitos na imortalização de linhagens celulares ductais pancreáticas, pois o AA induz captura de peróxido de hidrogênio. Estudos *in vivo* apontam que o AA inibe crescimento e prolonga sobrevivência celular (DU et al., 2010). Também existem relatos de que altas doses de ácido ascórbico (1 mM) aumenta a apoptose em células cancerígenas em camundongos, em co-tratamento com paclitaxel, melhorando os efeitos do antineoplásico com e sem células de Sarcoma 180 (PARK et al., 2012).

Nas concentrações de 0,5 – 5 mM, em estudos não clínicos, o AA também causa completa perda de viabilidade de linhagens celulares de câncer de pulmão, e em tratamentos combinados apresenta efeitos sinérgico aos antineoplásicos, induzindo mais apoptoses em linhagens de câncer de mama (VUYURI et al., 2013). Como observado na **Figura 3**, atividades pró-oxidantes do AA foram estudadas em modelos não clínicos para diversos tipos de câncer, incluindo os cânceres de pulmão e de mama.

Para Fromberg et al. (2011), a forma redox ativa do AA apresenta eficácia terapêutica em células tumorais, por indução de apoptose, por inibição de proliferação e parada do ciclo celular, podendo trazer benefícios para certos quimioterápicos, pois o AA em altas doses (**Tabela 3**), além dos mecanismos citados, pode aumentar citotoxicidade por geração de H₂O₂ e promover efeitos sinérgicos com os antineoplásicos (**Tabela 2**), aumentando assim a sensibilidade celular ao tratamento do câncer, um dos mecanismos antitumorais apresentados na **Tabela 4**, com percentual cumulativo de 100% entre os autores (**Figura 2**).

A mistura de micronutrientes apresenta efeitos sinérgico, exibe potentes atividades anticâncer *in vivo* e *in vitro* em linhagens celulares. Os efeitos anticâncer incluem inibição de metástase, do crescimento do tumor e da metaloproteína, angiogênese e indução de apoptose (NIEDZWIECKI et al., 2010), como relatado na **Tabela 4**. O AA aumenta as espécies reativas de oxigênio, agindo como pró-oxidante, inibe o crescimento celular, por estresse no retículo endoplasmático, supressão da insulina e inibição da angiogênese (ASHINO et al., 2003). A ação pró-droga do AA pode ser relacionada aos mecanismos com dependência do ferro, com geração do peróxido de hidrogênio, que induz citotoxicidade (PARROW; LESHIN; LEVINE, 2013), mecanismo antitumoral do AA com excelentes percentuais de indicação nos artigos de revisão da meta-análise (**Tabela 4**).

O AA é consumido pela população como prevenção ao envelhecimento, devido a sua capacidade antioxidante de sequestrar radicais livres evitando o aumento do estresse oxidativo. No entanto, em altas concentrações também pode ter ação pró-oxidante, por reduzir metais tipo ferro e cobre por meio da reação de Fenton, o que ocasiona a formação do peróxido de hidrogênio, com liberação do radical hidroxila (WONDRAK, 2009). Estudos clínicos indicam que o AA em altas doses (1 – 5 g/Kg) (**Tabela 3**) atua na regressão de tumores em pacientes com carcinoma renal, de rim e linfomas de células B, devido a sua ação pró-oxidante, com formação de espécies reativas de oxigênio (CHEN et al., 2008; CHEN et al., 2007).

Existem relatos de que o AA inibe a progressão de tumores tais como melanomas, tumores no cérebro, próstata e estômago. As altas doses do AA decrescem o potencial de membrana das mitocôndrias e libera o citocromo c para o citosol e promove a apoptose (KIM et al., 2008; LEE et al., 2008). Além disso, estudos sobre o uso clínico do ascorbato, em altas doses e por via intravenosa, durante a quimioterapia de pacientes em fase terminal aumenta a sobrevivência (HEAD, 1998).

Dados clínicos também apontam que o AA em altas doses e administrado de forma oral, apresenta decréscimo na sua absorção e aumento de excreção pela urina, assim com pouca biodisponibilidade, mas administrado por via intravenosa pode aumentar seu nível no plasma e induzir citotoxicidade, pela formação do peróxido de hidrogênio (CULLEN, 2010). Recentemente, outros estudos em linhagens celulares de câncer de mama de humanos tratadas com mitoxantrona indicam que o AA combinado com este antineoplásico pode apresentar algum grau de atividade antineoplásica dose-dependente, influenciando na apoptose, ciclo celular e sinalização celular, aumentando a citotoxicidade do antineoplásico (GUERREIRO et al., 2014).

Por outro lado, em linhagens tumorais de mama MCF-7, próstata DU-145 e bexiga T24, o uso concomitante de AA com etoposide, cisplatina, 5-fluorouracil, doxorrubicina e paclitaxel não foram observados efeitos antitumorais do AA. Porém, por via oral ou intravenosa até a dose de 10 g/dia, o AA foi efetivo para o tratamento de câncer. Estes dados coadunam diferenças de biodisponibilidade por rota de administração (PARROW; LESHIN; LEVINE, 2013), que podem confundir as ações do AA. Estudos farmacocinéticos do ácido ascórbico em altas doses por via intravenosa (**Tabela 3**) em pacientes em monoterapia de tumores sólidos, com administração de 1 g/min de 4 em 4 horas durante 4 semanas, indicam ação anticâncer do AA (STEPHENSON et al., 2013), como também em modelos animais (PADAYATTY; LEVINE, 2000; BRAM et al., 1980). Porém, por via oral o aumento da concentração no sangue é moderado (0,07 – 0,22 mM) (MURATA; MORISHIGE; YAMAGUCHI, 1982).

Entretanto, estudos apontam que uma grande maioria de pacientes em quimioterapia faz suplementação com vitaminas, especialmente com AA (vitamina C), o que pode ocasionar efeitos antagônicos aos antineoplásicos (SUBRAMANI et al., 2014). O AA pode reduzir a toxicidade dos antineoplásicos e evitar a formação de radicais livres, neutralizando alguns carcinógenos (CHAMBIAL et al., 2013; CHEN, BOISSONNEAULT, GLAUERT, 1988).

Cabe enfatizar que no estudo não foi possível encontrar associação entre AA e seus efeitos antioxidantes na modulação dos antineoplásicos, pois os RR (riscos relativos) não foram significantes ($P > 0,05$). Mas relatos epidemiológicos sugerem associação entre frutas e vegetais, contendo vitaminas antioxidantes, a exemplo da vitamina C com menores riscos de câncer (TAKATA et al., 2013).

A administração do AA em pré-tratamento da quimioterapia com os antineoplásicos doxorrubicina, cisplatina, vincristina em modelos hematopoiéticos (linhagens celulares para leucemia (K562) e linfomas (RL) de cânceres antagoniza os efeitos dos quimioterápicos, podendo afetar a terapêutica do câncer, pois preserva o potencial de membranas mitocondriais (HEANEY et al., 2008). Diversos estudos em modelos de cânceres em ensaios não clínicos (**Figura 4**) apontam para a ação do AA na modulação dos antineoplásicos (**Tabela 2**), quando usados em baixas concentrações (**Tabela 3**). Estudos *in vitro*, de células humanas MCF-7 (**Figura 4**) em exposição ao AA indica que o composto causa atenuação do antineoplásico podendo afetar a resposta terapêutica (SUBRAMANI et al., 2014; KARASAVAS et al., 2005). Dados recentes apontam que o AA reduz o risco de câncer de mama, devido a sua ação antioxidante para proteção de danos ao DNA, por neutralizar os radicais livres e bloquear a carcinogênese (WANG; WANG; YU, 2014).

Existem relatos sobre os efeitos dos antioxidantes da vitamina C, tocoferol e carotenoides, que podem inibir os efeitos de uma variedade de drogas citostáticas (5-fluorouracil, doxorrubicina e vincristina) em diversas culturas e linhagens celulares (MOSS, 2006; PRASAD; KUMAR, 1999), podendo diminuir os efeitos tóxicos em sistemas celulares (BLOCK; KOCH, 2007), por mecanismos relacionados a ataque e captura de radicais livres, redução de quebra de cadeias de DNA, por combinação com proteínas formando a selenoproteínas, por quelar metais e por promover reparos de aberrações do DNA (CAMERON; PAULING, 1976).

Existem muitas concordância de que os antioxidantes podem reduzir os radicais livres formados pela radioterapia e pela quimioterapia, devido ao fato de que a geração de radicais livres é um dos mecanismos de ação dos quimioterápicos (D'ANDREA, 2005). Porém, as variações genéticas na população humana, bem como as mutações em tumores devem ser

consideradas em estudos sobre o uso concomitante de medicações, pois podem ser fatores de risco para as respostas celulares da quimioterapia (HANIGAN et al., 2011).

4.5 Conclusão

Em síntese, cabe enfatizar que a quimioterapia é comumente complexa, com o agrupamento de diferentes antineoplásicos, que podem gerar diferentes respostas farmacocinéticas. Adicionado a este aspecto, o uso de AA pode alterar mecanismos indispensáveis para a regressão tumoral, mas também pode atuar como adjuvante, com efeitos sinérgicos e/ou aditivos às ações dos antineoplásicos. Em nosso estudo de meta-análise foi constatado que os dados foram significantes em estudos clínicos para associação entre o AA e seus efeitos antitumorais, especialmente em altas doses e por via intravenosa. Este aspecto também foi observado em diversos estudos não clínicos e com diferentes modelos de cânceres humanos que coadunam com a ação antitumoral do AA.

Não foram observadas associações significantes, em estudos clínicos, em relação à ação antioxidantes do AA, especialmente na modulação dos diversos mecanismos de ação dos antineoplásicos. Entretanto, alguns estudos não clínicos indicam essa associação do AA com seus efeitos antioxidantes, quando em baixas concentrações e administrado principalmente por via oral.

Assim, as diferentes respostas em relação à dose do AA, bem como de suas vias de administração ainda suscitam estudos para esclarecer melhor o limiar para suas ações antitumorais e antioxidantes, como também de suas interações farmacocinéticas. Por outro lado, os estudos clínicos quanto a ação antioxidante na modulação dos danos induzidos pelos antineoplásicos são insipientes e reduzidos. Este aspecto é de importância científica e principalmente clínica, pois é unânime o fato de que os pacientes em quimioterapia usem micronutrientes e suplementos de vitaminas para minimizar os efeitos colaterais dos antineoplásicos, sem informações sobre os riscos de suas interferências positivas e negativas no tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS

ABDEL-LATIF, M. M.; RAOUF, A. A.; SABRA, K.; KELLEHER, D.; REYNOLDS, J. V. Vitamin C enhances chemosensitization of esophageal cancer cells in vitro. **Journal of chemotherapy**, v. 17, n. 5, p. 539-549, 2005.

ASHINO, H.; SHIMAMURA, M.; NAKAJIMA, H.; DOMBOU, M.; KAWANAKA, S.; OIKAWA, T.; IWAGUCHI, T.; KAWASHIMA, S. Novel function of ascorbic acid as an angiostatic factor. **Angiogenesis**, v. 6, n. 4, p. 259-269, 2003.

BLOCK, KI; KOCH, A.C.; MEAD, M.N.; TOTHY, P.K.; NEWMAN, R.A.; GYLLENHAAL, C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. **Cancer Treatment Review**, v. 33, n. 1, p. 407-418, 2007.

BRAM, S.; FROUSSARD, P.; GUICHARD, M.; JASMIN, C.; AUGERY, Y.; SINOUSSE-BARRE, F.; WRAY, W. Vitamin C preferential toxicity for malignant melanoma cells. **Nature**, v. 284, n. 5757, p. 629-631, 1980.

CAMERON, E.; PAULING, L.; LEIBOVITZ, B. Ascorbic acid and cancer: a review. **Cancer Research**, v. 39, p. 663-669, 1979.

CARR, A. C.; VISSERS, M. C.; COOK, J. S. The effect of intravenous vitamin C on cancer- and chemotherapy-related fatigue and quality of life. **Frontiers in oncology**, v. 4, p. 283-299, 2014.

CHA, J.; ROOMI, M. W.; IVANOV, V.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. Ascorbate depletion increases growth and metastasis of melanoma cells in vitamin C deficient mice. **Experimental oncology**, v. 33, n. 4, p. 226-230, 2011.

CHAMBIAL, S.; DWIVEDI, S.; SHUKLA, K. K.; JOHN, P. J.; SHARMA, P. Vitamin C in disease prevention and cure: an overview. **Indian journal of clinical biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 314-328, 2013.

CHEN, P.; STONE, J.; SULLIVAN, G.; DRISKO, J. A.; CHEN, Q. Anti-cancer effect of pharmacologic ascorbate and its interaction with supplementary parenteral glutathione in preclinical cancer models. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 3, p. 681-697, 2011.

CHEN, Q.; ESPEY, M. G.; SUN, A. Y.; POOPUT, C.; KIRK, K. L.; KRISHNA, M. C.; KHOSH, D. B.; DRISKO, J.; LEVINE, M. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 32, p. 11105-11109, 2008.

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 Science USA**, v. 104, p. 8749-8754, 2007.

- CHEN, Q.; ESPEY, M.G.; SUN, A.Y.; POOPUT, C.; Kirk, K.L.; KRISHNA, M.C. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 105, n. 32, p. 11105-11109, 2008.
- CULLEN, J. J. Ascorbate induces autophagy in pancreatic cancer. **Autophagy**, v. 6, n. 3, p. 421-432, 2010.
- CYR, A. R.; DOMANN, F. E. The redox basis of epigenetic modifications: from mechanisms to functional consequences. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 2, p. 551-589, 2011.
- D'ANDREA, G. M. Use of antioxidants during chemotherapy and radiotherapy should be avoided. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 55, n. 5, p. 319-321, 2005.
- DEUBZER, B.; MAYER, F.; KUCI, Z.; NIEWISCH, M.; MERKEL, G.; HANDGRETINGER, R.; BRUCHELT, G. H₂O₂-mediated cytotoxicity of pharmacologic ascorbate concentrations to neuroblastoma cells: potential role of lactate and ferritin. Cellular physiology and biochemistry. **Journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 25, n. 6, p. 767-774, 2010.
- DU, J.; CULLEN, J. J.; BUETTNER, G. R. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1826, n. 2, p. 443-457, 2012.
- DU, J.; MARTIN, S. M.; LEVINE, M.; WAGNER, B. A.; BUETTNER, G. R.; WANG, S. H.; TAGHIYEV, A. F.; DU, C.; KNUDSON, C. M.; CULLEN, J. J. Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer. **Clinical cancer research**, v. 16, n. 2, p. 509-520, 2010.
- ESPEY, M. G.; CHEN, P.; CHALMERS, B.; DRISKO, J.; SUN, A. Y.; LEVINE, M.; CHEN, Q. Pharmacologic ascorbate synergizes with gemcitabine in preclinical models of pancreatic cancer. **Free radical biology & medicine**, v. 50, n. 11, p. 1610-1619, 2011.
- FONTHAM, E. T. Protective dietary factors and lung cancer. **International journal of epidemiology**, v. 19, n. 1, p. 32-42, 1990.
- FROMBERG, 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.
- GANDINI, S.; MERZENICH, H.; ROBERTSON, C.; BOYLE, P. Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. **European journal of cancer**, v. 36, n. 5, p. 636-646, 2000.
- GAZIANO, J. M.; GLYNN, R. J.; CHRISTEN, W. G.; KURTH, T.; BELANGER, C.; MACFADYEN, J.; BUBES, V.; MANSON, J. E.; SESSO, H. D.; BURING, J. E. Vitamins E and C in the prevention of prostate and total cancer in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. **Jama**, v. 301, n. 1, p. 52-62, 2009.
- GILLOTEAUX, J.; JAMISON, J. M.; NEAL, D.; SUMMERS, J. L. Synergistic antitumor cytotoxic actions of ascorbate and menadione on human prostate (DU145) cancer cells in

vitro: nucleus and other injuries preceding cell death by autschizis. **Ultrastructural pathology**, v. 38, n. 2, p. 116-140, 2014.

GOEL, S.; AGARWAL, S.B.; MANDAL, A.K.; SINGHAL, K.; AGARWAL, T. Emerging role of ascorbic acid in the management of advanced breast carcinoma as a chemosensitizer. **Asian Journal of Surgery**, v. 22, n. 7, p. 333-336, 1999.

GONZALEZ, C. A.; RIBOLI, E. Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. **European journal of cancer**, v. 46, n. 14, p. 2555-2562, 2010.

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.

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

GUERRIERO, E.; SORICE, A.; CAPONE, F.; NAPOLITANO, V.; COLONNA, G.; STORTI, G.; CASTELLO, G.; COSTANTINI, S. Vitamin C effect on mitoxantrone-induced cytotoxicity in human breast cancer cell lines. **PLoS one**, v. 9, n. 12, p. 115-123, 2014.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 280, n. 1, p. 1-8, 1990.

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

HARRIS, H. R.; BERGKVIST, L.; WOLK, A. Vitamin C intake and breast cancer mortality in a cohort of Swedish women. **British journal of cancer**, v. 109, n. 1, p. 257-264, 2013.

HEAD, K. A. Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. **Alternative medicine review**, v. 3, n. 3, p. 174-186, 1998.

HEANEY, M. L.; GARDNER, J. R.; KARASAVVAS, N.; GOLDE, D. W.; SCHEINBERG, D. A.; SMITH, E. A.; O'CONNOR, O. A. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. **Cancer research**, v. 68, n. 19, p. 8031-8038, 2008.

HOFFER, L. J.; LEVINE, M.; ASSOULINE, S.; MELNYCHUK, D.; PADAYATTY, S. J.; ROSADIUK, K.; ROUSSEAU, C.; ROBITAILLE, L.; MILLER, W. H., JR. Phase I clinical trial of i.v. ascorbic acid in advanced malignancy. **Annals of oncology**, v. 19, n. 11, p. 1969-1974, 2008.

JAIN, R. K. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. **Cancer metastasis reviews**, v. 9, n. 3, p. 253-266, 1990.

KARASAVVAS, N.; CARCAMO, J. M.; STRATIS, G.; GOLDE, D. W. Vitamin C protects HL60 and U266 cells from arsenic toxicity. **Blood**, v. 105, n. 10, p. 4004-4012, 2005.

