



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

**EFEITOS DO PALMITATO DE RETINOL SOBRE OS DANOS
TOXICOGENÉTICOS DE ANTINEOPLÁSICOS EM ESTUDOS NÃO CLÍNICOS**

RICARDO MELO DE CARVALHO

TERESINA – PIAUÍ
FEVEREIRO/2017

RICARDO MELO DE CARVALHO

**EFEITOS DO PALMITATO DE RETINOL SOBRE OS DANOS
TOXICOGENÉTICOS DE ANTINEOPLÁSICOS EM ESTUDOS NÃO CLÍNICOS**

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

Fevereiro/2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello
Branco Serviço de Processamento Técnico

C331e Carvalho, Ricardo Melo de.
Efeitos do palmitato de retinol sobre os danos
toxicogenéticos de antineoplásicos em estudos não clínicos
/ Ricardo Melo de Carvalho. – 2017.
166 f.

Mestrado – Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2017.
“Orientação: Prof^a. Dr^a. Ana Amélia de Carvalho Melo
Cavalcante”.

1. Quimioterápicos. 2. Danos Toxicogenéticos. 3.
Palmitato de Retinol. 4. Terapias Oncológicas. I. Título.

CDD 616.994

RICARDO MELO DE CARVALHO

**EFEITOS DO PALMITATO DE RETINOL SOBRE OS DANOS
TOXICOGENÉTICOS DE ANTINEOPLÁSICOS EM ESTUDOS NÃO CLÍNICOS**

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

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Departamento de Bioquímica e Farmacologia | *Campus* Ministro Petrônio Portella

Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa (Examinador Interno)

Departamento de Biologia | *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros

Prof. Dra. Adriana Maria Viana Nunes (Examinadora Externa)

Departamento de Biofísica e Fisiologia | *Campus* Ministro Petrônio Portella

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**REITOR**

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

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

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

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

Prof. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

*Dedico este trabalho a Deus, pois até aqui me sustentou; à minha família,
pelo imenso incentivo e aos demais amigos e verdadeiros irmãos
pois acreditaram que chegaria até aqui!*

AGRADECIMENTOS

Ao Único que é digno de receber a honra e a glória, a força e o poder, ao Rei eterno imortal, invisível, mas real, a Ele ministro o louvor, obrigado *Deus*;

Aos meus pais, *Francisco Lourenço de Carvalho e Maria Luiza Melo de Carvalho*, por todo o amor e cuidado, fundamentados em uma educação coerente;

Ao meu irmão, *Rafael Melo de Carvalho*, pelo apoio emocional e tecnológico;

À minha avó *Luiza Maria de Sousa Melo*, que mesmo sem entender a complexidade dos fatos, sempre soube o quanto esta etapa a mim é importante;

À Universidade Federal do Piauí, por meio do Magnífico Reitor Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes, do Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, através do Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira, e dos demais integrantes do corpo docente deste Programa de Pós-Graduação;

Aos ilustres 13 companheiros da 5^o turma do PPGCF/UFPI referente ao biênio 2015/2016, pelos inúmeros sorrisos e algumas milharinas, assim como pelas incontáveis propostas de churrascos, infelizmente não consolidadas;

Aos incríveis amigos, e também irmãos, do Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica, LAPGENIC, em especial ao *Marcus Vinícius, Rai Pablo, Ana Maria, Reyca Rodrigues, Jadson Teixeira, Toregul Islam, Antônio Lima, Rosália Tôrres, Leonardo Rocha, Júnior Gomes e Márcia Fernanda*;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Piauí (FAPEPI);

À minha orientadora, Profa. Dra. *Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante*, que de forma intensa, tem acreditado no meu potencial e me acompanhado desde o ano 2011, ainda na graduação.

E a todos os amigos e familiares que dedicaram votos, tempo, ajuda e apoio moral/emocional em prol da conclusão deste trabalho.

... *Muito Obrigado!*

“Até aqui nos ajudou o SENHOR!”

[I Samuel 7: 12]

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC	Esquema quimioterápico composto por ciclofosfamida e doxorrubicina
ERA	Atividade equivalente de retinol
AMP	Peptídeo mensageiro secundário celular
AMPKs	Proteína quinase indutora de apoptose dependente de AMP
AR	Ácido retinóico
AT	Gene relacionado relacionado à ataxia telangectasia
ATRA	All <i>trans</i> retinoic acid
A2780	Linhagens celulares de câncer de ovário humano
A549	Linhagens celulares de carcinoma pulmonar humano
Aspc-1	Linhagens celulares de adenocarcinoma pancreático humano
Bax	Proteína indutora de morte celular
Bcl-2	Proteína reguladora de apoptoses
BRAF	Família de proto-oncogene relacionado a diversos tumores
CAT	Catalase
CRBPs	Proteínas de ligação ao ácido retinóico
CBMN	Teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese
CPA	Ciclofosfamida
CuZnSOD	Superóxido dismutase cobre-zinco
DNMT's	DNA metiltransferases
DOX	Doxorrubicina
DU145	Linhagens celulares de câncer de próstata
EG	Linhagem duplo mutante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>SOD1ΔCAT1Δ</i>

EG103	Linhagem selvagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>SODWT</i>
EG110	Linhagem mutante e defectiva de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>SOD2Δ</i>
EG118	Linhagem mutante e defectiva de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>SOD1Δ</i>
EG133	Linhagem duplo mutante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>SOD1ΔSOD2Δ</i>
EG223	Linhagem mutante e defectiva de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>CAT1Δ</i>
ENC	Eritrócito normocromático
EPC	Eritrócito policromático
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN's	Espécies Reativas de Nitrogênio
FAC	Associação entre: 5-fluorouracil + adriamicina + ciclofosfamida
FD	Frequencia de danos
FDA	Órgão fiscalizador norte-americano: <i>Food and Drug Administration</i>
FLT3	Receptor da proteína tirosina quinase 3
GPx	Enzima glutaciona peroxidase
GSH	Enzima glutaciona reduzida
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HepG2	Linhagens celulares de hepatoma humano
HTC	Linhagens celulares de carcinoma hepocelular
ID	Índice de danos
NFκB	Fator de necrose tumoral kappa beta
MAPK's	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCF-7	Linhagens de células cancerígenas mamárias
MDM2	Gene de murinos antagônico a p53

MN	Micronúcleo
MnSOD	Produto do gene SOD2
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OH⁻	Íon hidroxila
OH[•]	Radical hidroxila
Panc-1	Linhagens celulares de adenocarcinoma pancreático humano
p14	Gene indutor de morte celular
p19	Linhagens celulares de carcinoma embrionário humano
p53	Gene supressor de tumor
PR	Palmitato de retinol
RARs	Receptores para ácido retinóico
RBP	Proteínas de ligação ao retinol
RXR_s	Receptores X- retinóicos
S-180	Linhagem de células tumorais de Sarcoma 180
SK-N-BE	Linhagens celulares de neuroblastoma
SH-SY5Y	Linhagens celulares de neuroblastoma
SOD	Superóxido dismutase
Stra6	Gene indutor de morte celular
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Divisão esquemática do corpo da dissertação. 22
- Figura 2.** Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes para 2016 por sexo, exceto pele não-melanoma (INCA). Números arredondados para múltiplos de 10. 24
- Figura 3.** Oxidação de moléculas biológicas por espécies reativas de oxigênio (ERO's). 26
- Figura 4.** Estrutura química da ciclofosfamida. 29
- Figura 5.** Estrutura química da doxorubicina. 31
- Figura 6.** Estrutura química do palmitato de retinol. 33
- Figura 7.** Esquema de posicionamento das linhagens utilizadas no teste com *S. cerevisiae* para determinação do potencial oxidante ou antioxidante de compostos. 35
- Figura 8.** Indução de anormalidades nucleares, micronúcleos (MN) e morte celular por agentes citotóxicos e genotóxicos em culturas de células com bloqueio de citocinese. 38

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Esquema da obtenção, análise, exclusão e avaliação de artigos científicos. 53
- Figura 2.** Ação terapêutica do ATRA, induzindo hipometilação de DNMT's. Com a ativação da expressão de p14 e a consequente degradação de MDM2, a estabilização e regulação da síntese de p53 promove a apoptose em células tumorais. 56
- Figura 3.** Ação oxidante do retinol induzindo produção e acumulação intracelular de espécies reativas, ocasionando a morte de células não neoplásicas. Condição ocasionada pela inibição de NFkB, não dependente de retinol, e consequente ausência da superóxido desmutase eficiente em equilibrar o estado redox. 60

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Estudo comparativo entre inibição de crescimento de linhagens de *S. cerevisiae* expostas à ciclofosfamida (CPA: 20 µg/mL) em relação aos danos induzidos pelo H₂O₂ (10 Mm) e palmitato de retinol (PR: 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância de ^a P<0,001 comparados à salina e ^b P<0,001 comparados à CPA. 83

Figura 2. Estudo comparativo entre inibição de crescimento de linhagens de *S. cerevisiae* expostas à doxorubicina (DOX: 2 µg/mL) em relação aos danos pelo H₂O₂ (10 Mm), e palmitato de retinol (PR: 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância de ^aP<0,001 comparados à salina; ^bP<0,05 comparados à DOX. 84

Figura 3. Viabilidade das células de Sarcoma 180 expostas ao Palmitato de Retinol (1, 10 e 100 UI/mL), ciclofosfamida (CPA: 20 µg/mL), Doxorubicina (DOX: 2 µg/mL) e ao protocolo de associação de doxorubicina + ciclofosfamida. ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância de ^a(P<0,001) comparados ao controle negativo (CN), ^b(P<0,05 e P<0,001) à CPA, ^c(P<0,001) à DOX e ^d(P<0,01) ao protocolo AC. 87

Figura 4. Atividade antigenotóxica do PR. Em (A) índice de danos (0 – 400) e em (B) frequência de danos (0 – 100) para o teste cometa em células de Sarcoma 180 tratadas com ciclofosfamida (CPA: 20 µg/mL) e co-tratadas com palmitato de retinol (1, 10 e 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância (MD±DP) de ^acomparados ao controle negativo (CN) e ^bcomparados aos antineoplásicos isolados. 88

Figura 5. Variação quantitativa dos tipos de danos (0 – 4) para o teste cometa em células de Sarcoma 180 tratadas com ciclofosfamida (CPA: 20 µg/mL) e co-tratadas com palmitato de retinol (1, 10 e 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores significantes (P<0,001) quando comparados à CPA. 89

Figura 6. Atividade antigenotóxica do PR. Em (A) índice de danos (0 – 400) e em (B) frequência de danos (0 – 100) para o teste cometa em células de Sarcoma 180 tratadas com doxorubicina (DOX: 2 µg/mL) e co-tratadas com palmitato de retinol (1, 10 e 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância (MD±DP) de ^acomparados ao controle negativo (CN) e ^bcomparados aos antineoplásicos isolados. 90

Figura 7. Variação quantitativa dos tipos de danos (0 – 4) para o teste cometa em células de Sarcoma 180, tratadas com doxorubicina (DOX: 2 µg/mL) e co-tratadas com palmitato de retinol (1, 10 e 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores significantes (P<0,001 e P<0,05) quando comparados à DOX. 91

Figura 8. Atividade antigenotóxica do PR. Em (A) índice de danos (0 – 400) e em (B) frequência de danos (0 – 100) para o teste cometa em células de Sarcoma 180 tratadas com o protocolo AC (ciclofosfamida + doxorubicina 2/20 µg/mL) e co-tratadas com palmitato de retinol (1, 10 e 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância (MD±DP) de ^acomparados ao controle negativo (CN) e ^bcomparados aos antineoplásicos isolados. 93

Figura 9. Variação quantitativa dos tipos de danos (0 – 4) para o teste cometa em células de Sarcoma 180 tratadas com o protocolo de associação de doxorubicina (2 µg/mL) + ciclofosfamida (20 µg/mL) e co-tratadas tratadas com o palmitato de retinol (1, 10 e 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valor significativo (P<0,001) quando comparado à DOX. 94

CAPÍTULO III

Figura 1. Esquema dos grupos de tratamento em células de S-180 e camundongos *Mus musculus* tratados com os antineoplásicos e PR. 107

Figura 2. Viabilidade das células de Sarcoma 180 expostas ao palmitato de retinol (PR: 1, 10 e 100 UI/mL), ciclofosfamida (CPA: 20 µg/mL), doxorrubicina (DOX: 2 µg/mL), e ao protocolo AC (CPA e DOX: 20/2 µg/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *bonferroni*. Valores de significância de $P < 0,05$ para ^a comparado ao controle negativo (CN), ^b comparado CPA, ^c comparado à DOX e ^d comparado ao protocolo AC. 112

Figura 3. Modulação (%) do palmitato de retinol (PR: 1, 10 e 100 UI/mL) sobre o número de biomarcadores de mutagenicidade e alterações citogenéticas (A), micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares; e de morte celular (B), apoptose e necrose; induzidos por ciclofosfamida (CPA: 20 µg/mL), doxorrubicina (DOX: 2 µg/mL) e protocolo AC (CPA e DOX: 20/2 µg/mL) em linhagens tumorais de S-180. 118

Figura 4. Perfil fotomicrográfico das linhagens de Sarcoma 180 tratados com os antineoplásicos ciclofosfamida (CPA), doxorrubicina (DOX), e protocolo AC (CPA + DOX), assim como pelo palmitato de retinol (PR), analisadas por meio do teste de CBMN. 119

Figura 5. Modulação (%) do palmitato de retinol (PR: 100 UI/kg) sobre o número de danos genotóxicos induzidos por ciclofosfamida (CPA: 20 mg/kg), doxorrubicina (DOX: 2 mg/kg) e protocolo AC (CPA e DOX: 20/2 mg/kg) em camundongos *Mus musculus* sadios por meio do teste cometa. 122

Figura 6. Perfil fotomicrográfico das células de camundongos tratados com os antineoplásicos ciclofosfamida (CPA), doxorrubicina (DOX), e protocolo AC (CPA + DOX), assim como pelo palmitato de retinol (PR), analisadas por meio do teste cometa. 124

CAPÍTULO IV

Figura 1. Estrutura química da ciclofosfamida (A), doxorrubicina (B) e palmitato de retinol (C). 138

Figura 2. Efeitos antigenotóxicos do palmitato de retinol sobre os danos induzidos por ciclofosfamida (CPA: 20 mg/kg), doxorrubicina (DOX: 2 mg/kg) e protocolo AC (CPA e DOX: 2/20 mg/kg) em medula óssea de *Mus musculus* por meio do teste cometa: índice (A) e frequência de danos (B). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. $n=5$. Valores significantes de $P < 0,001$ para ^a comparado ao grupo tratado com CPA, para ^b comparado ao grupo tratado com DOX e para ^c comparado ao grupo tratado com o protocolo AC. 145

Figura 3. Fotomicrografias apontando a ação antigenotóxica, do palmitato de retinol frente aos danos genotóxicos da ciclofosfamida, doxorrubicina, e do protocolo AC em células de medula óssea de *Mus musculus* analisadas por meio do teste cometa. PR: palmitato de retinol. CPA: ciclofosfamida. DOX: doxorrubicina. AC: protocolo de associação. D 0: dano 147

0. D 1: dano 1. D 2: dano 2. D 3: dano 3. D 4: dano 4. Coloração com nitrato de prata no teste cometa e análise microscópica de 100 células/lâmina sob o aumento de 400 X ao microscópio óptico. Teste realizado em duplicata.

Figura 4. Efeitos antimutagênicos do palmitato de retinol sobre o número de micronúcleos (MN) induzidos por ciclofosfamida (CPA: 20 mg/kg), doxorrubicina (DOX: 2 mg/kg) e protocolo AC (CPA e DOX: 2/20 mg/kg) em medula óssea de *Mus musculus* por meio do teste de micronúcleos. ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. $n=5$. Valores significantes de $P<0,05$ para ^a comparado ao grupo tratado com CPA, para ^b comparado ao grupo tratado com DOX e para ^c comparado ao grupo tratado com o protocolo AC.

150

Figura 5. Fotomicrografias apontando a ação antimutagênica e anticitotóxica do palmitato de retinol frente aos efeitos tóxicos da ciclofosfamida, doxorrubicina, e do protocolo AC em células de medula óssea de *Mus musculus* analisadas por meio do teste de micronúcleo. PR: palmitato de retinol. CPA: ciclofosfamida. DOX: doxorrubicina. AC: protocolo de associação. MN: micronúcleo. ENC: eritrócito normocromático. EPC: eritrócito policromático. Coloração com Giemsa a 10% no teste de micronúcleo e análise microscópica de 1000 células/lâmina sob o aumento de 1000X ao microscópio óptico. Teste realizado em duplicata.

151

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Efeitos terapêuticos da vitamina A, e variações, sobre o câncer em modelos de estudo clínicos e não clínicos. 58
- Tabela 2.** Efeitos oxidantes e adversos da vitamina A, e variações, em modelos de estudo clínicos e não clínicos. 62

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Descrição das linhagens e genótipos de *S. cerevisiae* utilizadas no estudo. 78
- Tabela 2.** Protocolo experimental em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. 79
- Tabela 3.** Esquema dos grupos controle e teste das células de Sarcoma 180 expostas aos antineoplásicos e ao PR. 80

CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Avaliação da mutagenicidade sobre células de S-180 induzida por ciclofosfamida (CPA), doxorrubicina (DOX) e protocolo AC (CPA + DOX), e os efeitos do palmitato de retinol (PR) avaliados por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese. 113
- Tabela 2.** IDNC (índice de danos nucleares indicativos de citotoxicidade), frequência de apoptose e necrose celular em células de S-180 induzidos por ciclofosfamida (CPA), doxorrubicina (DOX) e protocolo AC (CPA + DOX), e os efeitos do palmitato de retinol (PR) avaliados por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese. 115
- Tabela 3.** Avaliação dos danos genotóxicos induzidos por ciclofosfamida (CPA), doxorrubicina (DOX), e protocolo AC (CPA + DOX), e a modulação destes pelo palmitato de retinol (PR) em células de *Mus musculus* por meio do teste Cometa. 121

CAPÍTULO IV

- Tabela 1.** Esquema dos tratamentos dos animais com os químicos. 139
- Tabela 2.** Avaliação antigenotóxica do PR diante dos danos genotóxicos induzidos por ciclofosfamida (CPA), doxorrubicina (DOX), e protocolo AC (CPA + DOX), e a modulação destes pelo palmitato de retinol (PR) em medula óssea de *Mus musculus* por meio da aplicação do teste cometa. 143
- Tabela 3.** Avaliação da ação antimutagênica e anticitotóxica do palmitato de retinol frente a ação tóxica induzida por ciclofosfamida (CPA), doxorrubicina (DOX), e protocolo AC (CPA + DOX) em células de medula óssea não tumorais de *Mus musculus* por meio do teste de micronúcleos (MN). 149

SUMÁRIO

RESUMO	18
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO	20
OBJETIVOS	23
2. 1 Gerais	23
2. 2 Específicos	23
REVISÃO DE LITERATURA	24
3. 1 Câncer	24
3. 2 Estresse oxidativo	26
3. 3 Drogas antineoplásicas	28
3. 4 Palmitato de retinol	31
3. 5 Modelos de estudo para monitoramento de fármacos	33
REFERÊNCIAS	39

CAPÍTULO I

VITAMINA A: ENTRAVES PARA A PREVENÇÃO E TERAPIA DO CÂNCER

RESUMO	49
ABSTRACT	50
Introdução	51
Metodologia	53
Resultados e Discussão	54
Conclusão	63
Referências	64

CAPÍTULO II

ESTUDO NÃO-CLÍNICO DA ATIVIDADE DO PALMITATO DE RETINOL FRENTE AO MECANISMO OXIDATIVO DE QUIMIOTERÁPICOS DO PROTOCOLO AC

RESUMO	74
ABSTRACT	75
Introdução	76
Materiais e Métodos	78
Resultados e Discussão	83
Conclusão	95
Referências	96

CAPÍTULO III

O PALMITATO DE RETINOL FRENTE AOS DANOS TOXICOGENÉTICOS DE ANTINEOPLÁSICOS EM CÉLULAS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS

RESUMO	104
ABSTRACT	105
Introdução	106
Materiais e Métodos	108
Resultados e Discussão	112
Conclusão	125
Referências	126

CAPÍTULO IV

O PALMITATO DE RETINOL COM AÇÃO ANTIGENOTÓXICA, ANTIMUTAGÊNICA E ANTICITOTÓXICA FRENTE A ANTINEOPLÁSICOS

RESUMO	134
ABSTRACT	135
Introdução	136
Materiais e Métodos	138
Resultados e Discussão	142
Conclusão	155
Referências	156

CONSIDERAÇÕES FINAIS

ANEXOS

Efeitos do palmitato de retinol sobre os danos toxicogénéticos de antineoplásicos em estudos não clínicos. RICARDO MELO DE CARVALHO. Orientadora: Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. 165p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF, Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2016.

RESUMO

A incorporação de compostos naturais e nutracêuticos antioxidantes sobre a dieta alimentar ou durante os intervalos dos ciclos quimioterápicos, tem sido empregada como uma alternativa terapêutica e para a compensação dos efeitos tóxicos de antineoplásicos, com riscos para a eficácia das terapias oncológicas. O objetivo da pesquisa foi detectar os possíveis efeitos antioxidantes, antígenotóxicos/antimutagênicos e anticitotóxicos do palmitato de retinol sobre os danos toxicogénéticos induzidos pelos antineoplásicos ciclofosfamida e doxorrubicina, isoladas ou em associação. Os testes não clínicos aplicados foram: teste em *Saccharomyces cerevisiae*; teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese e teste cometa em Sarcoma 180; e testes cometa e de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico e células de medula óssea em *Mus musculus*. Em *Saccharomyces cerevisiae* e Sarcoma 180, as concentrações foram de 2 µg/mL para a doxorrubicina, 20 µg/mL para a ciclofosfamida, 2/20 µg/mL para a associação dos antineoplásicos, e de 1, 10 e 100 UI/mL para o palmitato de retinol. Nos tratamentos em *Mus musculus*, as doses dos antineoplásicos foram de 2 mg/kg para a doxorrubicina, 20 mg/kg para a ciclofosfamida, 2/20 mg/kg para a associação dos antineoplásicos, e de 100 mg/kg para o palmitato de retinol. Os antineoplásicos induziram significantes danos oxidativos, em linhagens de *S. cerevisiae*, toxicogénéticos (micronúcleos, pontes citoplasmáticas, brotos nucleares, apoptose e necrose) e genotóxicos (danos nucleares) em Sarcoma 180, assim como induziram efeitos mutagênicos, citotóxicos, e genotóxicos em células de sangue periférico e de medula óssea de camundongos. Entretanto, o palmitato de retinol modulou os mecanismos oxidativos dos antineoplásicos em *S. cerevisiae*, os efeitos toxicogénéticos e genotóxicos em S-180, os danos aneugénicos e/ou clastogénicos e citotóxicos em *Mus musculus*, com significantes percentuais para as atividades antígenotóxicas, antimutagênicas e anticitotóxicas. Estes dados inferem que os antineoplásicos induzem instabilidades genéticas em células tumorais e não tumorais, que podem ser moduladas pelo palmitato de retinol, com riscos para eficácia de terapias. Diante de controvérsias, ainda são necessários mais estudos para melhor esclarecer as interferências do uso de antioxidantes durante terapias oncológicas.

Palavras-chave: Quimioterápicos; Danos toxicogénéticos; Palmitato de retinol; Terapias oncológicas.

Effects of retinol palmitate on the toxicogenéticos damage from antineoplastics in non-clinical studies. RICARDO MELO DE CARVALHO. Advisor: Dr. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. 165 pp. Dissertation. Graduate Program in Pharmaceutical sciences-PPGCF, Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2016.

ABSTRACT

The incorporation of natural compounds and antioxidant nutraceuticals on the diet or during breaks of chemotherapy cycles, has been employed as a therapeutic alternative for the compensation of the toxic effects of antineoplastic agents, with risks for the effectiveness of oncological therapies. The objective of the research was to detect the possible modulatory effects of retinol palmitate on the toxicogenetics damage induced by antineoplastic agents cyclophosphamide and doxorubicin, alone or in association. The non-clinical tests were applied: test in *Saccharomyces cerevisiae*; micronucleus test with cytokinesis and Comet assay in Sarcoma 180; and comet and micronucleus tests in lymphocytes from peripheral blood and bone marrow cells in *Mus musculus*. For the treatments of the compounds in *Saccharomyces cerevisiae* and Sarcoma 180, concentrations were of 2 µg/mL for doxorubicin, 20 µg/mL for cyclophosphamide, 2/20 µg/mL for the Association of antineoplastic agents, and 1, 10 and 100 IU/mL retinol palmitate for. In *Mus musculus* treatments, doses of antineoplastic agents were 2 mg/kg for doxorubicin, 20 mg/kg for cyclophosphamide, 2/20 mg/kg for the combination of antineoplastics, and 100 mg/kg for palmitate of retinol. The antineoplastics induced significant oxidative damage, in strains of *S. cerevisiae*, toxicogenetics (micronucleis, cytoplasmic bridges, nuclear sprouts, apoptosis and necrosis) and genotoxic (nuclear damage) on Sarcoma 180, as well as induced mutagenic effects, cytotoxic, genotoxic and peripheral blood cells and bone marrow of mice. However, the retinol palmitate radioed oxidative mechanisms of antineoplastic agents in *s. cerevisiae*, toxicogenéticos and genotoxic effects in S-180, aneugênicos and/or clastogênicos and cytotoxic in *Mus musculus*, with polite percentages for antigenotoxic activity, antimutagênicas and anticitotóxicas. These data infer that antineoplastic induce genetic instability in tumor cells and not tumurais, which can be minimized by retinol palmitate, with laughter for effectiveness of therapies. On dispute settlement, further studies are still needed to better clarify the benefits and risks of the use of antioxidants during oncological therapies.

Palavras-chave: Chemotherapy; Toxicogenetics damage; Retinol palmitate; Oncological therapies.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial, principalmente em países sub-desenvolvidos. As estimativas para o acometimento de cânceres no país, a cada década, apresentam-se de maneira assustadora. Há 10 anos, as estimativas de novos casos era de 472.050, para o biênio 2016-2017, a expectativa é que os números ultrapassem a casa dos 600.000 diagnósticos confirmados (INCA, 2015).

O combate e controle do câncer só é possível e eficaz quando as causas e os fatores de risco principalmente para os cânceres mais recorrentes são compreendidos. Portanto, a probabilidade de aprimorar todas as variedades de tratamento e reduzir a incidência das neoplasias fica demasiadamente acentuada (SLOAN; GELBAND, 2007). Os mecanismos das drogas antitumorais são diversos, e agem diretamente sobre alguma vulnerabilidade celular. Desequilíbrio do estresse oxidativo tumoral; citotoxicidade celular por indução de morte celular, apoptose, necrose e autofagia; e a interferência sobre as etapas do ciclo celular das células cancerígenas são exemplos dos principais efeitos pró-oxidantes de antineoplásicos (SÁNCHEZ-PÉREZ; PERONA, 1999; MÖHLER; PFIRMAN; FREI, 2014).