- KIM, S. J.; RIM, K.T.; KANG, M. G.; KIM, J. K.; CHUNG, Y.; H. A Study of micronucleus induction with methyl formate and 2-methylbutane in bone marrow cells of male icr mice. **Safety and Health at Work**, v. 1, n. 1, p. 80-86, 2010.
- KUIPER, C.; MOLENAAR, I. G.; DACHS, G. U.; CURRIE, M. J.; SYKES, P. H.; VISSERS, M. C. Low ascorbate levels are associated with increased hypoxia-inducible factor-1 activity and an aggressive tumor phenotype in endometrial cancer. **Cancer research**, v. 70, n. 14, p. 5749-5758, 2010.
- LEE, S.K.; KANG, J.S.; JUNG, J.; HUR, D.Y.; KIM, J.E.; HAHM, E.; BAE, S.; KIM, H.W.; LEE, W.J. Vitamin C suppresses proliferation of the human melanoma cell SK-MEL-2 through the inhibition of cyclooxygenase (COX-2) expression and the modulation of insulin-like growth factor (IGF-II) production. **Journal of Cell Physiology**, v. 216, n. 3, p. 180-188, 2008.
- LEVINE, M.; PADAYATTY, S.J.; ESPEY, M.G. Vitamin C: a concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries. **Advance in Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 78-88, 2011.
- LUANPITPONG, S.; CHANVORACHOTE, P.; NIMMANNIT, U.; LEONARD, S. S.; STEHLIK, C.; WANG, L.; ROJANASAKUL, Y. 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, 2012.
- MA, Y.; CHAPMAN, J.; LEVINE, M.; POLIREDDY, K.; DRISKO, J.; CHEN, Q. High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy. **Science translational medicine**, v. 6, n. 222, p. 22-18, 2014.
- MANDL, J.; SZARKA, A.; BANHEGYI, G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. **British journal of pharmacology**, v. 157, n. 7, p. 1097-1110, 2009.
- MOERTEL, C. G.; FLEMING, T. R.; CREAGAN, E. T.; RUBIN, J.; O'CONNELL, M. J.; AMES, M. M. High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy. A randomized double-blind comparison. **The New England journal of medicine**, v. 312, n. 3, p. 137-141, 1985.
- MOSS, R. W. Should patients undergoing chemotherapy and radiotherapy be prescribed antioxidants? **Integrative cancer therapies**, v. 5, n. 1, p. 63-82, 2006.
- MURATA, A.; MORISHIGE, F.; YAMAGUCHI, H. Prolongation of survival times of terminal cancer patients by administration of large doses of ascorbate. **International journal for vitamin and nutrition research. Supplement**, v. 23, p. 103-113, 1982.
- NIEDZWIECKI, A.; ROOMI, M.W.; KALINOVSKY, T.; RATH, M. Micronutrient synergy - a new tool in effective control of metastasis and other key mechanisms of cancer. **Cancer Metastasis Review**, v. 29, n. 2, p. 529-542, 2010.
- ONG, P. S.; CHAN, S. Y.; HO, P. C. Differential augmentative effects of buthionine sulfoximine and ascorbic acid in As₂O₃-induced ovarian cancer cell death: oxidative stress-independent and -dependent cytotoxic potentiation. **International journal of oncology**, v. 38, n. 6, p. 1731-1749, 2011.

PADAYATTY, S. J.; LEVINE, M. Reevaluation of ascorbate in cancer treatment: emerging evidence, open minds and serendipity. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, n. 4, p. 423-435, 2000.

PADAYATTY, S. J.; SUN, A. Y.; CHEN, Q.; ESPEY, M. G.; DRISKO, J.; LEVINE, M. Vitamin C: intravenous use by complementary and alternative medicine practitioners and adverse effects. **PloS one**, v. 5, n. 7, p. 114-129, 2010.

PARK, J. H.; DAVIS, K. R.; LEE, G.; JUNG, M.; JUNG, Y.; PARK, J.; YI, S. Y.; LEE, M. A.; LEE, S.; YEOM, C. H.; KIM, J. Ascorbic acid alleviates toxicity of paclitaxel without interfering with the anticancer efficacy in mice. **Nutrition research**, v. 32, n. 11, p. 873-883, 2012.

PARK, J.H.; DAVIS, K.R.; LEE, G.; JUNG, M.; JUNG, Y.; PARK, J.; YI, S.Y.; LEE, M.A.; LEE, S.; YEOM, C.H. Ascorbic acid alleviates toxicity of paclitaxel without interfering with the anticancer efficacy in mice. **Nutrition Research**. v. 32, n. 4, p. 873-883, 2012.

PARK, S. The effects of high concentrations of vitamin C on cancer cells. **Nutrients**, v. 5, n. 9, p. 3496-3505, 2013.

PARROW, N. L.; LESHIN, J. A.; LEVINE, M. Parenteral ascorbate as a cancer therapeutic: a reassessment based on pharmacokinetics. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 17, p. 2141-2156, 2013.

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.

PERRONE, G.; HIDESHIMA, T.; IKEDA, H.; OKAWA, Y.; CALABRESE, E.; GORGUN, G.; SANTO, L.; CIRSTEIA, D.; RAJE, N.; CHAUHAN, D.; BACCARANI, M.; CAVO, M.; ANDERSON, K. C. Ascorbic acid inhibits antitumor activity of bortezomib in vivo. **Leukemia**, v. 23, n. 9, p. 1679-1686, 2009.

POOLE, E. M.; SHU, X.; CAAN, B. J.; FLATT, S. W.; HOLMES, M. D.; LU, W.; KWAN, M. L.; NECHUTA, S. J.; PIERCE, J. P.; CHEN, W. Y. Postdiagnosis supplement use and breast cancer prognosis in the After Breast Cancer Pooling Project. **Breast cancer research and treatment**, v. 139, n. 2, p. 529-37, 2013.

PRASAD, K. N.; KUMAR, A.; KOCHUPILLAI, V.; COLE, W. C. High doses of multiple antioxidant vitamins: essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 13-25, 1999.

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.

SPEIZER, F. E.; COLDITZ, G. A.; HUNTER, D. J.; ROSNER, B.; HENNEKENS, C. Prospective study of smoking, antioxidant intake, and lung cancer in middle-aged women (USA). **Cancer causes & control**, v. 10, n. 5, p. 475-482, 1999.

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

SUBRAMANI, T.; YEAP, S. K.; HO, W. Y.; HO, C. L.; OMAR, A. R.; AZIZ, S. A.; RAHMAN, N. M.; ALITHEEN, N. B. 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.

SZULAWSKA, A.; CZYZ, M. [Molecular mechanisms of anthracyclines action]. **Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej**, v. 60, p. 78-100, 2006.

TAKATA, Y.; XIANG, Y. B.; YANG, G.; LI, H.; GAO, J.; CAI, H.; GAO, Y. T.; ZHENG, W.; SHU, X. O. Intakes of fruits, vegetables, and related vitamins and lung cancer risk: results from the Shanghai Men's Health Study (2002-2009). **Nutrition and cancer**, v. 65, n. 1, p. 51-61, 2013.

TAKEMURA, Y.; SATOH, M.; SATOH, K.; HAMADA, H.; SEKIDO, Y.; KUBOTA, S. High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 394, n. 2, p. 249-253, 2010.

TAPER, H. S.; JAMISON, J. M.; GILLOTEAUX, J.; GWIN, C. A.; GORDON, T.; SUMMERS, J. L. In vivo reactivation of DNases in implanted human prostate tumors after administration of a vitamin C/K(3) combination. **The journal of histochemistry and cytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 109-120, 2001.

TOKARSKI, S.; RUTKOWSKI, M.; GODALA, M.; MEJER, A.; KOWALSKI, J. [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, 2013.

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

TSAI-TURTON, M.; LUONG, B. T.; TAN, Y.; LUDERER, U. Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. **Toxicological science**, v. 98, n. 1, p. 216-230, 2007.

VERMA, M. Cancer control and prevention by nutrition and epigenetic approaches. **Antioxidants & redox signaling**, v. 17, n. 2, p. 355-364, 2012.

VOLLBRACHT, C.; SCHNEIDER, B.; LEENDERT, V.; WEISS, G.; AUERBACH, L.; BEUTH, J. Intravenous vitamin C administration improves quality of life in breast cancer patients during chemo-/radiotherapy and aftercare: results of a retrospective, multicentre, epidemiological cohort study in Germany. **In vivo**, v. 25, n. 6, p. 983-990, 2011.

VOORRIPS, L. E.; GOLDBOEHM, R. A.; VERHOEVEN, D. T.; VAN POPPEL, G. A.; STURMANS, F.; HERMUS, R. J.; VAN DEN BRANDT, P. A. Vegetable and fruit consumption and lung cancer risk in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. **Cancer causes & control**, v. 11, n. 2, p. 101-115, 2000.

VUYYURI, S. B.; RINKINEN, J.; WORDEN, E.; SHIM, H.; LEE, S.; DAVIS, K. R.

Ascorbic acid and a cytostatic inhibitor of glycolysis synergistically induce apoptosis in non-small cell lung cancer cells. **PloS One**, v. 8, n. 6, p. 670-681, 2013.

WANG, Y. Y.; WANG, X. L.; YU, Z. J. Vitamin C and E intake and risk of bladder cancer: a meta-analysis of observational studies. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 7, n. 11, p. 4154-4164, 2014.

WEIJL, N. I.; ELSEENDOORN, T. J.; LENTJES, E. G.; HOPMAN, G. D.; WIPKINK-BAKKER, A.; ZWINDERMAN, A. H.; CLETON, F. J.; OSANTO, S. Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. **European journal of cancer**, v. 40, n. 11, p. 1713-1723, 2004.

WONDRAK, G. T. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 12, p. 3013-3069, 2009.

YEOM, C. H.; LEE, G.; PARK, J. H.; YU, J.; PARK, S.; YI, S. Y.; LEE, H. R.; HONG, Y. S.; YANG, J.; LEE, S. High dose concentration administration of ascorbic acid inhibits tumor growth in BALB/C mice implanted with sarcoma 180 cancer cells via the restriction of angiogenesis. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 70-79, 2009.

YUAN, J. M.; STRAM, D. O.; ARAKAWA, K.; LEE, H. P.; YU, M. C. Dietary cryptoxanthin and reduced risk of lung cancer: the Singapore Chinese Health Study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 12, n. 9, p. 890-898, 2003.

**5 CAPÍTULO II: O ácido ascórbico modula danos citogenéticos induzidos pela
ciclofosfamida e doxorrubicina em Sarcoma 180**

(Artigo submetido à *Tumor Biology*)

Qualis B1

O ácido ascórbico modula danos citogenéticos induzidos pela ciclofosfamida e doxorubicina em Sarcoma 180

Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar¹, Layla Martins de Castro Rocha¹, Juliana Lima Queiroz¹, Pétala Couto Martins¹, Sandra Maria Mendes de Moura Dantas², Paulo Michel Pinheiro Ferreira¹, Rivelilson Mendes de Freitas¹, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante¹

¹Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina – Brasil.

²Departamento de Biologia. Universidade Federal do Piauí.

Resumo

A Organização Mundial de Saúde estima 27 milhões de casos novos de câncer até 2030. A ciclofosfamida e a doxorubicina são usadas na quimioterapia, especialmente por gerarem espécies reativas de oxigênio. O uso clínico do ácido ascórbico ainda suscita várias controvérsias devido aos seus efeitos antagônicos aos antineoplásicos. O estudo avaliou os efeitos do ácido ascórbico na modulação de danos citogenéticos induzidos pela ciclofosfamida e doxorubicina, e esquema AC em células tumorais de Sarcoma 180, bem como as concordâncias desses danos em linfócitos de camundongos pelo teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese. A ciclofosfamida (20 mg/mL) e a doxorubicina (2 mg/mL) induzem significantes aumentos de apoptose>necrose>micronúcleos nos tipos celulares testados. Os danos citogenéticos em Sarcoma 180 foram modulados pelo ácido ascórbico (2 μ M), com significantes percentuais de modulação de danos da ciclofosfamida em mais de 70% em relação à apoptose, 70 % para micronúcleos e 32% para necrose. Os danos da doxorubicina foram modulados em 70% para apoptose, 40% para necrose e 21% para micronúcleos. No esquema AC também foram observadas modulações de 60% para apoptose, 42% para necrose e micronúcleos. Não foram observadas significâncias em relação aos brotos e pontes nucleoplasmáticas, exceto para pontes induzidas pela ciclofosfamida, mas o ácido ascórbico não teve efeito. Esses resultados coadunam com outros estudos que indicam riscos para a eficácia da quimioterapia, devido aos efeitos antioxidantes do ácido ascórbico na modulação de danos citogenéticos de importância para a regressão tumoral. Dessa forma, podem existir riscos para as propriedades farmacológicas dos antineoplásicos, que podem interferir na eficácia do tratamento do câncer.

Palavras-chave: Antineoplásicos; Ácido ascórbico; Apoptose; Necrose; Micronúcleos.

Abstract

Cancer is a public health problem worldwide and in Brazil. The World Health Organization estimates that by 2030 will be 27 million new cases. Cyclophosphamide and doxorubicin are used in chemotherapy, especially by generating reactive oxygen species. The clinical use of ascorbic acid also raises several controversies due to its antagonistic effects of antineoplastic agents. In this sense, the study evaluated the effects of ascorbic acid on modulation cytogenetic damage induced by cyclophosphamide and doxorubicin, and their interactions in tumor cell Sarcoma 180 and the concordance of this damage in mouse lymphocytes. Cytogenetic damage type apoptosis, necrosis, micronuclei, buds and bridges were identified with the application of micronucleus test with cytokinesis block. The cyclophosphamide and doxorubicin induces significant increases in apoptosis, necrosis and micronuclei in the cell types tested. The damage on Sarcoma 180 were modulated by ascorbic acid with percentage modulation in more than 70% to cyclophosphamide relative to apoptosis and micronuclei and 32% to necrosis. The damage of doxorubicin have been modulated by 70% for apoptosis, 40% to necrosis and 21% to micronuclei. In AC protocol, were also observed modulations of 60% to apoptosis and 42% to necrosis and micronuclei. There were no significance in relation to the buds and nucleoplasmic bridges, except for bridges induced by cyclophosphamide, but ascorbic acid had no effect. These results are in line with other studies that indicate hazards for the effectiveness of chemotherapy due to the antioxidant effects of ascorbic acid in the modulation of major cytogenetic damage important to tumor regression.

Keywords: Antineoplastic; Ascorbic acid; Apoptosis; Necrosis; Micronuclei.

5.1 Introdução

O câncer é uma patologia complexa e multifatorial. Sua etiologia presume mutações genéticas que conferem capacidade ilimitada de proliferação celular, perda de resposta a fatores de inibição de crescimento, evasão de apoptose (morte celular programada), possibilidades de invadir outros tecidos corpóreos (metástases) e produção de novos vasos sanguíneos (angiogênese) (INCA, 2014; HERCOS et al., 2014; ARAÚJO; GALVÃO, 2010). Avanços de biologia molecular e genética têm favorecido a identificação de tipos de sarcoma e técnicas para o diagnóstico e trajetos da terapia (FORSCHER, MITA, FIGLIN, 2014). O sarcoma corresponde a 20% dos cânceres pediátricos, com risco desconhecido. Estudos ainda são necessários para o entendimento dos seus mecanismos genéticos e influências ambientais (BURNINGHAM et al., 2012).

A modalidade terapêutica do câncer é a terapia farmacológica com a utilização de medicamentos antineoplásicos visando a destruição de células tumorais, com diversos efeitos adversos aos pacientes e danos em células normais (BECKER; NARDIN, 2011). A identificação da variedade de respostas à terapia do câncer requer conhecimento de variáveis incluindo medicações concomitantes, o que pode alterar o metabolismo e a farmacocinética da quimioterapia, devido a interações medicamentosas (HANIGAN et al., 2011).

Existem diversas modalidades terapêuticas para o câncer, incluindo a aplicação dos esquemas FAC (doxorrubicina + fluorouracil + ciclofosfamida) e/ou AC (doxorrubicina + ciclofosfamida). As doses destas medicações mais comuns são respectivamente 500/50/500 (mg/m²) e 60/600 (mg/m²), a cada 21 dias (GUIMARÃES, 2004). A ciclofosfamida (CPA) é um agente citotóxico de ação imunossupressora (JOY et al., 2012; McCUNE et al., 2009) e alquilante para o material genético, que induz apoptose por ação dos radicais livres (GOESSLER et al., 2011).

Alguns estudos já determinaram diversos fatores que influenciam a toxicidade celular por ação da doxorrubicina, mais notavelmente a expressão dos transportadores de membrana glicoproteína-P/MDR1 (Gp-P) e a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres por meio do ciclo redox da doxorrubicina, como também inibição da topoisomerase II (KIEVIT et al., 2012; FINN; FINDLEY; KEMP, 2011).

O estresse oxidativo consiste no aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio devido ao desequilíbrio intracelular de redução e oxidação, estando envolvido em várias doenças, incluindo o câncer. Alterações entre os níveis de oxidação e as defesas antioxidantes em pacientes com sarcomas geram aumento de peroxidação lipídica e decréscimo dos níveis de catalase, superóxido dismutase e tióis (NATHAN et al., 2011). A suplementação de alimentos

antioxidantes tem mostrado efeitos protetores contra o câncer, como relatados em diferentes estudos *in vivo* e *in vitro* (SAMOYLENKO et al., 2013).

Os antioxidantes são substâncias que, em baixas concentrações quando comparado com o substrato, previnem oxidação do substrato. Os antioxidantes tais como as vitaminas C e E são constituintes da dieta humana (PANDEL et al., 2013), que sequestram, quelam os radicais livres, como também regulam enzimas de reparo de DNA e de fatores pós-transcricionais. A vitamina C é um co-fator para a alfa-cetoglutarato dioxigenase, importante para a formação do colágeno e do fator transcricional que regula genes envolvidos no crescimento de tumores e na apoptose (GODIC et al., 2014; TRABER; STEVENS, 2011).

Grande parte dos pacientes em quimioterapia faz suplementação com vitaminas, especialmente com vitamina C, o que pode ocasionar efeitos antagônicos aos antineoplásicos e neutralizar alguns carcinógenos (SUBRAMANI et al., 2014; CHAMBIAL et al., 2013). Estudos *in vitro* de células humanas MCF-7 em exposição ao ácido ascórbico causam atenuação do antineoplásico podendo afetar a resposta terapêutica (SUBRAMANI et al., 2014). Também existem relatos de que altas doses de AA aumentam a apoptose em células de Sarcoma 180 em camundongos, em co-tratamento com paclitaxel, melhorando os efeitos do antineoplásico (PARK et al., 2012).

Várias linhagens celulares e outros tipos de modelos têm sido bem utilizados e são similarmente adaptáveis em relação à genética funcional de estudos *in vivo* (TAYLOR et al., 2011; FRAPOLLI et al., 2010). Muitos métodos têm sido utilizados em estudos, dentre eles, o teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN), que não mede apenas danos cromossômicos (micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos celulares), mas também outros eventos celulares como a apoptose e a necrose (PRADEEP, 2014; MCHUGH et al., 2013; FENECH, 2002).

Existem inúmeras controvérsias sobre o papel antioxidante/pró-oxidante do AA, e sobre o uso de antioxidantes durante a quimioterapia, no período da meia-vida dos antineoplásicos. Assim, o presente estudo busca contribuir para o entendimento da associação de antineoplásicos com o ácido ascórbico frente aos danos citogenéticos em modelo de Sarcoma 180, como também a análise destes danos em linfócitos de camundongos com aplicação de teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Preparo das substâncias

Os antineoplásicos CPA e DOX foram preparados por meio de diluição com solução salina 0.9% estéril até a concentração final de 20 mg/mL e 2 mg/mL, respectivamente. Estas concentrações para ambos os antineoplásicos foram escolhidas conforme Feredman e Partridge (2011). A associação de ambos os antineoplásicos foram preparadas da mesma maneira, mantendo-se as mesmas concentrações da forma isolada, como no esquema AC. O AA foi solubilizado em tampão fosfato 50 mM até a concentração final de 2 μ mol. Esta concentração foi previamente determinada devido ao fato de que concentrações acima de 40-80 μ mol podem ter efeito pró-oxidantes, considerando que os antioxidantes devem agir em baixas concentrações, como relatado por Halliwell (2006).