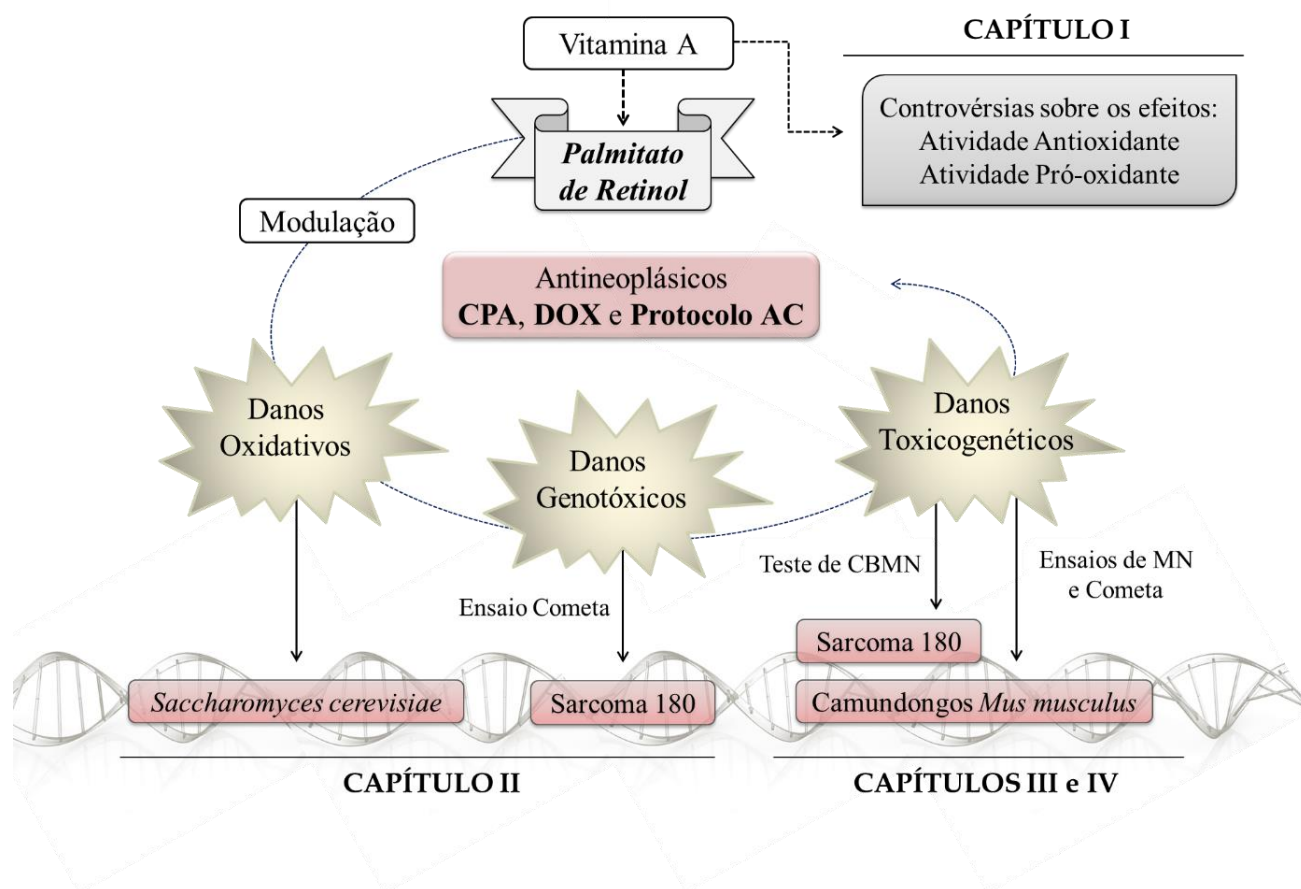
Não obstante, a quimioterapia encaixa-se como um dos maiores entraves para o próprio tratamento do câncer. A adequação de doses, ciclos e agressividade dos efeitos tóxicos e colaterais tornam a cura deste tipo de desordem mais longínqua e morosa. (CALMANOVICI, VIALE, 1988). Existem relatos de que os compostos naturais, sintéticos e precursores da vitamina A, são eficazes em combater moléculas quimicamente instáveis, como as espécies reativas de oxigênio - ERO's. Ação crucial para diminuir a descompensação do equilíbrio redox corporal que sofre com a incorporação dos variados ciclos e protocolos quimioterápicos (GREENLEE, 2012; CHANG; SHEEN; LEI, 2015).

Dentro desta perspectiva a suplementação nutricional de micronutrientes, como a vitamina A, concomitante ao uso de antineoplásicos surge como uma possibilidade terapêutica para o câncer. Muito embora a provável diminuição dos efeitos tóxicos dos quimioterápicos sobre uma gama de células corporais, derivado da incorporação de vitaminas antioxidantes à dieta de pacientes oncológicos tem provocado controvérsias no campo científico. O acompanhamento dos pacientes em tratamento quimioterápico ainda é

insuficiente para o dimensionamento da saúde como um todo, principalmente quanto aos aspectos toxicogénéticos do câncer e possíveis modulações de vitaminas antioxidantes (DEMARIA et al., 2010; TANG et al., 2014; ROCHETTE-EGLY, 2015). Portanto, o biomonitoramento dos danos oxidativos, nucleares e genotóxicos de produtos naturais e/ou sintéticos, manipulados/ingeridos pelo homem é de fundamental importância para a liberação de substâncias para o uso terapêutico. Neste contexto, ensaios não-clínicos com linhagens de células cancerosas, Sarcoma 180 (S-180); linhagens de células eucarióticas leveduriformes *Saccharomyces cerevisiae*; e testes *in vivo* em roedores são aprovados por agências nacionais e internacionais de segurança farmacológica (ANVISA, 2013; FERREITA et al., 2014; AMBERG; BURKE, 2016).

Tendo em vista a necessidade de compreender os possíveis efeitos moduladores do PR, vitamina A, frente às ações oxidativas, citogenéticas e genotóxicas dos antineoplásicos CPA, DOX e de suas associações no protocolo AC, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos antioxidantes, antigenotóxicos/antimutagênicos e anticitotóxicos do PR por meio de testes *ex vivo* e *in vivo*, através do estudo em células tumorais de Sarcoma 180, em *S. cerevisiae*, e em células de medula óssea e de sangue periférico de *Mus musculus* durante os tratamentos quimioterápicos (**Figura 1**). A dissertação compreende: uma revisão sobre o papel antioxidante e oxidante da vitamina A (**Capítulo I**); um estudo não-clínico da atividade do palmitato de retinol frente ao mecanismo oxidativo e genotóxico de quimioterápicos por meio de tratamentos em *S. cerevisiae* e em S-180 (**Capítulo II**); assim como os efeitos antigenotóxicos/antimutagênicos e anticitotóxicos do PR frente aos danos toxicogénéticos dos antineoplásicos em S-180 e em *Mus musculus* (**Capítulos III e IV**).

Figura 1. Divisão esquemática do corpo da dissertação.



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Analisar os efeitos antioxidantes, antígeno-tóxicos/antimutagênicos e anticitotóxicos do palmitato de retinol sobre os danos toxicogênicos induzidos pelos antineoplásicos ciclofosfamida (CPA), doxorrubicina (DOX), isoladas ou em associação, através da aplicação de biomarcadores toxicogênicos em células de *Saccharomyces cerevisiae*, Sarcoma 180, e *Mus musculus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma revisão sistemática sobre as controvérsias publicadas, a priori, entre os anos 2014 – 2015, em relação às atividades funcionais da vitamina A/palmitato de retinol como compostos antioxidantes e/ou pró-oxidantes, com ênfase nos modelos de estudo e mecanismos de ação para tais atividades;
- Avaliar os prováveis efeitos antioxidantes do palmitato de retinol frente aos danos oxidativos induzidos pela CPA, DOX e AC em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*; proficientes e mutadas em defesas antioxidantes para a superóxido dismutase e catalase;
- Verificar os possíveis efeitos antígeno-tóxicos/antimutagênicos do palmitato de retinol frente aos danos toxicogênicos (apoptose, necrose, micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares) da CPA, DOX e AC em Sarcoma 180 por meio dos testes cometa e de micronúcleos com bloqueio de citocinese;
- Avaliar os prováveis efeitos antígeno-tóxicos/antimutagênicos e anticitotóxicos do palmitato de retinol frente aos danos toxicogênicos da CPA, DOX e AC em células de medula óssea e de sangue periférico em camundongos *Mus musculus* por meio dos testes *in vivo* de cometa e micronúcleos.


3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Câncer

O câncer é um dos maiores problemas mundiais de saúde pública. Os países subdesenvolvidos ainda sofrem com duas questões: o aumento crescente de diagnósticos de doenças crônicas e crescimento exponencial dos número de novos casos de neoplasias, fatores comumente correlacionados. As causas para o desenvolvimento do câncer são diversas, tendo como fatores preponderantes a influência oxidativa de fatores exógenos ou mesmo endógenos, podendo estarem associados. Estando a agressividade destes ligadas a intensidade e duração da exposição das células aos próprios agentes cancerígenos (YEON et al., 2011; INCA, 2015).

O câncer representa a multiplicação exacerbada de células, que podem invadir e se espalhar para locais distantes do corpo, levando a consequências graves para a saúde humana, tendo em vista sua caracterização como uma das principais causas de morte em todo o mundo (WHO, 2015). Os tipos de cânceres mais comuns são: pulmão, próstata, colorretal, estômago e câncer de fígado, para os homens; enquanto mama, colorretal, pulmão, colo uterino e câncer de estômago, são os mais comuns entre as mulheres (**Figura 2**) (INCA, 2015).

Figura 2. Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes para 2016 por sexo, exceto pele não-melanoma (INCA). Números arredondados para múltiplos de 10.

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

Fonte: INCA, 2015.

Os fatores que podem dar origem ao processo de iniciação das neoplasias, apesar de diversos, são comumente representados por: fatores hereditários e genéticos, idade, hábitos alimentares e sexuais, estilo de vida, fatores ambientais e ocupacionais, medicamentos, infecções virais e bacterianas, tabagismo, alcoolismo e radiações ultravioleta e ionizantes (INCA, 2015). Assim, como os distúrbios alimentares e o histórico familiar positivo para o acometimento de cânceres são comumente associados ao prognóstico de neoplasias. A obesidade também apresenta-se não apenas como um distúrbio multifatorial para o desenvolvimento de inúmeras doenças crônicas, mas como uma condição favorável para induzir a angiogênese, fator condicional para a rota do câncer (MENDONÇA; SOARES, 2015).

Cabe enfatizar que as interferências sobre os segmentos cromossômicos são cruciais e praticamente necessárias nos cânceres. A iniciação das neoplasias, muitas vezes está associada ao silenciamento, ativação e mutação de variados genes, sejam eles repressores ou indutores de tumor. O gene BRAF, quando mutado, deixa inativadas um grupo de proteínas-quinases ativadas por mitógenos, MAPK's, peptídeos relacionados a divisão e diferenciação celular; sobrevivência e morte celular; o que aumenta a probabilidade da promoção de inúmeros tipos de câncer (JOHANSSON; BRAGE, 2014), que podem ser prevenidas.

A detecção precoce, diagnóstico preciso e tratamento eficaz, incluindo o alívio da dor e cuidados paliativos influenciam uma maior taxa de sobrevivência para o portador de cânceres, além de uma expressiva redução do sofrimento. As opções de tratamento incluem cirurgia, quimioterapia e radioterapia, sob medida para o estágio do tumor, tipo, localização e recursos disponíveis (NOWSHEEN; YANG, 2012). Inúmeros entraves estão condicionados ao aumento do número de prognósticos ruins e de mortes em decorrência do acometimento de cânceres. Entre eles, a demora na suspeita do diagnóstico ou subdiagnósticos, o que leva a grandes atrasos para o direcionamento do paciente até os clínicos específicos; e a deficiência dos tratamentos oferecidos, tornando as condições de saúde dos pacientes bastante críticas (NOWSHEEN; YANG, 2012), em terapias oncológicas.

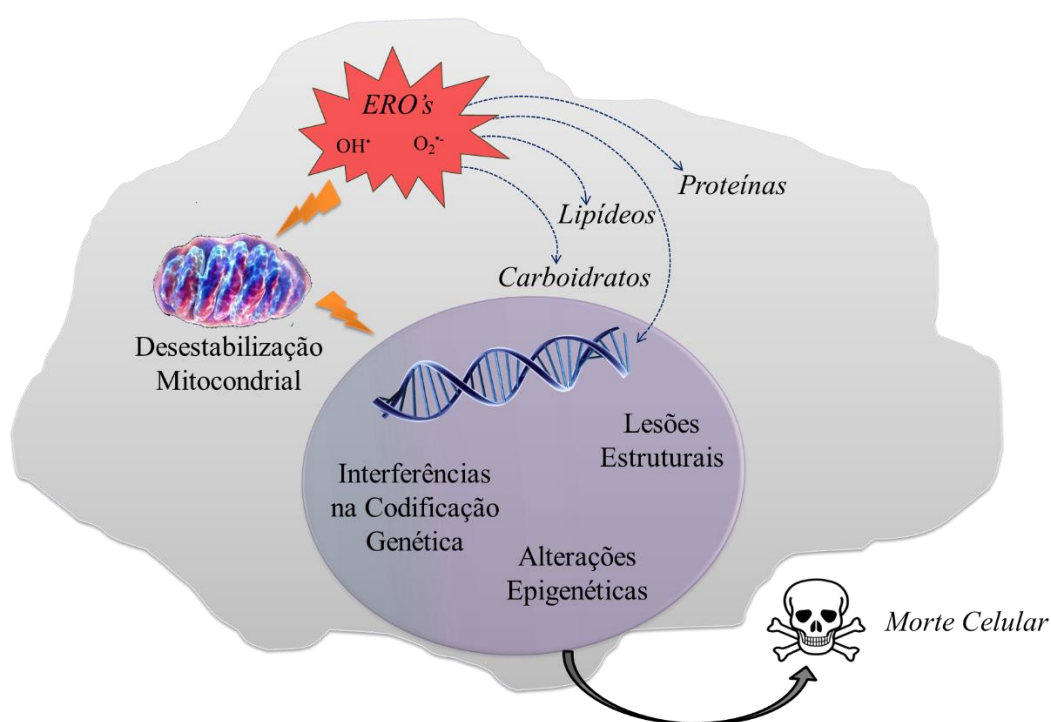
Quanto ao tratamento quimioterápico, as situações mais severas incluem a resistência às terapias oncológicas. A compreensão das vias que levam a este impecilho no combate ao câncer passa por mecanismos bioquímicos e genéticos. Alterações epigenéticas,

interferência sobre oncogenes e mutações secundárias podem levar não somente a ativação de genes de crescimento rápido, mas aos dois tipos de resistência as drogas antineoplásicas, intrínseca e adquirida, muito embora sejam acentuadamente distintas (ASIC, 2016; HU; ZHANG, 2016).

3.2 Estresse oxidativo

Algumas espécies de elementos químicos, que contenham um ou mais elétrons desemparelhados são denominados como radicais livres (PETERSEN, 2012). Por conta dessa característica, os radicais livres têm uma facilidade maior de ligarem-se a elétrons de outras moléculas, podendo geralmente alterar a estrutura e a função dessas moléculas interferindo nas suas atividades normais (PYLVAS et al., 2010). As espécies reativas do oxigênio (ERO's) atacam macromoléculas e estruturas celulares. Entre as biomoléculas afetadas pelos radicais livres, o DNA é uma das mais susceptíveis a esse tipo de interação (**Figura 3**) (GÖNENÇ et al., 2012). ERO's são os radicais livres que mais danificam o DNA provocando rupturas, alterações em bases de guanina e timina e translocações entre os pares de cromátides (PORTO et al., 2015).

Figura 3. Oxidação de moléculas biológicas por espécies reativas de oxigênio (ERO's).



Adaptação de GÖNENÇ et al., 2012.

As ERO's são fatores de grande importância no processo de carcinogênese, podendo atuar como iniciadores do processo de formação do câncer ou em sua progressão. No período de divisão celular, os radicais livres induzem danos oxidativos ao DNA contribuindo para a mutagênese, iniciando mutações que alteram o genoma de células normais. Se não reparadas, essas mutações, por meio da divisão celular, são incorporadas ao material genético alterando o DNA nas gerações posteriores (FREEMAN; KELLER, 2012). Essas mutações podem atuar inibindo os genes supressores de tumores como o P53 e AT (gene relacionado à ataxia telangectasia, uma síndrome neurodegenerativa) ou podem promover a expressão gênica de proto-oncogenes (YEON et al., 2011).

O desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e antioxidantes podem gerar uma instabilidade no estado redox do organismo, produzindo o aumento de agentes oxidativos, favorecendo assim o surgimento de doenças neurodegenerativas ou até mesmo o câncer. Entender a complexidade dos mecanismos que envolvem a indução e a regulação do estresse oxidativo é essencial para o acompanhamento de indivíduos expostos a variados tipos de substâncias carcinógenas, ou mesmo durante o tratamento oncológico. Tendo em vista que o desequilíbrio da homeostase dentro das atividades e mecanismos antioxidantes é um ponto crucial não apenas para o acometimento, mas também para a terapêutica do câncer (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Comumente fármacos de variadas classes geram efeitos oxidativos sobre lipídeos, proteínas e DNA. A extensão desses danos ocasionados por ERO's e ERN's, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, respectivamente podem ser potencializados ou minimizados a partir dos mecanismos de defesas antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos. Nesse contexto, o monitoramento clínico de pacientes, por meio do doseamento de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), faz-se necessário em inúmeros tipos de tratamentos em saúde (YEON et al., 2011).

A indução de estresse oxidativo está diretamente ligada a desestabilização mitocondrial e geração de ER a inúmeras macromoléculas biológicas. Lipídeos, proteínas, carboidratos e o material genético são os principais alvos de moléculas instáveis como os radicais livres. Estes, associados a fatores endógenos, como as alterações epigenéticas, aumentam a influência de interferências sobre o DNA, com modificações na expressão

gênica para incidência de danos estruturais ao material genético, como consequências das interações de ER, processos que quando não reparados corretamente são critérios para o desencadeamento da morte celular, principalmente por apoptose em células saudáveis (CIRCU; AW, 2010; LIU; WANG, 2015).

3.3 Drogas antineoplásicas

A quimioterapia é uma das principais formas de tratamento de câncer. Drogas citotóxicas, que causam danos ao DNA, levando à morte células cancerosas, e drogas citostáticas, que interferem na síntese de DNA e na mitose, interrompendo a reprodução das células e levando-as a um estágio de senescência são amplamente utilizadas para este fim. Os químicos aplicados nestas finalidades, usados de forma isolada ou em associação terapêutica são denominados quimioterápicos ou antineoplásicos. (FREEDMAN; PATRIDGE, 2011; SWIFT; GOLSTEYN, 2014).

Esta classe de compostos compreende fármacos com variados mecanismos de ação antitumoral. Os agentes alquilantes impedem a multiplicação celular pela incorporação de grupos alquil sobre sua cadeia metabólica. Os antimetabólitos são responsáveis por inibir a biossíntese de DNA e RNA. Os antibióticos citotóxicos e inibidores da topoisomerase, interferem tanto no ciclo celular como na duplicação do material genético. Os agentes hormonais são usados na terapêutica de neoplasias malignas hormônio-sensíveis principalmente quanto aos níveis de estrogênio e progesterona, e os anticorpos monoclonais agem simulando o sistema imunológico do paciente oncológico atrapalhando a proliferação tumoral (FERRARI et al., 2010; CECILIO et al., 2015; BA-SANG et al., 2016).

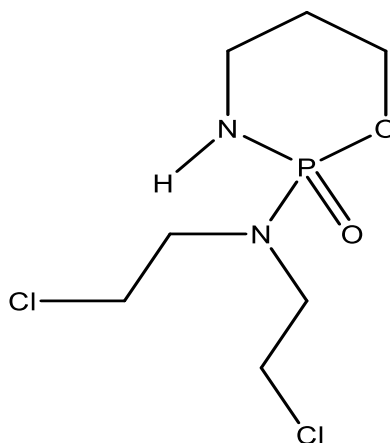
Os quimioterápicos se constituem em substâncias citotóxicas que atuam direta ou indiretamente no processo de proliferação celular, tendo como um dos principais objetivos a indução de apoptose em células cancerígenas (FREEDMAN; PARTRIDGE, 2011; DAI et al., 2013; BASU et al., 2015). Entre os esquemas quimioterápicos mais aplicáveis, existem os protocolos: FAC (5- Fluorouracil + Doxorrubicina + Ciclofosfamida), AC-T (Ciclofosfamida + Doxorrubicina + Taxol ou Paclitaxel) e AC (Doxorrubicina + Ciclofosfamida) (CIRILLO, 2008; GOMES JÚNIOR et al., 2015). A ciclofosfamida (CPA) e a doxorrubicina (DOX) apresenta-se como exemplos de quimioterápicos amplamente utilizados na terapêutica do câncer. Contudo, devido a não-seletividade destas drogas, as

mesmas podem afetar células normais, levando a surgimento de inúmeros e agressivos efeitos adversos nos pacientes durante a quimioterapia (DE ALMEIDA et al., 2005).

3.3.1 Ciclofosfamida

A CPA (**Figura 4**) é um antineoplásico de grande eficácia, utilizado no tratamento de neoplasias hematológicas e sólidas, além de doenças autoimunes, tais como artrite reumatoide, lúpus eritematoso e esclerose múltipla (BASU et al., 2015). A CPA ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$) é um agente alquilante citotóxico, cujos metabolitos, tais como a mostarda de fosforamida, reagem diretamente com o DNA e proteínas, produzindo *crosslinks*, efetuando seu efeito antineoplásicos (JAIN; JAIN, 2012). No entanto, a sua utilização tem sido associada ao desenvolvimento de efeitos adversos, tais como náusea, vômitos, alopecia, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (BHATTACHARJEE et al., 2014; BHATTACHARJEE et al., 2015).

Figura 4. Estrutura química da ciclofosfamida.



Adaptação de BASU et al., 2015.

Por ser um agente alquilante não-específico é capaz de induzir vários tipos de danos ao DNA, dentre eles danos oxidativos, mutações genéticas e aberrações cromossômicas (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008; DHESI et al., 2013; NAITO et al., 2015). A alta toxicidade da droga está relacionada, principalmente, à geração de radicais livres em tecidos normais e órgãos, levando ao processo de estresse oxidativo (ROY; CHAKRABORTY; BHATTACHARYA, 2014). A produção de ERO's e aumento da peroxidação lipídica é

devido a geração de acroleína, a qual constitui um metabólito da droga potencialmente tóxico, capaz de inativar proteínas e deprimir a síntese de defesas antioxidantes (NAFEES et al., 2015; LU et al., 2015), que podem alterar os efeitos antioxidantes da CPA.

Para a minimização dos efeitos adversos induzidos pela toxicidade de ciclofosfamida, são adotados protocolos de combinação da droga com substâncias antioxidantes e citoprotetivas (BASU et al., 2015). Wei e colaboradores (2012) demonstraram que a ciclofosfamida induz estresse oxidativo em ratos, o qual pode ser combatido pela administração de antioxidantes estereoespecíficos. Um estudo realizado por Roy, Chakraborty e Bhattacharya (2014) demonstrou que o estresse oxidativo e os danos ao DNA induzidos por ciclofosfamida podem ser minimizados com a administração oral de um composto de organoselênio com propriedades antioxidantes.

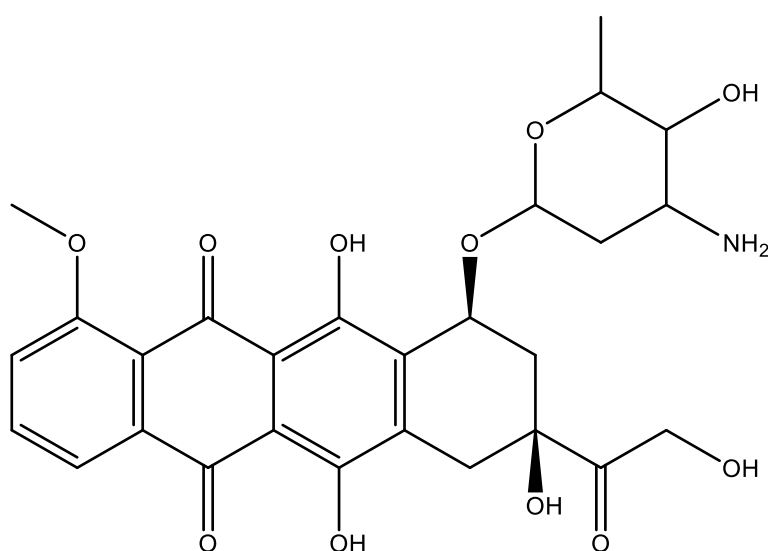
3.3.2 Doxorubicina

Isolada a partir de *Streptomyces peucetius var. caesi*, a doxorubicina (DOX), $C_{27}H_{29}NO_{11}$, também conhecida pelo nome comercial de adriamicina é um antibiótico citotóxico de antraciclina, utilizado no tratamento de diversos carcinomas, sarcomas de tumores moles e neoplasias hematológicas (**Figura 5**). Os mecanismos de ação desta droga incluem intercalação da molécula de DNA; bloqueio do reparo do material genético e da enzima topoisomerase II; assim como geração de radicais livres, durante o processo de oxidação da molécula em seu metabólito instável, a semiquinona (HADI et al., 2012). Como consequência, ocorre uma série de efeitos citotóxicos em conjunção com os efeitos antiproliferativos, que cessam a replicação de DNA e transcrição de RNA. (THORN et al., 2011). Além disso, DOX pode causar a ativação de vários sinais moleculares de sinalização, desde as proteínas quinases ativadas por AMP indutoras de apoptose (AMPKs – *AMP-activated protein kinase inducing apoptosis*) até a via de apoptose Bcl-2/Bax. Neste caso, DOX pode alterar as proporções Bcl-2/Bax, reduzir a ativação de diferentes caspases, causando apoptose de células cancerosas (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012).

No entanto, devido a não-seletividade da DOX, esta pode também induzir apoptose em células normais, levando a quadros de toxicidade no cérebro, fígado, rins e coração (MAKSIMENKO et al., 2014). Estudos demonstram que a utilização da doxorubicina pode

levar a geração exacerbada de ERO's, os quais podem mediar os mecanismos de cardiotoxicidade nos pacientes tratados (VINCENT et al., 2013). Verma e Vinayak (2012) sugerem que doses cumulativas e tóxicas de DOX podem ser evitadas por meio da utilização de doses baixas da droga em combinação com outras no tratamento do câncer. Ainda, o estudo realizado por Panchuk e colaboradores (2014) demonstrou que a utilização de agentes antioxidantes demonstrou efeitos protetivos contra a ação citotóxica de doxorubicina *in vivo* e *in vitro*.

Figura 5. Estrutura química da doxorubicina.



Adaptação de HADI et al., 2012.

Dentro deste contexto, os fármacos podem ser empregados em associações visando à utilização de menores doses e buscando o sinergismo entre esses fármacos, favorecendo uma relação de risco/benefício mais favorável ao paciente. O protocolo AC, associação entre a DOX e a CPA, apresenta aplicação terapêutica no tratamento neoadjuvante de cânceres, tornando-se um padrão terapêutico em pacientes com estadiamento oncológico avançado (MALDONATTO, LIMPER, JETT, 2012; VRIENS et al., 2013).

3.4 Palmitato de retinol

O estresse oxidativo não está relacionado apenas com a toxicidade das terapias oncológicas, mas também com a própria etiologia do câncer, isto é decorrente do acúmulo de ERO's entrando em conflito com o potencial neutralizador antioxidante do organismo. No

câncer, as espécies reativas podem agir estimulando a proliferação celular intermediada por mutações danificando o DNA, ocasionando uma progressão tumoral. Entretanto, existe a possibilidade de prevenção da desordem entre as moléculas antioxidantes e pró-oxidantes através de nutrientes que em sua composição disponibilizam vitaminas antioxidantes, como os retinóides, que são capazes de neutralizar radicais livres (PORTANTIOLO et al., 2014).

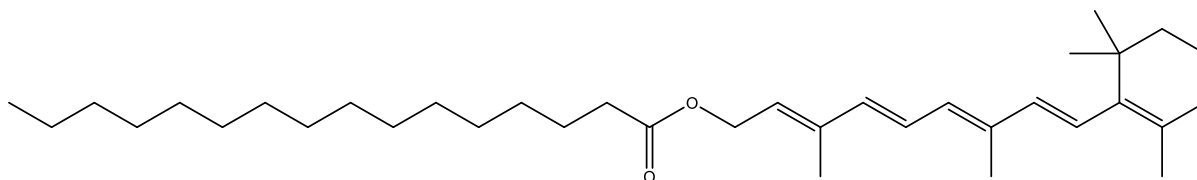
Os nutrientes antioxidantes podem apresentar ação benéfica tanto na prevenção quanto no tratamento do câncer, e sua ação é capaz de minimizar os efeitos colaterais relacionados à quimioterapia. A vitamina A é também conhecida como retinol, é uma das vitaminas solúveis em gordura que atua em uma série de processos fisiológicos incluindo a visão, desenvolvimento corporal, hematopoiese, sistema imune e diferenciação celular. A vitamina A é considerada como um importante micronutriente na dieta dos mamíferos e chega aos tecidos sob a forma de retinol. A vitamina A se apresenta principalmente em duas formas: retinol e ácido retinóico, no qual o ácido retinóico (AR) é o metabolito ativo da vitamina A. O AR funciona como um bom agente antioxidante atuando contra o stress oxidativo no organismo animal, uma vez que neutraliza os radicais livres (BANALA; KARNATI, 2015; SHAO et al., 2016.).

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

Dentre as variações nos tratamentos para os cânceres, inclui-se o equilíbrio dietético e nutricional dos pacientes. Embora ainda sem uma adequada consonância científica, a suplementação de vitaminas antioxidantes, como os derivados ou precursores da vitamina A, entre eles: retinol, palmitato de retinol e carotenóides que comumente são introduzidos em consonância aos protocolos quimioterápicos (FELISBINO et al., 2014; RAHAL et al., 2014). Dessa forma, inúmeras variedades de estudos científicos são aplicados com a finalidade de compreender a eficiência das terapias oncológicas. Dentre estas, metodologias computacionais, novas tecnologias genômicas e aplicação de sistemas-modelos e/ou

modelos de estudo pré-clínicos despontam como os caminhos mais propícios para a comprovação da eficácia de terapias clínicas em pacientes oncológicos (HU, ZHANG, 2016).

Figura 6. Estrutura química do palmitato de retinol.



Adaptação de NIH, 2012.