5.2.2 Cultivo *in vivo* de Sarcoma 180

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

5.2.3 Viabilidade celular por meio do teste de exclusão por azul de Tripán

A viabilidade celular foi analisada com a aplicação do teste de exclusão por azul de Tripán de acordo com Renzi et al. (1993). Após 72 horas de tratamento com os antineoplásico, bem como as células sem tratamento foram usadas para a aplicação da técnica, onde 90 μ L da suspensão de células foram retirados das culturas e acrescidos de 10 μ L do azul de Tripán aos diferentes grupos de tratamento: CPA, DOX e AC. As células não viáveis foram contadas por sua coloração azulada, sendo consideradas como células mortas. Em oposição, as células viáveis não apresentam esta coloração devido às suas capacidades de expulsarem o azul de Tripán. As diferenciações celulares foram observadas em microscopia óptica com o aumento de 40X, com o auxílio da câmara de Neubauer.

5.2.4 Cálculos da modulação do AA frente aos danos citogenéticos dos antineoplásicos em Sarcoma 180

Os valores do percentual de modulação do AA nos danos citogenéticos induzidos pelos antineoplásicos ciclofosfamida e doxorrubicina, bem como associados no protocolo AC foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%M = \frac{A - B + AA}{A}$$

onde, “A” representa os valores dos danos citogenéticos induzidos pelos antineoplásicos, e “B+AA” representa os valores dos danos citogenéticos induzidos pelos antineoplásicos associados ao ácido ascórbico.

5.2.5 Avaliação de danos citogenéticos induzidos pelos antineoplásicos CPA, DOX e AC em sangue periférico de camundongos em exposição *ex vivo*

Foram utilizados para os experimentos 40 Camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, albinos, 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 ± 1 °C, com livre acesso à ração tipo pellets (Purina®) e água, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6h às 18h. Todos os experimentos propostos foram previamente submetidos à avaliação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (081/14).

Os animais foram divididos em 4 grupos (n=10/grupo, igual proporção de gêneros): um grupo controle negativo, onde o sangue periférico não teve exposição “*ex vivo*” aos antineoplásicos (não recebeu tratamento); um grupo tratado com sangue periférico exposto “*ex vivo*” a ciclofosfamida (20 mg/kg); um grupo tratado, onde o sangue periférico foi exposto “*ex vivo*” a doxorrubicina (2 mg/kg); e um quarto grupo tratado, onde o sangue periférico foi exposto “*ex vivo*” ao AC (CPA e DOX 20/2 mg/kg). Após os testes, os animais foram eutanasiados pela administração de Pentobarbital Sódico (150 mg/kg).

5.2.6 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese

O CBMN foi realizado de acordo com Fenech (2007), com adaptações. Em frascos de cultura contendo 2 mL de meio RPMI suplementados com soro bovino fetal (20%), antibióticos (Sigma, St. Louis, MO) e fitohemaglutinina A (Gibco, Grand Island, NY) foram adicionados 20 µL de suspensão celular de Sarcoma 180 (0.5×10^6 /mL). Em cada frasco de cultura foram adicionados 10 µL das soluções contendo antineoplásicos ciclofosfamida na concentração final de 20 mg/mL (CPA) e doxorrubicina na concentração final de 2 mg/mL (DOX) separadamente, bem como a associação de ambos (AC) mantendo-se as mesmas concentrações. Além disso, foram adicionados 10 µL de ácido ascórbico na concentração final de 2 µmol (AA) para o co-tratamento. As células foram incubadas por 44h a $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$. Em seguida, foram adicionados às culturas 6 µg/mL de Citocalasina B (Sigma, St. Louis, MO), retornando os frascos à incubação por mais 28h. Ao final de 72h, as culturas foram transferidas para tubos falcon e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* celular foi levemente agitado, sendo centrifugados novamente após a adição de 5 mL de fixador (metanol:ácido acético 5:1) e 3 gotas de formaldeído aos tubos. O procedimento foi repetido por 2 vezes utilizando fixador 3:1 e sem o formaldeído. Ao final, o sobrenadante foi descartado e 2 a 4 gotas da suspensão celular foram gotejados sobre lâminas, as quais foram coradas com solução de Giemsa 5% por 7 minutos. As lâminas previamente codificadas foram analisadas em teste cego, por meio de microscópio óptico, com aumento de 1000X, considerando os danos citogenéticos presentes em 1000 células por lâmina em duplicata.

5.2.7 Parâmetros que foram considerados na análise

- a) Número de células binucleadas analisadas;
- b) Distribuição de células binucleadas com 0, 1, 2, 3 ou mais MNs em pelo menos 1000 células binucleadas;
- c) Número total de micronúcleos em binucleadas;
- d) Frequência de MN/1000 células binucleadas;
- e) Frequência de células binucleadas micronucleadas/1000 células binucleadas.

Durante a análise do material foram avaliadas as células que apresentavam as seguintes características:

- a) Núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais, mesmo padrão de coloração e dentro do limite citoplasmático;

b) Membrana celular intacta e célula claramente distinguível das células adjacentes.

Para a análise da frequência de micronúcleos, não foram incluídas na amostra células com um ou mais núcleos, as células necróticas e aquelas em apoptose, segundo Fenech et al. (2011).

5.2.8 Características das células apoptóticas e necróticas

As células apoptóticas foram avaliadas pela cromatina condensada com preservação dos contornos nucleares e citoplasmáticos (células em início de apoptose) ou pequenos fragmentos nucleares dentro de um citoplasma intacto (células em apoptose avançadas). Para ambas, a intensidade de coloração do núcleo, fragmentos nucleares e citoplasma é maior que em células viáveis. As células necróticas foram avaliadas pelo citoplasma descorado (opaco) e com inúmeros vacúolos, membrana celular danificada e núcleo razoavelmente intacto (células em início de processo necrótico) ou perda de citoplasma, membrana nuclear danificada e irregular com o núcleo parcialmente intacto (células em necrose avançada). A intensidade de coloração de ambas as células é menor que a das células viáveis (FENECH, 2000).

O IDNC (Índice de divisão nuclear considerando a citotoxicidade) reflete a sensibilidade celular ao tratamento com os agentes testados, visto que inclui as células necróticas e apoptóticas no número total de células analisadas. Sendo assim, cálculo do IDNC foi realizado por meio da seguinte fórmula:

$$IDNC = \frac{[Apop+Necr+M1+2 (M2)+3 (M3)+4 (M4)]}{NT}$$

onde, “Apop” representa o número de células apoptóticas; “Necr” representa o número de células necróticas; “M1” a “M4” representa o número de células viáveis com 1 a 4 núcleos; e “NT” representa o número total de células analisadas (incluindo viáveis e não viáveis).

A apoptose é considerada como um processo dependente de energia cuidadosamente regulado, caracterizado por características morfológicas e bioquímicas específicas em que a ativação de caspases desempenham papel central (ELMORE, 2007). A necrose difere da

apoptose por representar um fenômeno degenerativo irreversível, causado por uma agressão intensa, resultando em degradação progressiva das estruturas celulares (KRYSKO et al., 2008).

5.2.9 Características dos micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares

Os micronúcleos (MN) são originados, principalmente, a partir de fragmentos de cromossomos acêntricos, fragmentos de cromátides acêntricas ou mesmo cromossomos inteiros que não conseguem ser incluídos nos núcleos das células filhas na conclusão da telófase durante a mitose (FENECH et al., 2011). Os MN foram analisados considerando os seguintes parâmetros: (1) morfologia idêntica a dos núcleos principais; (2) diâmetro entre 1/16 até, no máximo, 1/3 dos núcleos principais; (3) mesma coloração dos núcleos, embora possam apresentar coloração mais intensa; (4) não apresentar refringências; (5) não estar ligado ou conectado a um dos núcleos principais; (6) não pode estar sobreposto a um dos núcleos principais.

As pontes são ligações contínuas entre os núcleos, cuja largura, embora variável, não ultrapassa $\frac{1}{4}$ do diâmetro dos núcleos e possui mesma coloração dos núcleos. Raramente é observada mais de uma ponte por células binucleadas. Células binucleadas com PNP (pontes nucleoplasmáticas) frequentemente apresentam um ou mais MN (FENECH, 2000). Pontes são biomarcadores de instabilidade genômica que se expressam como ligações contínuas entre os núcleos das células binucleadas, podendo ser ainda considerado como rearranjo cromossômico envolvendo mais de um centrômero (FENECH et al., 2011).

Os brotos podem representar DNA amplificado eliminado do núcleo por um processo ativo, durante a fase S do ciclo celular (COLUZZI et al., 2014). Os brotos foram considerados por meio das seguintes características: (1) mesma coloração do núcleo principal; (2) não pode ser do mesmo diâmetro do núcleo principal; (3) não apresentar refringência; (4) pode ser observado em células que contenham micronúcleos.

5.2.10 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste de *Newman-Keuls* como *post hoc* teste por meio do programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, Copyright ©. O mesmo programa (GraphPad Prism©) foi utilizado para confecção dos gráficos dos resultados obtidos neste estudo.

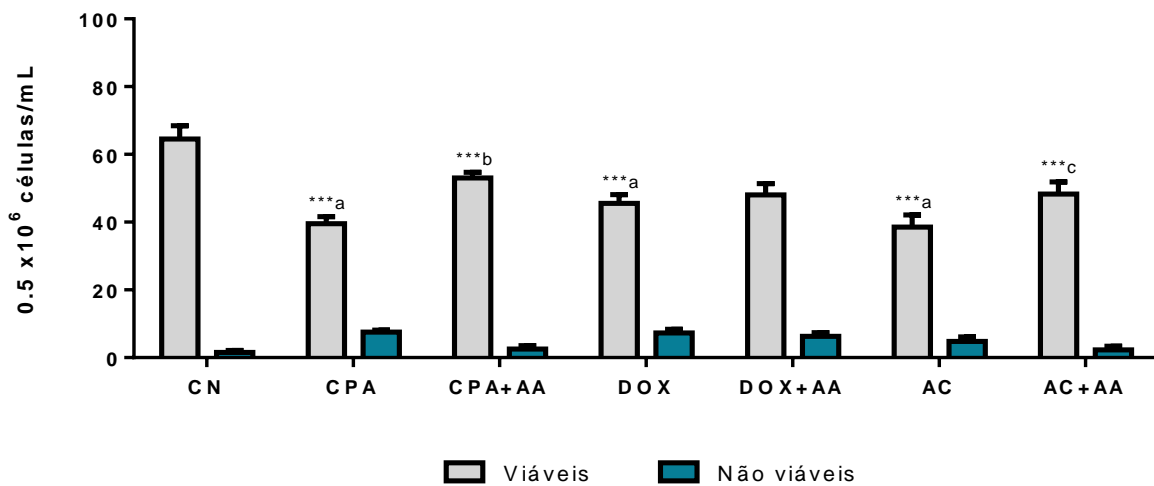
5.3 Resultados

5.3.1 Estudo da viabilidade celular em linhagens de células tumorais de Sarcoma 180 por meio do teste de exclusão por azul de Tripán

A viabilidade celular de Sarcoma 180 foi analisada após 72 horas de exposição *ex vivo* aos antineoplásicos CPA, DOX e AC. Para tanto, foi aplicada a técnica de exclusão por azul de Tripán. O tratamento de células de Sarcoma 180 com a ciclofosfamida reduz significativamente ($P<0.0001$) a viabilidade celular em relação ao dano basal (controle negativo).

Entretanto, este evento foi significativamente ($P<0.0001$) modulado com o co-tratamento com o AA (**Figura 1**). Similarmente, a DOX também reduz ($P<0.0001$) a viabilidade celular, mas o AA não modulou estes efeitos (**Figura 1**). Em relação ao tratamento AC, os resultados foram concordantes com os da CPA, onde o AC também inibiu ($P<0.0001$) a viabilidade celular em relação ao nível basal, mas o AA também modulou ($P<0.0001$) estes efeitos (**Figura 1**). Os dados para células não viáveis não foram significantes ($P>0.05$).

Figura 1. Efeitos dos antineoplásicos CPA, DOX e AC na viabilidade de células de Sarcoma 180 avaliada por meio do teste de exclusão por azul de Tripán.



Legenda: Os dados correspondem a Média \pm Desvio padrão de experimentos independentes ($n=2$). CN: controle negativo; CPA: ciclofosfamida (20 mg/mL); DOX: doxorrubicina (2 mg/mL); AC: doxorrubicina (2 mg/mL) + ciclofosfamida (20 mg/mL); AA: ácido ascórbico (2 μ mol). ^{***a} $P<0.0001$ em relação ao controle negativo; ^{***b} $P<0.0001$ em relação à CPA; ^{***c} $P<0.0001$ em relação ao AC.

5.3.2 Avaliação de danos citogenéticos da CPA, DOX e AC em culturas de células tumorais (Sarcoma 180), e dos efeitos do AA em co-tratamento com os antineoplásicos

A CPA induziu, significativamente ($P < 0.0001$), apoptose em culturas de células de Sarcoma 180, em relação ao nível basal (controle negativo). No entanto, o AA em co-tratamento CPA + AA reduziu, significativamente ($P < 0.001$), a apoptose induzida pelo tratamento das células com CPA (**Tabela 1**).

De forma similar, a CPA induz significantes ($P < 0.0001$) aumentos de necrose em células de Sarcoma 180, em relação ao dano basal. Entretanto, o AA (2 μmol) apresenta efeitos modulatórios na necrose induzida pela CPA. Em relação a outros danos citogenéticos, tais como micronúcleos, brotos e pontes, a CPA induz significativamente ($P < 0.05$) a formação de micronúcleos e de pontes, em Sarcoma 180, mas a associação com ácido ascórbico modula de forma significativa ($P < 0.001$) os efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos da CPA, mas não modula a indução de pontes. A CPA não induz a formação de brotos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Danos citogenéticos induzidos pelos antineoplásicos ciclofosfamida, doxorubicina e de sua associação, bem como a modulação do AA em células tumorais de Sarcoma 180 por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.

Tratamentos [£]	Alterações citogenéticas				
	Apoptose	Necrose	Micronúcleos	Brotos	Pontes
Dano basal	47.5 \pm 7.7	39.5 \pm 3.5	0.50 \pm 0.7	5.5 \pm 3.3	2.5 \pm 0.7
CPA	294.5 \pm 17.6 ^a	115.0 \pm 2.8 ^a	8.5 \pm 2.1 ^{#a}	21.5 \pm 7.7	10.5 \pm 0.7 ^{#a}
CPA + AA	76.0 \pm 8.4 ^b	77.5 \pm 3.5 ^b	2.5 \pm 0.7 ^b	26.0 \pm 1.4	5.00 \pm 2.8
DOX	279.5 \pm 28.9 ^a	93.5 \pm 3.5 ^a	18.5 \pm 4.9 ^{#a}	15.5 \pm 3.5	8.5 \pm 3.5
DOX + AA	80.0 \pm 2.8 ^c	56.0 \pm 4.2 ^c	14.5 \pm 2.1	13.5 \pm 4.9	10.5 \pm 0.7
AC	568.5 \pm 34.6 ^{#a}	85.0 \pm 7.0 ^a	20.0 \pm 1.4 ^a	21.0 \pm 4.2	6.5 \pm 2.1
AC + AA	297.0 \pm 137.2 ^d	58.0 \pm 4.2 ^d	12.5 \pm 2.2 ^{#d}	17.5 \pm 7.5	6.00 \pm 4.2

£ Os dados correspondem a Média \pm D.P de duas lâminas, sendo avaliadas 1000 células por lâminas. CPA: ciclofosfamida (20 mg/mL); DOX: doxorubicina (2 mg/mL); AC: doxorubicina (2 mg/mL) + ciclofosfamida (20 mg/mL); AA: ácido ascórbico (2 μmol). ANOVA-*one-way* e pós-teste de *Newman-keuls*. ^a $P < 0.0001$ comparado ao Dano basal (controle negativo). ^{#a} $P < 0.05$ comparado ao Dano basal (Sem tratamento). ^b $P < 0.001$ comparado à CPA. ^c $P < 0.001$ comparado à DOX; ^d $P < 0.001$ comparado ao AC; ^{#d} $P < 0.05$ comparado ao AC.

A DOX, a exemplo da CPA, também induz, significativamente ($P < 0.0001$), os níveis de apoptose e de necrose, mas estes danos citogenéticos foram modulados pelo AA. Este antineoplásico também não induz brotos e nem pontes ($P > 0.05$), mas induz mutagenicidade pelo significativo ($P < 0.05$) aumento da frequência de micronúcleos. Cabe enfatizar que os dados

para o co-tratamento com DOX + AA apontam que o AA modula os efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos da DOX (**Tabela 1**).

A associação da CPA com a DOX, como ocorre no esquema AC, induz, significativamente ($P < 0.05$ e $P < 0.0001$), apoptoses e necroses em células de Sarcoma 180. No entanto, estes efeitos são significativamente ($P < 0.05$) modulados pelo AA. Em relação aos significantes efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos da associação AC, os dados foram significantes para a formação de micronúcleos, que foram modulados pelo co-tratamento com AA. De forma similar aos dados da DOX relativos aos danos citogenéticos, o AC não induziu pontes e brotos (dados não significantes) (**Tabela 1**).

5.3.3 Modulação (%) de danos citogenéticos da CPA, DOX e do AC pelo ácido ascórbico, em culturas de células tumorais (Sarcoma 180)

Os dados apresentados, na **Tabela 1**, sobre os efeitos modulatórios do AA frente aos danos citogenéticos dos antineoplásicos CPA, DOX e AC foram plotados em percentuais de modulação (%M) para as alterações citogenéticas do tipo apoptose, necrose, micronúcleos e pontes. O cálculo do % de modulação foi realizado pela fórmula:

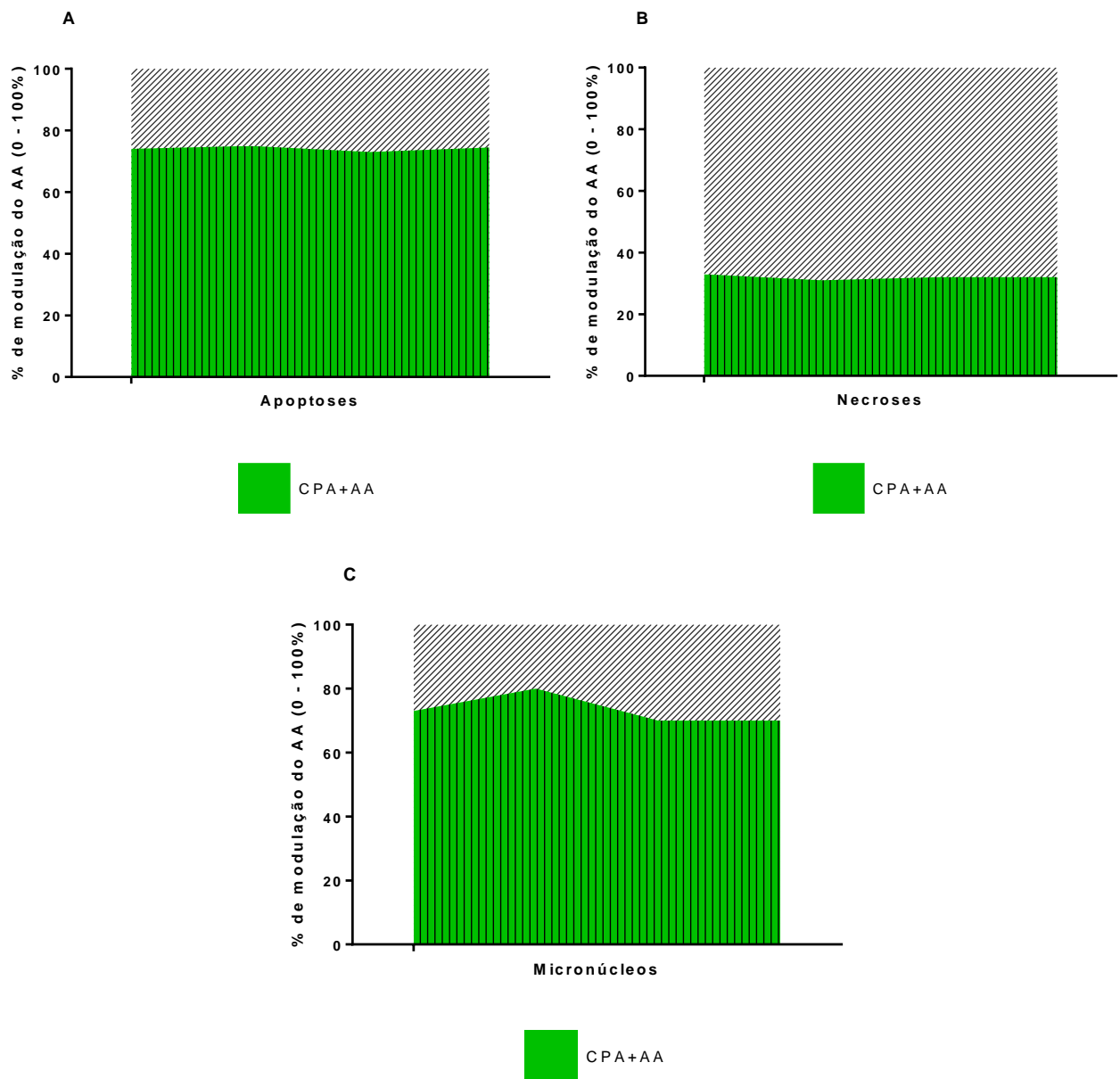
$$\%M = \frac{A - B}{A} \times 100$$

onde, %M (percentual de modulação do AA); A (Alterações citogenéticas induzidas pelo antineoplásico); B (Alterações citogenéticas do co-tratamento com AA).

O ácido ascórbico modula, significativamente, as apoptoses induzidas pela CPA, com médias de 74% ($74,13 \pm 0.85$) de modulação (**Figura 2A**); entretanto, ocorre cerca de 32% (32 ± 0.81) de modulação para necroses (**Figura 2B**), indicando uma melhor performance para a modulação de apoptoses.

De forma similar, o AA modula, significativamente, os efeitos aneugênicos e clastogênicos induzidos pela CPA, em células tumorais de Sarcoma 180, com 70% ($70,25 \pm 4,71$) de inibição dos micronúcleos (**Figura 2C**). Cabe relatar que as pontes induzidas pela CPA não foram moduladas pelo AA.

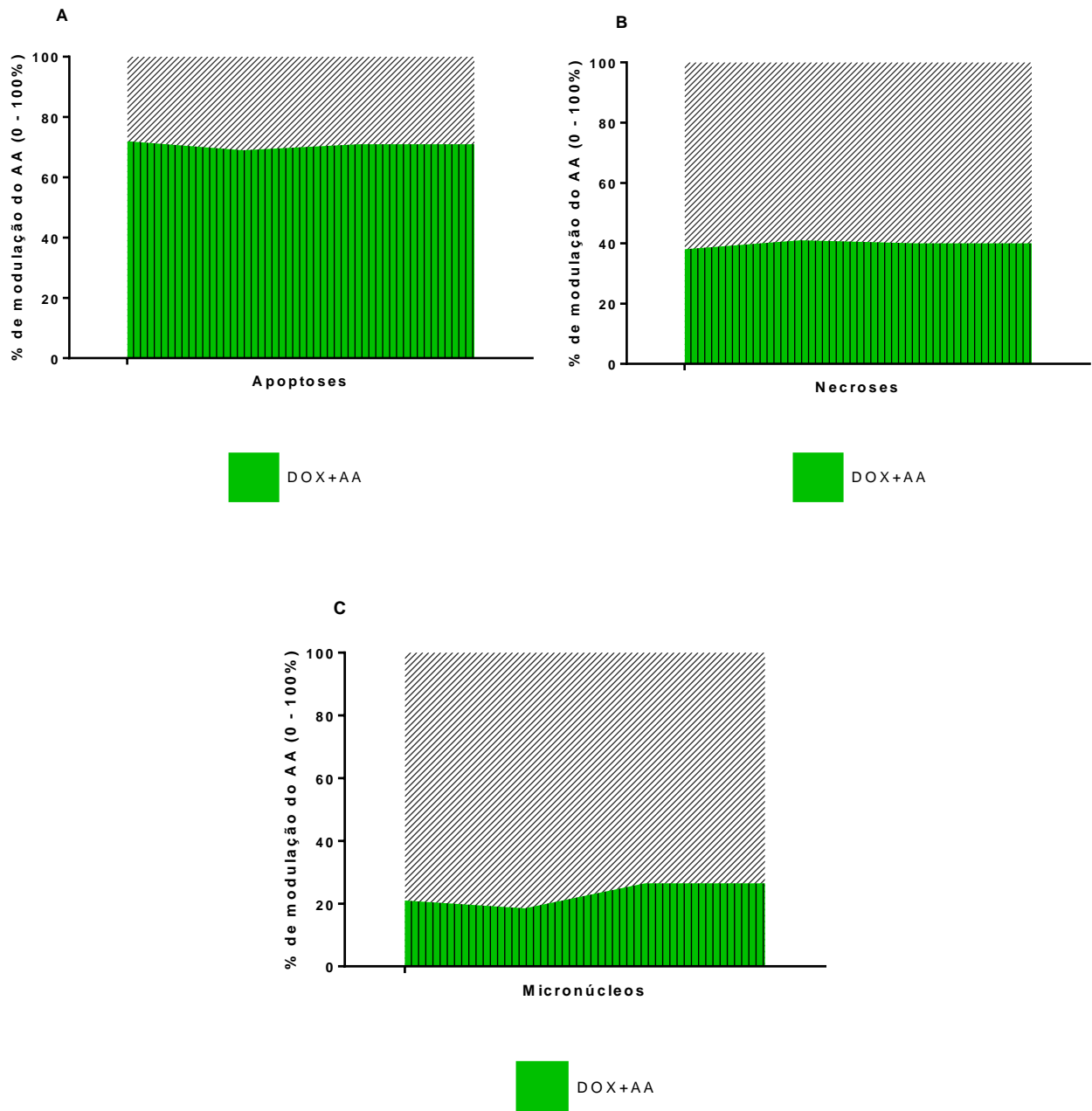
Figura 2. Percentuais dos efeitos do ácido ascórbico na modulação dos danos citogenéticos induzidos pela ciclofosfamida em culturas de células tumorais de Sarcoma 180.



Legenda: CPA: Ciclofosfamida (20 mg/mL); AA: Ácido Ascórbico (2 μ mol).

As apoptoses, induzidas pela DOX, foram significativamente moduladas pelo AA, com mais de 70% ($70,25 \pm 1,25$), de forma similar a CPA (**Figura 3A**). Assim como o observado para CPA, o percentual de modulação do AA em relação às necroses foi menor (40%, $39,75 \pm 1,25$) (**Figura 3B**). A mutagenicidade (aumento de micronúcleos induzidos pela DOX) foi significativamente modulada pelo AA (21%, $21,13 \pm 4,2$) (**Figura 3C**).

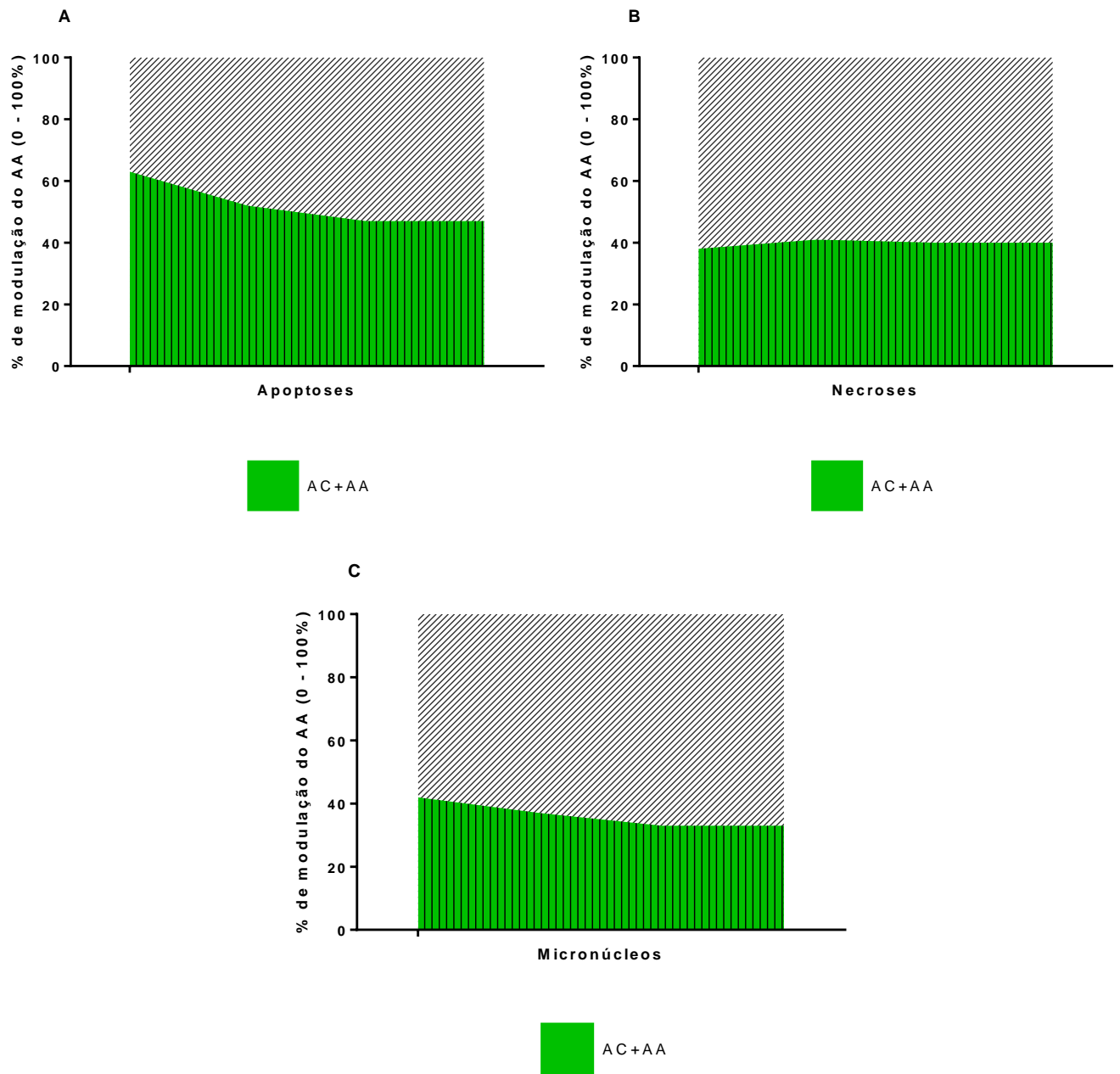
Figura 3. Percentuais dos efeitos do ácido ascórbico na modulação dos danos citogenéticos induzidos pela doxorubicina em culturas de células tumorais de Sarcoma 180.



Legenda: DOX: doxorubicina (2 mg/mL); AA: ácido ascórbico (2 μmol).

Como observado na **Tabela 1**, os percentuais de modulação dos efeitos citogenéticos induzidos pelo AC foram menores em relação aos observados para CPA e DOX. Entretanto, o AA modulou cerca de 60% ($52,2 \pm 7,54$) para os danos apoptóticos (**Figura 4A**), e de 31% ($31,9 \pm 1,25$) para as necroses (**Figura 4B**). Os micronúcleos foram modulados pelo AA em 42% ($39,2 \pm 4,27$) (**Figura 4C**). Apesar das pontes induzidas pela CPA, em todos os tratamentos não foram observados efeitos do AA sobre as alterações citogenéticas do tipo brotos e pontes (**Tabela 1**).

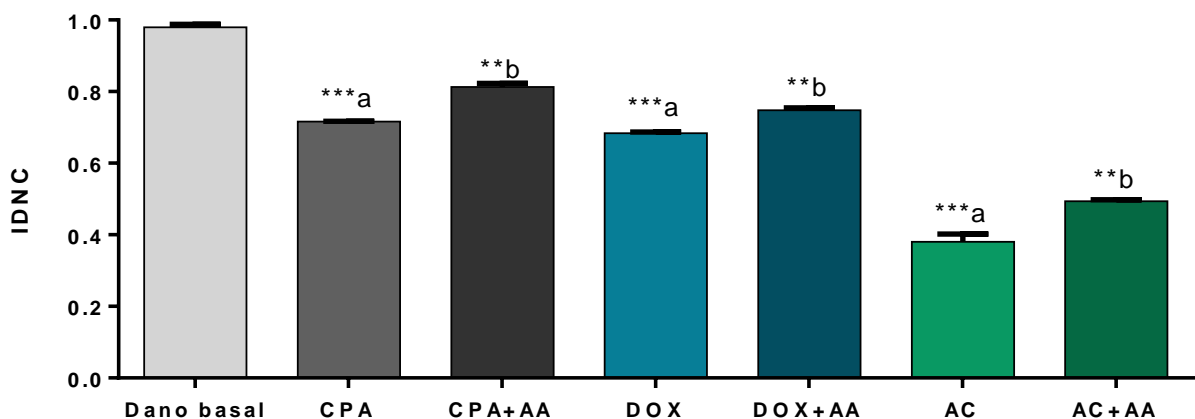
Figura 4. Percentuais dos efeitos do ácido ascórbico na modulação dos danos citogenéticos induzidos pelo AC, em culturas de células tumorais de Sarcoma 180.



Legenda: AC: doxorubicina (2 mg/mL) + ciclofosfamida (20 mg/mL); AA: ácido ascórbico (2 μ mol).

A avaliação da toxicidade geral dos antineoplásicos CPA, DOX e AC, bem como os efeitos do AA neste parâmetro, foi avaliada por meio do cálculo do IDMC (Índice de divisão nuclear considerando a citotoxicidade). A proporção de apoptoses e de necroses reflete a sensibilidade celular ao tratamento dos antineoplásicos testados. A CPA, DOX e AC apresentaram toxicidade, com significância em relação aos danos basais (Sarcoma sem tratamento) (**Figura 5**). Entretanto, o co-tratamento com o AA modulou a toxicidade/citotoxicidade induzidas pelos antineoplásicos.

Figura 5. Análise da toxicidade dos antineoplásicos CPA, DOX e AC em Sarcoma 180.



Legenda: Os dados correspondem a Média \pm D.P de duas lâminas, sendo avaliadas 1000 células por lâmina. CPA: ciclofosfamida (20 mg/mL); DOX: doxorubicina (2 mg/mL); AC: doxorubicina (2 mg/mL) + ciclofosfamida (20 mg/mL); AA: ácido ascórbico (2 μ mol). ANOVA-*one-way* e pós-teste de *Newman-keuls*. ^a P<0.0001 comparado ao Dano basal (controle negativo). ^b P<0.001 comparado aos antineoplásicos.

Por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) foi detectado a presença de células em apoptose, necrose, também alterações nucleares, como brotos e pontes nucleoplasmáticas. Foram seguidos todos os critérios de identificação estabelecidos por Fenech et al. (2011). O teste de micronúcleos descrito por este é muito utilizado na monitoração de compostos genotóxicos e se revelou bastante eficaz como marcador de danos cromossômicos. Como observado no perfil fotomicrográfico, a CPA, DOX e AC induziram danos citogenéticos do tipo apoptose, necrose, brotos e micronúcleos (indicados pelas siglas e setas). O perfil fotomicrográfico do co-tratamento dos antineoplásicos com AA mostrou alterações nas frequências desses danos citogenéticos (**Figura 6**).

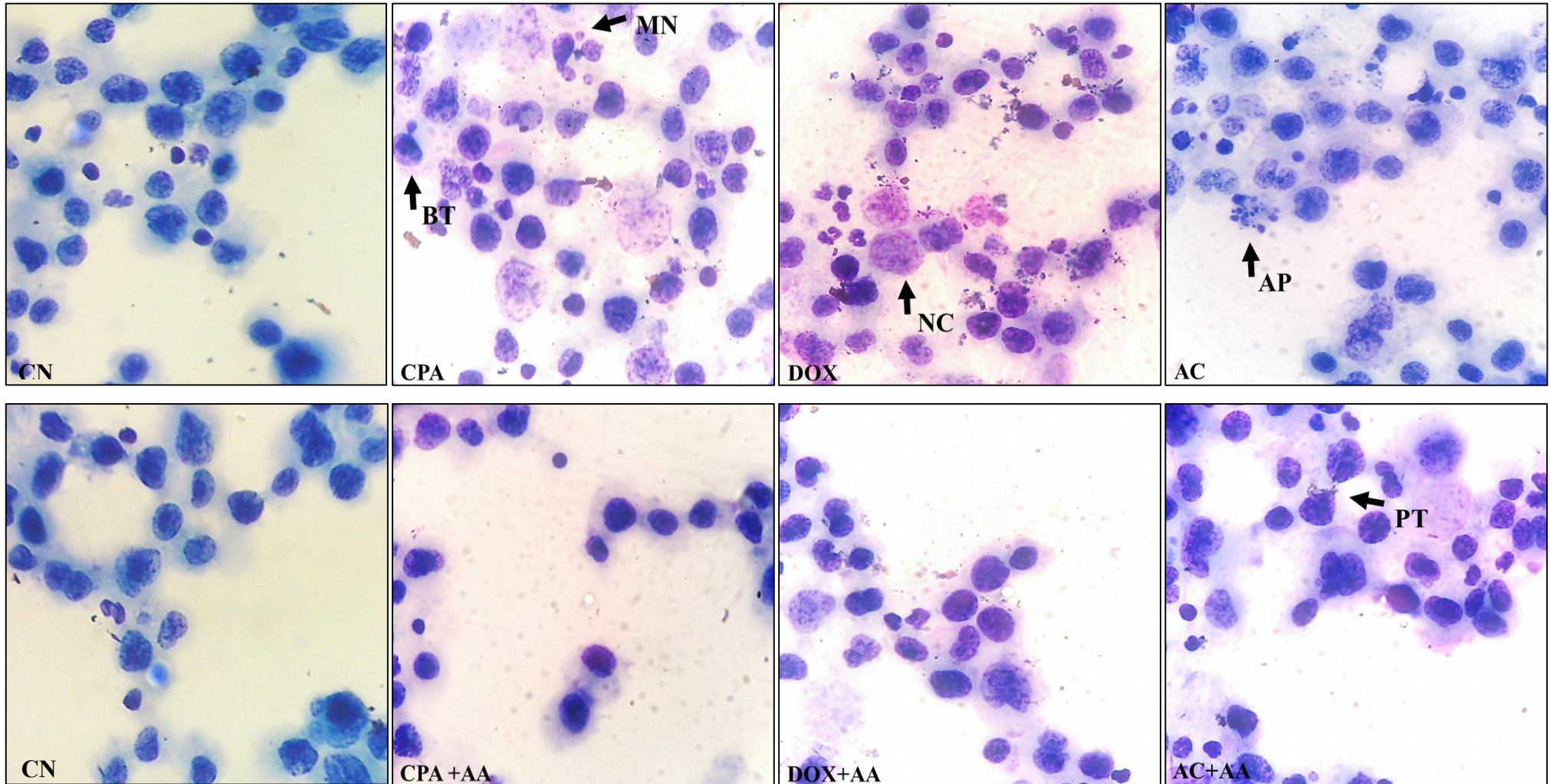
5.3.4 Avaliação de danos citogenéticos da CPA, DOX e AC em células não tumorais de sangue periférico expostas *ex vivo* aos antineoplásicos

A avaliação dos níveis de apoptose em células não tumorais foi realizada com a aplicação do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese *ex vivo* em células de sangue periférico de camundongos. Ambos antineoplásicos, ciclofosfamida e doxorrubicina, induziram apoptoses de forma significativa, tanto de forma isolada, como associados (**Figura 7A**). Os dados apontam que estes antineoplásicos também induzem danos em culturas de células não tumorais.