3.5 Modelos de estudo para monitoramento de fármacos

3.5.1 Linhagens de células cancerígenas de Sarcoma 180

Os sarcomas são um grupo heterogêneo de neoplasias mesenquimais que podem ser divididos em dois tipos gerais: sarcoma ósseo primário e sarcoma de tecido mole (SKUBITZ; D'ADAMO, 2007). Sarcoma ósseo primário inclui principalmente osteossarcoma, sarcoma de Ewing e condrossarcoma; sarcoma dos tecidos moles incluem principalmente leiomiossarcoma, sarcoma sinovial, rabiomiossarcoma e lipossarcoma. Sarcoma de tecido ósseo e mole pode ocorrer em todas as faixas etárias, e a incidência tem aumentado nos últimos 30 anos (YOUN; MILANO; CONSTINE, 2014).

Os sarcomas apresentam diferentes bases genéticas e anomalias citogenéticas e variam de rearranjos genômicos distintos (CONYERS; YOUNG; THOMAS, 2011). Não obstante, existem algumas condições que favorecem o uso de experimentos com tumores transplantáveis na forma ascítica, tais como a facilidade na padronização do número de células a serem inoculadas; quantificação do crescimento e regressão da massa tumoral, quando for o objetivo do estudo; possibilidade de realizar um estudo comparativo, utilizando dos mesmos métodos de pesquisa, na corrente sanguínea e nos fluidos corporais (NERY, 2004). Sendo assim, o uso do modelo experimental utilizando células tumorais como aquelas derivadas do Sarcoma 180 tem sido um excelente modelo de estudo, uma vez que apresenta

eficiente e rápida fase de promoção quando comparados com outros modelos experimentais tumorigênicos (OLIVEIRA- JÚNIOR et al., 2005).

O sarcoma de camundongos (Sarcoma 180) foi um dos primeiros tumores experimentais a serem transplantados em animais. Inicialmente este tumor, descoberto em 1914 como uma massa sólida na axila direita de um camundongo albino, foi denominado como Tumor de *Crocker*. Esse tumor foi primariamente classificado como carcinoma mamário, mas após várias transplantações subcutâneas, observou-se que suas características morfológicas e seu comportamento eram característicos de um sarcoma e passou, então, a ser chamado de Sarcoma 180 (QI; XU, 2006).

O tumor na forma ascítica é intensamente utilizado em sistemas experimentais, uma vez que facilita a definição da quantidade de células que serão transplantadas, o que permite certo grau de controle. O tumor desenvolve-se na forma sólida desde que seja inoculado por via subcutânea ou intramuscular em camundongos e cresce na forma ascítica quando inoculado por via intraperitoneal (RIZZO, 2000; MATSUZAKI et al., 2003; BERGAMI-SANTOS; MARIANO; BARBUTO, 2004). A identificação da progressão tumoral está possibilitando o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas tendo como alvo células presentes no microambiente tumoral, enfatizando a importância da elaboração de novas estratégias com o restabelecimento do controle do ciclo celular por meio de agentes que atuem nos pontos de checagem, disponibilizando de estratégias viáveis na terapia anticâncer. Neste sentido, o modelo Sarcoma 180 pode ser utilizado para avaliar a ação de componentes físicos, biológicos e químicos sobre o crescimento, patogênese, imunologia, cinética e terapia de células tumorais (ATKINS, 2006; FISCHER et al., 2007).

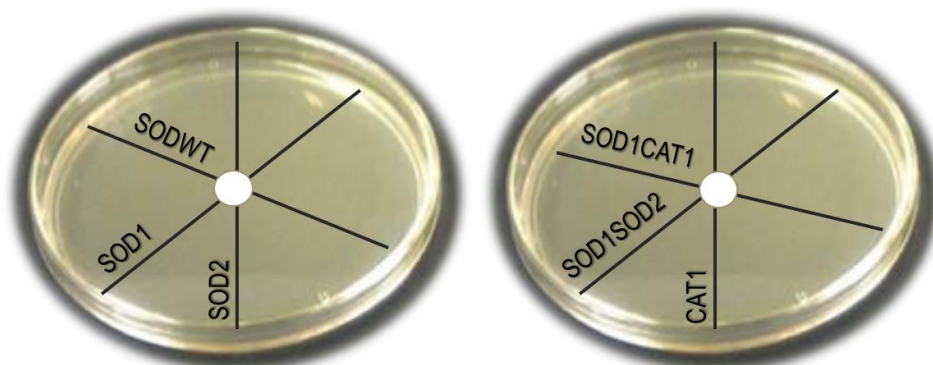
Modelos com sarcoma são fundamentais para o entendimento da biologia molecular do câncer. Os sarcomas são distinguidos por aberrações moleculares tais como mutações, deleção intergenes, ampliações de genes e translocações (QUESADA; AMATON, 2012). O sarcoma 180 (S180) é bastante utilizado em estudos experimentais com taxa de disseminação e índice de proliferação determinados, permitindo o estudo comparativo no uso de substâncias potencialmente tóxicas. O transplante de suas células é realizado, em animais, via inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal, com crescimento em até 100% dos casos, no qual pode ocorrer regressão natural em 8 a 10% (WAL et al., 2003).

3.5.2 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Estudos pré-clínicos *in vivo* se apresentam como modelos eficientes na extrapolação de resultados, mesmo com limitações, para comparações com organismos superiores, como os mamíferos (KIRKLAND et al., 2014). Organismos eucariontes simples, por serem de fácil manuseio, cultivo e rápida multiplicação celular, como a *Saccharomyces cerevisiae* são padronizados como modelos de pesquisa para análise de propriedades tóxicas e/ou oxidantes em compostos, medicamentos, extratos ou substâncias isoladas (HOSTETTER; OSBORN; DE ROSE, 2012). As linhagens de *S. cerevisiae* proficientes ou mutadas em suas defesas antioxidantes são comumente utilizadas na avaliação da atividade de compostos, naturais ou sintéticos, frente aos mecanismos de defesa antioxidante destes organismos unicelulares eucariotos. Tendo em vista a existência de enzimas antioxidantes funcionalmente semelhantes à de humanos, a extrapolação de resultados comparativos quanto a segurança na liberação do uso de fármacos e a consolidação de protocolos terapêuticos torna-se mais eficaz (OLIVEIRA et al., 2014a).

Em geral, seis linhagens leveduriformes são semeadas em meios de cultura, líquidos ou sólidos, neste tipo de estudo (**Figura 7**). A linhagem EG118 foi mutada em laboratório para torna-se deficiente no sistema enzimático quanto a enzima superóxido dismutase citoplasmática (gene *SOD1*), já a EG110 não apresenta a *SOD* mitocondrial (gene *SOD2*). A linhagem EG133 é mutada para as duas enzimas, caracterizada pela ausência da *SOD1* e *SOD2*. EG223 é proficiente em defesa antioxidante para a enzima catalase (*CAT1*) e EG103 corresponde à linhagem selvagem (*SODWT*), portanto proficiente nestas enzimas mitocondriais e citoplasmáticas.

Figura 7. Esquema de posicionamento das linhagens utilizadas no teste com *S. cerevisiae* para determinação do potencial oxidante ou antioxidante de compostos.



3.5.3 Biomarcadores toxicogenéticos

Dentro da avaliação toxicológica de fármacos e produtos naturais, a pesquisa em genética toxicológica surge como um campo relativamente novo, mas essencial dentro da análise e controle de medicamentos. Vale ressaltar que este campo vai bem além da análise de toxicidade aguda e crônica de compostos, apresentando inclusive relação direta com o campo da citogenética como base para a mensuração de interferências sobre a estrutura tridimensional e funcional do material genético (TORRES-BUGARÍN et al., 2014).

O DNA lesionado segue obrigatoriamente três vias fisiológicas a depender da funcionalidade dos mecanismos endógenos relacionados a reparação de danos no material genético. Na ausência de reparação dos danos sobre o material genético, o mesmo perde as atividades que seriam conferidas após a codificação genética daquele segmento. Caso o reparo seja incorreto, mutações podem ser geradas, por exemplo, pelo mal pareamento de bases nitrogenadas. Entretanto, quando o sistema de reparo responde corretamente, o DNA é completamente restaurado (FENECH, 2007).

A idade, sexo e constituição genética apresentam-se como fatores endógenos relacionados com a predisposição para o acometimento de mutações sobre a molécula de DNA. Hábitos de consumo e alimentação, exposição a medicamentos e outros agentes químicos, físicos e biológicos surgem como fatores exógenos aos organismos quanto a probabilidade de influenciarem alterações morfológicas no DNA. Estes agentes, podem estar ligados a interferências funcionais, espontâneas ou induzidas, no material genético, o que irá gerar efeitos silenciosos ou não aos organismos (BITGEN et al., 2016; TORRES-BUGARÍN et al., 2014).

Em geral, as alterações mais comuns são aquelas que não modificam a quantidade de cromossomos de uma célula, mas podem originar cromossomos anormais. Nesse sentido, quebras e ampliações do DNA podem ser facilmente detectadas por meio de técnicas citogenéticas em inúmeros modelos de estudo, *ex vivo* e *in vivo*. Assim, o biomonitoramento, por meio de testes toxicogenéticos, que avaliam a ocorrência de danos e anormalidades nucleares, a exemplo do teste cometa e do teste de micronúcleos (MN) possibilita o acompanhamento dos efeitos de agentes estressores ao material genético em inúmeros tipos de sistemas biológicos (BONASSI, et al., 2011; EL-ZEIN et al., 2014).

O teste citogenético cometa, quando realizado sob pH alcalino recebe esta denominação por avaliar através de uma técnica eletroforética a presença de quebras nas moléculas de DNA, de lesões em sítios alcalino-sensíveis e em sítios de reparo por excisão incompleta e danos oxidativos, em células eucarióticas. Por ser uma técnica aplicável para o controle de inúmeros tipos de substâncias, como fármacos já em comercialização, o teste cometa representa uma versatilidade no monitoramento de protocolos terapêuticos para mensuração do potencial genotóxico de drogas isoladas ou em associação (CASH et al., 2014).

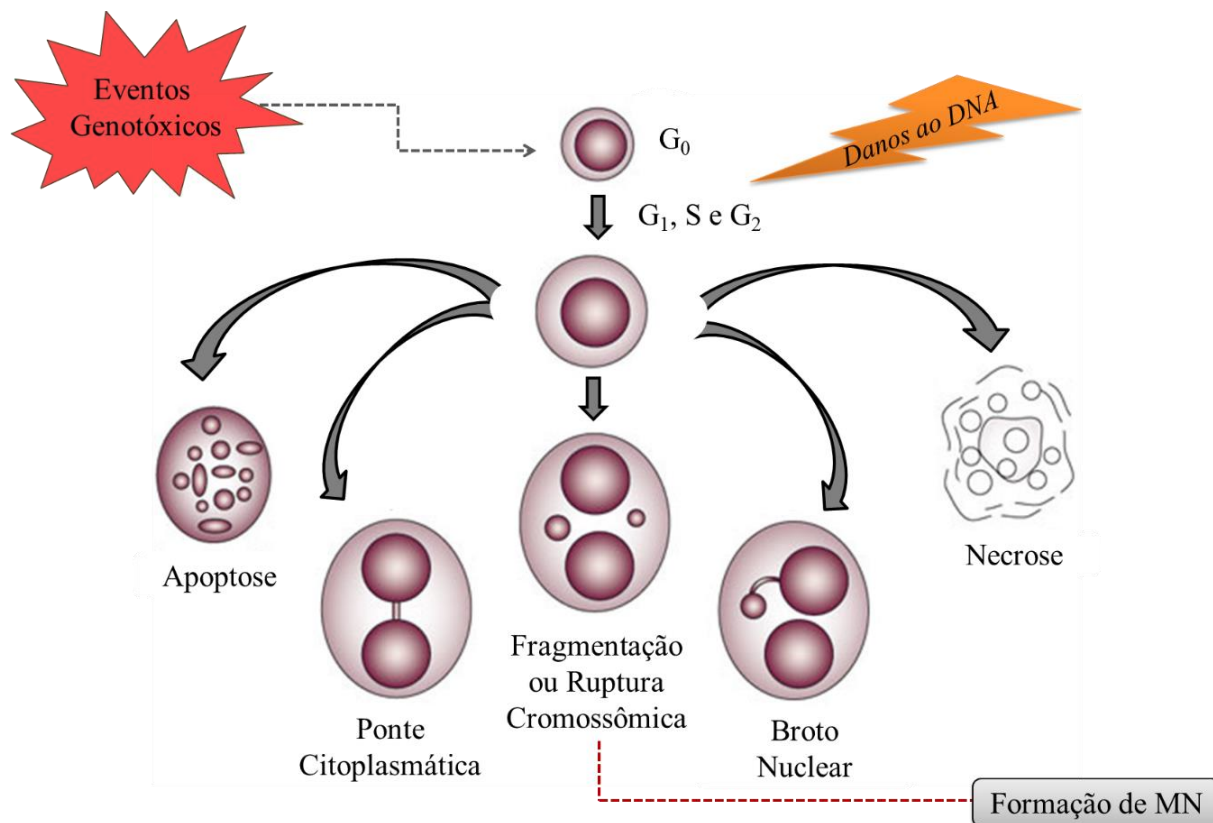
Os biomarcadores citogenéticos são parâmetros biológicos utilizados como objeto de estudo para avaliação de processos fisiológicos normais ou patológicos, dietas alimentares, estilo de vida, respostas farmacológicas e intervenções terapêuticas em saúde. Estes indicadores além de permitir a mensuração de riscos ambientais e ocupacionais, contribuem com os avanços em terapias clínicas por meio da detecção e quantificação de alterações citológicas, genéticas e moleculares em células ou organismos expostos a inúmeros tipos de agentes (TORRES-BUGARÍN et al., 2014; BOLOGNESI et al., 2015), que podem ser avaliados com teste de micronúcleos.

O teste de MN com bloqueio de citocinese – CBMN – (**Figura 8**) permite a detecção de variadas anormalidades celulares por intervir sobre a etapa final da divisão celular (FENECH, 2007). Os micronúcleos são fragmentos ou cromossomos acêntricos derivados de erros na anáfase da divisão nuclear, não sendo destinados para uma nova célula (BOLOGNESI; FENECH, 2012). Já as falhas em rearranjos cromossômicos ou a fusão de extremidades cromossomais, telômeros, permitem a formação de filamentos de cromatina que ligam dois núcleos distintos chamados de pontes nucleoplasmáticas (FENECH et al., 2011) e os brotos nucleares estão associados à amplificação do DNA, e a não segregação do núcleo, apresentando-se como prolongamentos do próprio espaço nuclear (BITGEN et al., 2016).

Técnicas citogenéticas permitem o biomonitoramento de organismos sob a ação lesiva e tóxica de agentes químicos. Entretanto, a pesquisa com seres humanos enfrenta grandes entraves metodológicos e principalmente éticos para aprovação e realização. Nesse contexto, os modelos de estudo pré-clínicos, como atividades em pesquisa envolvendo roedores *Mus musculus*, mesmo com inúmeros entraves para sua aplicação, apresentam-se

irrevogavelmente como ferramentas eficazes na compreensão de inúmeros processos biológicos e farmacodinâmicos (BOLOGNESI et al., 2013; AKYIL; KONOK, 2015).

Figura 8. Indução de anormalidades nucleares, micronúcleos (MN) e morte celular por agentes citotóxicos e genotóxicos em culturas de células com bloqueio de citocinese.



Fonte: Adaptação de Fenech, 2007.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. 2ª versão. Brasília: ANVISA, 2013. 48 p.
- AKYIL, D.; KONUK, M. Detection of genotoxicity and mutagenicity of chlorthiophos using micronucleus, chromosome aberration, sister chromatid exchange, and Ames tests. **Environmental Toxicology**, v. 30, n. 8, p. 937-945, 2015.
- AMBERG, D. C.; BURKE, D. J. Classical Genetics with *Saccharomyces cerevisiae*. **Cold Spring Harbor Laboratory**, v. 5, 2016.
- ASIĆ, K. Dominant mechanisms of primary resistance differ from dominant mechanisms of secondary resistance to targeted therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 97, p. 178-196, 2016.
- ATKINS, M. B. Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. **Clin Cancer Res**, v. 2, n. 7, 2006.
- BANALA, R. R.; KARNATI, P. R. An oxidative stress marker in sodium fluoride (NaF) induced oxidative damage in developing rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 47, p. 298-303, 2015.
- BA-SANG, D. Z.; LONG, Z. W.; TENG, H.; ZHAO, X. P.; QIU, J.; LI, M. S. A network meta-analysis on the efficacy of sixteen targeted drugs in combination with chemotherapy for treatment of advanced/metastatic colorectal cancer. **Oncotarget**, 2016.
- BASU, A.; BHATTACHARJEE, A.; SAMANTA, A.; BHATTACHARYA, S. Prevention of cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and genotoxicity: Effect of an l-cysteine based oxovanadium (IV) complex on oxidative stress and DNA damage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 747-757, 2015.
- BERGAMI-SANTOS, P. C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J. A. M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 245-255, 2004.
- BHATTACHARJEE, A.; BASU, A.; BISWAS, J.; BHATTACHARYA, S. Nano-Se attenuates cyclophosphamide-induced pulmonary injury through modulation of oxidative stress and DNA damage in Swiss albino mice. **Mol. Cell. Biochem**, v. 405, p. 243-256, 2015.
- BHATTACHARJEE, A.; BASU, A.; GHOSH, P.; BISWAS, J.; BHATTACHARYA, S. Protective effect of Selenium nanoparticle against cyclophosphamide induced hepatotoxicity and genotoxicity in Swiss albino mice. **J. Biomater. Appl**, v. 29, p. 303-317, 2014.

BITGEN, N.; DONMEZ-ALTUNTAS, H.; BAYRAM, F.; ÇAKIR, I.; HAMURCU, Z.; DIRI, H.; BASKOL, G.; SENOL, S.; DURAK, A. C. Increased micronucleus, nucleoplasmic bridge, nuclear bud frequency and oxidative DNA damage associated with prolactin levels and pituitary adenoma diameters in patients with prolactinoma. **Biotechnic & Histochemistry**, vol. 91, i. 2, p. 128-136, 2016.

BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Mussel micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v.7, n .6, p. 1125-1137, 2012.

BOLOGNESI, C.; KNASMUELLER, S.; NERSESYAN, A.; FENECH, M. F. et al. The HUMNxl scoring cells types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – na update and expanded photogallery. **Mutation Research**, v. 753, n. 2, p. 100-113, 2013.

BOLOGNESI, C.; BONASSI, S.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M.; BRUZZONE, M.; LANDO, C.; CEPPI, M. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 766, p. 20-31, 2015.

BONASSI, S.; EL-ZEIN, R.; BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 93-100, 2011.

CALMANOVICI, R. W.; VIALE, L. C. SAN-MARTÍN. Effect of some antineoplasics on metabolic heme pathway. **International Journal of Biochemistry**, v. 20, p. 1015-1020, 1988.

CASH, S. W.; BERESFORD, S. A. A.; VAUGHAN, T. L.; HEAGERTY, P. J.; BERNSTEIN, L.; WHITE, E.; NEUHOUSER, M. L. Recent physical activity in relation to DNA damage and repair using the comet assay. **Journal of Physical Activity and Health**, v. 11, n.4, p. 770–776, 2014.

CECILIO, A. P. TAKAKURA, E. T.; JUMES, J. J.; SANTOS, J. W.; HERRERA, A. C.; VICTORINO, V. J.; PANIS, C. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 7, p. 43–49, 2015.

CHANG, H.; SHEEN, L.; LEI, Y. The protective role of carotenoids and polyphenols in patients with head and neck cancer. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 78, p. 89–95, 2015.

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

CIRILLO, J. V. Chemoterapeutic treatment of mammary neoplasms in female dogs and cats. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**. v. 26, n 3. p. 325-7, 2008.

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

DAI, R. Y.; ZHAO, X. F.; LI, J. J.; CHEN, S. K.; ZHANG, C. Y.; DUAN, C. Y.; LIU, Y. P.; FENG, C. H.; XIA, X. M.; LI, H.; WANG, H. Y. Implication of transcriptional repression in compound C-induced apoptosis in cancer cells. **Cell Death & Disease**, v.4, n.10, p. 9-15, 2013.

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

DEMARIA, S.; PIKARSKY, E.; KARIN, M.; COUSSENS, L. M.; CHEN, Y.-C.; EL-OMAR, E. M.; TRINCHIERI, G.; DUBINETT, S. M.; MAO, J. T.; SZABO, E.; KRIEG, A.; WEINER, G. J.; FOX, B. A.; COUKOS, G.; WANG, E.; ABRAHAM, R. T.; CARBONE, M.; LOTZE, M. T. **Cancer and Inflammation: Promise for Biologic Therapy**, v. 33, 2010.

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

EL-ZEIN, R. A.; LOPEZ, M. S.; D'AMELIO JR, A. M.; LIU, M.; MUNDEN, R. F., CHRISTIANI, D.; SU, L.; TEJERA-ALVERAZ, A.; ZHAI, R.; SPITZ, M. R.; ETZEL C. J. The Cytokinesis Blocked Micronucleus Assay as a Strong Predictor of Lung Cancer: Extension of a Lung cancer risk prediction model. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 23, n.º. 11, p. 2462–2470, 2014.

FELISBINO, S.; MORENO, V.; BATISTA, A. A.; SILVEIRA-LACERDA, E. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium (II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 105-125, 2014.

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

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**, vol. 26, n. 1, p. 125–132, 2011.

FERRARI, S.; PALMERINI, E.; ALBERGHINI, M.; STAALS, E.; MERCURI, M.; BARBIERI, E. et al. Vincristine, doxorubicin, cyclophosphamide, actinomycin D, ifosfamide, and etoposide in adult and pediatric patients with nonmetastatic Ewing sarcoma. Final results of a monoinstitutional study. **Tumori Journal**, v. 96, n. 2, p. 213-218, 2010.

FERREIRA, P. M. P.; MILITÃO, G. C. G.; LIMA, D. J. B.; COSTA, N. D. J.; MACHADO, K. C.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S. PESSOA, C. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenes. **Chemical-Biological Interactions**, v. 222, p.112-125, 2014.

FISCHER, C.; JONCKX, B.; MAZZONE, M.; ZACCHIGNA, S.; LOGES, S.; PATTARINI, L. AntiPIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy Vessels. **Cell.**, v. 131, p. 463-75, 2007.

FREEMAN, L. R.; KELLER, J. N. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood–brain-barrier and antioxidant based interventions. **Biochim Biophys Act.**, v. 1822, n. 5, p. 822-829, 2012.

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.

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

GÖNENÇ, A.; HACIŞEVKI, A.; ASLAN, S.; TORUN, M.; ŞİMŞEK, B. Increased oxidative DNA damage and impaired antioxidant defense system in patients with gastrointestinal cancer. **Eur. J. Intern. Med.**, v. 23, n. 4, p. 350-354, 2012.

GREENLEE, H. Natural Products for Cancer Prevention. **Seminars in Oncology Nursing**. v. 28, p. 29–44, 2012.

HADI, N.; YOUSIF, N. G.; AL-AMRAN, F. G.; HUNTEI, N. K.; MOHAMMAD, B. I.; ALI, S. J. Vitamin E and telmisartan attenuates doxorubicin induced cardiac injury in rat through down regulation of inflammatory response. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 12, n. 63, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 15 ed. New York: Oxford University Press, 2015.

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

HU, X.; ZHANG, Z. Understanding the Genetic Mechanisms of Cancer Drug Resistance Using Genomic Approaches. **Trends in Genetics**, v. 32, i. 2, p. 127-137, 2016.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa | 2016**. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

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

JOHANSSON, C. H.; BRAGE, S. E. BRAF inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 142, I. 2, p. 176–182, 2014.

- KIRKLAND, D. et al. Can in vitro mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or in vivo genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 775-776, p. 55–68, 2014.
- LIU, J.; WANG, Z. Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015.
- LU, W.; MEI, X.; WANG, Y.; ZHENG, Y.; XUE, Y.; XU, D. Zn (II)–curcumin protects against oxidative stress, deleterious changes in sperm parameters and histological alterations in a male mouse model of cyclophosphamide-induced reproductive damage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 515–524, 2015.
- MAKSIMENKO, A.; DOSIO, F.; MOUGIN, J.; FERRERO, A.; WACK, S.; REDDY, L. H. A unique squalenoylated and nonpegylated doxorubicin nanomedicine with systemic long-circulating properties and anticancer activity. **PNAS USA**, p. 217–226, 2014.
- MALDONADO, F.; LIMPER, A. H.; JETT, J. R. Pulmonary toxicity associated with antineoplastic therapy: cytotoxic agents. **Uptodate.com** [Internet]. 2012 [cited 2016 Nov 16; last updated: Mar 29, 2012].
- MATSUZAKI, P., AKISUE, G., OLORIS, S.C.S., GÓRNIK, S., DAGLI, M.L.Z. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. **Life Sciences**, v. 74, p. 573-579, 2003.
- MENDONÇA, F.; SOARES, R. Obesity and cancer phenotype: Is angiogenesis a missed link? **Life Sciences**, v. 139, p. 16-23, 2015.
- MÖHLER, H.; PFIRMAN, R. W.; FREI, K. Redox-directed cancer therapeutics: Taurolidine and Piperlongumine as broadly effective antineoplastic agents (Review). **International Journal of Oncology**, v. 45, p. 1329-1336, 2014.
- NAFEES, S.; RASHID, S.; ALI, N.; HASAN, S. K.; SULTANA, S. Rutin meliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: role of NFκB/MAPK pathway. **Chem. Biol. Interact.**, v. 231, p. 98–107, 2015.
- NAITO, T.; BABA, T.; TAKEDA, K.; SASAKI, S.; NAKAMOTO, Y.; MUKAIDA, N. High-dose cyclophosphamide induces specific tumor immunity with concomitant recruitment of LAMP1/CD107a-expressing CD4-positive T cells into tumor sites. **Cancer Letters**, v. 366, p. 93–99, 2015.
- NERY, L. H. R. **Eficácia da dexametasona e da doxorubicina no tumor de Ehrlich transplantado em camundongos BALB/c**. [Tese] Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 2004. 71 pgs.
- NIH. U.S. Department of Health and Human Services. National Toxicology Program. **Photocarcinogenesis Study of Retinoic Acid and Retinyl Palmitate in SKH-1 Mice**. National Institutes of Health, NTP TR 568, n. 12-5910, 2012.

- NOWSHEEN, S.; YANG, E.S. The intersection between DNA damage response and cell death pathways. **Experimental Oncology**, 34, n. 3, p. 243-254, 2012.
- OLIVEIRA, M. B.; PRADO, A. H.; BERNEGOSSI, J.; SATO, C. S.; BRUNETTI, I. L.; SCARPA, M. A. Topical Application of Retinyl Palmitate-Loaded Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for the Treatment of Skin Aging. **BioMed Research International**, 2014.
- OLIVEIRA-JÚNIOR, R. J.; CHESCHINI, J. J.; HUMANES, A. C.; MORELLI, S.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. **Caracterização citogenética de uma linhagem celular tumoral (Sarcoma 180) de *Mus musculus***. Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia. 2005.
- PANCHUK, R.; SKOROKHYD, N.; CHUMAK, V.; STOIKA, R. Specific antioxidant compounds differentially modulate cytotoxic activity of doxorubicin and cisplatin: In vitro and in vivo study. **Croatian Medical Journal**, v. 55, n. 3, p. 206-217, 2014.
- PETERSEN, R. C. Reactive secondary sequence oxidative pathology polymer model and antioxidant tests. **IJPAC**, v. 2, n. 4, 247-285, 2012.
- PORTANTIOLO, T. N.; VALE, I. A. V.; BERGMANN, R. B.; ABID, R. T. Consumo de Vitaminas Antioxidantes por Mulheres com Câncer de Mama submetidas ao Tratamento Quimioterápico na Cidade de Pelotas-RS. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n. 4, p. 323-329, 2014.
- PORTO, M.; LÍRIO, L. M.; DIAS, A. T.; BATISTA, A. T.; CAMPAGNARO, B. P.; MILL, J. G.; MEYRELLES, S. S.; BALDO, M. P. Increased oxidative stress and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of fructose-fed rats. **Toxicol In Vitro**, v. 29, p. 1977-1981, 2015.
- PYLVAS, M.; PUISTOLA, U.; KAUPPILA, S.; SOINI, Y.; KARIHTALA, P. Oxidative stress-induced antioxidant enzyme expression is an early phenomenon in ovarian carcinogenesis. **Eur. J. Cancer**, v. 46, n. 9, p. 1661-1667, 2010.
- QI, L.; XU, Z. *In vivo* antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorganic Med. Chem. Letters**, v. 16, n. 16, p. 4243-4245, 2006.
- 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. **Nutrition and Cancer**, v. 2014, p. 7612-7624, 2014.
- RIZZO, M. S. **Colonização Preferencial e Disseminação do Tumor Transplantável de Ehrlich em Camundongos**. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ROCHETTE-EGLY, C. Retinoic acid signaling and mouse embryonic stem cell differentiation : Cross talk between genomic and non-genomic effects of RA ☆.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, v. **1851**, p. **66–75**, 2015.