De forma similar ao observado em relação à apoptose, os antineoplásicos em estudo induziram necrose em linfócitos de sangue periférico de forma significativa ($P < 0.001$) (**Figura 7B**). Em relação à indução de pontes, como observado em células tumorais de Sarcoma 180, durante a exposição *ex vivo* de sangue periférico de camundongos, também foram observados danos significativos ($P < 0.05$) para pontes em AC.

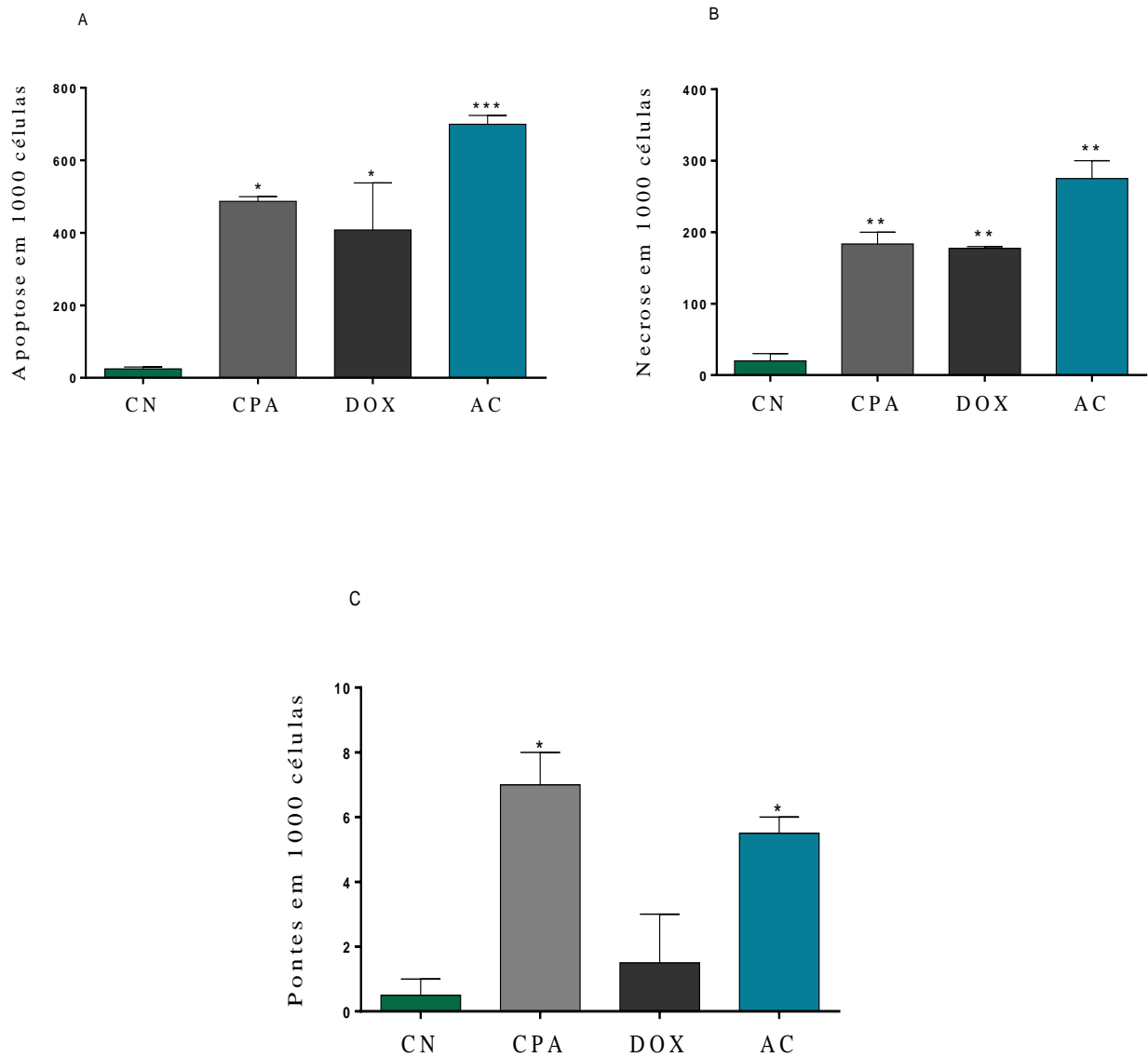
A ciclofosfamida e a doxorrubicina, bem como o esquema AC usados na quimioterapia do câncer induzem aberrações cromossômicas do tipo pontes, observadas em células não neoplásicas (**Figura 7C**), mas não observadas em culturas de células tumorais do tipo Sarcoma 180, exceto para a CPA, que induziu pontes de forma significativa (**Tabela 1**). Não foram observados brotos em linfócitos induzidos pelos antineoplásicos ($P > 0.05$).

Figura 6. Perfil fotomicrográfico das células de Sarcoma 180 expostas aos antineoplásicos e ao ácido ascórbico. Nos dois primeiros quadrantes CN, seguido de CPA, DOX, e por AC.



Legenda: CN: controle negativo; CPA: ciclofosfamida 20 mg/mL; DOX: doxorubicina 2 mg/mL; AC: ciclofosfamida + doxorubicina (20:2 mg/mL); AA: ácido ascórbico 2 μ mol; AP: apoptose; NC: necrose; MN: micronúcleo; BT: broto; PT: Ponte. Coloração por Giemsa 5%, aumento de 1000X.

Figura 7. Danos citogenéticos induzidos pela CPA, DOX e AC em linfócitos de sangue periférico de camundongos expostos *ex vivo* aos antineoplásicos.



Legenda: CN: controle negativo; CPA: Ciclofosfamida (20 mg/kg); DOX: Doxorrubicina (2 mg/kg); AC: Doxorrubicina (2 mg/kg) + Ciclofosfamida (20 mg/kg). ANOVA-*one-way* e pós-teste de *Newman-keuls*. * $P < 0,05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ em relação ao controle negativo.

5.4 Discussão

Embora os benefícios dos antioxidantes, a exemplo da vitamina C (ácido ascórbico), já sejam bem descritos na prevenção do câncer, ainda existem dúvidas sobre suas interferências na quimioterapia, pois eles captam o radical superóxido, e, conseqüentemente, esgotam o fornecimento de peróxido de hidrogênio intracelular, o que agrava o câncer. Mas, por outro lado, eliminam os radicais hidroxilas. Assim, o uso de antioxidantes podem diminuir os efeitos da quimioterapia ou radioterapia, devido à eliminação dos radicais livres, já que a radiação e a maioria das drogas antineoplásicas atuam justamente na produção de radicais livres para combater as células cancerosas (ABDOLLAHI; SHETAB-BOUSHEHRI, 2012).

O modo de ação de drogas antitumorais é essencial para o desenvolvimento de novas drogas. Acredita-se que a atividade antitumoral é mediada pela capacidade de certas drogas induzirem danos ao DNA e desencadearem a apoptose. A seleção de quimioterápicos é baseada na citotoxicidade específica para o tipo de célula tumoral e relativamente baixa toxicidade para células e tecidos normais. Entretanto, a toxicidade para células normais possui uma maior alteração clínica, principalmente quando células malignas adquirem resistência à quimioterapia, a qual resulta de fatores como variação individual, heterogeneidade genética no tumor e evolução tumoral (LEE; RAFFAGHELLO; LONGO, 2012).

A apoptose é um processo de respostas a vários estresses celulares, dentre eles danos ao DNA, sendo considerada como uma das bases para a resposta terapêutica (NOWSHEEN; YANG, 2012). Em nossos estudos, a CPA induz apoptose em Sarcoma 180 (**Tabela 1, Figura 2**) e em linfócitos de sangue periférico de camundongos (**Figura 7**). Estes dados apontam ação da CPA em células neoplásicas e em células não neoplásicas. As espécies reativas de oxigênio exercem papel central nos mecanismos redox envolvidos na sinalização e controle da apoptose no citosol e nas mitocôndrias que liberam o citocromo c, que são eventos iniciais da apoptose. As enzimas antioxidantes, a exemplo da S-Glutationa, exercem papel no sítio catalítico das cisteínas que podem ativar e inativar as caspases no controle da apoptose (CIRCU; AW, 2010).

Um dos principais objetivos das terapias para o câncer é matar as células cancerosas. As várias formas de morte celular, incluindo apoptose e necrose podem levar à morte destes tipos de células. Mesmo com a grande variabilidade do câncer, estudos apontam que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes de boa parte dos tumores malignos. Os medicamentos utilizados na quimioterapia resultam em danos ao DNA e resposta ao estresse, podendo acarretar a morte apoptótica, em algumas células cancerosas. A CPA é um importante antineoplásico utilizado no tratamento do câncer, pois induz elevado número de apoptoses (DAI

et al., 2013; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007), que pode ser relacionado à ação de espécies reativas de oxigênio (FARSHID, TAMADDONFARD, RANJBAR, 2013).

Entretanto, os antioxidantes protegem a pele contra o câncer pois sequestram e quelam os radicais livres, como também regulam enzimas de reparo de DNA e de fatores pós-transcricionais (GODIC et al., 2014). Altos níveis de dietas com antioxidantes e/ou suplementação pode interferir na ação dos agentes quimioterápicos pró-oxidantes (BICHSEL et al., 2013). A associação de co-tratamento do ácido ascórbico, na concentração de 2 μmol , com a CPA, bem como no esquema AC ocasionou a modulação de apoptoses induzidas pelos antineoplásicos em cerca de 74% e 47 %, respectivamente (**Tabela 1, Figuras 2 e 4**).

Heaney et al. (2008) indicaram que a vitamina C atenua os efeitos citotóxicos de agentes antineoplásicos. O pré-tratamento de duas linhagens celulares derivadas de um paciente com linfoma folicular e outro com leucemia mieloblástica com a vitamina C levou a uma diminuição na apoptose dependente da dose com todos os agentes testados. A apoptose foi reduzida entre 37-82%. Esse fato também foi observado no presente estudo, onde a quantidade de apoptose foi reduzida no co-tratamento da ciclofosfamida com a vitamina C, quando comparadas com o tratamento apenas com a ciclofosfamida (BICHSEL et al., 2013).

Os resultados encontrados no estudo realizado por Shatzer et al. (2013) também demonstraram que, em concentrações farmacológicas, o ácido ascórbico foi altamente antagônico em relação ao bortezomibe *in vitro* para células B positivas para Vírus de Epstein-Barr. O bortezomib é um inibidor do proteossoma 26S e, assim como a ciclofosfamida, ele mostra atividade antitumoral em uma variedade de doenças malignas (ZHANG et al., 2014).

Estudos *in vitro*, de células humanas MCF-7 em exposição ao AA, causa atenuação do antineoplásico podendo afetar a resposta terapêutica (SUBRAMANI et al., 2014). Mas, também existem relatos indicando que a vitamina C pode aumentar a efetividade de quimioterápicos, que pode reduzir a toxicidade dos antineoplásicos, mas também pode prevenir radicais livres e neutralizar alguns carcinógenos (CHAMBIAL et al., 2013; LEE et al., 2002). A identificação da variedade de respostas à terapia do câncer requer conhecimento de variáveis incluindo medicações concomitantes, o que pode alterar o metabolismo e a farmacocinética da quimioterapia. Estudos clínicos apontaram interações medicamentosas (HANIGAN et al., 2011).

Diversos estudos epidemiológicos que investigaram os efeitos da vitamina C contra o câncer de mama apontam muitos resultados inconsistentes, mas há relatos de que a vitamina C reduz o risco de câncer de mama, devido a sua ação antioxidante para proteção de danos ao DNA, por neutralizar os radicais livres e bloquear a iniciação da carcinogênese (WANG, WANG; YU, 2014).

A DOX é uma das mais eficientes drogas anticâncer, mas seu uso clínico é limitado pelos seus efeitos adversos, tais como a indução de cardiotoxicidade por peroxidação lipídica (JOHNKENNEDY e IFEOMA, 2012). Estes efeitos são ocasionados por estresse oxidativo e minimizados pelo uso de antioxidantes (CHENNURU; SALEEM, 2013). Cabe também relatar que a DOX induziu significativo aumento de apoptose em células de Sarcoma 180 (**Tabela 1**), bem como em linfócitos de camundongos (**Figura 7**). Entretanto, este dano citogenético foi também modulado pelo ácido ascórbico em 40 % (**Figura 3**).

Existem relatos sobre os efeitos dos antioxidantes tais como vitamina C, tocoferol e carotenoides que podem inibir os efeitos de uma variedade de drogas citostáticas (5-fluorouracil, doxorubicina e vincristina) em diversas culturas e linhagens celulares (MOSS, 2006; PRASAD; KUMAR, 1999), podendo diminuir os efeitos tóxicos em sistemas celulares (BLOCK, KOCH, 2007).

Como relatado anteriormente, o ácido ascórbico modula a indução de apoptose pelos antineoplásicos CPA, DOX, e AC. Entretanto, além de apoptose, os dados apontam que a CPA, DOX e AC também induzem necrose, que também foram moduladas pelo AA em cerca de 30 a 42% (**Tabela 1, Figuras 2, 3 e 4**). A quimioterapia é comumente bem tolerada, entretanto resultados de tratamentos que induzem necrose são preditivas para riscos de metástase, e esta informação pode ser útil para terapias sistêmicas (MACDERMED et al., 2010).

A apoptose induzida pela quimioterapia envolve a ativação da via de morte mitocondrial, que está firmemente regulada pelo balanço entre as proteínas da família pró e antiapoptóticas Bcl-2. A ativação de proteínas Bcl-2 pró-apoptóticas leva à permeabilização da mitocôndria, e a libertação para o citosol de fatores apoptogênicos tais como citocromo c. O citocromo c, em seguida, participa na ativação de pró-caspase-9 em caspase-9, a qual, por sua vez, ativa caspases executoras (BARROS et al., 2013; BROWN; BORUTAITE, 2007).

Diferentes caminhos para morte celular têm sido observados, dentre eles a apoptose reconhecida pela fragmentação nuclear, com ativação das caspases e ausência de processo inflamatório, a autofagia caracterizada pela presença de grandes vacúolos que induz uma resposta inflamatória, e a necrose que não é controlada, caracterizada por rupturas de membranas e indução de resposta inflamatória (SUZANNE; STELLER, 2013).

Além dos danos citogenéticos por apoptose e necrose, como observado no perfil fotomicrográfico na **Figura 6**, a CPA, DOX e AC também induzem micronúcleos. Entretanto, o ácido ascórbico modula apenas em CPA (70 %) e AC (42%). Os micronúcleos são formados a partir de todo o cromossomo ou de um fragmento dele e são induzidos pelo estresse genotóxico (SUNG et al., 2013). Também foram observadas outras alterações citogenéticas do tipo ponte, mas que não foram moduladas pelo AA (**Tabela 1**).

Muitos pacientes em tratamento de câncer usam micronutrientes, suplementos para minimizar os efeitos colaterais do tratamento. Existem muitas concordâncias sobre os efeitos dos antioxidantes que podem decrescer os efeitos da quimioterapia, mas também aumentam as evidências dos benefícios dos antioxidantes em altas concentrações, como pró-oxidantes para os efeitos citotóxicos. Neste contexto, é importante explorar o uso de antioxidantes e de outros micronutrientes suplementares, como estratégia educativa sobre as potencialidades, efeitos benéficos e negativos (GROBER, 2009).

5.5 Conclusão

Os dados do presente estudo indicam que os antineoplásicos CPA, DOX e AC induzem apoptose, necrose e outras alterações citogenéticas do tipo micronúcleos e pontes, em Sarcoma 180 e em linfócitos de sangue periférico de camundongos (exposição *ex vivo*). No entanto, considerando o período de meia-vida dos antineoplásicos, o AA (2 μmol) modula os danos citogenéticos observados. Além disso, atua na inibição de danos oxidativos, que são importantes para o desenvolvimento de apoptoses e de alterações genéticas. Assim, as interações com AA podem interferir nos mecanismos de indução de apoptose e alterações genéticas, aspectos que também são clinicamente apontados para a eficácia da terapia do câncer.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M.; SHETAB-BOUSHEHRI, S. V. Is it right to look for anti-cancer drugs amongst compounds having antioxidant effect? **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 61, p. 587-591, 2012.
- ANVISA. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. **Fármacos utilizados em neoplasia**. Disponível. <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/livro_eletronico/neoplasia. Html>. Data de acesso: 19/09/2014.
- ARAÚJO, A.P.S.; GALVÃO, D.C.A. Câncer ósseo: enfoque sobre a biologia do câncer. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 3, p. 359-363, 2010.
- BARROS, S.; MENCIA, N.; RODRIGUEZ, L.; OLEAGA, C.; SANTOS, C.; NOE, V.; CIUDAD, C. J. The redox state of cytochrome c modulates resistance to methotrexate in human MCF7 breast cancer cells. **PLoS one**, v. 8, n. 5, p. 632-646, 2013.
- BECKER, J.; NARDIN, J.M. Antiemetics utilization in antineoplastic treatment of oncologic patients. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar**, v.2, n.3, p. 18-22, 2011.
- BICHSEL, K.J.; GOGIA, N.; MALOUFF T.; PENA, Z.; FORNEY, E.; HAMMILLER, B.; WATSON, P.; HANSEN, L.A. Role for the epidermal growth factor receptor in chemotherapy-induced alopecia. **PLoS ONE**, v.8, n.7, p. 12-23, 2013.
- BLOCK, K. I.; KOCH, A. C.; MEAD, M. N.; TOTHY, P. K.; NEWMAN, R. A.; GYLLENHAAL, C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. **Cancer treatment reviews**, v. 33, n. 5, p. 407-418, 2007.
- BROWN, G. C.; BORUTAITE, V. Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1777, n. 7-8, p. 877-881, 2008.
- BURNINGHAM, Z.; HASHIBE, M.; SPECTOR, L.; SCHIFFMAN, J.D. The Epidemiology of Sarcoma. **Clinical Sarcoma Research**. v.2, n. 14, p.34-48, 2012.
- CHAMBIAL, S.; DWIVEDI, S.; SHUKLA, K. K.; JOHN, P. J. Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview Praveen Sharma. **Indian Journal Clinical Biochemistry** v. 28, n. 4, p. 314-328, 2013.
- 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. 2013, p. 934-939, 2013.
- CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free radical biology & medicine**, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.
- COLUZZI, E.; COLAMARTINO, M.; COZZI, R.; LEONE, S.; MENEGHINI, C.; O'CALLAGHAN, N.; SGURA, A. Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 110-123, 2014.

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.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**. v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

FARSHID, A. A.; TAMADDONFARD, E.; RANJBAR, S. 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, 2013.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocol**. v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

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

FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 504, n. 1-2, p. 131-136, 2002.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLE, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

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

FINN, N. A.; FINDLEY, H. W.; KEMP, M. L. A switching mechanism in doxorubicin bioactivation can be exploited to control doxorubicin toxicity. **PLoS computational biology**, v. 7, n. 9, p. 100-121, 2011.