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

SÁNCHEZ-PÉREZ, I.; PERONA, R. Signal transduction pathways activated by antineoplastic drugs and their role in apoptosis. **European Journal of Cancer**, v. 35, p. S108, 1999.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, P.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; GALLEGOS-HERNÁNDEZ, F.; PEÑARROJA-FLORES, R.; TOLEDO-GARCÍA, J.; BRAVO, J. L.; DEL CASTILLO, E. R.; BENÍTEZ-BRIBIESCA, L. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. **Mutation Research**, v. 640, p. 8 – 15, 2008.

SHAO, L.; ZHU, X.; YANG, Y.; JIN, J.; LIU, H.; HAN, D.; XIE, S. Effects of dietary vitamin A on growth, hematology, digestion and lipometabolism of on-growing gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). **Aquaculture**, v. 460, p. 83-89, 2016.

SKUBITZ, K. M.; D'ADAMO D. R. Sarcoma. **Mayo Clin Proc**, v. 82, p. 1409–1432, 2007.

SLOAN, F. A.; GELBAND, H.; eds. **Cancer Control Opportunities in Low- and Middle-Income Countries**. Washington, DC: National Academies Press, 2007.

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

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

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

THORN, C. F.; OSHIRO, C.; MARSH, S.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; MCLEOD, H.; KLEIN, T. E. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, n. 7, p. 440–446, 2011.

TORRES-BUGARÍN, O.; ZAVALA-CERNA, M. G.; NAVA, A.; FLORES-GARCÍA, A.; RAMOS-IBARRA, M. L. Potential Uses, Limitations, and Basic Procedures of Micronuclei and Nuclear Abnormalities in Buccal Cells. **Disease Markers**, 2014.

VERMA, N.; VINAYAK, M. A low dose of doxorubicin improves antioxidant defence system and modulates anaerobic metabolism during the development of lymphoma. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 44, n. 3, p. 308-313, 2012.

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

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

WAL, R.; SATO, D.; OLIVEIRA, C. C.; LOPES, L.; OLIVEIRA, S. M.; DIBERNARDI, R. P.; GEHRKE, S.; PALAURO, F. R.; BUCHI, D. F. Immunomodulation in Sarcoma-180 Bearing Mice. **Cell and Molecular Biology of Cancer**, p. 34, 2003.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. WHO. Disponível.
<<http://www.who.int/cancer/en/>>. Data de acesso: 16/05/2016.

YEON, J. Y.; SUH, Y. J.; KIM, S. W.; BAIK, H. W.; SUNG, C. J.; KIM, H. S. et al. Evaluation of dietary factors in relation to the biomarkers of oxidative stress and inflammation in breast cancer risk. **Nutrition**, v. 27, n. 9, p. 912-918, 2011.

YOUN, P.; MILANO, M. T.; CONSTINE, L. S. Long-term cause-specific mortality in survivors of adolescent and young adult bone and soft tissue sarcoma: a population-based study of 28,844 patients. **Cancer**, v. 120, p. 2334–2342, 2014.



Capítulo I

**VITAMINA A: ENTRAVES PARA A PREVENÇÃO E TERAPIA DO
CÂNCER**

VITAMINA A: ENTRAVES PARA A PREVENÇÃO E TERAPIA DO CÂNCER

Ricardo Melo de Carvalho¹; Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata¹;
Reyca Rodrigues e Silva¹; Marcus Vinicius Oliveira Barros de Alencar¹; Ana Amélia de
Carvalho Melo Cavalcante¹

¹ Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica, LAPGENIC - Universidade Federal do Piauí, UFPI, Ininga, CEP: 64.049-550, Teresina/PI – Brasil. E-mail: ricardo_carvalho50@hotmail.com

RESUMO

A dieta é apontada como agente quimiopreventivo ou como um fator de risco para o acometimento do câncer. Tendo em vista a problemática da prevenção e terapêutica do câncer, o equilíbrio nutricional dos pacientes oncológicos é de suma importância. A suplementação de compostos antioxidantes, como a vitamina A em suas inúmeras variações estruturais, a fim de atenuar o estresse oxidativo, em indivíduos portadores de câncer ainda é uma incógnita. A análise sistemática de 75 artigos indexados nas bases de dados PubMed e *Science Direct*, publicados a priori entre 2014 e 2015, teve o objetivo de relacionar a vitamina A como um composto anti ou pró-oxidante por meio da verificação de controvérsias relatadas quanto a ingestão desta substância como um agente em potencial para a prevenção e terapia do câncer. Embora o risco do acometimento de certos tipos de cânceres possa ter diminuído mediante a ingestão de doses diárias mais baixas, pesquisas também clínicas demonstram incongruências entre resultados que reportam ingestões de altas doses de vitamina A em estudos para este tipo de associação. Portanto, a inconstância dos efeitos dos precursores, derivados ou metabólitos da vitamina A, conota uma precaução quanto a sua suplementação nutricional não somente durante o combate do câncer, mas especialmente durante as terapias oncológicas.

Palavras-chave: Vitamina A; Estresse oxidativo; Câncer.

ABSTRACT

The diet is seen as a chemopreventive agent or as a risk factor for the onset of cancer. Considering the problems regarding the cancer prevention and treatment, nutritional balance of cancer patients is of great importance. Supplementation of antioxidant compounds such as vitamin A with its many structural variations, in order to alleviate the oxidative stress in cancer patients, is still unknown. A systematic review of 75 articles indexed in the PubMed and Science Direct databases, published particularly between 2014 and 2015, aimed to link vitamin A as an anti-oxidant or pro-oxidant compound, through the verification of reported controversy regarding the intake of this compound as a potential agent for cancer prevention and therapy. Although the risk of the onset of certain cancers may have decreased by the intake of lower daily doses, clinical studies showed discrepancies between the results that report ingestion of high doses of vitamin A in studies for this type of association. Therefore, the fickleness of the effects of precursors, derivatives or metabolites of vitamin A connotes a precaution concerning its nutritional supplementation for cancer fight.

Keywords: Vitamin A; Oxidative stress, Cancer.

1 Introdução

O câncer é uma das maiores causas de morte em todo mundo, e por apresentar inúmeros tipos e estágios, sempre é caracterizado pela dificuldade na prevenção e principalmente na problemática do tratamento e comumente da sua cura. Com o intuito de melhorar o prognóstico desta e de outras desordens, o equilíbrio dietético dos pacientes tem-se mostrado fundamental (BOZZETTI, 2015). Entretanto, a incorporação de micronutrientes minerais, zinco e selênio; e principalmente de análogos e derivados vitamínicos isolados ou combinados na alimentação para este fim, mesmo com os inúmeros avanços alcançados, ainda não denota-se de maneira conclusiva quanto às suas consequências (CHEN; PRABHU; MASTRO, 2013; COOK-MILLS; ABDALA-VALENCIA; HARTERT, 2013; OLIVEIRA, 2015).

Embora as múltiplas funções e os prejuízos corporais ocasionados pela deficiência das vitaminas sejam facilmente difundidos no meio científico, o uso suplementar destas no tratamento oncológico não se apresenta por meio de um consenso literário (BARBER et al., 2014; CLAMON, 2015). Não obstante, os estudos clínicos e não clínicos, tem demonstrado resultados que não raramente se contrapõem quanto a concomitância do uso destas substâncias sobre a eficácia preventiva ou terapêutica em cânceres (COULTER et al., 2006; BJELAKOVIC; NIKOLOVA; GLUUD, 2013a; SHUKLA; MEERAN; KATIYAR, 2014).

Independente da classe, lipossolúveis ou hidrossolúveis, as vitaminas antioxidantes são obtidas por meio da dieta alimentar e apresentam inúmeras atribuições orgânicas, sendo extremamente necessárias para a homeostase corporal (ALABDALI; AL-AYADHI; EL-ANSARY, 2014; CHANG; SHEEN; LEI, 2015). Dentre elas, as vitaminas A, C e E, bastante caracterizadas por retinol, ácido ascórbico e tocoferol situam-se como compostos extremamente eficientes na estabilização de moléculas instáveis, com radicais disponíveis para pareamento (BUCIOLI et al., 2011; GREENLEE, 2012; CELIK et al., 2013). A suplementação nutricional, principalmente de compostos exógenos com atividade antioxidante, como a vitamina A, vem sendo implementada à décadas para a prevenção e tratamento de neoplasias em inúmeros protocolos quimioterápicos (ROCHETTE-EGLY, 2015).

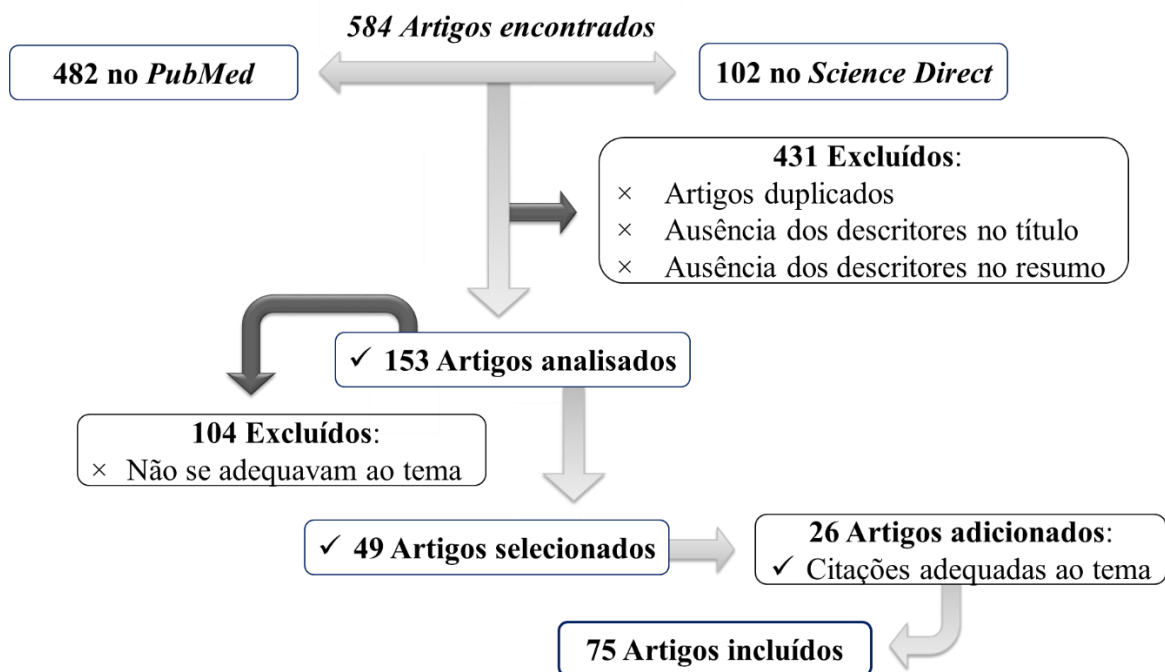
Embora o uso geral destas macromoléculas esteja relacionado a um superávit funcional, pesquisas de inúmeras ordens apontam que a ingestão não controlada de vitaminas antioxidantes pode não apenas prejudicar a ação antineoplásica de alguns fármacos, por possivelmente agirem de forma antagônica a estes; ou mesmo promoverem uma predisposição

ao acometimento inicial do câncer (DEMARIA et al., 2010; WONG; LODGE, 2012; TANG et al., 2014; DOLDO et al., 2015). O presente trabalho consiste em uma revisão sistemática da vitamina A como um composto pró ou antioxidante, por meio da verificação de controvérsias relatadas sobre o tema a fim de melhorar a compreensão do uso desta substância como um agente potencial para a prevenção e tratamento do câncer.

2 Metodologia

A revisão de literatura foi realizada a partir da busca de artigos científicos, clínicos e não clínicos escritos em inglês, disponíveis em periódicos e revistas indexadas, prioritariamente, entre os anos de 2014 e 2015. Os objetos de estudo foram obtidos mediante a associação dos descritores “*cancer*”, “*vitamin A*” e “*retinoic acid*” nas bases de dados PubMed e *Science Direct*. 482 trabalhos científicos foram obtidos por meio da pesquisa no primeiro banco de dados e 102 no segundo. Do total de 584 artigos, foram excluídos da análise 431, pois não se adequavam aos critérios de inclusão, tendo em vista a exigência dos descritores anteriormente citados concomitantemente no título e no resumo. Dessa forma, 153 artigos foram selecionados para análise científica, entretanto, 104 não se adequavam ao tema central da pesquisa e não foram incluídos no corpo do trabalho. Com o intuito de ampliar o referencial teórico, todos os 49 artigos restantes foram selecionados e analisados por completo, onde a avaliação das referências destes permitiu a adição de mais 26 artigos relacionados ao tema. Totalizando 75 artigos avaliados e incluídos neste trabalho de revisão de literatura (**Figura 1**).

Figura 1. Esquema da obtenção, análise, exclusão e avaliação de artigos científicos.



3 Resultados e Discussão

3.1 Ação Antioxidante da Vitamina A

As atuações fisiológicas da vitamina A são individualizadas e complexas, estando relacionadas a inúmeros processos de reconhecimento e sinalização molecular, assim como ao metabolismo basal corporal; atuando eficazmente sobre a resposta imunológica; reposição de células epiteliais e tecidos mucosos; reprodução-espermatogênese e manutenção da visão (DOLDO et al., 2015; LEE et al., 2010; VON LINTIG, 2012). α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, retinol, ácido retinóico (AR) e retinaldeído são algumas das milhares de terminologias científicas que correspondem a compostos naturais, sintéticos e pro-vitaminas A (DONKENA; KARNES; YOUNG, 2010; BUSHUE; WAN, 2010). As estruturas químicas são tão variadas que os metabólitos da vitamina A podem ser atribuídas a conformações, *cis*, 9-*cis* retinoic acid; e *trans*, ATRA (all *trans* retinoic acid) (SZABO et al., 2013; CONNOLLY; NGUYEN; SUKUMAR, 2013; GRUNE et al., 2010; VARSHOSAZ et al., 2013).

A atuação específica de cada análogo ou derivado depende, dentre diversos fatores, da especificidade de sua identificação molecular. Pela capacidade de mediar a resposta imunológica; combater a ligação de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio - ERO's: ânion superóxido, radicais hidroxila e hidroperoxila - a uma grande variedade de grupos orgânicos como o DNA, a vitamina A é comumente apresentada como um potente modulador da progressão ou mesmo iniciação de cânceres, impedindo desde a proliferação celular a invasividade tecidual (DOLDO et al, 2015; ZEEGERS; GOLDBOHM, 2001).

Devido a lipossolubilidade da vitamina A, os receptores proteicos nucleares esteroidais, como os receptores para o ácido retinóico (RARs) e os receptores X-retinóicos (RXRs), são impreterivelmente ativados e expressivos na genética do câncer, já que influenciam a transcrição de genes supressores de tumor, a exemplo o P450 (LEE et al., 2010; BUSHUE; WAN, 2010). Outros compostos proteicos que medeiam reações extremamente cruciais podem ser exemplificados, como: RBP, CRBPs/CRABPs, proteínas plasmáticas de ligação ao retinol ou ácido retinóico que se apresentam em várias subunidades; e o Stra6, gene associado a p53 na indução de apoptose celular, o que pode ser fundamental para o controle da proliferação celular e invasividade tecidual tumoral (DOLDO et al., 2015; LI et al., 2011; CARRERA et al., 2013; KHILLAN, 2014; LIU et al., 2011; MAHALINGAM et al., 2010).

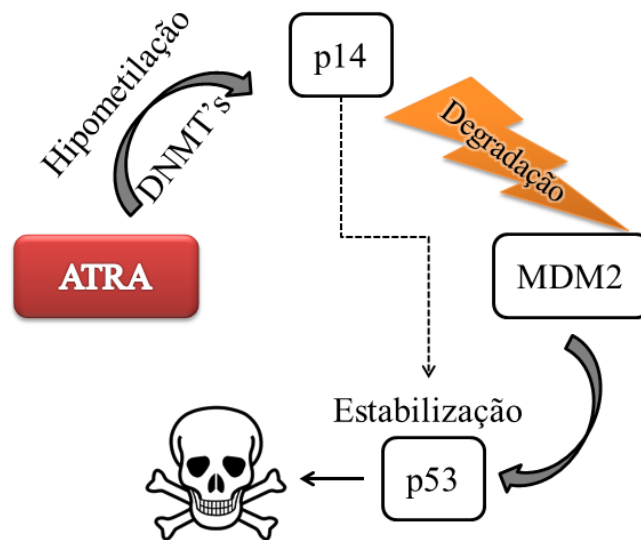
A procura incessante por protocolos, técnicas e/ou insumos de origem natural e até mesmo sintética a fim de combater a iniciação e a proliferação de células neoplásicas, é impreterivelmente, um dos maiores entraves das ciências em saúde (CONNOLLY; NGUYEN; SUKUMAR, 2013). A terapêutica do câncer por ser restrita, individualizada, complexa e diferenciada, acarreta em grandes déficits à saúde pública como um todo; seja pela árdua adesão dos pacientes, complicações e altos custos do tratamento, ou por conta dos agressivos efeitos adversos (alopécia; distúrbios dietéticos, circulatórios; toxicidade sanguínea, hepática, cardíaca, entre outros) que culminam em um maior sofrimento do paciente oncológico (TYKWINSKA et al., 2013; LQUBAL et al., 2014; TANG et al., 2014).

Dentre os inúmeros mecanismos para a promoção da morte celular pela interação da vitamina A e seus derivados, a atuação para este fim do ATRA, o identifica como um agente antitumoral principalmente no âmbito de pesquisas não-clínicas abrangendo os modelos de estudo *in vitro* e *ex vivo*, por exemplo, em análise de células primárias de pacientes portadores de leucemia linfóide crônica (HOLMES, 2012; FERNÁNDEZ-CALOTTI et al., 2012). A aplicação de ATRA sobre células cancerígenas, HepG2 e A549, positivas e negativas para p14, gene indutor de morte celular por meio de um mecanismo epigenético que envolve a diminuição da atividade de DNMT's, DNA metiltransferases, acarretou não apenas na ativação, mas também na regulação de p53 através da ubiquitinação de MDM2 (SHUKLA; MEERAN; KATIYAR, 2014; MELONI, 2014). O que viabiliza a sua ação sobre células do câncer por duas vias de ativação protéica eficientes em induzir apoptose (HEO; KWAK; JANG, 2015; CARMONA-GUTIÉRREZ et al., 2011; CIRCU; AW, 2012; GUICCIARDI et al., 2013; JOHANSSON et al., 2010), como observado na figura 2.

Dentre a apreciação da regulação do estado nutricional individualizado como uma alternativa terapêutica para a prevenção ou melhora do prognóstico do câncer, os estudos do polimorfismo gênico de segmentos cromossômicos relacionados à expressão de proteínas sinalizadoras dos análogos/derivados de retinol apresentam-se como biomarcadores eficientes para a instalação de várias desordens corporais, como glaucomas, doenças crônicas cardiovasculares, neoplasias intraepiteliais ou mesmo os cânceres, como o de colorretal, colo uterino e de mama (ZANON-MORENO et al., 2013; BROWN et al., 2014; KHAN et al., 2015). Embora os resultados de estudos científicos possam se distinguir quanto à atenuação dos efeitos das desordens neoplásicas mediante a ingestão de macronutrientes, pesquisas em saúde tendem

a sugerir a suplementação de antioxidantes ao paciente diagnosticado com câncer (**Tabela 1**) (NEUZIL et al., 2007; DORJGOCHOO et al., 2008; APRAIZ; BOYANO; ASUMENDI, 2011).

Figura 2. Ação terapêutica do ATRA, induzindo hipometilação de DNMT's. Com a ativação da expressão de p14 e a consequente degradação de MDM2, a estabilização e regulação da síntese de p53 promove a apoptose em células tumorais.



Adaptação de Heo; Kwak e Jang (2015).

Apesar de certos cânceres manterem o padrão de resistência a ação de protocolos quimioterápicos, como a leucemia pró-mielocítica aguda (LPA), a ação moduladora da vitamina A, frente a estes efeitos oxidantes é detectada e continuamente aperfeiçoada, convergindo ou sugerindo uma melhora terapêutica (JOHNSON; REDNER, 2015; UCHINO et al., 2015). Linhagens cancerígenas MCF-7 de células mamárias (MARCATO et al., 2015; FLODROVA et al., 2015), SK-N-BE e SH-SY5Y de neuroblastoma (WATTERS et al., 2013), P19 de carcinoma embrionário (LEE et al., 2015), HTC de carcinoma hepocelular (IONTA et al., 2012), células primárias de osteosarcoma (ZHANG et al., 2014), Panc-1 e Aspc-1 de adenocarcinoma pancreático (GUAN et al., 2014), DU145 de câncer de próstata (AMERI et al., 2011), A2780 de câncer ovariano (DOLDO et al., 2015), dentre outras, já se mostraram sensíveis a atuação citotóxica desta vitamina em inúmeros parâmetros, que envolvem: inflamação, diferenciação e proliferação celular neoplásica, ativação de genes pro-apoptóticos e expressão de proteínas ligadas a resposta celular citotóxica (**Tabela 1**) (GUO, 2011; QIAO et al., 2012).

As pesquisas clínicas envolvem a implicação benéfica da ingestão da vitamina A, em doses variadas, com a mutação de genes supressores do câncer e mecanismos epigenéticos

(Tabela 1). A avaliação da combinação quimioterápica com ATRA a 45 mg/m²/dia em 53 pacientes diagnosticados com leucemia promielocítica aguda revelou um melhor prognóstico em indivíduos não mutados para o receptor FLT3/ITD (HONG et al., 2011). Apesar das dosagens mais baixas serem mais comuns, descrição do uso de ATRA em dosagens ajustadas que vão de 3.869 a 222.111 UI/dia em 49 pacientes portadores de tumores na cabeça e pescoço demonstrou que a maior suplementação esteve associada com a menor metilação de gene supressor de tumor (COLACINO et al., 2012).

A suplementação dos precursores, derivados e metabólitos da vitamina A na prevenção ou tratamento do câncer também se mantêm eficiente em estudos com grandes amostragens **(Tabela 1)**. A suplementação nutricional de β-caroteno em conjunto com palmitato de retinol em dosagens inferiores a 1.500 µg/dia/AER (atividade equivalente de retinol) direcionada a 1428 fumantes demonstrou uma acentuada diminuição do risco de câncer de pulmão (CHENG et al., 2014). Uma metanálise de 25 estudos clínicos constatou o papel preventivo da suplementação de retinol em um total de 11.580 indivíduos pelo decréscimo do risco do acometimento de câncer de bexiga (TANG et al., 2014). A combinação do retinol com β-caroteno foi mensurada, também por meio de metanálises. Dois trabalhos, que envolveram 10 estudos em uma população de 236.623 pessoas, e 47 estudos em uma população de 1.221.392 indivíduos, respectivamente para análise da potencial proteção contra o melanoma e o câncer gástrico, comprovaram a acentuada redução do risco de iniciação para as duas desordens corporais, tendo no segundo caso, melhor significância para as mais baixas dosagens de vitamina A, 1,5 mg/dia (ZHANG; CHU; LIU, 2014; KONG et al., 2014).

Apesar das milhares e diferentes rotas para ativação da apoptose, a comum associação entre proteínas indutoras de morte celular conota uma relação entre estas vias que permeiam o mecanismo de ação das próprias vitaminas antioxidantes, em geral (SUNTHARALINGAM; SONG; LIPPARD, 2014). Conjecturando-se assim, que por meio de suas conformações bidimensionais a afinidade seletiva destes por grupamentos orgânicos, geralmente específicos, possa aferir uma maior toxicidade à células tumorais (DOLDO et al., 2015; CIRCU; AW, 2012; YANG, 2015).

Tabela 1. Efeitos terapêuticos da vitamina A e variações, sobre o câncer em modelos de estudo clínicos e não clínicos.

Tipo	Modelo de Estudo	Proposta do Estudo	Dose ou Concentração	Efeitos da Vitamina	Referência
Retinol	(Revisão) <i>In vitro</i> = A2780 células de câncer de ovário	Eficácia terapêutica do Retinol	20 μ M	Promoveu a reexpressão de CRBP-1 interferindo sobre a diferenciação das células cancerígenas	DOLDO et al., 2015
ATRA	Estudo clínico = 49 pacientes	Associação com a metilação do DNA em pacientes com tumor de cabeça e pescoço	3869 - 222111 UI/dia	A maior ingestão teve menor associação com a metilação do gene supressor de tumor	COLACINO et al., 2012
Ácido Retinóico	<i>In vitro</i> = linhagem de células cancerígenas HTC	Uso combinado com cAMP no tratamento de CHC	0.1 μ M	Inibição da proliferação de células HTC e melhora da diferenciação	IONTA et al., 2012
ATRA	<i>In vitro</i> = linhagem de células cancerígenas SK-N-BE e SH-SY5Y	Indicação da rota de carcinogênese em neuroblastoma	5 μ M	Alteração dos níveis de expressão de T-CRs induzindo a diferenciação celular	WATTERS et al., 2013
ATRA	<i>In vitro</i> = linhagem de células cancerígenas HT93A	Análise da diferenciação celular em LPA	100 nM	Indução da diferenciação granulocítica terminal pela regulação de proteínas CD11b e CD34	UCHINO et al., 2015
ATRA	<i>In vitro</i> = células primárias de osteosarcoma	Análise da diferenciação celular em osteosarcoma	1 μ M	Ligação específica em E2F1 pelo RAR α induzindo a diferenciação osteogênica	ZHANG et al., 2014
ATRA	<i>In vitro</i> = linhagem de células cancerígenas DU145	Efeito sobre proliferação de células no câncer de próstata	1 e 10 μ M	Indução de apoptose pela clivagem de p35 e super ativação de Cdk5	CHEN et al., 2012
ATRA	<i>Ex vivo</i> = 23 pacientes	Análise de células primárias de pacientes com LLC resistentes a fludarabina	10 μ M	Elevação intracelular de hCNT3 por TGF β 1 intensificando a apoptose celular	FERNÁNDEZ-CALOTTI et al., 2012
ATRA	Estudo clínico = 53 pacientes	Impacto sobre o prognóstico de uma combinação quimioterápica em LPA	45 mg/m ² /dia	Melhor prognóstico em indivíduos não mutados para o receptor FLT3/ITD	HONG et al., 2011
Retinol	Meta-análise de 25 estudos = 11.580 indivíduos	Análise do efeito preventivo da dieta sobre o câncer de bexiga	NR	Diminuição do risco de câncer de bexiga	TANG et al., 2014
β-caroteno + Palmitato de retinol	Estudo clínico = 1.428 indivíduos	Investigação do efeito preventivo da dieta em população de alto risco para o câncer de pulmão	< 1.500 μ g/dia AER	Diminuição do risco de câncer de pulmão em fumantes	CHENG et al., 2014
Retinol + β-caroteno	Meta-análise de 10 estudos = 236,623 indivíduos	Análise do efeito preventivo sobre o melanoma	NR	Diminuição do risco de câncer de melanoma	ZHANG; CHU; LIU, 2014
Retinol + β-caroteno	Meta-análise de 47 estudos = 1.221.392 indivíduos	Análise do efeito preventivo sobre o câncer gástrico	1,5 mg/dia	Baixas doses de vitamina podem diminuir significativamente o risco do câncer gástrico	KONG et al., 2014
ATRA	<i>In vitro</i> = linhagem de células cancerígenas HepG2 e Hep3B	Análise da indução de apoptose em hepatoblastoma e hepatoma	5 μ M	Expressão de p14, promoção da hipometilação e indução de apoptose	HEO; KWAK; JANG, 2015
ATRA ou 9-cis ácido retinóico	<i>In vitro</i> = células tumorais Panc-1 e Aspc-1	Efeito da proliferação celular em câncer pancreático	20 μ M	Inibição da migração celular pela baixa expressão de α -SMA, FAP, IL-6 e diminuição da produção de matriz extracelular	GUAN et al., 2014
ATRA e 9-cis ácido retinóico	<i>In vitro</i> = linhagem de células cancerígenas humanas MCF-7	Análise da invasão e metástase em câncer de mama	0,01 mmol/L a 25 mmol/L	Aumento da regulação de p27, ribonucleoproteína Smd3, e cofilina-1, afetando a migração celular no tumor	FLODROVA et al., 2015

Legenda: NR = não relatado. TCP = tumor de cabeça e pescoço. cAMP = adenosina monofosfatada cíclica. CHC = carcinoma hepatocelular. ATRA = all *trans* retinoic acid.

3.2 Ação Oxidante da Vitamina A

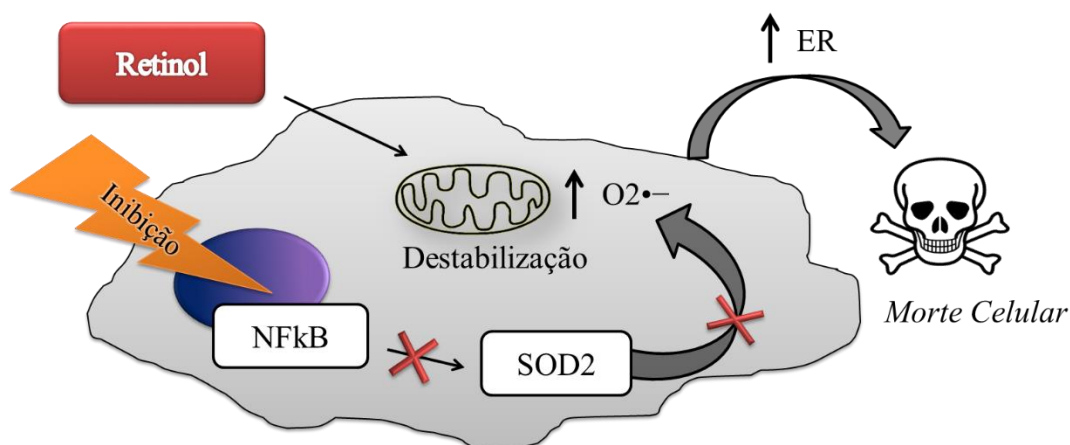
Embora grande parte dos experimentos enfatizem os benefícios da vitamina A devido a sua capacidade antioxidante, alguns dos representantes do grupo estão propensos a exercerem atividades opostas, apresentando-se como agentes pró-oxidantes (BEHR et al., 2012). Não raramente, em altas concentrações eles podem permitir oxidação biológica, tendo relação com os altos níveis de O_2 ; e a entrada de toxinas ou metabólitos, por meio da interferência sobre as propriedades de membranas celulares (BOWRY; INGOLDT; STOCKER, 1992).

A suplementação da vitamina A pode exercer efeitos tóxicos sobre variados sistemas, em diversos modelos de estudo, inclusive *in vivo* (**Tabela 2**). Em ratos adultos a neurotoxicidade é um deles, acarretada, por exemplo, pela influência sobre a atividade de enzimas antioxidantes plasmáticas como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (SCHNORR et al., 2014). O estresse oxidativo e nitrosativo mitocondrial eleva ainda monoamina oxidase (MAO), α -sinucleína, proteína β -amilóide, RAGE, e TNF- α em organismos saudáveis, por meio de ingestões diárias de até 2500 UI/kg/dia⁻¹ (OLIVEIRA et al., 2012; MOQUIN; CHAN, 2010). Os efeitos neurotóxicos são tão expressivos que doses clínicas de 1000 a 9000 IU/kg/dia de palmitato de retinol não apenas promovem interferência sobre a cadeia respiratória, elevam a produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), como incrementam as taxas de glutathione-S-transferase (GST) danificando o córtex frontal, cerebelo e hipotálamo de animais (DE OLIVEIRA; MOREIRA, 2008; DE OLIVEIRA et al., 2009; DE OLIVEIRA; MOREIRA, 2007).

A progressão do câncer é dependente do equilíbrio entre a indução da proliferação ou de morte celular, não obstante do processo de peroxidação lipídica (NICOLAU-GALMÉS et al., 2011; SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2014). A relação com mediadores cruciais para a sobrevivência celular, como NFkB e citocinas pró-inflamatórias, já permitiu a identificação do intenso estresse oxidativo induzindo morte em células não neoplásicas de Sertoli pela alteração da transferência de elétrons mitocondriais ocasionada pelo tratamento *in vitro* com retinol (ZANOTTO-FILHO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; VASEVA et al., 2012), como caracterizado na figura 3. O desequilíbrio do estado redox pela dieta rica em palmitato de retinol é tão severo que a interferência deste sobre o metabolismo basal de ratas adultas gestantes e lactantes pode promover efeitos teratogênicos, e a sua influência negativa

sobre ratas ovariectomizadas, sugere inclusive o cuidado na suplementação da vitamina em mulheres menopausadas (BEHR et al., 2012; SCHNORR et al., 2011).

Figura 3. Ação oxidante do retinol induzindo a produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e a acumulação intracelular de espécies reativas (ER), ocasionando a morte de células não neoplásicas. Condição ocasionada pela inibição de NFkB (fator de necrose tumoral kB), não dependente de retinol, e consequente ausência da superóxido desmutase (SOD2) eficiente em equilibrar o estado redox.



Adaptação de Zanotto-Filho et al., (2009).

Avaliações clínicas também comprovam a inconstância dos efeitos da vitamina A e dos seus derivados (**Tabela 2**) (OLIVEIRA, 2015; MACTIER; WEAVER, 2005). Um estudo randomizado de 53 pesquisas clínicas, envolvendo a influência da suplementação alimentar de vitaminas em 241.883 indivíduos, com idade entre 18 e 103 anos, demonstrou uma maior taxa de mortalidade em pessoas com ingestão comprovada de β -caroteno em doses acima de 9,6 mg (BJELAKOVIC; NIKOLOVA; GLUUD, 2013b). A avaliação de 13 populações, abrangendo um total de 1400 portadores de LPA registrados no *National Cancer Institute's Surveillance* demonstrou que as taxas de mortalidade nos grupos permaneceram elevadas mesmo após a suplementação de ATRA (PARK et al., 2011). Em pacientes com câncer de pele não-melanoma a ingestão de 25,000 IU de retinol desencadeou um significativo aumento do risco destes desenvolverem carcinoma de células escamosas (CCE) (CLOUSER et al., 2010). Não obstante, Bjelakovic et al (2007), em um estudo randomizado envolvendo 232.606 participantes constatou que a dieta rica em β -caroteno/vitamina A, em doses diárias variadas, mas também elevadas, chegando a 200.000 UI, desencadeou um incremento no risco de morte.

As dosagens ou posologias tomam destaque nas controvérsias quanto ao uso de micronutrientes vitamínicos para a terapêutica do câncer (PARK et al., 2010; BJELAKOVIC;

NIKOLOVA; GLUUD, 2013b). Embora as maiores perspectivas sejam oriundas de resultados obtidos a partir de testes *in vitro* e *ex vivo*, o favorecimento à incorporação de vitaminas à dieta concomitante aos tratamentos quimioterápicos é mais associada a concentrações mais baixas dos compostos em questão, enquanto que as mais elevadas estão relacionadas majoritariamente a atuação pró-oxidante dos mesmos (TYKWINSKA et al., 2013; IONTA et al., 2012). Isto conota ao balanceamento exigido para o equilíbrio das reações geradoras de eletronegatividade, características pela liberação de átomos ou moléculas instáveis pelo não pareamento de elétrons disponíveis, processo comum na cadeia respiratória (WENSVEEN et al., 2011).

A suplementação nutricional dos precursores ou derivados de vitamina A está associada não somente a manutenção da homeostase corporal como a incorporação em diversos tipos de terapias em humanos, como desordens dermatológicas e oncológicas (KHILLAN, 2014; ZHANG; CHU; LIU, 2014; HSU et al., 2015). Tendo em vista que as suas dosagens podem exceder 300.000 UI/dia, faz-se necessário a determinação de doses terapêuticas não apenas individualizadas, mas principalmente confiáveis que assegurem ao paciente a ausência de efeitos oxidantes e adversos a proposta inicial deste tipo de protocolo preventivo ou quimioterápico (BEHR et al., 2012; DE OLIVEIRA; MOREIRA, 2008).

Tabela 2. Efeitos oxidantes e adversos da vitamina A, e variações, em modelos de estudo clínicos e não clínicos.

Tipo	Modelo de Estudo	Proposta do Estudo	Dose ou Concentração	Efeitos da Vitamina	Referência
β-caroteno e vitamina A	Ensaio randomizado de 385 artigos clínicos = 232,606 indivíduos	Prevenção do câncer	1333-200.000 UI	A suplementação elevou o risco de morte	BJELAKOVIC et al., 2007
ATRA	Estudo clínico = 1400 pacientes	Análise da eficácia do tratamento em LPA	NR	As taxas de mortalidade permanecem elevadas após a suplementação	PARK et al., 2011
Palmitato de Retinol	<i>In vivo</i> = ratas Wistar fêmeas	Efeitos da suplementação durante a menopausa em ratas OVX	500 ou 1,500 UI kg ⁻¹ dia ⁻¹ (30 dias)	Diminuição da SOD/CAT hipotalâmica e do córtex frontal, além da peroxidação lipídica do córtex frontal	BEHR et al., 2012
Palmitato de Retinol	<i>In vivo</i> = ratos	Avaliação do estado redox	1000–9000 UI/kg/dia	Interferência sobre a atividade da transferência de elétrons mitocondriais no cerebelo	DE OLIVEIRA; MOREIRA, 2008
All-trans retinol (ROH)	<i>In vitro</i> , células de Sertoli ROH-tratadas	Efeito protetor do NFκB contra o estresse oxidativo induzido por ROH	5–10 μM	Acumulação de espécies reativas	ZANOTTO-FILHO et al., 2009
Palmitato de Retinol	<i>In vivo</i> = ratos Wistar adultos	Avaliação da interferência sobre a homeostase neuronal	1000–9000 IU/kg/dia (28 dias)	Indução do estresse nitrosativo no hipotálamo	DE OLIVEIRA et al., 2009
Palmitato de Retinol	<i>In vivo</i> = ratos Wistar adultos	Avaliação da disfunção do metabolismo cerebral	1000–9000 UI/kg/dia (28 dias)	Disfunção do estado redox e bioenergético no córtex frontal	OLIVEIRA et al., 2009
Palmitato de Retinol	<i>In vivo</i> = ratos adultos	Avaliação de marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo	500-2500 UI/kg/dia ⁻¹ (3 meses)	Disfunção do estado redox hepático	OLIVEIRA et al., 2012
Palmitato de Retinol	<i>In vivo</i> = ratos adultos	Análise do estado redox de PSM	1000–9000 UI/kg/dia	Disfunção mitocondrial e alteração cerebral do córtex e/ou cerebelo	DE OLIVEIRA; MOREIRA, 2007
β-caroteno	Ensaio randomizado de 53 artigos = 241,883 indivíduos	Efeitos de diferentes doses sobre as taxas de mortalidade	> 9,6 mg	Altas doses aumentaram significativamente a mortalidade	BJELAKOVIC; NIKOLOVA; GLUUD, 2013 (b)
Palmitato de Retinol	<i>In vivo</i> = ratas Wistar fêmeas	Efeitos durante a gestação e lactação por parâmetros do estresse oxidativo	2500-25.000 UI/kg	A suplementação durante a gestação e lactação pode ser tóxica para as mães com efeitos adversos para o desenvolvimento dos descendentes	SCHNORR et al., 2011
Retinol	Estudo clínico = 525 pacientes	Ação contra a recorrência em pacientes de risco com câncer de pele não melanoma	25.000 UI	Aumento significativo do risco de desenvolver carcinoma de células escamosas	CLOUSER et al., 2010

Legenda: NR = não relatado. LPA = leucemia promielocítica aguda. OVX = ovariectomizadas. NFκB = fator de necrose tumoral kappa beta. PMS = partículas submitocondriais. ATRA = all *trans* retinoic acid. Retinol alcoolico = ROH.

4 Conclusões

A análise de testes não clínicos, revelou contrastes quanto ao tratamento de células com a vitamina A. Em testes *in vitro*, administração de concentrações de 10 μM de derivados da vitamina A, demonstrou efeitos terapêuticos sobre células cancerígenas (**Tabela 1**), mas oxidantes sobre células não neoplásicas, pela acumulação de espécies reativas, quando inibida a atuação da SOD2, enzima antioxidante (**Tabela 2**). Embora não se tenha um consenso literário, como observado nas doses em torno de 200.000 UI de precursores ou derivados da vitamina A, a análise dos testes clínicos constatou que a ingestão de doses diárias mais baixas, 1,5 mg (β -caroteno combinado ao retinol) esteve relacionada com os efeitos antioxidantes, mais cabíveis a prevenção do câncer. A carência de estudos conclusivos e não conflitantes sobre a ingestão da vitamina A como um antioxidante, isolada ou disposta em formulações de suplementos vitamínicos para prevenir ou tratar o câncer necessita de mais esclarecimentos. Frisa-se ainda que a diminuição da predisposição para certos tipos de cânceres, por consequência deste tipo de suplementação nutricional, não exclui o risco do acometimento de outra desordem corporal, incluindo especialmente os danos ao material genético.

Referências

- ALABDALI, A.; AL-AYADHI, L.; EL-ANSARY, A. A key role for an impaired detoxification mechanism in the etiology and severity of autism spectrum disorders. **Behav. Brain Funct.**, v. 10, n. 14, 2014.
- AMERI, A.; ALIDOOSTI, A.; HOSSEINI, Y.; PARVIN, M.; EMRANPOUR, M. H.; TASLIMI, F.; SALEHI, E.; FADAVI, P. Prognostic value of promoter hypermethylation of Retinoic Acid Receptor Beta (RARβ) and CDKN2 (p16/MTS1) in prostate cancer. **Chinese J. Cancer Res.**, v. 23, p. 306–311, 2011.
- APRAIZ, A.; BOYANO, M. D.; ASUMENDI, A. Cell-centric view of apoptosis and apoptotic cell death-inducing antitumoral strategies. **Cancers (Basel)**, v. 3, p. 1042–1080, 2011.
- BARBER, T.; ESTEBAN-PRETEL, G.; MARÍN, M.; TIMONEDA, J. Vitamin A Deficiency and Alterations in the Extracellular Matrix. **Nutrients**, v. 6, p. 4984–5017, 2014.
- BEHR, G. A.; SCHNORR, C. E.; SIMOES-PIRES, A.; DA MOTTA, L. L.; FREY, B. N.; MOREIRA, J. C. F. Increased cerebral oxidative damage and decreased antioxidant defenses in ovariectomized and sham-operated rats supplemented with vitamin A. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 28, p. 317–330, 2012.
- BJELAKOVIC, G.; NIKOLOVA, D.; GLUUD, C. Antioxidant Supplements to Prevent Mortality. **JAMA**, v. 310, n. 11, p. 1178-9, 2013. (b)
- BJELAKOVIC, G.; NIKOLOVA, D.; GLUUD, C. Meta-regression analyses, meta-analyses, and trial sequential analyses of the effects of supplementation with beta-carotene, vitamin A, and vitamin E singly or in different combinations on all-cause mortality: do we have evidence for lack of harm? **PLoS One**, v. 8, e74558, 2013. (a)
- BJELAKOVIC, G.; NIKOLOVA, D.; GLUUD, L. L.; SIMONETTI, R. G.; GLUUD, C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. **JAMA**, v. 297, n. 8, p. 842-57, 2007.
- BOWRY, V. W.; INGOLDT, K. U.; STOCKER, R. Vitamin E in human low-density lipoprotein. **Biochem J.**, v. 288, p. 341–344, 1992.
- BOZZETTI, F. Evidence-based nutritional support of the elderly cancer patient. **Nutrition**, v. 31, p. 585–586, 2015.
- BROWN, G. T.; CASH, B. G.; BLIHOGHE, D.; JOHANSSON, P.; ALNABULSI, A.; MURRAY, G. I. The expression and prognostic significance of retinoic acid metabolising enzymes in colorectal cancer. **PLoS One**, v. 9, p. 1–13, 2014.
- BUCIOLI, S. A.; DE ABREU, L.; VALENTI, V. E.; LEONE, C.; VANNUCCHI, H. Effects of vitamin E supplementation on renal non-enzymatic antioxidants in young rats submitted to exhaustive exercise stress. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 11, n. 133, 2011.

- BUSHUE, N.; WAN, Y. Y. Retinoid pathway and cancer therapeutics ☆. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 62, p. 1285–1298, 2010.
- CARMONA-GUTIÉRREZ, D.; BAUER, M. A.; RING, J.; KNAUER, H.; EISENBERG, T.; BÜTTNER, S.; RUCKENSTUHL, C.; REISENBICHLER, A.; MAGNES, C.; RECHBERGER, G. N.; BIRNER-GRUENBERGER, R.; JUNGWIRTH, H.; FRÖHLICH, K.-U.; SINNER, F.; KROEMER, G.; MADEO, F. The propeptide of yeast cathepsin D inhibits programmed necrosis. **Cell Death Dis.**, v. 2, e161, 2011.
- CARRERA, S.; CUADRADO-CASTANO, S.; SAMUEL, J.; JONES, G. D. D.; VILLAR, E.; LEE, S. W.; MACIP, S. Stra6, a retinoic acid-responsive gene, participates in p53-induced apoptosis after DNA damage. **Cell Death Differ.**, v. 20, p. 910–919, 2013.
- CELIK, V. K.; EKEN, I. E.; YILDIZ, G.; YILMAZ, M. B.; GURLEK, A.; AYDIN, H. Vitamin E and antioxidant activity; its role in slow coronary flow. **Cardiovasc. J. Afr.**, v. 24, p. 360–363, 2013.
- CHANG, H.; SHEEN, L.; LEI, Y. The protective role of carotenoids and polyphenols in patients with head and neck cancer. **J. Chinese Med. Assoc.**, v. 78, p. 89–95, 2015.
- CHEN, M.-C.; HUANG, C.-Y.; HSU, S.-L.; LIN, E.; KU, C.-T.; LIN, H.; CHEN, C.-M. Retinoic Acid Induces Apoptosis of Prostate Cancer DU145 Cells through Cdk5 Overactivation. **Evid. Based. Complement. Alternat. Med.**, 580736, 2012.
- CHEN, Y.-C.; PRABHU, K. S.; MASTRO, A. M. Is selenium a potential treatment for cancer metastasis? **Nutrients**, v. 5, p. 1149–68, 2013.
- CHENG, T. Y. D.; GOODMAN, G. E.; THORNQUIST, M. D.; BARNETT, M. J.; BERESFORD, S. A A; LACROIX, A. Z.; ZHENG, Y.; NEUHOUSER, M. L. Estimated intake of vitamin D and its interaction with vitamin A on lung cancer risk among smokers. **Int. J. Cancer.**, v. 135, n. 9, p. 2135-2145, 2014.
- CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Glutathione and modulation of cell apoptosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1823, p. 1767–77, 2012.
- CLAMON, G. Chemoprevention and Screening for Lung Cancer : Changing Our Focus to Former Smokers. **Clin. Lung Cancer**, v. 16, p. 1–5, 2015.
- CLOUSER, M. C.; ROE, D. J.; FOOTE, J. A.; HARRIS, R. B.; ALBERTS, D. S. Dose Response of Retinol and Isotretinoin in the Prevention of Nonmelanoma Skin Cancer Recurrence Dose Response of Retinol and Isotretinoin in the Prevention of Nonmelanoma Skin Cancer Recurrence. **Nutr Cancer.**, v. 62, n. 8, p. 1058-66, 2010.
- COLACINO, J. A.; ARTHUR, A. E.; DOLINOY, D. C.; SARTOR, M. A.; DUFFY, S. A.; CHEPEHA, D. B.; BRADFORD, C. R.; WALLINE, H. M.; MCHUGH, J. B.; D’SILVA, N.; CAREY, T. E.; WOLF, G. T.; TAYLOR, J. M. G.; PETERSON, K. E.; ROZEK, L. S. Pretreatment dietary intake is associated with tumor suppressor DNA methylation in head and neck squamous cell carcinomas. **Epigenetics**, v. 7, p. 883–91, 2012.

CONNOLLY, R.; NGUYEN, N.; SUKUMAR, S. Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. **Clin. Cancer Res.**, v. 19, p. 1651–1659, 2013.

COOK-MILLS, J. M.; ABDALA-VALENCIA, H.; HARTERT, T. Two faces of vitamin e in the lung. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 188, p. 279–284, 2013.

COULTER, I. D.; HARDY, M. L.; MORTON, S. C.; HILTON, L. G.; TU, W.; VALENTINE, D.; SHEKELLE, P. G. Antioxidants Vitamin C and Vitamin E for the Prevention and Treatment of Cancer. **Cancer**, v. 2138, p. 735–744, 2006.

DE OLIVEIRA, M. R.; MOREIRA, J. C. F. Acute and chronic vitamin A supplementation at therapeutic doses induces oxidative stress in submitochondrial particles isolated from cerebral cortex and cerebellum of adult rats. **Toxicol. Lett.**, v. 173, p. 145–150, 2007.

DE OLIVEIRA, M. R.; MOREIRA, J. C. F. Impaired redox state and respiratory chain enzyme activities in the cerebellum of vitamin A-treated rats. **Toxicology**, v. 253, p. 125–130, 2008.

DE OLIVEIRA, M. R.; OLIVEIRA, M. W. S.; DA ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C. F. Vitamin A supplementation at pharmacological doses induces nitrosative stress on the hypothalamus of adult Wistar rats. **Chem. Biol. Interact.**, v. 180, p. 407–413, 2009.

DEMARIA, S.; PIKARSKY, E.; KARIN, M.; COUSSENS, L. M.; CHEN, Y.-C.; EL-OMAR, E. M.; TRINCHIERI, G.; DUBINETT, S. M.; MAO, J. T.; SZABO, E.; KRIEG, A.; WEINER, G. J.; FOX, B. A.; COUKOS, G.; WANG, E.; ABRAHAM, R. T.; CARBONE, M.; LOTZE, M. T. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. **Journal of immunotherapy**, v. 33, n.4, p. 335-351, 2010.

DOLDO, E.; COSTANZA, G.; AGOSTINELLI, S.; TARQUINI, C.; FERLOSIO, A.; ARCURI, G.; PASSERI, D.; SCIOLI, M. G.; ORLANDI, A. Vitamin A, Cancer Treatment and Prevention: The New Role of Cellular Retinol Binding Proteins. **Biomed Res. Int.**, p. 1–14, 2015.

DONKENA, K. V.; KARNES, R. J.; YOUNG, C. Y. F. Vitamins and Prostate Cancer Risk. **Mayo Clinic**, v. 15, n. 3, p. 1762–1783, 2010.

DORJGOCHOO, T.; SHRUBSOLE, M. J.; SHU, X. O.; LU, W.; RUAN, Z.; ZHENG, Y.; CAI, H.; DAI, Q.; GU, K.; GAO, Y. T.; ZHENG, W. Vitamin supplement use and risk for breast cancer: The Shanghai breast cancer study. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 111, p. 269–278, 2008.

FERNÁNDEZ-CALOTTI, P. X.; LOPEZ-GUERRA, M.; COLOMER, D.; PASTOR-ANGLADA, M. Enhancement of fludarabine sensitivity by all-trans-retinoic acid in chronic lymphocytic leukemia cells. **Haematologica**, v. 97, p. 943–951, 2012.

FLODROVA, D.; BENKOVSKA, D.; MACEJOVA, D.; BIALESOVA, L.; HUNAKOVA, L.; BRTKO, J.; BOBALOVA, J. Proteomic analysis of changes in the protein composition of MCF-7 human breast cancer cells induced by all-trans retinoic acid, 9-cis retinoic acid, and their combination. **Toxicol. Lett.**, v. 232, p. 226–232, 2015.

- GREENLEE, H. Natural Products for Cancer Prevention. **Semin. Oncol. Nurs.**, v. 28, p. 29–44, 2012.
- GRUNE, T.; LIETZ, G.; PALOU, A.; ROSS, A C.; STAHL, W.; TANG, G.; THURNHAM, D.; YIN, S.; BIESALSKI, H. K. Beta-carotene is an important vitamin A source for humans. **J. Nutr.**, v. 140, p. 2268S–2285S, 2010.
- GUAN, J.; ZHANG, H.; WEN, Z.; GU, Y.; CHENG, Y.; SUN, Y.; ZHANG, T.; JIA, C.; LU, Z.; CHEN, J. Retinoic acid inhibits pancreatic cancer cell migration and EMT through the downregulation of IL-6 in cancer associated fibroblast cells. **Cancer Lett.**, v. 345, p. 132–139, 2014.
- GUICCIARDI, M. E.; MALHI, H.; MOTT, J. L.; GORES, G. J. Apoptosis and Necrosis in the Liver Maria. **Compr Physiol.**, v. 3, n. 2, 2013.
- GUO, R. Rosiglitazone and retinoic acid inhibit proliferation and induce apoptosis in the HCT-15 human colorectal cancer cell line. **Exp. Ther. Med.**, p. 413–417, 2011.
- HANG, J.; CHEN, Y.-H.; LU, Q. Pro-oncogenic and anti-oncogenic pathways: opportunities and challenges of cancer therapy. **Future Oncol**, v. 6, p. 587–603, 2010.
- HEO, S.-H.; KWAK, J.; JANG, K. L. All-trans retinoic acid induces p53-depenent apoptosis in human hepatocytes by activating p14 expression via promoter hypomethylation. **Cancer Lett.**, v. 362, 139–148, 2015.
- HOLMES, D.; VISHNU, P.; DORER, R. K.; ABOULAFIA, D. M. All-Trans Retinoic Acid-Induced Pseudotumor Cerebri during Induction Therapy for Acute Promyelocytic Leukemia: A Case Report and Literature Review. **Case Rep. Oncol. Med.**, p. 1–11, 2012.
- HONG, S.-D.; KIM, Y.-K.; KIM, H.-N.; LEE, S. R.; AHN, J.-S.; YANG, D.-H.; LEE, J.-J.; LEE, I.-K.; SHIN, M.-G.; KIM, H.-J. Treatment outcome of all-trans retinoic acid/anthracycline combination chemotherapy and the prognostic impact of FLT3/ITD mutation in acute promyelocytic leukemia patients. **Korean J. Hematol.**, v. 46, p. 24–30, 2011.
- HSU, K.-H.; CARBIA, B. E.; PLUMMER, C.; CHAUHAN, A. Dual Drug Delivery from Vitamin E loaded Contact Lenses for Glaucoma Therapy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 94, p. 312-321, 2015.
- IONTA, M.; ROSA, M. C.; ALMEIDA, R. B.; FREITAS, V. M.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Retinoic acid and cAMP inhibit rat hepatocellular carcinoma cell proliferation and enhance cell differentiation. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 45, p. 721–729, 2012.
- JOHANSSON, A. C.; APPELQVIST, H.; NILSSON, C.; KÅGEDAL, K.; ROBERG, K.; ÖLLINGER, K. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. **Apoptosis**, v. 15, p. 527–540, 2010.
- JOHNSON, D. E.; REDNER, R. L. An ATRActive future for differentiation therapy in AML. **Blood Rev.**, p. 10–15, 2015.

- KHAN, S.; WALL, D.; CURRAN, C.; NEWELL, J.; KERIN, M. J.; DWYER, R. M. MicroRNA-10a is reduced in breast cancer and regulated in part through retinoic acid. **BMC Cancer**, v. 15, p. 1–8, 2015.
- KHILLAN, J. S. Vitamin A/retinol and maintenance of Pluripotency of stem cells. **Nutrients**, v. 6, p. 1209–1222, 2014.
- KONG, P.; CAI, Q.; GENG, Q.; WANG, J.; LAN, Y.; ZHAN, Y.; XU, D. Vitamin Intake Reduce the Risk of Gastric Cancer: Meta-Analysis and Systematic Review of Randomized and Observational Studies. **PLoS One**, v. 9, e116060, 2014.
- LEE, J. H.; KISHIKAWA, M.; KUMAZOE, M.; YAMADA, K.; TACHIBANA, H. Vitamin A enhances antitumor effect of a green tea polyphenol on melanoma by upregulating the polyphenol sensing molecule 67-kDa laminin receptor. **PLoS One**, v. 5, p. 1–8, 2010.
- LEE, S. I.; YUN, J.; BAEK, J.; JEONG, Y.; KIM, J.; KANG, J. S.; PARK, S. H.; KIM, S. K.; PARK, S. NgR1 Expressed in P19 Embryonal Carcinoma Cells Differentiated by Retinoic Acid Can Activate STAT3. **Korean J Physiol Pharmacol.**; v. 19, n. 2, p. 105–109, 2015.
- LI, X.; ASHANA, A. O.; MORETTI, V. M.; LACKMAN, R. D. The relation of tumour necrosis and survival in patients with osteosarcoma. **Int. Orthop.**, v. 35, p. 1847–1853, 2011.
- LIU, X.; CAI, H.; HUANG, H.; LONG, Z.; SHI, Y.; WANG, Y. The prognostic significance of apoptosis-related biological markers in chinese gastric cancer patients. **PLoS One**, v. 6, p. 1–8, 2011.
- LQUBAL, M. A. KHAN, M.; KUMAR, P.; KUMAR, A.; AJAI, K. Role of Vitamin E in Prevention of Oral Cancer:-A Review. **J. Clin. Diagnostic Res**, v. 8, n. 10, p. 5–7, 2014.
- MACTIER, H.; WEAVER, L. T. Vitamin A and preterm infants: what we know, what we don't know, and what we need to know. **Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.**, v. 90, F103–F108, 2005.
- MAHALINGAM, D.; NATONI, A.; KEANE, M.; SAMALI, A.; SZEGEZDI, E. Early growth response-1 is a regulator of DR5-induced apoptosis in colon cancer cells. **Br. J. Cancer**, v. 102, p. 754–764, 2010.
- MARCATO, P.; DEAN, C. A.; LIU, R. Z.; COYLE, K. M.; BYDOUN, M.; WALLACE, M.; CLEMENTS, D.; TURNER, C.; MATHENGE, E. G.; GUJAR, S. A.; GIACOMANTONIO, C. A.; MACKEY, J. R.; GODBOUT, R.; LEE, P. W. K. Aldehyde dehydrogenase 1A3 influences breast cancer progression via differential retinoic acid signaling. **Mol. Oncol.**, v. 9, p. 17–31, 2014.
- MELONI, M. The social brain meets the reactive genome: neuroscience, epigenetics and the new social biology. **Front. Hum. Neurosci.**, v. 8, n. 309, 2014.
- MOQUIN, D.; CHAN, F. The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. **Trends Biochem. Sci.**, v. 35, p. 434–441, 2010.