FORSCHER, C.; MITA, M.; FIGLIN, R. Targeted therapy for sarcomas. **Biologics : targets & therapy**, v. 8, p. 91-105, 2014.

FRAPOLLI, R.; TAMBORINI, E.; VIRDIS, E.; BELLO, E.; TARANTINO, E.; MARCHINI, S.; GROSSO, F.; SANFILIPPO, R.; GRONCHI, A.; TERCERO, J. C.; PELOSO, G.; CASALI, P.; PILOTTI, S.; D'INCALCI, M. Novel models of myxoid liposarcoma xenografts mimicking the biological and pharmacologic features of human tumors. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 16, n. 20, p. 4958-4967, 2010.

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

GODIC, A.; POLJSAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. v. 14, n. 20, p. 860-879, 2014.

GOESSLER, K.F.; RUIZ, R.J.; SIMÃO, A.N.C.; SIQUEIRA, C.P.C.M.; RAMOS, S.P.; POLITO, D.M. Efeito citotóxico provocado por ciclofosfamida na massa corporal e no tecido muscular estriado esquelético de ratos treinados. **Revista da Educação Física/UEM**, v. 22, n. 2, p. 273-281, 2011.

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

GROBER, U. Antioxidants and Other Micronutrients in Complementary Oncology. **Breast care (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 1, p. 13-20, 2009.

GUIMARÃES, J.R.Q. **Manual de Oncologia**, São Paulo: BBS Editora, 2004.

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

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

HEANEY, M. L.; GARDNER, J. R.; KARASAVVAS, N.; GOLDE, D. W.; SCHEINBERG, D. A.; SMITH, E. A.; O'CONNOR, O. A. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. **Cancer research**, v. 68, n. 19, p. 8031-8038, 2008.

HERCOS, T.M.; VIEIRA, F.S.; OLIVEIRA, M.S.; BUETTO, L.S.; SHIMURA, C.M.N.; SONOBE, H.M.N. O trabalho dos profissionais de enfermagem em unidades de terapia intensiva na assistência ao paciente oncológico. **Revista Brasileira de cancerologia**, v. 60, n. 1, p. 51-58, 2014.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2014**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>. Data de acesso: 13/01/2014. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

JOHNKENNEDY, N.; IFEOMA, U.H. Cardioprotective effect of Gnetum Bucholizianum leaf extract against doxorubicin cardiomyopathy in Wistar rats. **Novel Science**, v. 1, n. 3, p. 61-64, 2012.

JOY, M. S.; LA, M.; WANG, J.; BRIDGES, A. S.; HU, Y.; HOGAN, S. L. Cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide pharmacokinetics in patients with glomerulonephritis secondary to lupus and small vessel vasculitis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 74, n. 3, p. 445-455, 2012.

KIEVIT, F. M.; WANG, F. Y.; FANG, C.; MOK, H.; WANG, K.; SILBER, J. R.; ELLENBOGEN, R. G.; ZHANG, M. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 152, n. 1, p. 76-83, 2011.

KRYSKO, D. V.; VANDEN BERGHE, T.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 44, n. 3, p. 205-221, 2008.

LEE, C.; RAFFAGHELLO, L.; LONGO, V. D. Starvation, detoxification, and multidrug resistance in cancer therapy. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 15, n. 1-2, p. 114-122, 2012.

LEE, K. W.; LEE, H. J.; KANG, K. S.; LEE, C. Y. Preventive effects of vitamin C on carcinogenesis. **Lancet**, v. 359, n. 9301, p. 172-184, 2002.

MACDERMED, D. M.; MILLER, L. L.; PEABODY, T. D.; SIMON, M. A.; LUU, H. H.; HAYDON, R. C.; MONTAG, A. G.; UNDEVIA, S. D.; CONNELL, P. P. Primary tumor necrosis predicts distant control in locally advanced soft-tissue sarcomas after preoperative concurrent chemoradiotherapy. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 76, n. 4, p. 1147-1153, 2010.

McCUNE, J. S.; SALINGER, D. H.; VICINI, P.; OGLESBY, C. Population Pharmacokinetics of Cyclophosphamide and Metabolites in Children with Neuroblastoma: a Report from the Children's Oncology Group. **Journal of clinical pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 88-102, 2009.

MCHUGH, M.K.; LOPEZ, M.S.; HO, C.H.; SPITZ, M.R.; ETZEL, C.J.; EL-ZEIN, R.A. Use of the Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay (CBMN) to Detect Gender Differences and Genetic Instability in a Lung Cancer Case-Control Study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.22, n.1, p.135-145, 2013.

MOSS, R. W. Should patients undergoing chemotherapy and radiotherapy be prescribed antioxidants? **Integrative cancer therapies**, v. 5, n. 1, p. 63-82, 2006.

NATHAN, F.M.; SINGH, V. A.; DHANOA, A.; PALANISAMY, U. D. Oxidative stress and antioxidant status in primary bone and soft tissue sarcoma. **BMC Cancer**, v. 11, n. 382, p.2-7, 2011.

NOWSHEEN, S.; YANG, E. S. The intersection between DNA damage response and cell death pathways. **Experimental oncology**, v. 34, n. 3, p. 243-254, 2012.

PANDEL, R.; POLJSAK, B.; GODIC, A.; DAHMANE, R. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. **ISRN dermatology**, v. 13, n. 3, p. 930-944, 2013.

PARK, J. H.; DAVIS, K. R.; LEE, G.; JUNG, M.; JUNG, Y.; PARK, J.; YI, S. Y.; LEE, M. A.; LEE, S.; YEOM, C. H.; KIM, J. Ascorbic acid alleviates toxicity of paclitaxel without interfering with the anticancer efficacy in mice. **Nutrition research (New York, N.Y.)**, v. 32, n. 11, p. 873-883, 2012.

PRADEEP, M. R.; GURUPRASAD, Y.; JOSE, M.; SAXENA, K. K. D.; PRABHU, V. Comparative Study of Genotoxicity in Different Tobacco Related Habits using Micronucleus Assay in Exfoliated Buccal Epithelial Cells. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 8, n. 5, p. 341-354, 2014.

PRASAD, K. N.; KUMAR, A.; KOCHUPILLAI, V.; COLE, W. C. High doses of multiple antioxidant vitamins: essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 13-25, 1999.

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

SAMOYLENKO, A.; HOSSAIN, J. A.; MENNERICH, D.; KELLOKUMPU, S.; HILTUNEN, J. K.; KIETZMANN, T. Nutritional countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer: from mechanisms to biomarkers and clinical evidence. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 17, p. 2157-2166, 2013.

SHATZER, A.; ESPEV, M.G.; CHAVEZ, M.; TU, H.; LEVINE, M.; COHEN, E. Ascorbic acid kills epstein-barr virus (ebv) positive burkitt lymphoma cells and ebv transformed b-cells in vitro, but not in vivo. **Leukemia & Lymphoma**, v. 54, n. 5, p. 1069-1078, 2013.

SUBRAMANI, T.; YEAP, S.K.; HO, W. Y.; HO, C. L.; OMAR, A. R.; AZIZ, S. A.; RAHMAN, N. M. A. N. A.; ALITHEEN, N. B. 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.

SUNG, C.C.; HSU, Y.C.; CHEN, C.C.; LIN, Y.F.; WU, C.C. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2, n.7, p. 205-217, 2013.

SUZANNE, M.; STELLER, H. Shaping organisms with apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 20, n. 5, p. 669-675, 2013.

TAYLOR, B. S.; BARRETINA, J.; MAKI, R. G.; ANTONESCU, C. R.; SINGER, S.; LADANYI, M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 8, p. 541-557, 2011.

TRABER, M. G.; STEVENS, J. F. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 1000-1013, 2011

WANG, Y. Y.; WANG, X. L.; YU, Z. J. Vitamin C and E intake and risk of bladder cancer: a meta-analysis of observational studies. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 7, n. 11, p. 4154-4164, 2014.

ZHANG, X.; LI, W.; WANG, C.; LENG, X.; LIAN, S.; FENG, J.; LI, J.; WANG, H. Inhibition of autophagy enhances apoptosis induced by proteasome inhibitor bortezomib in human glioblastoma U87 and U251 cells. **Molecular Cell Biochemistry**, v.385, p. 265-275, 2014.

6 CAPÍTULO III: Atividade oxidante dos antineoplásicos ciclofosfamida e doxorrubicina e os efeitos antioxidantes do ácido ascórbico em *Saccharomyces cerevisiae*

(Artigo submetido à *Yeast*)

Qualis B1

Atividade oxidante dos antineoplásicos ciclofosfamida e doxorrubicina e o efeito antioxidante do ácido ascórbico em *Saccharomyces cerevisiae*

Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar¹, Melissa¹, Mayara¹, Milena Braga Soares Silva¹, Teófilo Alexandro Vieira Lima Cavalcante¹, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz¹, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata¹, Rivelilson Mendes de Freitas¹, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina – Brasil

Resumo

O uso clínico de antioxidantes durante a quimioterapia ainda vem sendo bastante discutido, devido a várias controvérsias do seu potencial de reduzir a eficácia citotóxica de quimioterápicos tais como a ciclofosfamida e a doxorrubicina, bem como de suas interações farmacocinéticas. O ácido ascórbico possui uma potente atividade de limpeza de radicais livres no plasma, protegendo as células contra os danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio. O presente estudo avaliou as atividades oxidantes dos antineoplásicos ciclofosfamida, doxorrubicina e de suas interações no esquema AC, em linhagens de *S. cerevisiae* proficiente e mutadas em defesas antioxidantes para as enzimas superóxido dismutase e catalase, bem como os efeitos do ácido ascórbico na modulação destes danos. Os antineoplásicos ciclofosfamida, doxorrubicina e suas interações, como no esquema AC induziram significativamente danos oxidativos em todas as linhagens de *S. cerevisiae* testadas, quando comparadas com as linhagens sem tratamento. Cabe enfatizar que a ciclofosfamida (20 mg/mL) induziu oxidação com significância em relação ao peróxido de hidrogênio, enquanto para doxorrubicina (2 mg/mL) os efeitos foram contrários, em todas as linhagens testadas. Entretanto, o ácido ascórbico (2 µmol) em co-tratamento com os antineoplásicos modulou, significativamente, os danos oxidativos, com percentuais para a maioria das linhagens testadas acima de 50%, especialmente para a superóxido dismutase selvagem (70% pela ciclofosfamida) e para o duplo mutante sod1cat1Δ (62% para doxorrubicina). No entanto, para o duplo mutante sod1sod2Δ, os percentuais foram 45% no co-tratamento com a AC. Os resultados apontam que os danos oxidativos induzidos pelos antineoplásicos em estudo foram modulados pelo ácido ascórbico, interferindo no potencial oxidativo dos antineoplásicos em *S. cerevisiae*. Assim, o ácido ascórbico pode minimizar a apoptose necessária para a ação antitumoral.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Antineoplásicos; Ácido ascórbico; Antioxidante.

Abstract

The clinical use of antioxidants during chemotherapy is still being widely discussed, due to various controversies of its potential to reduce the cytotoxic efficacy of chemotherapy and pharmacokinetic interactions; cyclophosphamide and doxorubicin are two such chemotherapeutic drugs in this context. Ascorbic acid has potent free radical cleaning activity in plasma, protective ability of cells against oxidative damage caused by reactive oxygen species. This study evaluated the oxidizing activity of cyclophosphamide, doxorubicin and their interactions in *Saccharomyces cerevisiae* strains to determine the antioxidant defenses by assaying the enzymes superoxide dismutase and catalase as well as the effects of ascorbic acid in the modulation of such damages. Antineoplastic agents cyclophosphamide, doxorubicin and their interactions, and in CA protocol significantly induced oxidative damage in all *S. cerevisiae* strains tested, as compared with the vehicle (saline solution). It should be emphasized that cyclophosphamide (20 mg/mL) induced significant oxidations compared with hydrogen peroxide, whereas for doxorubicin (2 mg/mL) the effects were contrary, in all strains tested. However, ascorbic acid (2 μ mol) in co-treatment with antineoplastic significantly modulated oxidative damage to the most strains with percentages above 50%, especially for wild superoxide dismutase (70% by cyclophosphamide) and double mutant *sod1cat1 Δ* (62% to doxorubicin). However, for the double mutant *sod1sod2 Δ* the percentages were 45% in co-treatment with AC. The results indicate that oxidative damage induced by antineoplastic in the study were modulated by ascorbic acid, interfering with the oxidative potential of antineoplastic in *S. cerevisiae*. Thus, ascorbic acid can minimize apoptosis required for antitumor activity.

Keywords: Antineoplastic; Antioxidant; Ascorbic acid; Oxidative stress.

6.1 Introdução

O câncer pode ser definido como uma doença crônica degenerativa, onde o crescimento descontrolado de células anormais se propaga por tecidos e órgãos (MELO et al., 2011; HERR et al., 2013). A quimioterapia faz parte da maioria dos tratamentos antineoplásicos. Com ela é possível curar alguns tumores, também sendo possível o tratamento precoce de metástases que não foram detectadas. Porém, este tratamento causa vários efeitos colaterais (COLLING; DUVAL; SILVEIRA, 2012; RODRIGUES; POLIDORI, 2012).

Muitas classes de agentes antineoplásicos são conhecidas por gerar altos níveis de estresse oxidativo em sistemas biológicos, levando a lesões dos tecidos. Vários estudos já relataram estas lesões provocadas por antineoplásicos em órgãos vitais (PUJARI, 2010). A ciclofosfamida (CPA) é uma droga amplamente distribuída pelo corpo, inclusive com passagem pela barreira hematoencefálica. Apresenta biodisponibilidade oral de 75%, com picos plasmáticos em uma hora e meia-vida de duas a dez horas. Como agente alquilante, age atravessando a membrana nuclear, ligando-se ao DNA e inibindo a síntese de guanina, citosina e adenina, ultrapassando a capacidade de reparo, com consequente apoptose (BRESSAN et al., 2010).

A CPA atua exercendo um efeito citotóxico sobre as células de proliferação rápida, por alquilar grupos nucleofílicos em bases de DNA, especificamente na posição 7 do nitrogênio da guanina. Este fato leva à ligação cruzada de bases de DNA, pareamento de base anormal, ou quebra de fita de DNA, fazendo com que as células se danifiquem quando submetidas à mitose (PUJARI, 2010; CHOI et al., 2013). A doxorrubicina (DOX) é um das mais eficientes drogas anticâncer, mas seu uso clínico é limitado pelos seus efeitos adversos, tais como a indução de cardiotoxicidade por peroxidação lipídica (JOHNKENNEDY; IFEOMA, 2012). Esses efeitos são ocasionados por estresse oxidativo e são minimizados pelo uso de antioxidantes (CHENNURU; SALEEM, 2013).

O estresse oxidativo pode ser descrito como um desequilíbrio existente entre eliminação e geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Estas espécies reativas foram consideradas exclusivamente prejudiciais para as células. A regulação da redução-oxidação envolvendo espécies reativas de oxigênio é de extrema importância para a modulação de inúmeras funções celulares (AGUIAR et al., 2012). Os radicais livres são espécies químicas que têm pelo menos um elétron descompartilhado na camada de valência, ou seja, são átomos que possuem reatividade elevada, com um número ímpar de elétrons na sua última camada eletrônica. É justamente essa característica do não emparelhamento de elétrons que leva a alta

reatividade destes átomos ou moléculas (OLIVEIRA; SHOFEN, 2010; BOLISSETTY; JAIMES, 2013).

A peroxidação lipídica da membrana é um dos efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio. Para prevenir efeitos danosos às células, os organismos aeróbicos possuem mecanismos de defesa antioxidante; estes, incluem sistemas enzimáticos e também não enzimáticos. A atividade das enzimas inclui a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPX) e glutathione (GSH), a adição de ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno, a vitamina A, flavonoides e polifenóis, auxiliando, assim, na proteção do organismo contra o estresse oxidativo (ARANGÍZ et al., 2009).

Os antioxidantes são conhecidos como um grupo de substâncias que em ideais concentrações podem atrasar ou inibir os processos oxidativos (VICENTINO; MENEZES, 2007; BOLISSETTY; JAIMES, 2013). A vitamina C (ácido ascórbico) é um antioxidante não enzimático, que é encontrado em altas concentrações no soro e no interior das células. Ela é um antioxidante necessário para uma variedade de funções biológicas (FRANKE et al, 2013; TRABER; STEVENS, 2012). É um micronutriente essencial solúvel em água em seres humanos e é obtido através da dieta, principalmente a partir de frutos e vegetais. A principal propriedade que a torna um antioxidante tão eficiente é o seu baixo potencial de redução de ponto médio que permite a doação imediata de um elétron para espécies reativas de oxigênio (CAR; VISSERS, 2013).

A *Saccharomyces cerevisiae*, perante o ponto de vista genético e metabólico, é um dos organismos eucariotos mais utilizados em testes biológicos. Várias explicações tornam a levedura *S. cerevisiae* um modelo de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo. Seu metabolismo é similar ao dos eucariotos superiores, com mecanismos apropriados de ativação metabólica (citocromo P450) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias (GUARIENT; BERTOLIN; COSTA, 2010; COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001).

Neste contexto, este estudo tem por objetivo avaliar os efeitos oxidantes dos antineoplásicos CPA, DOX e AC e os efeitos antioxidantes do ácido ascórbico na modulação da genotoxicidade da ciclofosfamida, doxorubicina e de suas interações (AC), durante o período de sua meia-vida, por meio do teste do disco central em *S. cerevisiae*.

6.2 Materiais e Métodos

6.2.1 Preparo das substâncias

Os antineoplásicos ciclofosfamida e doxorrubicina foram preparados por meio de diluição com solução salina 0.9% estéril até a concentração final de 20 mg/mL e 2 mg/mL, respectivamente. Estas concentrações para ambos os antineoplásicos foram escolhidas conforme Freedman e Partridge (2011). A associação dos antineoplásicos foi preparada da mesma maneira, mantendo-se as mesmas concentrações da forma isolada. O Ácido Ascórbico (AA) foi solubilizado em tampão fosfato 50 mM até a concentração final de 2 μ mol. Esta concentração foi determinada em virtude do limiar plasmático para efeitos pró-oxidantes do AA (aproximadamente 40-80 μ mol) e pelo fato de que substâncias antioxidantes devem agir em baixas concentrações (HALLIWELL, 2006).

6.2.2 Linhagens utilizadas

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

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

Descrição	Genótipo	Origem
EG103 (SODWT)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	Edith Gralla, L Angeles
EG118 (Sod1 Δ)	sod1::URA3 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG110 (Sod2 Δ)	sod2::TRP1 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG133 (Sod1 Δ Sod2 Δ)	sod1::URA3 sod2::TRP1 double mutant all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG223 (Cat1 Δ)	EG103, except cat1:: TRP1	Edith Gralla, L Angeles
EG (Sod1 Δ Cat1 Δ)	EG103, except sod1:: URA3 and cat1:: TRP1	Edith Gralla, L Angeles

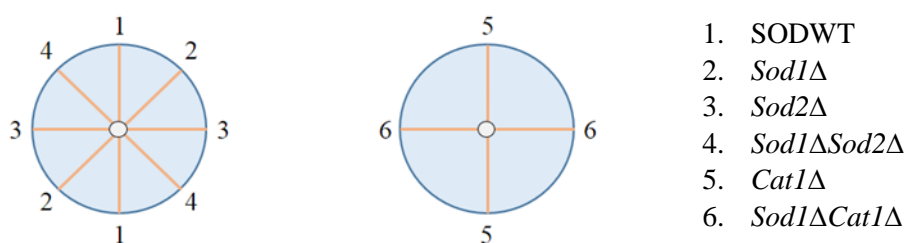
Adaptado de Oliveira et al., 2014.