NEUZIL, J.; TOMASETTI, M.; ZHAO, Y.; DONG, L.-F.; BIRNINGER, M.; WANG, X.-F.; LOW, P.; WU, K.; SALVATORE, B. A.; RALPH, S. J. Vitamin E analogs, a novel group of “mitocans,” as anticancer agents: the importance of being redox-silent. **Mol. Pharmacol.**, v. 71, 1185–1199, 2007.

NICOLAU-GALMÉS, F.; ASUMENDI, A.; ALONSO-TEJERINA, E.; PÉREZ-YARZA, G.; JANGI, S. M.; GARDEAZABAL, J.; ARROYO-BERDUGO, Y.; CAREAGA, J. M.; DÍAZ-RAMÓN, J. L.; APRAIZ, A.; BOYANO, M. D. Terfenadine induces apoptosis and autophagy in melanoma cells through ROS-dependent and -independent mechanisms. **Apoptosis**, v. 16, p. 1253–1267, 2011.

OLIVEIRA, M. R. Vitamin A and Retinoids as Mitochondrial Toxicants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015.

OLIVEIRA, M. R.; DA ROCHA, R. F.; PASQUALI, M. A. D. B.; MOREIRA, J. C. F. The effects of vitamin A supplementation for 3 months on adult rat nigrostriatal axis: Increased monoamine oxidase enzyme activity, mitochondrial redox dysfunction, increased β -amyloid 1-40 peptide and TNF- α contents, and susceptibility. **Brain Res. Bull.**, v. 87, p. 432–444, 2012.

OLIVEIRA, M. R.; OLIVEIRA, M. W. S.; BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C. F. Vitamin A supplementation at clinical doses induces a dysfunction in the redox and bioenergetics states, but did change neither caspases activities nor TNF- α levels in the frontal cortex of adult Wistar rats. **J. Psychiatr. Res.**, v. 43, p. 754–762, 2009.

PARK, J. H.; QIAO, B.; PANAGEAS, K. S.; SCHYMURA, M. J.; JURCIC, J. G.; ROSENBLAT, T. L.; ALTMAN, J. K.; DOUER, D.; ROWE, J. M.; TALLMAN, M. S. Early death rate in acute promyelocytic leukemia remains high despite all- trans retinoic acid. **Blood**, v. 118, n. 5, p. 1248–1255, 2011.

PARK, Y.; SPIEGELMAN, D.; HUNTER, D. J.; ALBANES, D.; BERGKVIST, L.; BURING, J. E.; FREUDENHEIM, J. L.; GIOVANNUCCI, E.; GOLDBOHM, R. A.; HARNACK, L.; KATO, I.; KROGH, V.; SCHATZKIN, A.; SHORE, R.; SIERI, S.; STAMPFER, M. J. Intakes of vitamins A, C, and E and use of multiple vitamin supplements and risk of colon cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. **Cancer Causes Control**, v. 21, n. 11, p. 1745–1757, 2010.

QIAO, J.; PAUL, P.; LEE, S.; QIAO, L.; JOSIFI, E.; TIAO, J. R.; CHUNG, D. H. PI3K/AKT and ERK regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 424, p. 421–426, 2012.

ROCHETTE-EGLY, C. Biochimica et Biophysica Acta Retinoic acid signaling and mouse embryonic stem cell differentiation: Cross talk between genomic and non-genomic effects of RA ☆. **BBA - Mol. Cell Biol. Lipids**, v. 1851, p. 66–75, 2015.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; BARTOSZ, G. Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. **Biomed Res. Int.**, 404680, 2014.

SCHNORR, C. E.; MORRONE, M. D. S.; WEBER, M. H.; LORENZI, R.; BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C. F. The effects of vitamin A supplementation to rats during gestation and

lactation upon redox parameters: Increased oxidative stress and redox modulation in mothers and their offspring. **Food Chem. Toxicol.**, v. 49, p. 2645–2654, 2011.

SCHNORR, C.; MORRONE, M.; SIMÕES-PIRES, A.; BITTENCOURT, L.; ZEIDÁN-CHULIÁ, F.; MOREIRA, J. Supplementation of Adult Rats with Moderate Amounts of β -Carotene Modulates the Redox Status in Plasma without Exerting Pro-Oxidant Effects in the Brain: A Safer Alternative to Food Fortification with Vitamin A? **Nutrients**, v. 6, 5572–5582, 2014.

SHUKLA, S.; MEERAN, S. M.; KATIYAR, S. K. Epigenetic regulation by selected dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. **Cancer Lett.**, v. 355, p. 9–17, 2014.

SUNTHARALINGAM, K.; SONG, Y.; LIPPARD, S. J. Conjugation of vitamin E analog α -TOS to Pt(IV) complexes for dual-targeting anticancer therapy. **Chem. Commun. (Camb)**., v. 50, p. 2465–2468, 2014.

SZABO, E.; MAO, J. T.; LAM, S.; REID, M. E.; KEITH, R. L. Chemoprevention of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. **Chest**, v. 143, 2013.

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

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

UCHINO, Y.; IRIYAMA, N.; HATTA, Y.; TAKEI, M. Granulocyte colony-stimulating factor potentiates all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cell line HT93A. **Cancer Cell Int.**, v. 15, p. 1–11, 2015.

VARSHOSAZ, J.; SADEGHI-ALIABADI, H.; GHASEMI, S.; BEHDADFAR, B. Use of magnetic folate-dextran-retinoic acid micelles for dual targeting of doxorubicin in breast cancer. **Biomed Res. Int.**, 2013.

VASEVA, A. V.; MARCHENKO, N. D.; JI, K.; TSIRKA, S. E.; Holzmann, S.; Moll, U. M. P53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. **Cell**, v. 149, p. 1536–1548, 2012.

VON LINTIG, J. Provitamin A metabolism and functions in mammalian biology. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 96, p. 1234–1244, 2012.

WATTERS, K. M.; BRYAN, K.; FOLEY, N. H.; MEEHAN, M.; STALLINGS, R. L. Expressional alterations in functional ultra-conserved non-coding RNAs in response to all-trans retinoic acid--induced differentiation in neuroblastoma cells. **BMC Cancer**, v. 13, 184, 2013.

WENSVEEN, F. M.; ALVES, N. L.; DERKS, I. A. M.; REEDQUIST, K. A.; ELDERING, E. Apoptosis induced by overall metabolic stress converges on the Bcl-2 family proteins Noxa and Mcl-1. **Apoptosis**, v. 16, p. 708–721, 2011.

WONG, M.; LODGE, J. K. A metabolomic investigation of the effects of vitamin E supplementation in humans. **Nutr. Metab.** (Lond), v. 9, n. 1, 2012.

YANG, Z. Vitamin E Intake and Pancreatic Cancer Risk: A Meta-Analysis of Observational Studies. **Med. Sci. Monit.**, v. 21, p. 1249–1255, 2015.

ZANON-MORENO, V.; ASENSIO-MARQUEZ, E. M.; CIANCOTTI-OLIVER, L.; GARCIA-MEDINA, J. J.; ORTEGA-AZORIN, C.; PINAZO-DURAN, M. D.; ORDOVÁS, J. M.; CORELLA, D. Effects of polymorphisms in vitamin E-, vitamin C-, and glutathione peroxidase-related genes on serum biomarkers and associations with glaucoma. **Molecular Vision**, v. 19, p. 231–242, 2013.

ZANOTTO-FILHO, A.; GELAIN, D. P.; SCHRÖDER, R.; SOUZA, L. F.; PASQUALI, M. A. B.; KLAMT, F.; MOREIRA, J. C. F. The NFκB-mediated control of RS and JNK signaling in vitamin A-treated cells: Duration of JNK-AP-1 pathway activation may determine cell death or proliferation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 77, p. 1291–1301, 2009.

ZEEGERS, M. P.; GOLDBOHM, R. A.; VAN DEN BRANDT, P. A. Are retinol, vitamin C, vitamin E, folate and carotenoids intake associated with bladder cancer risk? Results from the Netherlands Cohort Study. **Br. J. Cancer**, v. 85, n. 7, p. 977–983, 2001.

ZHANG, L.; ZHOU, Q.; ZHANG, N.; LI, W.; YING, M.; DING, W.; YANG, B.; HE, Q. E2F1 impairs all-trans retinoic acid-induced osteogenic differentiation of osteosarcoma via promoting ubiquitination-mediated degradation of RARα. **Cell Cycle**, v. 13, p. 1277–1287, 2014.

ZHANG, Y.-P.; CHU, R.-X.; LIU, H. Vitamin A Intake and Risk of Melanoma: A Meta-Analysis. **PLoS One**, v. 9, e102527, 2014.



Capítulo II

**ESTUDO NÃO-CLÍNICO DA ATIVIDADE DO PALMITATO DE
RETINOL FRENTE AO MECANISMO OXIDATIVO DE
QUIMIOTERÁPICOS DO PROTOCOLO AC**

Artigo submetido à Revista Chemico-Biological Interactions

Qualis B1 para Farmácia

**ESTUDO NÃO-CLÍNICO DA ATIVIDADE DO PALMITATO DE
RETINOL FRENTE AO MECANISMO OXIDATIVO DE
QUIMIOTERÁPICOS DO PROTOCOLO AC**

Ricardo Melo de Carvalho¹; Mayra Bezerra Rocha²; Melice Barbosa Oliveira Feitosa²; Leidiana Sousa Sampaio²; Mickael Laudrup de Sousa Cavalcante²; Márcia Fernanda Correa Jardim Paz¹; Marcus Vinicius Oliveira Barros de Alencar ¹; Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata¹; MD. Torequul Islam¹; Reyca Rodrigues e Silva²; Paulo Michel Pinheiro Ferreira¹; Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante¹

¹ Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica, LAPGENIC - Universidade Federal do Piauí, UFPI, Ininga, CEP: 64.049-550, Teresina/PI – Brasil. E-mail: ricardo_carvalho50@hotmail.com

² Clínica Integrada de Saúde - Centro Universitário de Saúde, Ciências Humanas e Tecnológicas do Piauí, UNINOVAFAPI, Rua Vitorino Orthigues Fernandes, 6123 – Uruguai, CEP: 64073-505, Teresina/Piauí – Brasil.

RESUMO

Os antineoplásicos são conhecidos pela geração de altos níveis de estresse oxidativo em sistemas biológicos. O uso de nutrientes e de suplementações vitamínicas é indicado para minimizar os efeitos adversos da quimioterapia, embora existam controvérsias sobre suas interferências na eficácia deste tipo de tratamento. O estudo analisou a ação do palmitato de retinol frente aos danos oxidativos e genotóxicos da doxorubicina e/ou ciclofosfamida, respectivamente, por meio do uso de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficientes e mutadas quanto às defesas antioxidantes e do teste cometa, em Sarcoma 180. Em *S. cerevisiae*, o palmitato de retinol foi testado na concentração de 100 UI/mL; e em Sarcoma 180, nas concentrações 1, 10 e 100 UI/mL frente aos danos da doxorubicina e ciclofosfamida nas concentrações de 2 µg/mL e 20 µg/mL, respectivamente. Os danos oxidativos ao DNA citoplasmático e mitocondrial das linhagens *SodWT*, *Sod1Δ*, *Sod2Δ*, *Sod1Δ/sod2Δ*, *Cat1Δ* e *Sod1Δ/Cat1Δ* induzidos pelos antineoplásicos foram significativamente ($P < 0,001^{***}$) modulados pelo palmitato de retinol. De forma similar, a genotoxicidade induzida pelos antineoplásicos em Sarcoma 180 também foi modulada pelo palmitato de retinol em todas as concentrações testadas. Considerando que os danos oxidativos causam genotoxicidade em células eucarióticas não tumorais e tumorais, os resultados apontam que durante a meia-vida dos antineoplásicos, a suplementação vitamínica de nutrientes ricos em palmitato de retinol pode interferir na eficácia da quimioterapia por interpelarem sobre os mecanismos citotóxicos inerentes à indução da morte celular, de importância para a regressão tumoral.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Antineoplásicos; Antioxidantes; Palmitato de retinol.

ABSTRACT

Antineoplastic agents are known for their inducing capability of oxidative stress in biological systems. Nutrients usage and vitamin supplements are recommended for minimizing the adverse effects of chemotherapy, despite of some controversies about the interference of these substances on the effectiveness of treatment. This study analyzed the retinyl palmitate (RP) action front of oxidative and genotoxic damage by doxorubicin (DOX) and/or cyclophosphamide (CPA) by using comet assay in proficient and mutated *Saccharomyces cerevisiae* strains and Sarcoma 180 cells. On *S. cerevisiae*, the RP was tested at a concentration of 100 IU/mL, while on Sarcoma 180, it was 1, 10 and 100 IU/mL. The DOX and CPA were used as oxidative agents at the concentrations of 20 µg/mL and 2 µg/mL, respectively. Results suggest that, the oxidative damage in the proficient and deficient *S. cerevisiae* (*Sod*WT, *Sod1Δ*, *Sod2Δ*, *Sod1ΔSod2Δ*, *Cat1Δ* and *Sod1ΔCat1Δ*) strains was significantly ($P < 0.05$) modulated by RP. Similarly, the genotoxicity induced by the antineoplastics (DOX/CPA) on Sarcoma 180 was also modulated by RP. However, the oxidative damages cause genotoxicity in non-tumor and tumor eukaryotic cells. In conclusion, the antineoplastics with vitamin supplementation of retinyl palmitate-enriched nutrients can impede the efficacy of chemotherapy, by interfering with the cytotoxic mechanisms related to induction of cell death, which is crucial for the tumor regression.

Keywords: Oxidative stress; Antineoplastic; Antioxidants; Retinyl palmitate.

1 Introdução

O câncer é uma doença caracterizada pela multiplicação e propagação descontrolada, no corpo, de formas anômalas das próprias células, representando estatisticamente uma das maiores causas de morte no planeta (ZNAOR et al., 2015). Os registros de Câncer de Base Populacional do Brasil fornecem dados que propõem uma estimativa em torno de 600 mil novos casos confirmados de algum tipo de neoplasia em todo o país, apenas para o biênio 2016-2017 (INCA, 2015).

A quimioterapia (QT) é uma das modalidades terapêuticas de maior escolha para o alcance da cura, controle ou apenas palição em pacientes oncológicos (FUH et al., 2015). Entre os esquemas quimioterápicos mais aplicáveis, existem os protocolos FAC (5- Fluorouracil + Doxorrubicina + Ciclofosfamida), AC-T (Ciclofosfamida + Doxorrubicina + Taxol ou Paclitaxel) e AC (Doxorrubicina + Ciclofosfamida) (CIRILLO, 2008; GOMES JÚNIOR et al., 2015). Os quimioterápicos se constituem em substâncias citotóxicas que atuam direta ou indiretamente no processo de proliferação celular, tendo como um dos principais objetivos a indução de apoptose em células cancerígenas (FREEDMAN; PARTRIDGE, 2011; DAI et al., 2013; BASU et al., 2015).

Uma parcela considerável dos pacientes em tratamento quimioterápico faz suplementação alimentar, especialmente com os derivados ou precursores das vitaminas A e C, o que pode ocasionar efeitos antagônicos aos antineoplásicos (BOZZETTI, 2014; SUBRAMANI et al., 2014). Pertencendo ao subgrupo dos retinoides, o palmitato de retinol, composto associado à vitamina A, apresenta relação direta com o desenvolvimento saudável do corpo, ajudando na manutenção da visão e da umidade das mucosas, o que interfere, positivamente, no equilíbrio do sistema imunológico; além de estar envolvido em processos de regulação e diferenciação celular (SOUGANIDIS et al., 2013; PIRAZZI et al., 2014).

Atualmente, questiona-se a eficácia do tratamento para o câncer quando administrados antioxidantes, concomitantemente, aos quimioterápicos, tendo em vista que se deve levar em consideração as propriedades individuais dos compostos antioxidantes e os mecanismos de ação dos próprios antineoplásicos (CONKLIN, 2004). Em razão disso, o uso clínico dos antioxidantes, como reguladores do estresse oxidativo durante a quimioterapia, não apresenta consenso literário e clínico (OLIVEIRA, 2015; PISOSCHI; POP, 2015).

Este estudo teve como objetivo analisar o papel do palmitato de retinol (PR) na modulação de danos oxidativos induzidos pelos antineoplásicos ciclofosfamida (CPA) e doxorubicina (DOX) em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e mutadas quanto às defesas enzimáticas antioxidantes; além de avaliar o efeito modulador frente aos danos genotóxicos induzidos pelos antineoplásicos DOX, CPA, e o Protocolo AC sobre células de Sarcoma 180, *ex vivo*, com aplicação do teste cometa.

2 Materiais e Métodos

2.1 Obtenção e preparo das substâncias

Todos os químicos foram obtidos em uma farmácia de manipulação em Teresina, PI. Os antineoplásicos CPA e DOX foram preparados por meio de diluição com solução salina 0,9% (estéril) até a concentração final de 20 µg/mL e 2 µg/mL, respectivamente, escolhidas conforme Freedman e Partridge (2011). Procedeu-se a solubilização do palmitato de retinol até as concentrações de 1, 10 e 100 UI/mL, em solução fisiológica 0,9% acrescido de DMSO a 10%.

2.2 Atividade oxidante em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Trata-se de um estudo experimental de caráter analítico descritivo, no qual foram utilizadas seis linhagens de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e mutadas em suas defesas antioxidantes. 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*; a linhagem EG223 é defectiva na enzima catalase (*CAT1*); a EG é o duplo mutante defectivo para *SOD1* e *CAT1*; e EG103 corresponde à linhagem selvagem, portanto proficiente nestas enzimas (**Tabela 1**).

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

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

Adaptação: De Lima, 2008.

Todos os experimentos foram realizados através do teste do disco central em *S. cerevisiae*, onde as culturas de leveduras foram distribuídas sobre a técnica de co-tratamento, tratadas com H₂O₂ ou solução fisiológica. As linhagens foram cultivadas em meio YEL (extrato de levedura 0,5%, 2% de Bacto-peptona, 2% de glucose) a 28°C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária, de acordo com Oliveira e colaboradores (2014a). Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem das placas de Petri em um movimento contínuo, para ambos os lados da placa, contendo em seu centro um disco de papel de filtro estéril, ao qual foi acrescentado, nas distintas placas, 10 µL das concentrações de cada antineoplásico e 10 µL do palmitato de retinol para realização do co-tratamento. Para correlação estatística com os resultados dos grupos testes, dois grupos controle foram utilizados. 10µL de uma solução contendo H₂O₂ (10 mMol) foi utilizado como controle positivo e 10µL de solução salina (0,9%), como controle negativo (**Tabela 2**). O período de exposição aos antineoplásicos foi definido com base no período correspondente à meia-vida dos fármacos, aproximadamente: 7 h para ciclofosfamida e 48 h para doxorrubicina (BRESSAN et al., 2010). Após 48 h de incubação em estufa a 37°C, os halos de inibição de crescimento das linhagens, em milímetros, foram mensurados desde a margem do disco de papel-filtro até o início do crescimento celular. Os valores tabelados e submetidos à análise estatística variaram de 0mm (crescimento completo) a 40 mm (ausência de crescimento), que corresponde à medida do raio da placa de Petri. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Tabela 2. Protocolo experimental em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tratamentos	Procedimentos
<i>Co-tratamento</i>	Adição de 10 µL do PR 100 UI/mL + de 10µL dos antineoplásicos CPA (20 µg/mL) e DOX (2 µg/mL) sobre o disco central em placas de Petri, com posterior direcionamento à estufa por 48 h.
<i>Peróxido de Hidrogênio</i>	Adição de 10 µL de H ₂ O ₂ (10mMol), como controle positivo, sobre o disco central em placas de Petri, com posterior direcionamento à estufa por 48 h.
<i>Sem Tratamento</i>	Adição de 10 µL de solução fisiológica (0,9%), como controle negativo, a fim de avaliar os danos oxidativos espontâneos às linhagens de leveduras, com posterior direcionamento à estufa por 48 h.

Legenda: CPA - ciclofosfamida; DOX – doxorrubicina.

2.3 Cultivo *in vivo* e *ex vivo* de Sarcoma 180

Os experimentos de manutenção do tumor Sarcoma 180 em camundongos *Mus musculus* foram iniciados sob a aprovação prévia pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI, com documento comprobatório de 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 assépticas e centrifugado (500g, 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). Em frascos de cultura contendo 1mL de meio RPMI suplementados com soro bovino fetal (20%), antibióticos (Sigma, St. Louis, MO) e fitohemaglutinina A (Gibco, Grand Island, NY) foram adicionados 20 μ L de suspensão celular de Sarcoma 180 (0.5×10^6 /mL). Após a realização das culturas, os frascos contendo as células de sarcoma 180 em meio RPMI foram organizados em 16 grupos, 4 controles e 12 testes, tratados e co-tratados com os antineoplásicos DOX e CPA; e uma variação de 3 concentrações do PR, onde em cada frasco de cultura foram adicionados 10 μ L das soluções (**Tabela 3**). Ao final de 72 h a $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$, as culturas foram transferidas para tubos falcon e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos, para obtenção do *pellet* celular.

Tabela 3. Esquema dos grupos controle e teste das células de Sarcoma 180 expostas aos antineoplásicos e ao palmitato de retinol.

Grupos	Tratamentos	Concentração Celular
<i>Controle Negativo</i>	Sem tratamento	$0,5 \times 10^6$ células/mL em meio RPMI (FERREIRA et al., 2011)
<i>Controle Positivo</i>	CPA: ciclofosfamida (20 μ g/mL) DOX: doxorubicina (2 μ g/mL) Protocolo AC: CPA e DOX (20/2 μ g/mL)	
<i>Grupos Testes</i>	PR: palmitato de retinol 1 UI/mL 10 UI/mL 100 UI/mL	
	CPA + PR 1 UI/mL CPA + PR 10 UI/mL CPA + PR 100 UI/mL	
	DOX + PR 1 UI/mL DOX + PR 10 UI/mL DOX + PR 100 UI/mL	
	Protocolo AC + PR 1 UI/mL Protocolo AC + PR 10 UI/mL Protocolo AC + PR 100 UI/mL	

2.4 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 e colaboradores (1993). Após 72 h, tanto as células sem tratamento quanto aquelas sob tratamento com os antineoplásicos e co-tratamento com o Palmitato de Retinol foram usadas para a aplicação da técnica. Foram retirados das culturas 90 μ L da suspensão de células e acrescidos de 10 μ L do azul de Tripán aos diferentes grupos de tratamento: PR, 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 apresentaram 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, na análises dos quatro quadrantes da câmara de Neubauer.

2.5 Teste cometa

O teste cometa foi realizado segundo Singh et al. (1988), com modificações de Tice et al. (2000), e adaptações de Hartmann et al. (2003). As lâminas foram pré-cobertas por solução de agarose de ponto de fusão normal a 0,75% e, posteriormente, foram mantidas em temperatura ambiente até a solidificação da agarose. 10 μ L do centrifugado foi misturado com 90 μ L de agarose (0,75%) de baixo ponto de fusão (*low melting*), a 37°C. O homogenato foi colocado sobre as lâminas, as quais foram cobertas com lamínulas (24 x 60 mm) e mantidas em baixa temperatura até a solidificação da agarose. Retirou-se a lamínula e mergulhou-se a lâmina em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) a 4°C e protegida da luz, por 24 horas. As lâminas foram removidas da solução de lise e deixadas na posição horizontal na cuba de eletroforese, a qual estava em um banho de gelo para a manutenção da temperatura da eletroforese constante em torno de 4°C. A cuba foi preenchida com a solução de eletroforese, recém-preparada (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13), a um nível superior (0,25cm em média), e as lâminas foram deixadas em repouso, por 20 minutos, para o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios alcalilábeis. A eletroforese foi conduzida usando 25 V e 300 mA, por um tempo de 15 minutos; e todas as etapas foram executadas na presença de luminárias com baixo comprimento de onda. Ao final da eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas na solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5, por 5 minutos). Em seguida, foram expostas, por 10 minutos, à solução fixadora (Ácido tricloroacético 15%, Sulfato de zinco heptahidratado 5%, e glicerol

5%). Após a secagem, as mesmas foram coradas com solução de nitrato de prata (0,02%) e lavadas 3 vezes com água destilada. Adicionou-se a solução de parada (ácido acético) por 5 minutos, e, logo após, foram feitas 3 lavagens com água destilada. As lâminas foram deixadas em bandejas para secagem em temperatura ambiente. Para cada concentração, foram fotografadas 100 células aleatórias, as quais foram avaliadas a partir de 5 classes, de acordo com o tamanho e a intensidade dos nucleoides e dos danos ao material genético: sem dano ou intacto, classe 0, até com máximo de dano, classe 4. Após a avaliação, foi calculado o Índice de Dano, segundo a fórmula: $ID = \sum (\text{n}^\circ \text{ de células com dano "y"} \times \text{classe "y" de dano})$, que variou de 0 (ex.: 100 células com dano 0 X 0) a 400 (ex.: 100 células com dano 4 X 4). Também foi calculada a frequência de dano através da fórmula: $FD = 100\% - \text{danos de classe 0}$.

2.6 Análise estatística

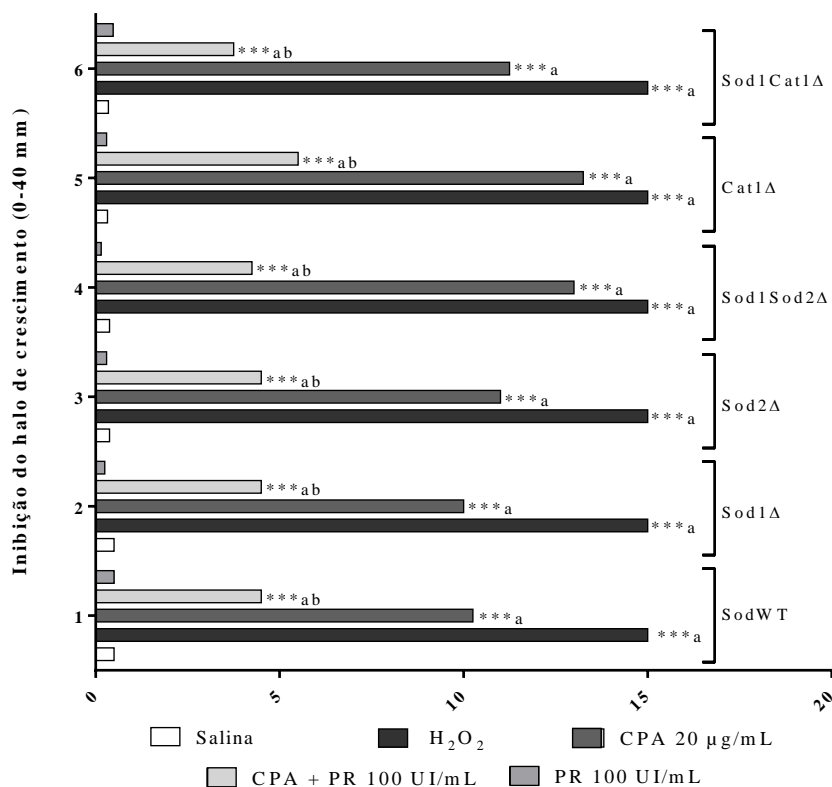
Os resultados foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) e pelo *Bonferroni* como *post hoc* teste por meio do programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, Copyright ©. Significância na correlação estatística para $P < 0,05$.

3 Resultados e Discussão

3.1 Danos oxidativos da Ciclofosfamida e Doxorubicina em linhagens de *S. cerevisiae* e os efeitos do Palmitato de Retinol.