6.2.3 Teste do disco central em *S. cerevisiae*

As linhagens foram cultivadas em meio YEL (extrato de levedura 0,5%, 2% de Bacto-peptona, 2% de glucose) a 28°C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária, de acordo com Oliveira et al. (2014).

Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem de uma placa de Petri em um ciclo contínuo (**Figura 1**) para ambos os lados da placa contendo no centro um disco de papel de filtro estéril, no qual foi adicionado 100µL das concentrações dos antineoplásicos, bem como 10 µL de AA 2 µmol para o co-tratamento.

Figura 1. Posicionamento das linhagens utilizadas no ensaio com *S. cerevisiae*.



Fonte: Autoria própria.

O período de exposição aos antineoplásicos foi definido com base no período de meia vida dos fármacos no plasma que corresponde a ~7h para ciclofosfamida e ~48h para Doxorrubicina. Após 48h de incubação em estufa a 30°C, os halos de inibição de crescimento das linhagens foram mensurados, sendo estes resultados tabelados e submetidos a tratamento estatístico. A inibição do crescimento leveduriforme foi medida em milímetros desde a margem do disco de papel-filtro para o início do crescimento celular. Os valores podem variar de 0 mm (crescimento completo) a 40 mm (ausência de crescimento), para o tamanho da placa de Petri). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

6.2.4 Avaliação do AA na modulação de danos oxidativos induzidos pelos antineoplásicos

Os valores do percentual de modulação do AA nos danos oxidativos pelos antineoplásicos, ciclofosfamida e doxorrubicina, bem como associados no esquema AC foram calculados de acordo com a seguinte fórmula: $\%M = \frac{A-B+AA}{A} \times 100$

onde, “A” representa os valores das inibições de crescimento induzidos pelos antineoplásicos, e “B+AA” representa os valores das inibições de crescimento induzidos pelos antineoplásicos associados ao AA.

6.2.5 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste de *Newman-Keuls* como *post hoc* teste por meio do programa GraphPad Prism (versão 6.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, Copyright ©).

6.3 Resultados

6.3.1 Avaliação de danos oxidativos induzidos pelos antineoplásicos CPA, DOX e AC e pelo co-tratamento com AA em *Saccharomyces cerevisiae*

Na **Tabela 2**, estão apresentados os valores de inibição dos antineoplásicos ciclofosfamida e doxorrubicina, de forma isolada e associados ao AA, avaliados pelas medidas de halos de inibição de crescimento (0-40 mm). A CPA e o seu co-tratamento com AA induziram significantes danos oxidativos em todas as linhagens testadas, quando comparados com a solução salina. Entretanto, o AA modulou, significativamente, os danos oxidativos induzidos pelo antineoplásico. Além disso, os danos oxidativos induzidos pela CPA foram similares aos induzidos pelo peróxido de hidrogênio. A DOX, em relação à salina, induziu danos oxidativos em todas as linhagens testadas, similarmente ao observado para a CPA, tanto de forma isolada, como associado ao AA (**Tabela 2**).

Os dados apresentados na **Tabela 2** também apontam que a associação da CPA com a DOX, como é usado no esquema AC, induz significantes danos oxidativos. Cabe enfatizar que em concordância com os dados para o tratamento dos antineoplásicos, o AA também modula a oxidação induzida pelo AC, em todas as linhagens testadas.

Tabela 2. Inibição de crescimento induzidos por ciclofosfamida, doxorubicina e AC, e co-tratamento com o ácido ascórbico, em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Dados obtidos pela inibição de crescimento em placas (0-40 mm).

Tratamentos	Linhagens [#]					
	<i>SODWT</i>	<i>Sod1Δ</i>	<i>Sod2Δ</i>	<i>Sod1Sod2Δ</i>	<i>CatΔ</i>	<i>Sod1CatΔ</i>
Salina	0.75 ± 0.50	3.00 ± 0.81	1.00 ± 0.81	1.50 ± 1.29	1.25 ± 0.50	2.50 ± 1.91
H ₂ O ₂	20.2 ± 0.50***a	15.7 ± 2.87***a	17.0 ± 2.70***a	25.2 ± 3.50***a	16.2 ± 2.21***a	15.5 ± 0.57***a
AA	1.00 ± 0.81	2.50 ± 1.29	1.25 ± 0.50	1.75 ± 0.95	2.50 ± 1.29	2.75 ± 0.95
CPA	25.7 ± 3.30***a	34.7 ± 2.50***a	37.2 ± 0.95***a	37.0 ± 1.41***a	33.2 ± 4.03***a	37.2 ± 0.95***a
CPA+AA	7.50 ± 1.29***ab	11.5 ± 2.38***ab	15.7 ± 1.70***ab	17.7 ± 3.30***ab	13.2 ± 1.70***ab	16.2 ± 0.95***ab
DOX	8.75 ± 0.95***a	10.7 ± 0.95***a	10.1 ± 1.41***a	11.2 ± 2.21***a	10.2 ± 1.25***a	11.5 ± 3.00***a
DOX+AA	4.50 ± 1.29***ac	5.00 ± 0.81***ac	5.10 ± 1.80***ac	4.00 ± 1.81***ac	5.00 ± 1.41***ac	4.25 ± 1.25***ac
AC	10.1 ± 0.81***a	10.5 ± 1.29***a	11.0 ± 0.81***a	10.5 ± 1.73***a	10.1 ± 1.81***a	9.25 ± 0.50***a
AC+AA	5.75 ± 0.95***ad	6.25 ± 0.95***ad	7.50 ± 1.29***ad	6.00 ± 1.15***ad	6.75 ± 1.25***ad	5.50 ± 1.29***ad

[#]Os valores correspondem a Média ± Desvio padrão das medidas dos halos de inibição de crescimento das linhagens. AA: Ácido Ascórbico (2 mM). CPA: Ciclofosfamida (20 mg/mL). DOX: Doxorubicina (2 mg/mL). AC (20 mg:2mg/mL): ciclofosfamida + doxorubicina. ANOVA-*one-way* e pós-teste de *Newman-keuls*. Valores de significância para ^a P<0.001 comparado à salina; ^b P<0.001 comparado à CPA; ^c P<0.001 comparado à DOX; ^d P<0.001 comparado ao AC.

6.3.2 Percentuais de inibição de crescimento de *S. cerevisiae* pela CPA, DOX e AC em comparação com os danos oxidativos induzidos pelo AA e H₂O₂

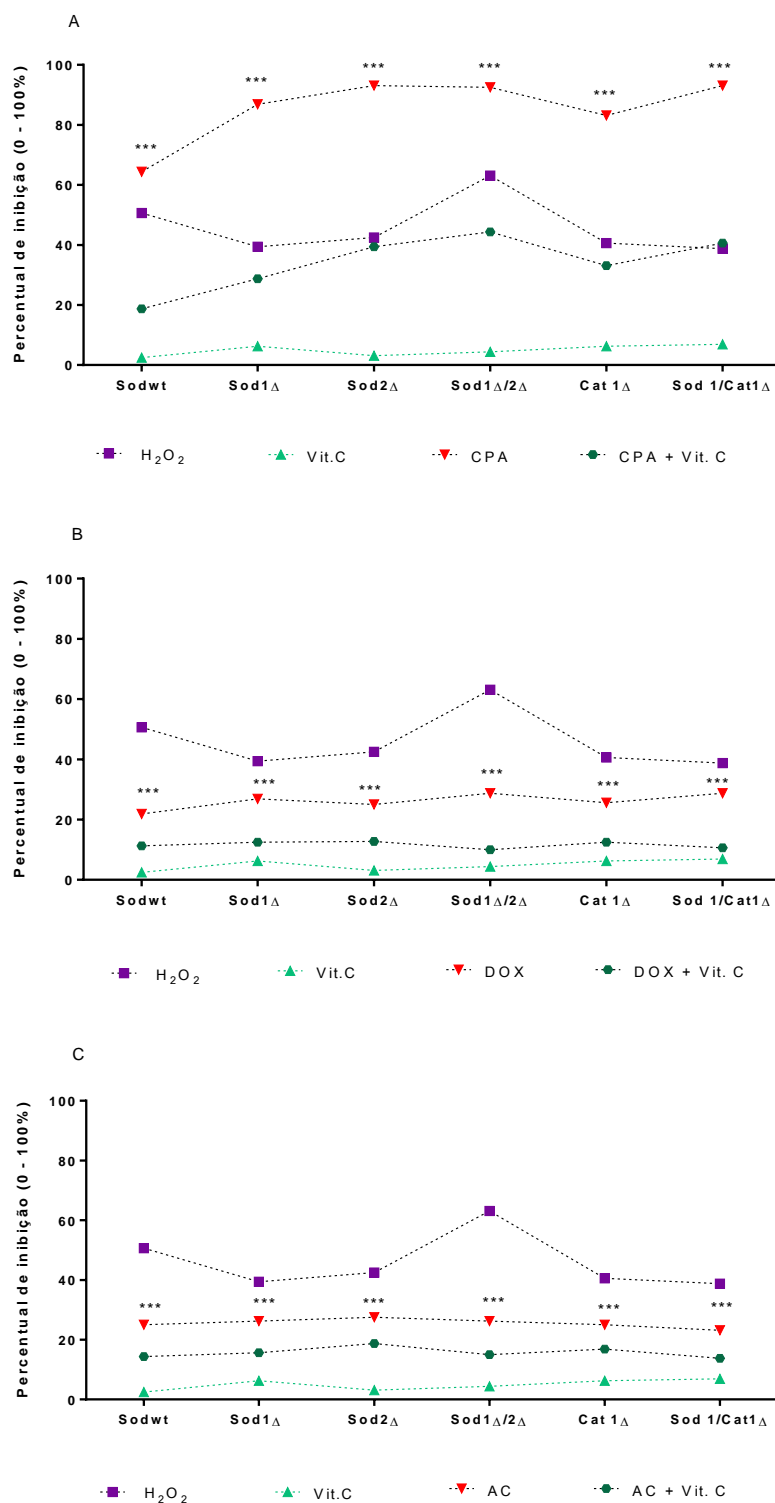
Os percentuais de inibição de crescimento de *S. cerevisiae* usados no teste estão apresentados na **Figura 2**. A CPA, em todas as linhagens testadas, induziu danos oxidativos significantes em relação ao AA, como também em relação ao peróxido de hidrogênio (**Figura 2A**). De forma contrária, os danos oxidativos induzidos pela DOX foram menores do que os induzidos pelo peróxido de H₂O₂. Entretanto seus danos oxidativos foram significantes em relação ao AA, e DOX associada ao AA (**Figura 2B**). Em relação à CPA associada com a DOX e AA os dados foram similares ao observado com a DOX (**Figura 2C**), sugerindo que CPA induz mais danos oxidativos do que a DOX (**Figura 3**).

6.3.3 Efeitos modulatórios do AA frente aos danos oxidativos induzidos pela CPA, DOX e AC, em *Saccharomyces cerevisiae*

A atividade modulatória do ácido ascórbico foi evidenciada por meio de ensaios biológicos semiquantitativos a partir da inibição de crescimento de linhagens de *S. cerevisiae* proficiente e deficientes no sistema de defesa antioxidante da enzima superóxido dismutase e catalase (*Sodwt*, *Sod1Δ*, *Sod2Δ*, *Sod1Δ/sod2Δ*, *CatΔ*, *Sod1Δ/CatΔ*).

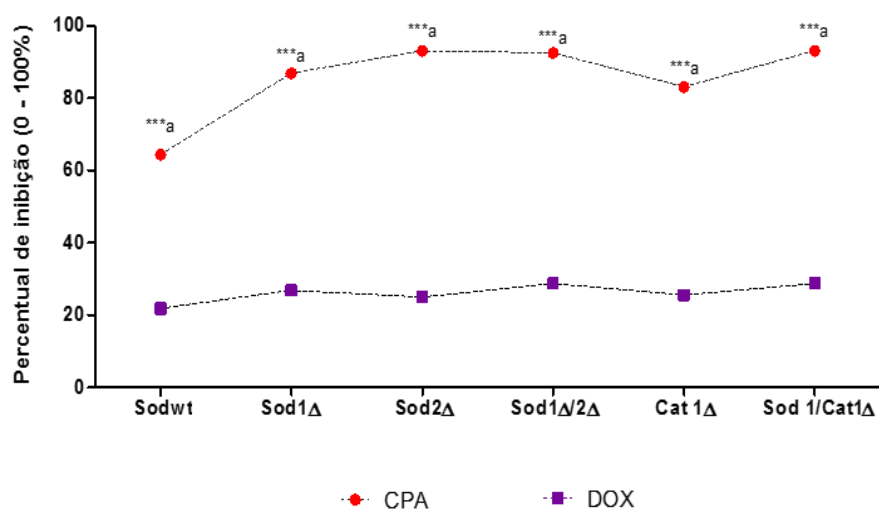
O AA modula os efeitos oxidativos dos antineoplásicos CPA, DOX e AC em todas as linhagens testadas, proficiente e mutadas em defesas antioxidantes para as enzimas superóxido dismutase e catalase. Para melhor compreender os efeitos modulatórios do AA, os dados apresentados na **Tabela 2** foram plotados em percentuais de modulação (%M) do AA diante dos danos oxidativos induzidos pelos antineoplásicos. O cálculo foi feito segundo a fórmula: $\%M = \frac{A-B}{A} \times 100$ onde, **%M** (% de modulação); **A** (inibição de crescimento induzidas pelo antineoplásico); **B** (inibição de crescimento induzidos pelo co-tratamento do antineoplásico + AA), como descrito nos materiais e métodos.

Figura 2. Estudo comparativo entre os percentuais de inibição de crescimento de linhagens de *S. cerevisiae* expostas aos antineoplásicos em relação aos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico.



Legenda: Em A (CPA); B (DOX) e C (AC). ANOVA-one-way e pós-teste de *Newman-keuls*.
 ***P<0.0001 em relação ao Peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

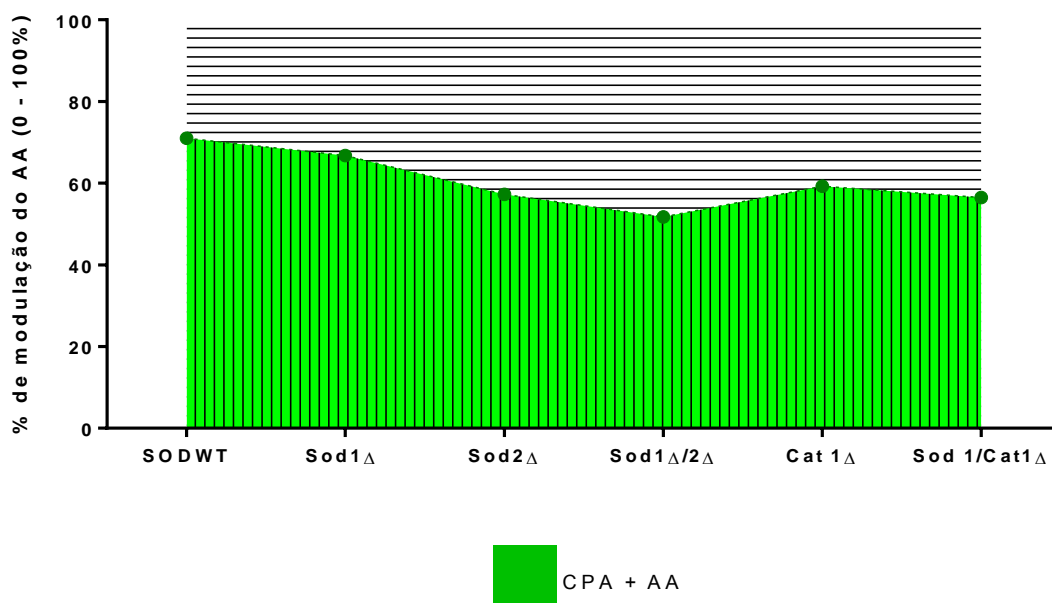
Figura 3. Danos oxidativos induzidos pela ciclofosfamida e doxorubicina em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.



Legenda: CPA: Ciclofosfamida 20 mg/mL. DOX: Doxorubicina 2mg/mL. ANOVA-*one-way* e pós-teste de *Newman-keuls*. ^a P<0.0001 em relação à DOX.

O AA modulou os danos oxidativos induzidos pela CPA com percentuais acima de 50% para a maioria das linhagens testadas, com percentuais de modulação acima de 70% ($71,0 \pm 4,32$), especialmente para a SODWT e sod1Δ (66% , $66,7 \pm 6,39$) (superóxido dismutase citoplasmática) (**Figura 4**).

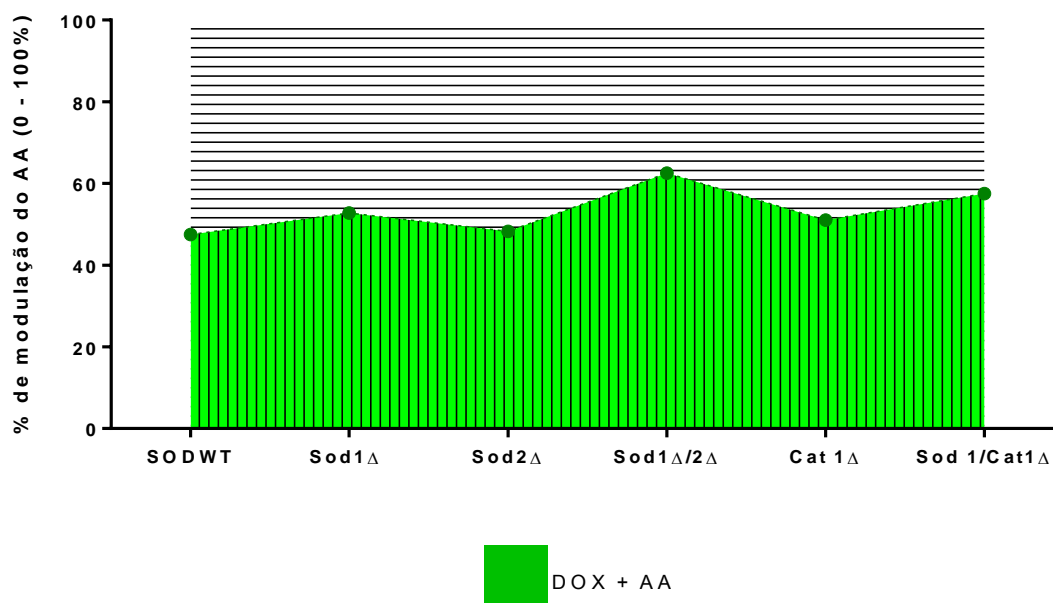
Figura 4. O ácido ascórbico na modulação dos danos oxidativos induzidos pela ciclofosfamida em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e mutadas em enzimas superóxido dismutase e catalase.



Legenda: CPA: ciclofosfamida 20 mg/mL; AA: ácido ascórbico 2 μmol.

Em relação aos danos oxidativos induzidos pela DOX, o AA modulou estes danos com percentuais em cerca de 50% ($52,7 \pm 9,14$) para a maioria das linhagens testadas, com valor acima de 60% ($62,5 \pm 14,83$) para o duplo mutante $sod1\Delta sod2\Delta$, indicando também ação para a superóxido dismutase mitocondrial (**Figura 5**).

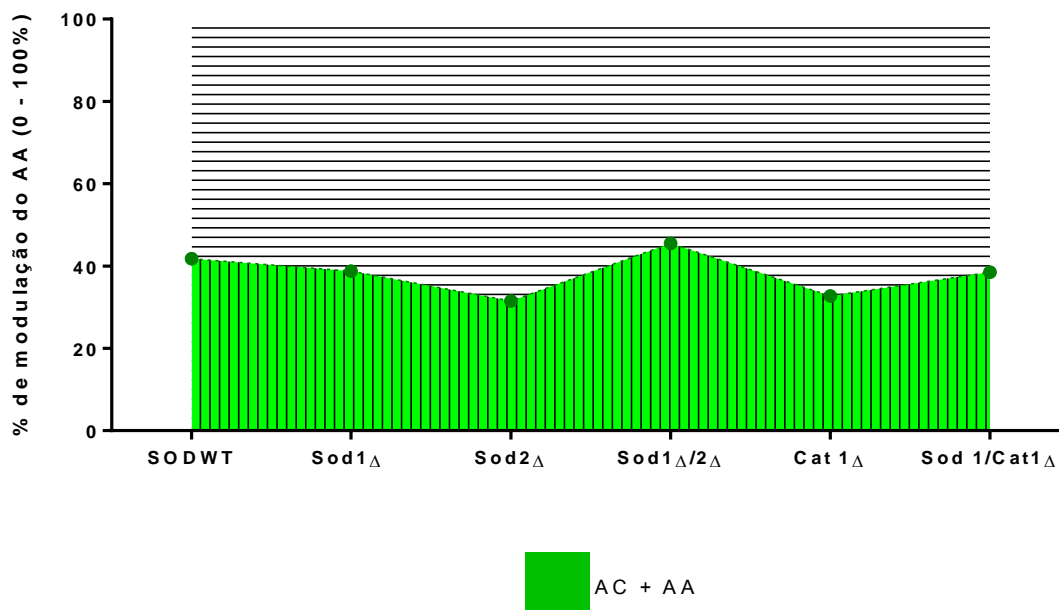
Figura 5. O ácido ascórbico na modulação dos danos oxidativos induzidos pela doxorubicina em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e mutadas em enzimas superóxido dismutase e catalase.



Legenda: DOX: doxorubicina 2 mg/mL; AA: ácido ascórbico 2 μ mol.

Os efeitos do AA sobre os danos oxidativos induzidos pelo esquema AC estão em cerca de 40% ($41,7 \pm 12,10$) para a maioria das linhagens testadas, chegando a 45% ($45,5 \pm 15,8$) para o duplo mutante $sod1\Delta sod2\Delta$ (**Figura 6**), a exemplo do que foi observado para a DOX.

Figura 6. O ácido ascórbico na modulação dos danos oxidativos induzidos pelo esquema AC em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficientes e mutadas em enzimas superóxido dismutase e catalase.



Legenda: AC: ciclofosfamida 20 mg/mL + doxorrubicina 2 mg/mL; AA: ácido ascórbico 2 μ mol.

6.4 Discussão

A *S. cerevisiae* é um organismo eucarioto amplamente estudado e notavelmente semelhante às células de mamíferos no que se referem às macromoléculas, organelas e proteínas com homologia a proteínas humanas, tornando-a uma ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese, reparo do DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (COSTA; FERREIRA, 2001). A avaliação da capacidade antioxidante pode ser feita pela medida da sobrevivência de células tratadas com os antioxidantes em presença e ausência de agentes estressores (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2005), ou mesmo células defectivas em suas enzimas de defesa antioxidante (*sod1 Δ* , *sod2 Δ* , *sod1sod2 Δ* , *cat1 Δ* e *sod1cat1 Δ*). *Sod1 Δ* foi a primeira enzima *Sod* a ser caracterizada. É um homodímero de cobre e zinco que se encontra quase que exclusivamente no citoplasma intracelular.

Sod2 Δ é um tetrâmero que contém manganês em seu sítio ativo, podendo ser encontrada nas mitocôndrias da maioria dos tecidos de animais e leveduras. Já a enzima *cat1 Δ* é um tetrâmero formado por monômeros contendo grupos prostéticos heme no centro catalítico (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002; FRIDOVICH, 1998).

A CPA, DOX e o AC inibem significativamente o crescimento de todas as linhagens de *S. cerevisiae* testadas, quando comparados os halos das placas de 0-40 mm (**Tabela 2**) com percentuais de inibição de crescimento significante em relação ao peróxido de hidrogênio, para a CPA (**Figura 2A**). Entretanto, esta ação foi diferenciada em relação à DOX, pois ao contrário, os danos oxidativos do peróxido de hidrogênio foram significantes em relação à DOX (**Figura 2B**), como também em relação ao AC (**Figura C**). Assim, a CPA induziu mais danos oxidativos em todas as linhagens testadas (**Figura 3**).

Estudos comprovaram que a ciclofosfamida pode gerar danos ao DNA, proteínas e lipídios, tendo grande potencial para causar lesão por estresse oxidativo, pela formação de radicais livres (TRIPATHI; JENA, 2010; LIU et al., 2012). Os ensaios realizados com micro-organismos são fáceis, rápidos e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas. Várias razões tornaram a levedura *S. cerevisiae* um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2005).

Para determinar os mecanismos que medeiam a citoproteção da DOX, as *S. cerevisiae* apresentam 71 deleções nas linhagens que demonstraram diferentes graus de hipersensibilidade para a doxorrubicina a uma concentração que não reduz significativamente a viabilidade das células de tipo selvagem. Concluindo, assim, que a sensibilidade de linhagens para a doxorrubicina é devido à deleção de genes (XIA et al., 2007).

A toxicidade da DOX envolve a geração de espécies reativas de oxigênio que causam danos às mitocôndrias e geralmente leva à apoptose. Esta droga confere susceptibilidade à formação de radicais livres, além de promover diminuição nos antioxidantes intracelulares, os quais são responsáveis pela prevenção de danos por radicais livres, aumentando, desta forma, os efeitos tóxicos (MINOTT et al., 2004).

A *S. cerevisiae* também tem sido utilizada para a investigação da toxicidade da cisplatina, incluindo o transporte da droga, o reparo de DNA e os genes envolvidos na resistência e sensibilidade às drogas. E sua citotoxicidade em *S. cerevisiae* foi estabelecida pelo crescimento e curvas de sobrevivência, assim como por marcadores apoptóticos (HOSTETTER, OSBORN, DEROSE, 2012).

A administração do AA em pré-tratamento na quimioterapia com os antineoplásicos doxorrubicina, cisplatina, vincristina em modelos hematopoiéticos de linhagens celulares K562 (leucemia) e RL (linfomas) antagoniza os efeitos dos quimioterápicos, podendo afetar a terapêutica do câncer, pois a vitamina preserva o potencial de membranas mitocondriais (HEANEY et al., 2008).

O AA modulou os danos oxidativos induzidos pela CPA, DOX e AC em todas as linhagens testadas com significâncias para a maioria das linhagens em torno de 50%, chegando em até mais de 70% para a linhagem proficiente em defesas antioxidantes (**Figuras 4, 5 e 6**). Estudos *in vitro* de células humanas MCF-7 em exposição ao ácido ascórbico causam atenuação do antineoplásico podendo afetar a resposta terapêutica (SUBRAMANI et al., 2014).

Diversos estudos epidemiológicos, que investigaram os efeitos do AA contra o câncer de mama, apontam muitos resultados inconsistentes, mas os relatos indicam que o AA reduz o risco de câncer de mama, devido a sua ação antioxidante para proteção de danos ao DNA, por neutralizar os radicais livres e bloquear a iniciação da carcinogênese (WANG, WANG e YU, 2014). Os estudos sobre radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante têm aumentado consideravelmente nos últimos anos (VIDAL et al., 2010).

O teste com *S. cerevisiae* foi importante para apontar que os antineoplásicos do esquema AC e em estudos isolados da CPA e da DOX coadunam sobre as suas induções de danos oxidativos em linhagens proficiente e mutadas em defesas antioxidantes. Cabe enfatizar que a CPA induz mais danos oxidativos do que o peróxido de hidrogênio, mas com suas interações com a DOX estes danos foram minimizados.

6.5 Conclusão

O ácido ascórbico modulou os danos oxidativos induzidos pelos antineoplásicos CPA, DOX e AC com percentuais de modulação significativos, indicando o seu potencial antioxidante frente aos antineoplásicos, podendo interferir em mecanismos de indução de danos oxidativos. Este aspecto deve ser considerado para a ação dos quimioterápicos, considerando que o uso concomitante de AA, em baixas concentrações durante a quimioterapia, implica prognósticos ruins para regressão tumoral, especialmente relacionados à apoptose, que presume danos oxidativos.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C.C.T.; ALMEIDA, A.B.; ARAUJO, P.V.P.; ABREU, R.N.D.C.; CHAVES, E.M.C.; VALE, O.C.V.; MACEDO, D.S.; WOODS, D.J.; FONTELES, M.M.F.; VASCONCELOS, S.M.M. Oxidative Stress and Epilepsy: Literature Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 4, n. 2, p. 133-151, 2012.

ARANGUIZ, F.; GAETE, H.; HIDALGO, M.E.; LOBOS, G. Daño oxidativo en la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* expuesta a aguas receptoras de un efluente minero en del Río Blanco. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2417-2422, 2009.

BOLISETTY, S.; JAIMES, E.A. Mitochondria and Reactive Oxygen Species: Physiology and Pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p. 6306-6344, 2013.

BRESSAN, A. L.; SILVA, R. S.; FONTENELLE, E.; GRIPP, A. C. Imunossupressores na Dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. vol.85, n.1, pp. 9-22, 2010.

CARR, A.C.; VISSERS, M.C.M. Synthetic or food-derived vitamin c - are they equally bioavailable? **Nutrients**, v. 5, n. 11, p. 4284-4294, 2013.

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. 2013, p. 934-939, 2013.

CHOI, J. S.; JOU, S.S.; OH, M. H.; KIM, Y.H.; PARK, M.J., GIL, H.W.; SONG, H. Y.; HONG, S. Y. The dose of cyclophosphamide for treating paraquat-induced rat lung injury. **The Korean Journal of Internal Medicine**. v. 28, n. 4, p. 420-427, 2013.

COLLING, C.; DUVAL, P.A.; SILVEIRA, D.H. Pacientes submetidos à quimioterapia: avaliação nutricional prévia. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 4, p. 611-617, 2012.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular aspects of medicine**, v. 22, n. 4-5, p. 217-246, 2001.

FRANKE, S. I.; MULLER, L. L.; SANTOS, M. C.; FISHBORN, A.; HERMES, L.; MOLZ, P.; PEREIRA, C. S.; WICHMANN, F. M.; HORTA, J. A.; MALUF, S. W.; PRA, D. Vitamin C intake reduces the cytotoxicity associated with hyperglycemia in prediabetes and type 2 diabetes. **BioMed research international**, v. 2013, p. 896-998, 2013.

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.

FRIDOVICH, I. The trail to superoxide dismutase. **Protein Science**, v. 7, n. 12, p. 2688-2690, 1998.

GUARIENTI, C.; BERTOLIN, E.T.; COSTA, J.A.V. Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquat / Antioxidant capacity of the *Spirulina platensis* microalgae on *Saccharomyces*

cerevisiae yeast cells exposed to paraquat stressor. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 106-111, 2010.

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

HEANEY, M. L.; GARDNER, J. R.; KARASAVVAS, N.; GOLDE, D. W.; SCHEINBERG, D. A.; SMITH, E. A.; O'CONNOR, O. A. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. **Cancer research**, v. 68, n. 19, p. 8031-8038, 2008.

HERR, G.E.; KOLANKIEWICZ, A.C.B.; BERLEZI, E.M.; GOMES, J.S.; MAGNAGO, T.S.B.S.; ROSANELLI, C.P.; LORO, M.M. Avaliação de conhecimentos acerca da Doença Oncológica e práticas de cuidado com a saúde. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59, n.1, p.33-41, 2013.

HOSTETTER, A. A.; OSBORN, M. F.; DEROSE, V. J. RNA-Pt adducts following cisplatin treatment of *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS chemical biology**, v. 7, n. 1, p. 218-225, 2012.

JOHNKENNEDY, N.; IFEOMA, U.H. Cardioprotective effect of *Gnetum Bucholizianum* leaf extract against doxorubicin cardiomyopathy in Wistar rats. **Novel Science**, v. 1, n. 3, p. 61-64, 2012.

LIU, Q ; PENG, Y. B ; QI, L. W ; CHENG, X. L ; XU, X. J ; LIU , L. L ; LIU, E. H; LI, P. 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, 2012.

MELO, J.G.; SANTOS, A.G.; AMORIM, E.L.C.; NASCIMENTO, S.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, n. 1, p. 1-14, 2011.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacology Review**, v. 56, n. 5, p. 185-229, 2004.

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

OLIVEIRA, M.C.; SCHOFFEN, J.P.F. Oxidative Stress Action in Cellular Aging. **Brazilian archives of biology and technology**, v.53 n. 6: pp. 1333-1342, 2010.

PUJARI, S.S.; KEMPEN, J.H.; NEWCOMB, C.W.; GANGAPUTURA, S.; EBENEZER, D.; SUNLER, M.D.; THORNE, E.T.; JABS, D.A.; CLARKE, G. A.L.; NUSSENBLATT, R.B.; ROSEBAUM, J.T.; FOSTER, C. Cyclophosphamide for ocular inflammatory diseases. **Ophthalmology**, v.117, n.2, p. 342-354, 2010.

RODRIGUES, F.S.S.; POLIDORI, M.M. Enfrentamento e resiliência de pacientes em tratamento quimioterápico e seus familiares. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.58, n.4, p. 619-627, 2012.

SOARES, DG.; ANDREAZZA, AC.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p.13-25, 2005.

SUBRAMANI, T.; YEAP, S. K.; HO, W. Y.; HO, C. L.; OMAR, A. R.; AZIZ, S. A.; RAHMAN, N. M.; ALITHEEN, N. B. 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.

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

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

VICENTINO, A. R. R; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.17, n.3, p.384-387, 2007.

VIDAL, L. S.; ALVES, A. M.; KUSTER, R. M.; LAGE, C.; LEITÃO, A. C. Genotoxicity and mutagenicity of *Echinodorus macrophyllus* (chapéu-de-couro) extracts. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 549-557, 2010.

WANG, Y. Y.; WANG, X. L.; YU, Z. J. Vitamin C and E intake and risk of bladder cancer: a meta-analysis of observational studies. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 7, n. 11, p. 4154-4164, 2014.

XIA, L.; JAAFAR, L.; CASHIKAR, A.; FLORES-ROZAS, H. Identification of genes required for protection from doxorubicin by a genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cancer research**, v. 67, n. 23, p. 11411-11428, 2007.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free radical biology & medicine**, v. 33, n. 3, p. 337-49, 2002.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que os antineoplásicos podem induzir danos citogenéticos e oxidativos ao material genético, por mecanismos de bloqueio de replicação, inibição de Topoisomerase e geração de espécies reativas de oxigênio, dentre outros que podem ocasionar morte celular (apoptoses); e que os modelos de Sarcoma 180 e linfócitos de sangue periférico são importantes para a caracterização de danos citogenéticos e de que linhagens celulares de *S. cerevisiae* podem ser usadas para avaliação de danos oxidativos, bem como de potenciais antioxidantes, o presente estudo contribuiu para a identificação de danos citogenéticos e oxidativos induzidos pela CPA, DOX e AC, bem como para a ação modulatória do AA, em concentrações antioxidantes, apontando os seguintes conhecimentos:

- Os antineoplásicos CPA, DOX e AC induzem similares danos citogenéticos do tipo apoptoses, necroses, micronúcleos e pontes, em Sarcoma 180 e em exposição *ex vivo* em linfócitos de sangue periférico de camundongos, evidenciados pelo teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.
- O AA (2 μ M) apresenta efeitos modulatórios com significantes percentuais de inibição dos danos citogenéticos da CPA, DOX e AC em Sarcoma 180, relacionados aos principais mecanismos de regressão tumoral, a exemplo das apoptoses, necroses e formação de micronúcleos.
- A CPA, DOX e AC induziram danos oxidativos em linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e mutadas em defesas antioxidantes para as enzimas superóxido dismutase citoplasmática, mitocondrial e para o duplo mutante, bem como para catalase e duplo mutante superóxido dismutase/catalase.
- O AA (2 μ M) apresenta efeitos antioxidantes, com significantes percentuais de modulação dos danos oxidativos da CPA, DOX e AC em *S. cerevisiae*, relacionados às espécies reativas de oxigênios por prováveis mecanismos de bloqueio, sequestro de radicais livres e/ou de inibição de peroxidação lipídica.
- Os danos citogenéticos foram fortemente (coeficiente de correlação = 1) e significativamente ($P < 0,001$) correlacionados positivamente com os danos oxidativos, em relação à apoptose, necrose e micronúcleos.

Diante do exposto, a identificação da variedade de respostas à terapia do câncer requer conhecimento de variáveis, incluindo medicações concomitantes, o que pode alterar o metabolismo e a farmacocinética da quimioterapia. Os dados apontaram interações medicamentosas entre os quimioterápicos CPA, DOX e AC com a ação antioxidante do AA,

que reduziu a eficácia dos antineoplásicos, em mecanismos de importância, especialmente para a geração de radicais livres e apoptose de células tumorais.

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.^a Iyete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

ANEXO B – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO AO JORNAL *TUMOR BIOLOGY*

Submission Confirmation

De: **Editorial Office Tumor Biology** (em@editorialmanager.com)
Enviada: segunda-feira, 23 de fevereiro de 2015 15:20:42
Para: Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar (marcus-alencar@msn.com)

Dear Dr. Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar,

Thank you for submitting your manuscript,
"Ascorbic acid modulates cytogenetic damage induced by cyclophosphamide and doxorubicin in Sarcoma 180", to Tumor Biology

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://tubi.edmgr.com/>

Your username is: marvinalen
Your password is: alencar42775

Springer offers authors the option of making their articles available with open access via our Open Choice programme. We advise you to familiarise yourself with the details of Springer Open Choice in advance, to be able to decide quickly should your paper be accepted for publication. Further information can be found at www.springer.com/openchoice.

With kind regards,

Journals Editorial Office TUBI
Springer

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

ANEXO C – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO AO JORNAL YEAST

Yeast - YEA-Feb-15-0018

De: **yeast@wiley.co.uk**
Enviada: quarta-feira, 25 de fevereiro de 2015 03:21:39
Para: **marcus-alencar@msn.com**

24-Feb-2015

Dear Dr. Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar

Your manuscript entitled "Oxidizing activities of doxorubicin and cyclophosphamide and antioxidant effects of ascorbic acid in *Saccharomyces cerevisiae*" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Yeast.

Your manuscript ID is YEA-Feb-15-0018

Please mention the above manuscript # in all future correspondence regarding this submission.

You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging into <https://mc.manuscriptcentral.com/yeast>.

Please bear in mind that if your manuscript is accepted in the future, you will be required to complete and sign a copyright transfer agreement and send a permission request form for any previously published material contained in your manuscript.

Thank you for submitting your manuscript to Yeast.

Sincerely,

Andrea Lewis
Yeast
yeast@wiley.co.uk