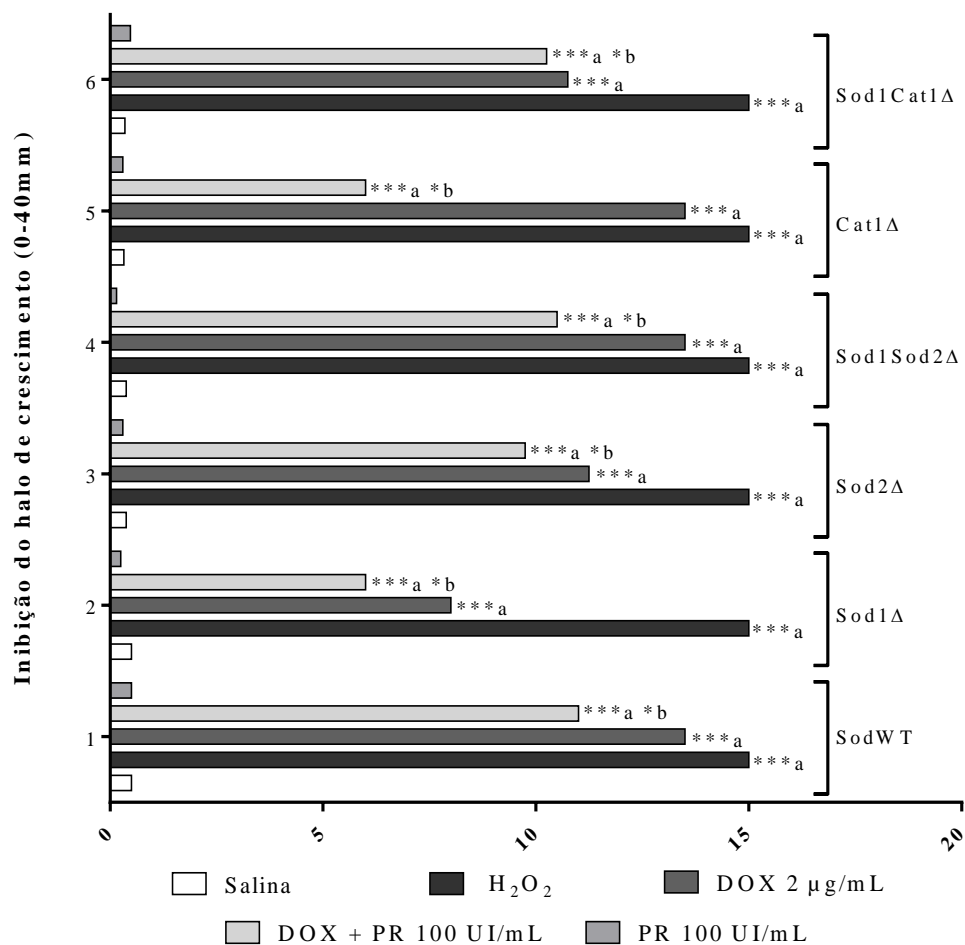
A CPA induziu expressivos danos oxidativos ao DNA nuclear e mitocondrial em todas as linhagens de *S. cerevisiae* testadas, quando comparadas ao H₂O₂ (P<0,001***). Entretanto, o co-tratamento com o palmitato de retinol, na concentração de 100 UI/mL, ocasionou a significativa modulação dos danos oxidativos (P<0,001***) derivados da CPA em todas as linhagens de *S. cerevisiae* (**Figura 1**). A ciclofosfamida (CPA) e a doxorubicina (DOX) são exemplos de quimioterápicos amplamente utilizados na terapêutica do câncer. A CPA é um agente alquilante, do tipo ciclo celular não-específico, que faz parte da família das mostardas nitrogenadas, capaz de induzir vários tipos de danos ao DNA, dentre eles mutações genéticas, aberrações cromossômicas e danos oxidativos (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008; DHESI et al., 2013; NAITO et al., 2015).

Figura 1. Estudo comparativo entre inibição de crescimento de linhagens de *S. cerevisiae* expostas à ciclofosfamida (CPA: 20 µg/mL) em relação aos danos induzidos pelo H₂O₂ (10 Mm) e palmitato de retinol (PR: 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância de ^aP<0,001 comparados à salina e ^bP<0,001 comparados à CPA.



A DOX também induziu, significativamente, os danos oxidativos ($P < 0,001^{***}$) em todas as linhagens de *S. cerevisiae*. Da mesma forma, o palmitato de retinol modulou os danos oxidativos ao DNA nuclear e mitocondrial promovidos pela ação do quimioterápico. Foram observados efeitos antioxidantes no co-tratamento da DOX com vitamina A, em todas as linhagens de *S. cerevisiae*, proficientes e deficientes em defesas enzimáticas ($P < 0,05^*$) (**Figura 2**). A DOX é outro exemplo de quimioterápico com predileção pela molécula de DNA. Foi uma das primeiras antraciclina isoladas, no decorrer da década de 60, a partir de *Streptomyces peucetius* e é classicamente conhecida por sua ação inibitória sobre a topoisomerase II, o que impede que essa proteína religue as fitas de DNA, causando quebras duplas no material genético (MARSH; LIU, 2009; BAMODU et al., 2015; HOFMAN et al., 2015).

Figura 2. Estudo comparativo entre inibição de crescimento de linhagens de *S. cerevisiae* expostas à doxorubicina (DOX: 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em relação aos danos pelo H_2O_2 (10 Mm), e palmitato de retinol (PR: 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância de ^a $P < 0,001$ comparados à salina; ^b $P < 0,05$ comparados à DOX.



Em estudos clínicos e não clínicos, a vitamina A demonstra seus importantes efeitos na inibição de danos oxidativos, assim como na prevenção e tratamento do câncer. O palmitato de retinol representa uma das variadas formas derivadas da vitamina A, um composto antioxidante de natureza hidrofóbica. Este micronutriente é um éster originado a partir de conformações químicas do retinol, um álcool, eficaz no combate a EROs (OLIVEIRA et al., 2014b). A atividade atenuadora do palmitato de retinol frente ao estresse oxidativo dos antineoplásicos foi evidenciada por meio de ensaios biológicos semiquantitativos a partir da inibição de crescimento de linhagens de *S. cerevisiae* proficiente e mutadas no sistema de defesa antioxidante da enzima superóxido dismutase e catalase (*SodWT*, *Sod1Δ*, *Sod2Δ*, *Sod1Δ/sod2Δ*, *Cat1Δ*, *Sod1Δ/Cat1Δ*).

Como discutido anteriormente para CPA (**Figura 1**), os danos oxidativos promovidos pela DOX (**Figura 2**) sobre *S. cerevisiae*, foram significativamente modulados pelo palmitato de retinol ($P < 0,001^{***}$ e $P < 0,05^*$, respectivamente) na concentração de 100 UI/mL em todas as linhagens testadas. Como os antioxidantes atuam na inibição de efeitos oxidantes, as interações deles com os antineoplásicos podem interferir nos mecanismos de indução de apoptose e alterações genéticas, aspectos que são clinicamente necessários para a eficácia terapêutica do câncer. A dieta rica em antioxidantes e/ou suplementação vitamínica com o palmitato de retinol pode interferir na ação dos agentes quimioterápicos pró-oxidantes, atenuando os seus efeitos citotóxicos, considerados como os seus efeitos terapêuticos necessários para o combate ao câncer (HEANEY et al., 2008; BICHSEL et al., 2013).

O estresse oxidativo pode estar envolvido na fisiopatologia do câncer por geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's), que fazem parte dos mecanismos de ação de diversas drogas anticancerígenas, bem como da radioterapia (KASAPOVIĆ et al, 2010). As células tumorais frequentemente produzem grandes quantidades de ERO's. Isto pode ser explicado pela presença de defeitos mitocondriais e uma expressão diminuída dos antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (MnSOD), glutatona peroxidase e/ou catalase (CAT) (GLORIEUX et al., 2011; OLIVEIRA et al, 2014a). Os alimentos antioxidantes, entre eles as vitaminas, são, segundo o Consenso Nacional de Nutrição ao paciente oncológico, recomendados seguindo doses sugeridas pelo “*Dietary Reference Intake*”. Estudos epidemiológicos apontam que a vitamina A tem ação preventiva para certos tipos de cânceres, devido sua eficiência na diferenciação celular e regulação da apoptose. Isso porque são capazes de atrasar ou inibir a oxidação, diminuindo a concentração de radicais livres no organismo

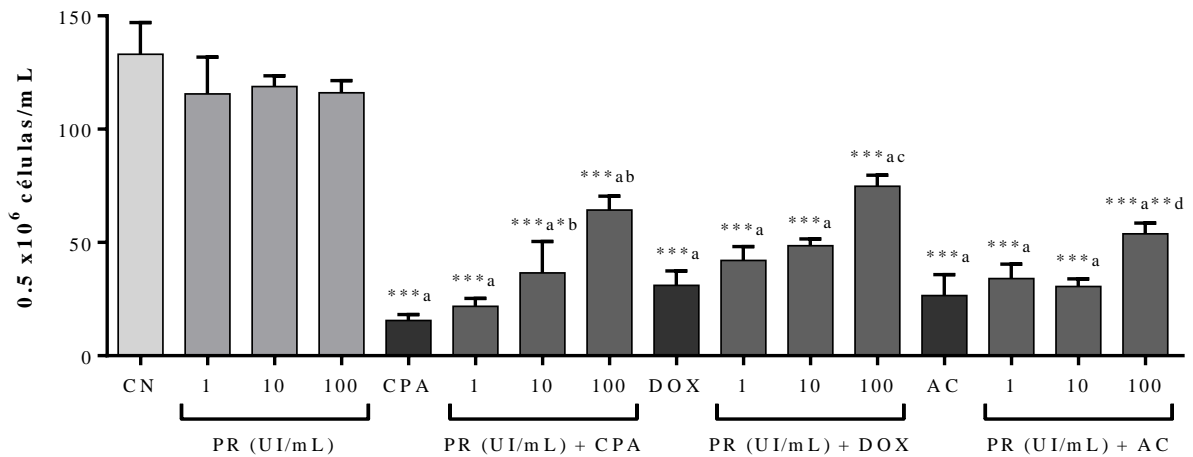
podendo, assim, atuar na prevenção do câncer, mas também reduzir os efeitos dos antineoplásicos (WANG; WANG; YU, 2014).

Em síntese, o estudo apontou riscos para o uso, concomitante, da CPA e DOX com o PR, durante a meia-vida dos antineoplásicos, devido a diversos mecanismos do PR, possivelmente relacionados à quelação, diluição e/ou sequestro de radicais livres em nível citoplasmático e mitocondrial, que podem interferir na eficácia do tratamento. Cabe enfatizar que a levedura *S. cerevisiae*, perante o ponto de vista genético e metabólico, representa um dos organismos mais usados em testes biológicos, inclusive para estudos de monitoramento do estresse oxidativo (HOSTETTER; OSBORN; DEROSE, 2012). As deleções de enzimas antioxidantes tais como a superóxido dismutase manganês (MnSOD) e cobre-zinco (CuZnSOD) causam aumento de proteínas oxidase que favorecem o uso destas linhagens em estudos de danos oxidativos (FARRUGIA; BALZAN, 2012). Seu metabolismo basal para regulação do estado redox é similar ao dos eucariotos superiores, com mecanismos apropriados de ativação metabólica (citocromo P450) e detoxificação de EROs, que não estão presentes em bactérias; autofagia, degradação e morte celular (GONZALEZ-PEREZ; GARCIA-RUIZ; ALCALDE, 2012; LEE; RAFFAGHELLO, LONGO, 2012). Assim, sugerimos a aplicação não clínica de linhagens de *S. cerevisiae* em avaliações de danos oxidativos e de interações medicamentosas.

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

Por meio da técnica de coloração por azul de Tripán, as células não viáveis de Sarcoma 180 detectadas após 72 horas de exposição *ex vivo* ao PR e aos antineoplásicos CPA, DOX e protocolo AC foram excluídas para a determinação da viabilidade celular. Da mesma forma que os antineoplásicos isolados, todos os co-tratamentos com o PR continuaram a diminuir a viabilidade das células neoplásicas ($P < 0,001^{***}$) em comparação ao dano basal, grupo sem tratamento. Entretanto, o estudo revelou que o palmitato de retinol na maior concentração, quando em co-tratamento com os antineoplásicos, aumentou significativamente ($P < 0,05^*$) a viabilidade das linhagens tumorais quando comparadas aos tratamentos dos antineoplásicos isolados. Esse fato caracteriza a modulação sobre os danos oxidativos destes fármacos em células tumorais de S-180 (**Figura 3**).

Figura 3. Viabilidade das células de Sarcoma 180 expostas ao palmitato de retinol (1, 10 e 100 UI/mL), ciclofosfamida (CPA: 20 µg/mL), doxorrubicina (DOX: 2 µg/mL) e ao protocolo de associação de doxorrubicina + ciclofosfamida. ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância de ^a (P<0,001) comparados ao controle negativo (CN), ^b (P<0,05 e P<0,001) à CPA, ^c (P<0,001) à DOX e ^d (P<0,01) ao protocolo AC.



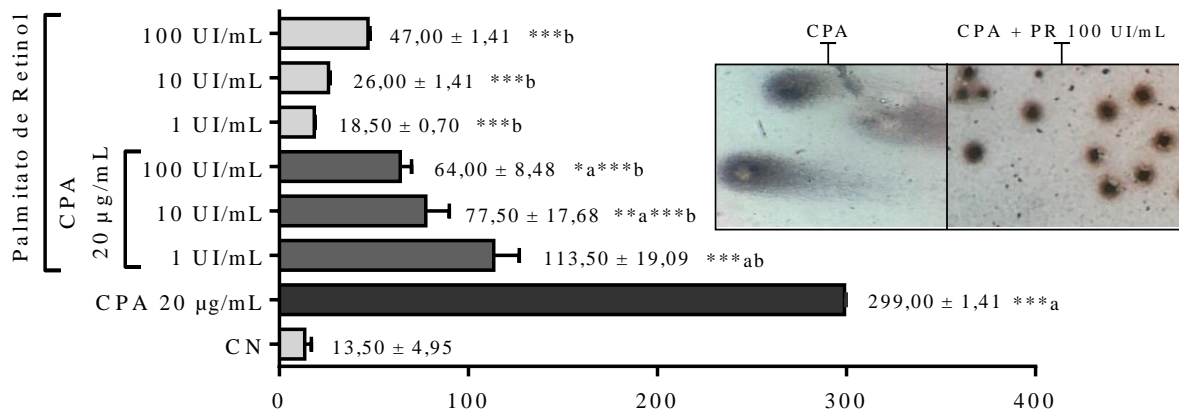
3.3 Danos genotóxicos da ciclofosfamida, doxorrubicina, protocolo AC e os efeitos do palmitato de retinol através do teste cometa em Sarcoma 180

O câncer é uma doença multifatorial caracterizada pelo crescimento desordenado de células e pela capacidade de proliferação em sítios distantes, as metástases (WHO, 2016). Sarcoma 180 é uma linhagem de câncer delimitada a camundongos, amplamente utilizada para investigação de efeitos antitumorais de compostos naturais ou sintéticos em testes não-clínicos. As linhagens de células neoplásicas S-180 são heterogêneas sem padrão de acometimento, mas apresentam uma acentuada predisposição para multiplicação celular sobre o líquido ascítico (YU et al., 2007; GHAZARYAN et al., 2015).

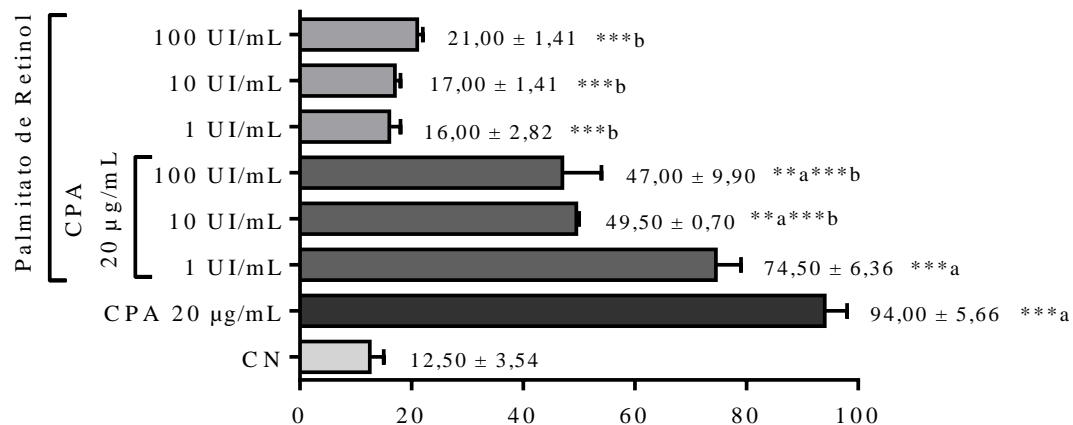
O palmitato de retinol, em co-tratamento com a CPA, modulou de forma significativa (P<0,001***) os danos induzidos em células tumorais de Sarcoma 180, em todas as três concentrações testadas, pela análise do índice e frequências de danos visualizados com a aplicação do teste cometa na versão alcalina (**Figura 4**). O percentual de modulação foi de 78,19% (PR 1 UI/mL); 66,43% (PR 10 UI/mL); e 80,54% (PR 100 UI/mL) para a análise dos índices de danos, assim como relatado anteriormente, na modulação dos danos oxidativos em diversas linhagens de *S. cerevisiae*, como células eucarióticas sem neoplasias.

Figura 4. Atividade antígeno-tóxica do PR. Em (A) índice de danos (0 – 400) e em (B) frequência de danos (0 – 100) para o teste cometa em células de Sarcoma 180 tratadas com ciclofosfamida (CPA: 20 µg/mL) e co-tratadas com palmitato de retinol (1, 10 e 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância (MD±DP) de ^a comparados ao controle negativo (CN) e ^b comparados aos antineoplásicos isolados.

A



B



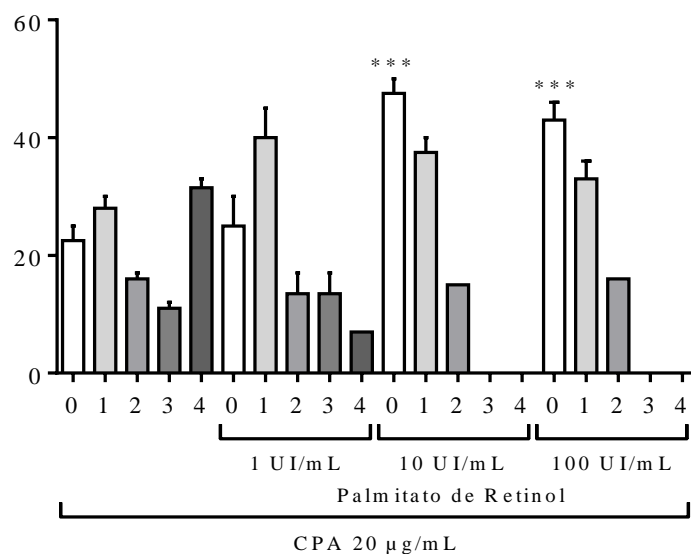
O teste cometa na versão alcalina (pH>13) é um teste de monitoramento genotóxico altamente sensível à detecção de alterações estruturais do DNA, como quebras simples e duplas, sítios alcalinos-lábeis e aos locais de reparação por excisão incompleta (PU; WANG, KLAUNIG, 2015), podendo ser aplicado para o entendimento e o acompanhamento do câncer (GONZÁLEZ-ACEVEDO et al., 2016; SINGH, 2016). A genotoxicidade da CPA observada em linhagens de células de Sarcoma 180 foi avaliada pelo índice e frequência de danos ao DNA de células neoplásicas (P<0,001***). Devido às suas ações genotóxicas, a CPA induz mutações

genéticas, aberrações cromossômicas, formação de micronúcleos, trocas nas cromátides-irmãs, apoptose e geração de radicais livres (SELVAKUMAR et al., 2006).

Há indícios de que as vitaminas antioxidantes podem inibir os efeitos de uma variedade de drogas citotóxicas (fluorouracil, doxorrubicina e vincristina) em diversas culturas e linhagens de células (MOSS, 2006), podendo diminuir efeitos tóxicos em sistemas celulares, por mecanismos relacionados ao ataque e captura de radicais livres, redução de quebra de cadeias de DNA, combinação com proteínas formando as selenoproteínas, ou reparo de aberrações do DNA (CAMERON; PAULING; LEIBOVITZ, 1979).

Na análise dos tipos de danos ao DNA que variam de 0 – 4, em células neoplásicas de Sarcoma 180, o co-tratamento da CPA com o palmitato de retinol induziu significantes danos do tipo 0, quando comparado aos mesmos tipos de danos induzidos pelo antineoplásico isolado (**Figura 5**). Cabe enfatizar que a variação dos demais tipos de danos 1, 2, 3 e 4 induzidos pelas associações da CPA com o PR, nas duas maiores concentrações testadas, foram consideravelmente mais expressivas, quanto à ocorrência, em relação aos demais, caracterizando a diminuição dos danos genotóxicos, principalmente de maior intensidade, quando comparados aos danos induzidos pela CPA de forma isolada.

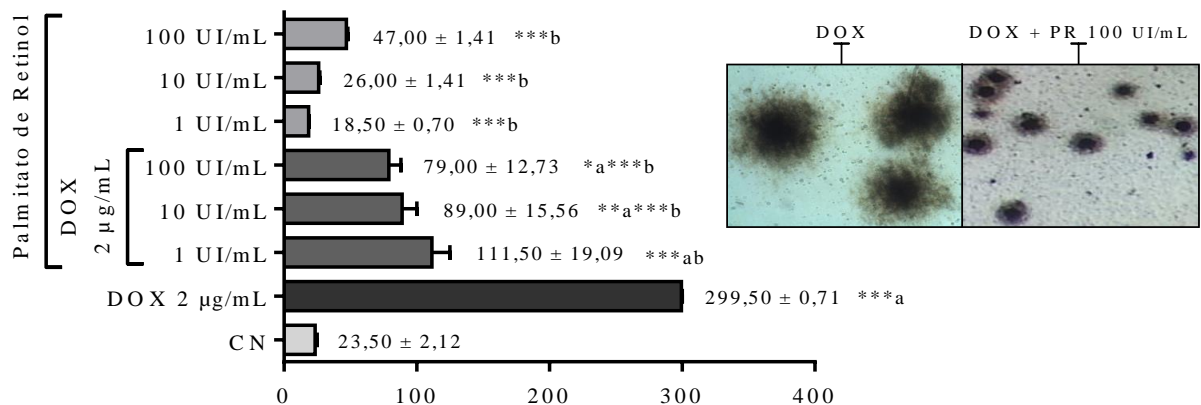
Figura 5. Variação quantitativa dos tipos de danos (0 – 4) para o teste cometa em células de Sarcoma 180 tratadas com ciclofosfamida (CPA: 20 µg/mL) e co-tratadas com palmitato de retinol (1, 10 e 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores significantes ($P < 0,001$) quando comparados à CPA isolada para a classe de dano 0.



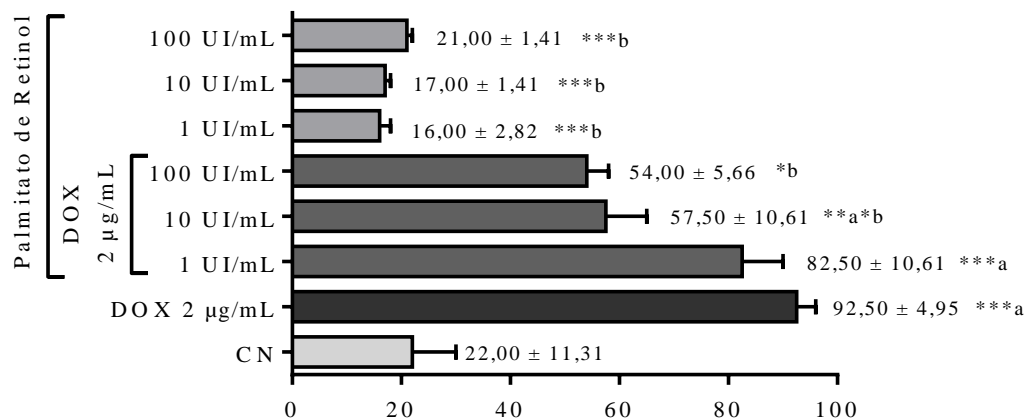
A doxorubicina (DOX) induziu significantes danos ao DNA de células neoplásicas de Sarcoma 180, quando comparada ao controle negativo (Sarcoma 180 sem tratamento) ($P < 0,001^{***}$). Entretanto, o Palmitato de Retinol, a exemplo do observado para CPA, também atenuou, significativamente, a genotoxicidade da DOX pela diminuição do índice de danos ($P < 0,001^{***}$), através dos percentuais de modulação: 62,78% (PR 1 UI/mL); 70,29% (PR 10 UI/mL); e 73,63% (PR 100 UI/mL); como também pela frequência de danos ($P < 0,05^*$) (**Figura 6**).

Figura 6. Atividade antígeno-tóxica do PR. Em (A) índice de danos (0 – 400) e em (B) frequência de danos (0 – 100) para o teste cometa em células de Sarcoma 180 tratadas com doxorubicina (DOX: 2 $\mu\text{g/mL}$) e co-tratadas com palmitato de retinol (1, 10 e 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância (MD \pm DP) de ^a comparados ao controle negativo (CN) e ^b comparados aos antineoplásicos isolados.

A



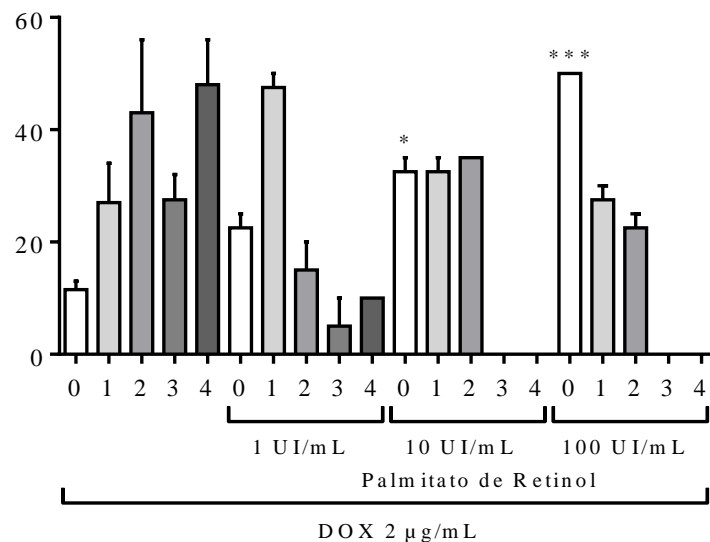
B



Estudos mostram que a combinação de derivados da vitamina A à terapia com antraciclinas para o tratamento de leucemia promielocítica aguda (APL), resulta em uma acentuada interferência terapêutica, fato que corrobora com os achados (PETRIE; ZELENT, WAXMAN, 2009). Não obstante, um estudo randomizado de fase III mostrou que a associação também deste derivado da vitamina A e associação ao trióxido de arsênio, em pacientes com risco intermediário de APL, resultou em benefício terapêutico com baixa ocorrência de lesões ao DNA (LO-COCO et al., 2013).

Na análise sobre os tipos de danos, o co-tratamento do palmitato de retinol com a DOX aumentou, significativamente, a ocorrência da ausência de danos (núcleos em dano 0, intactos), diminuindo a quantificação de danos de maior intensidade, a exemplo do mesmo tipo de associação com a CPA em células neoplásicas de Sarcoma 180. Observou-se, assim, que a partir da elevação na concentração da vitamina o efeito antioxidante do PR foi melhor observado (**Figura 7**).

Figura 7. Variação quantitativa dos tipos de danos (0 – 4) para o teste cometa em células de Sarcoma 180, tratadas com doxorubicina (DOX: 2 µg/mL) e co-tratadas com palmitato de retinol (1, 10 e 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores significantes ($P < 0,001$ e $P < 0,05$) quando comparados à DOX isolada para a classe de dano 0.



Em geral, os fármacos são empregados em associações visando à utilização de menores doses e buscando o sinergismo entre esses fármacos, favorecendo uma relação de risco/benefício mais favorável ao paciente. O protocolo AC tem aplicação terapêutica no tratamento neoadjuvante, tornando-se um padrão terapêutico em pacientes com câncer avançado (MALDONADO; LIMPER; JETT, 2012; VRIENS et al., 2013).

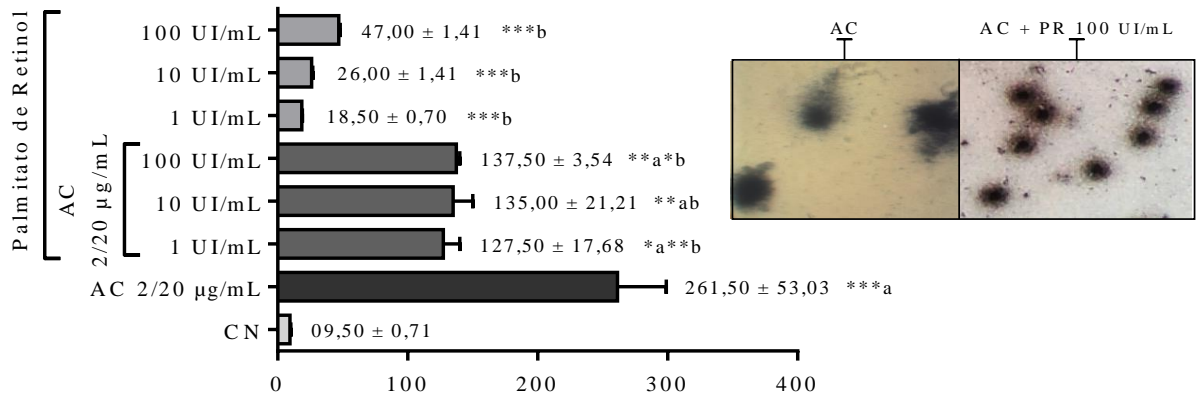
Para verificar os efeitos das interações entre a CPA e DOX, o protocolo AC também foi avaliado em células neoplásicas de Sarcoma 180, assim como os efeitos do PR sobre esta associação. O Protocolo AC ocasionou aumento nos danos ao material genético das células de Sarcoma 180, de forma significativa ($P < 0,001^{***}$) em relação ao controle negativo. Tal fato está diretamente ligado ao elevado potencial genotóxico dos medicamentos sobre as células cancerígenas utilizadas no estudo. Entretanto, mais uma vez, o palmitato de retinol modulou os danos genotóxicos em todos os grupos expostos ao co-tratamento. Na associação com o Protocolo AC, o PR, mesmo na concentração mais baixa (1 UI/mL), modulou o índice de danos do protocolo testado em 51,24%; além de reduzir, significativamente, em todas as concentrações os índices e frequências (**Figura 8**) de danos ($P < 0,05^*$ e $P < 0,01^{**}$) do Protocolo AC isolado.

Também foi observado efeito do Palmitato de Retinol na redução da classe de danos. Isso foi verificado quando comparados os efeitos da vitamina com os diferentes tipos de danos induzidos pelo Protocolo AC. Em relação à variação dos tipos de danos para o protocolo AC, observou-se uma interferência significativa ($P < 0,001^{***}$) sobre o aumento de dano 0, no tratamento com a concentração intermediária do Palmitato de Retinol (**Figura 9**).

Sobre as células, os radicais livres, produzidos pela ação dos quimioterápicos, representam importante fator na carcinogênese e progressão de tumores, pois estimulam lesões oxidativas no DNA, contribuindo para a mutagênese (SASTRE-SERRA et al., 2010; FREEMAN; KELLER, 2012). Dentro desse contexto, as vitaminas podem agir reduzindo a eficácia desses fármacos, por meio da neutralização dos radicais livres e também pela interferência sobre a regulação de enzimas de reparo de DNA e de fatores pós-transcricionais (LEE et al., 2002; CHAMBIAL et al., 2013; WANG; WANG; YU, 2014). Portanto, a suplementação com vitaminas antioxidantes pode não apenas interferir no desenvolvimento de efeitos colaterais resultantes do tratamento quimioterápico, como também atenuar a resposta terapêutica dos antineoplásicos (CHAKRABORTY et al., 2009).

Figura 8. Atividade antígeno-tóxica do PR. Em (A) índice de danos (0 – 400) e em (B) frequência de danos (0 – 100) para o teste cometa em células de Sarcoma 180 tratadas com o protocolo AC (ciclofosfamida + doxorubicina 2/20 µg/mL) e co-tratadas com palmitato de retinol (1, 10 e 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância (MD±DP) de ^a comparados ao controle negativo (CN) e ^b comparados aos antineoplásicos isolados.

A



B

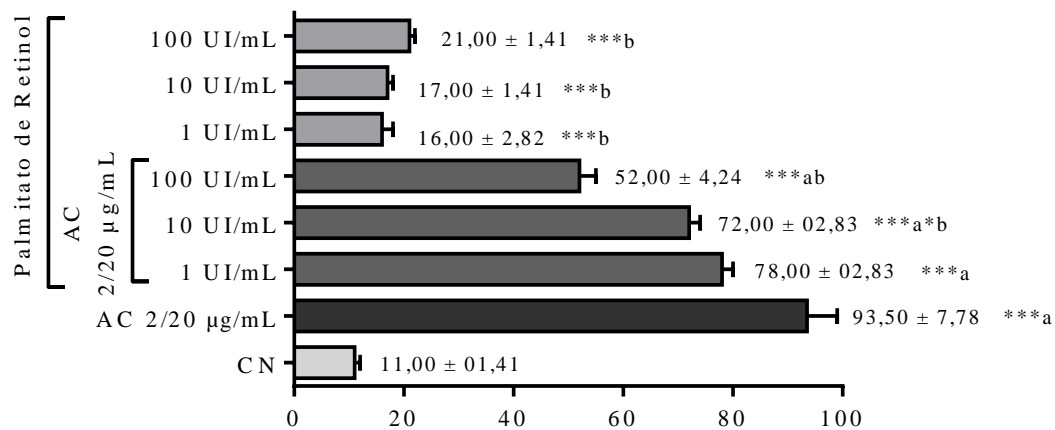
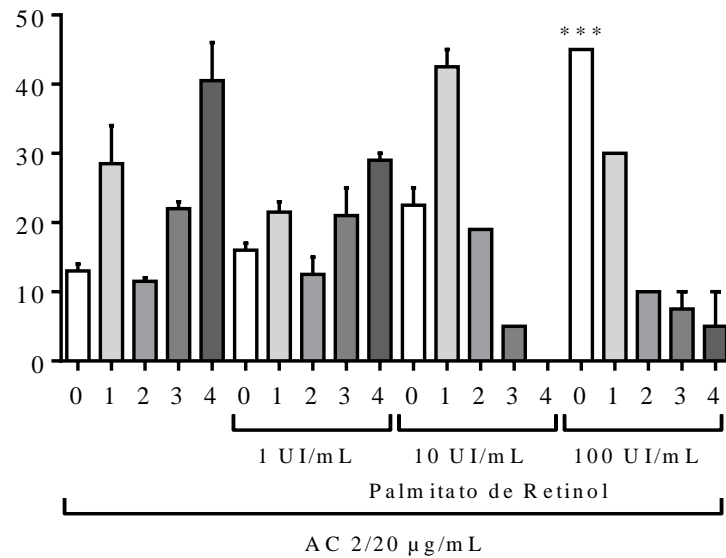


Figura 9. Variação quantitativa dos tipos de danos (0 – 4) para o teste cometa em células de Sarcoma 180 tratadas com o protocolo de associação de doxorrubicina (2 µg/mL) + ciclofosfamida (20 µg/mL) e co-tratadas tratadas com o palmitato de retinol (1, 10 e 100 UI/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valor significativo ($P < 0,001$) quando comparado ao protocolo AC isolado para a classe de dano 0.



4 Conclusão

Os antineoplásicos ciclofosfamida e doxorrubicina induziram danos oxidativos em todas as linhagens testadas de *S. cerevisiae*, proficiente e mutadas em defesas antioxidantes para as enzimas superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial, bem como para a catalase e duplos mutantes. Assim como os resultados mostraram que o tratamento da matriz celular da linhagem Sarcoma 180 com os dois antineoplásicos isolados e o protocolo AC induziu uma série de danos ao DNA, relacionados a diversos mecanismos de ação dos antineoplásicos, especialmente aos indutores do estresse oxidativo, o que diminuiu a viabilidade das células de S-180.

O co-tratamento dos quimioterápicos com o palmitato de retinol modulou os danos oxidativos sobre o DNA nuclear e mitocondrial induzidos pela CPA e DOX em todos os genótipos leveduriformes, comprovando sua ação antioxidante. Na avaliação dos efeitos genotóxicos, através do teste cometa de células neoplásicas, o PR modulou, significativamente, os efeitos oxidativos dos antineoplásicos sobre o material genético das células, conferindo, conseqüentemente, um efeito citoprotetor às mesmas. Essa modulação foi observada pela redução dos valores de índice e frequência de danos, além da diminuição dos tipos de danos de maior intensidade.

Evidenciou-se, que o PR, concomitante ao tratamento quimioterápico com ciclofosfamida, doxorrubicina e o protocolo AC, sem considerar a meia-vida dos antineoplásicos, pode favorecer interferências sobre a apoptose celular, como apontado em modelos de estudos de farmacomonиторamento com células neoplásicas, a exemplo do Sarcoma 180, e em linhagens de *S. cerevisiae*, possivelmente devido a sua ação antioxidante.

Referências

- BAMODU, O. A.; HUANG, W. C.; TZENG, D. T.; WU, A.; WANG, L. S.; YEH, C. T.; CHAO, T. Y. Ovatodiolide sensitizes aggressive breast cancer cells to doxorubicin, eliminates their cancer stem cell-like phenotype, and reduces doxorubicin-associated toxicity. **Cancer Letters**, v. 364, p. 125–134, 2015.
- BASU, A.; BHATTACHARJEE, A.; SAMANTA, A.; BHATTACHARYA, S. Prevention of cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and genotoxicity: Effect of an l-cysteine based oxovanadium (IV) complex on oxidative stress and DNA damage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 747–757, 2015.
- BRESSAN, A. L.; SILVA, R. S.; FONTENELLE, E.; GRIPP, A. C. Imunossupressores na Dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 85, n.1, p. 9-22, 2010.
- 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.
- BOZZETTI, F. Evidence-based nutritional support of the elderly cancer patient. **Nutrition**, v. 31, n. 4, p. 585–586, 2014.
- CAMERON, E.; PAULING, L.; LEIBOVITZ, B. Ascorbic acid and cancer: a review. **Cancer Research**, v. 39, p. 663-669, 1979.
- CHAKRABORTY, P.; SK, U. H.; MURMU, N.; DAS, J. K.; PAL, S.; BHATTACHARYA, S. Modulation of Cyclophosphamide-Induced Cellular Toxicity by Diphenylmethyl Selenocyanate *In Vivo*, an Enzymatic Study. **Journal of Cancer Molecules**, v. 4, n. 6, p. 183-189, 2009.
- 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.
- 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.
- CIRILLO, J. V. Chemoterapeutic treatment of mammary neoplasms in female dogs and cats. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**. v. 26, n 3. p. 325-7, 2008.
- CLARKE, N.; GERMAIN, P.; ALTUCCI, L.; GRONEMEYER, H. Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. **Expert Rev Mol Med**, v. 6, p. 1–23, 2004.
- COLDITZ, G. A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W.C. Diet and lung cancer. A review of the epidemiologic evidence in humans. **Archives of Internal Medicine**. v. 147, n. 1, p. 157–160, 1987.

- CONKLIN, K. A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**, v.3, n. 4, p.294-300, 2004.
- DAI, R. Y.; ZHAO, X. F.; LI, J. J.; CHEN, S. K.; ZHANG, C. Y.; DUAN, C. Y.; LIU, Y. P.; FENG, C. H.; XIA, X. M.; LI, H.; WANG, H. Y. Implication of transcriptional repression in compound C-induced apoptosis in cancer cells. **Cell Death & Disease**, v.4, n.10, p. 9-15, 2013.
- DE LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. São Paulo: USP, 2008. 181 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. São Paulo, 2008.
- DHESI, S.; CHU, M. P.; BLEVINS, G.; PATERSON, I.; LARRATT, L.; OUDIT, G. Y.; KIM, D. H. Cyclophosphamide-Induced Cardiomyopathy: A Case Report, Review, and Recommendations for Management. **Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports**, v. 1, p. 1–7, 2013.
- DRAGNEV, K. H.; PETTY, W. J.; DMITROVSKY, E. Retinoid targets in cancer therapy and chemoprevention. **Cancer Biol Ther**, v. 2, p. S150–156, 2003.
- FARRUGIA, G.; BALZAN, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. **Frontiers in Oncology**, v. 2, n. 64, p. 1-21, 2012.
- FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; VIANA, M. P.; SOUZA, T. M.; VASCONCELOS, I. M., SOARES, B. M. et al. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1045–1058, 2011.
- FREEMAN, L. R.; KELLER, J. N. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood–brain-barrier and antioxidant based interventions. **Biochim Biophys Act.**, v. 1822, n. 5, p. 822-829, 2012.
- 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.
- FRITZ, H.; KENNEDY, D.; FERGUSSON, D.; FERNANDES, R.; DOUCETTE, S.; COOLEY, K. et al. Vitamin A and Retinoid Derivatives for Lung Cancer: A Systematic Review and Meta Analysis. **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-11, 2011.
- FUH, K. C.; SECORDB, A. A.; BEVISC, K. S.; HUHC, W.; ELNAGGARD, A.; BLANSITA, K. et al. Comparison of Bevacizumab Alone or with Chemotherapy in Recurrent Ovarian Cancer Patients. **Gynecologic Oncology**, 2015.
- GHAZARYAN, N. A.; GHULIKYAN, L. A.; KISHMIRYAN, A. V.; KIRAKOSYAN, G. R.; NAZARYAN, O. H.; GHEVONDYAN, T. H. et al. Anti-tumor effect investigation of obtustatin and crude *Macrovipera lebetina obtusa* venom in S-180 sarcoma bearing mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 764, p. 340-345, 2015.

- GLORIEUX, C.; DEJEANS, N.; SID, B.; BECK, R.; CALDERON, P. B.; VERRAX, J. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 10, p. 1384-1390, 2011.
- GOMES JÚNIOR, A. L.; PAZ, M. F. C. J.; DA SILVA, L. M. S.; CARVALHO, S. C. C.; SOBRAL, A. L. P.; MACHADO, K. C. et al. Serum Oxidative Stress Markers and Genotoxic Profile Induced by Chemotherapy in Patients with Breast Cancer: A Pilot Study. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-11, 2015.
- GONZÁLEZ-ACEVEDO, A.; GARCÍA-SALAS, J. A.; GOSÁLVEZ, J.; FERNÁNDEZ, J. L.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M. I.; CERDA-FLORES, R. I. et al. Evaluation of environmental genotoxicity by comet assay in *Columba lívia*. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 26, p. 61-66, 2016.
- GONZALEZ-PEREZ, D.; GARCIA-RUIZ, E.; ALCALDE, M. *Saccharomyces cerevisiae* in directed evolution: An efficient tool to improve enzymes. **Bioengineered Bugs**, v. 3, n. 3, 172–177, 2012.
- HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2003.
- 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.
- HOFMAN, J.; SKARKA, A.; HAVRANKOVA, J.; WSOL, V. Pharmacokinetic interactions of breast cancer chemotherapeutics with human doxorubicin reductases. **Biochemical Pharmacology**, v. 96, n. 3, p. 168–1781, 2015.
- 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.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2016**. Rio de Janeiro: INCA, 2015.
- KASAPOVIĆ, J.; PEJIĆ, S.; STOJILJKOVIĆ, V.; TODOROVIĆ, A.; RADOSEVIĆ-JELIĆ, L.; SAICIĆ, Z. S.; PAJOVIĆ, 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.
- LEE, C. RAFFAGHELLO, L.; LONGO, V. D. Starvation, detoxification, and multidrug resistance in cancer therapy. **Drug Resistance Updates**, 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. **The Lancet**, v. 359, n. 9301, p. 172, 2002.

LO-COCO, F.; AVVISATI, G.; VIGNETTI, M.; THIEDE, C.; ORLANDO, S. M.; IACOBELLI, S.; FERRARA, F.; FAZI, P.; CICCIONI, L.; DI BONA, E.; SPECCHIA, G.; SICA, S.; DIVONA, M.; LEVIS, A.; FIEDLER, W.; CERQUI, E.; BRECCIA, M.; FIORITONI, G.; SALIH, H. R.; CAZZOLA, M.; MELILLO, L.; CARELLA, A. M.; BRANDTS, C. H.; MORRA, E.; VON LILIENFELD-TOAL, M.; HERTENSTEIN, B.; WATTAD, M.; LÜBBERT, M.; HÄNEL, M.; SCHMITZ, N.; LINK, H.; KROPP, M. G.; RAMBALDI, A.; LA NASA, G.; LUPPI, M.; CICERI, F.; FINIZIO, O.; VENDITTI, A.; FABBIANO, F.; DÖHNER, K.; SAUER, M.; GANSER, A.; AMADORI, S.; MANDELLI, F.; DÖHNER, H.; EHNINGER, G.; SCHLENK, R. F.; PLATZBECKER, U. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 369, p.111–121, 2013.

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

MARSH, S.; LIU, G. Pharmacokinetics and pharmacogenomics in breast cancer chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 381-387, 2009.

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

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

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

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

OLIVEIRA, M. R. Vitamin A and Retinoids as Mitochondrial Toxicants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-13, 2015.

PETRIE, K.; ZELEN, A.; WAXMAN, S. Differentiation therapy of acute myeloid leukemia: past, present and future. **Current Opinion in Hematology**, v. 16, p. 84–91, 2009.

PIRAZZI, C.; VALENTI, L.; MOTTA, B. M.; PINGITORE, P.; HEDFALK, K.; MANCINA, R. M. et al. PNPLA3 has retinyl-palmitate lipase activity in human hepatic stellate cells. **Human Molecular Genetics**, v. 23, p. 4077-4085, 2014.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

PU, X.; WANG, Z.; KLAUNIG, J. E. Alkaline Comet Assay for Assessing DNA Damage in Individual Cells. **Current Protocols in Toxicology**, v. 63, n. 3, p. 1-3, 2015.

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

SÁNCHEZ-SUÁREZ, P.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; GALLEGOS-HERNÁNDEZ, F.; PEÑARROJA-FLORES, R.; TOLEDO-GARCÍA, J.; BRAVO, J. L.; DEL CASTILLO, E. R.; BENÍTEZ-BRIBIESCA, L. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. **Mutation Research**, v. 640, p. 8 – 15, 2008.

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 and Medicine**, v. 48, n. 4, p. 506–512, 2010.

SELVAKUMAR, E.; PRAHALATHAN, C.; VARALAKSHMI, P.; KUMARASAMY, P.; SARAVANAN, R. Modification of cyclophosphamide-induced clastogenesis and apoptosis in rats by alpha-lipoic acid. **Mutation Research**, vol. 606, p. 85–91, 2006.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, N. P.; The comet assay: Reflections on its development, evolution and applications. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 767, p. 23-30, 2016.

SOUGANIDIS, E.; LAILLOU, A.; LEYVRAZ, M.; MOENCH-PFANNER, R. A. Comparison of Retinyl Palmitate and Red Palm Oil β -Carotene as Strategies to Address Vitamin A Deficiency. **Nutrients**, v. 5, p. 3257-3271, 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.

TICE, R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HART-MANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

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

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. WHO, 2016. Disponível <<http://www.who.int/cancer/en/>>

YU, H. S.; XUE, H. W.; GUO, C. B.; SONG, A. Q.; SHEN, F. Z.; LIANG, J. et al. Low dose radiation increased the therapeutic efficacy of cyclophosphamide on S(180) sarcoma bearing mice. **Journal of Radiation Research**, v. 48, p. 281-288, 2007.

ZNAOR, A.; HURK, C. V. D.; PRIMIC-ZAKELJC, M.; AGIUS, D.; COZA, D., DEMETRIOU, A. et al. Reprintof: Cancer incidence and mortality patterns in South Eastern Europe in the last decade: Gaps persist compared with therest of Europe. **European Journal of Cancer**, v. 51, p. 1199–1200, 2015.



Capítulo III

O PALMITATO DE RETINOL FRENTE AOS DANOS TOXICOGENÉTICOS DE ANTINEOPLÁSICOS EM CÉLULAS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS

Artigo submetido à Revista Experimental and Toxicologic Pathology

Fator de Impacto 1.716 – Qualis B2 para Farmácia

**O PALMITATO DE RETINOL FRENTE AOS DANOS
TOXICOGENÉTICOS DE ANTINEOPLÁSICOS EM CÉLULAS
TUMORAIS E NÃO TUMORAIS**

Ricardo Melo de Carvalho¹; Marcus Vinicius Oliveira Barros de Alencar¹; Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata¹; Rosália Maria Tôrres de Lima¹; Rai Pablo Sousa de Aguiar²; Jadson Texeira e Silva²; MD. Torequl Islam¹; Soane Kaline Morais Chaves¹; Márcia Fernanda Correia Jardim Paz¹; João Marcelo de Castro e Sousa¹; Paulo Michel Pinheiro Ferreira¹; Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante¹

¹ Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica, LAPGENIC - Universidade Federal do Piauí, UFPI, Ininga, CEP: 64.049-550, Teresina/PI – Brasil. E-mail: ricardo_carvalho50@hotmail.com

² Clínica Integrada de Saúde - Centro Universitário de Saúde, Ciências Humanas e Tecnológicas do Piauí, UNINOVAFAPI, Rua Vitorino Orthigues Fernandes, 6123 – Uruguai, CEP: 64073-505, Teresina/Piauí – Brasil.

RESUMO

O câncer é um problema mundial de saúde pública, no qual a recomendação de antineoplásicos representa uma das principais alternativas terapêuticas. Entretanto, a falta de seletividade tecidual destes fármacos gera intensos efeitos colaterais e adversos aos pacientes oncológicos, tornando a incorporação de micronutrientes vitamínicos na dieta de indivíduos sob uso de antineoplásicos, uma recomendação clínica-nutricional. Assim, o objetivo da pesquisa foi realizar uma bioprospecção dos efeitos antigenotóxicos/antimutagênicos do palmitato de retinol (PR) sobre os danos toxicogenéticos induzidos pela ciclofosfamida, doxorrubicina e suas associações no protocolo AC, em linhagens de células tumorais de Sarcoma 180, por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese; e em células não tumorais de camundongos *Mus musculus*, por meio do teste cometa. Os antineoplásicos e o protocolo AC induziram significativos danos toxicogenéticos ($P < 0,05$) sobre as linhagens de S-180, pela indução de micronúcleos, pontes citoplasmáticas, brotos nucleares, apoptose e necrose celular, comprovando seus efeitos antitumorais; e significativos danos ($P < 0,001$) ao material genético de células de sangue periférico de *Mus musculus* sadios, comprovando o potencial genotóxico destes fármacos. Entretanto, o PR modulou os efeitos toxicogenéticos dos antineoplásicos testados tanto no teste de micronúcleos ($P < 0,05$), nas concentrações de 1, 10 e 100 UI/mL; quanto no teste cometa ($P < 0,001$), na concentração de 100 UI/kg, para índice e frequência de danos genotóxicos. Os resultados apresentados em testes não-clínicos comprovaram que os efeitos antioxidantes do palmitato de retinol reduziram não somente a ação lesiva dos antineoplásicos ao DNA de células não tumorais, quanto a ação citotóxica, mutagênica e indutora de morte celular em células neoplásicas. Portanto, a incorporação do palmitato de retinol, como vitamina antioxidante, na terapêutica oncológica pode exercer influência sobre os mecanismos oxidativos terapêuticos dos antineoplásicos em estudo.

Palavras-chave: Câncer; Antineoplásicos; Danos toxicogenéticos; Palmitato de retinol.

ABSTRACT

Cancer is a global public health problem, in which the recommendation of antineoplastic represents a major therapeutic alternatives. However, the lack of tissue selectivity of these drugs generates intense side effects and adverse to cancer patients, making the addition of micronutrients and vitamin in the diet of individuals under use of antineoplastic agents, a nutritional clinic recommendation. Thus, the objective of the research was to perform a bioprospecting of the effects of retinol palmitate about the toxicogenéticos damage induced by cyclophosphamide, doxorubicin and their associations in BC, in tumor cells lineages of Sarcoma 180, through the micronucleus test with cytokinesis; and in tumor cells of mice *Mus musculus*, by means of the comet assay. The CPA, the DOX and the AC induced significant damage toxicogenéticos ($P < 0.05$) on the lines of S-180, the induction of micronuclei, cytoplasmic bridges, nuclear sprouts, apoptosis and cellular necrosis, proving its anti-tumour effects; and significant damage ($P < 0.001$) the genetic material of cells from peripheral blood of *Mus musculus*, proving the genotoxic potential sound of these drugs. However, the PR radioed the toxic effects and genetic of antineoplastic tested just as much the *micronucleis* ($P < 0.05$), at concentrations of 1, 10 and 100 IU/mL; as the Comet assay ($P < 0.001$), at a concentration of 100 IU/kg, for content and frequency of genotoxic damage. The results presented in non-clinical tests have shown that the antioxidant effects of retinol palmitate reduced not only the action affecting the antineoplastic agents to tumor cells DNA, as mutagenic and cytotoxic action, cell death-inducing in neoplastic cells. Therefore, the incorporation of retinol palmitate, as vitamin antioxidant, in cancer therapy can influence the oxidative therapeutic mechanisms of antineoplastic agents in study.

Keywords: Cancer; Antineoplastics; Damage toxicogenetics; Retynil palmitate.

1 Introdução

O câncer é uma desordem multifatorial, resultante da combinação de condições genéticas, sócio-ambientais, estilo de vida e mecanismos epigenéticos, estrapalando a homeostase corporal, a partir da multiplicação descontrolada de qualquer tipo de célula (MELONI, 2014; AUDERGON et al., 2015). É considerado como um problema de saúde pública em todo o mundo e sua terapêutica oncológica com antineoplásicos garante um melhor prognóstico ao paciente, mas ainda causa efeitos comprometedores em sistemas essenciais em razão da falta de seletividade tecidual (ARAN et al., 2016; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016).

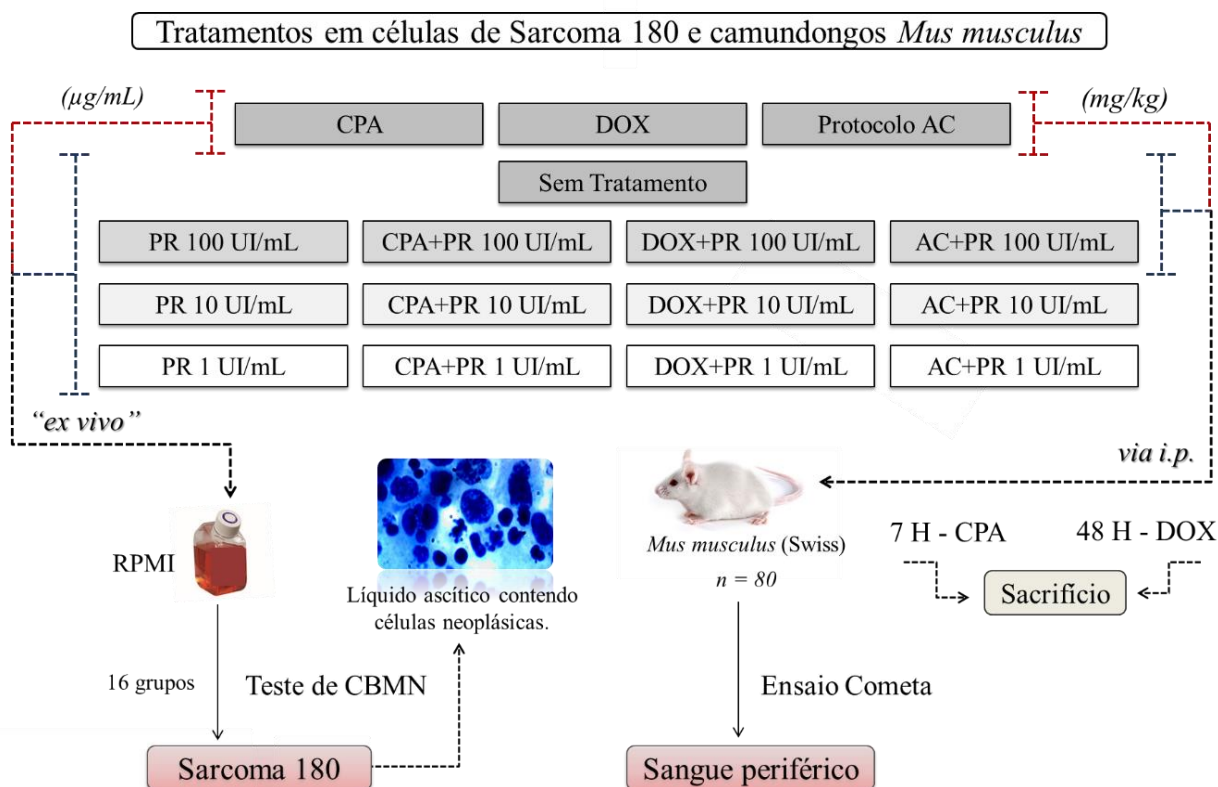
Os antineoplásicos apresentam potencial toxicogenético às células cancerosas e não cancerosas, a exemplo da ciclofosfamida (CPA) que por ativação enzimática, incorpora grupos alquil, sítios pirimídicos e purínicos sobre as moléculas de DNA e RNA, e adiciona ligações covalentes a dupla fita do material genético, o que acarreta em mutações gênicas e alterações cromossômicas (BASU et al., 2015; ZHU et al., 2015). A doxorubicina (DOX), antineoplásico usado em associação com a CPA, pode gerar radicais livres e inibir a topoisomerase II, enzima ativada durante a replicação do material genético (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012; BAMODU et al., 2015).

Devido a ação tóxica dos antineoplásicos a inúmeros sistemas biológicos, variações dietéticas são recomendadas a pacientes oncológicos a fim de contribuir com os efeitos terapêuticos e reduzir os efeitos colaterais e adversos oriundos do tratamento quimioterápico (VRIENS et al., 2013; MADEDDU et al., 2016). Assim, a incorporação de micronutrientes vitamínicos com propriedades antioxidantes, como o palmitato de retinol, na dieta de indivíduos sob uso de antineoplásicos, apresenta-se como uma recomendação clínica-nutricional. Muito embora o uso de vitaminas antioxidantes (especialmente A, C e E) concomitante a fármacos oxidantes ainda cause controvérsias quanto a eficácia na quimioterapia por suas capacidades de redução de citotoxicidade (CLARKE et al., 2004; FRITZ et al., 2011; PISOSCHI; POP, 2015).

A administração de palmitato de retinol (vitamina A) pode influenciar na diferenciação, proliferação e apoptose celular, estimula o sistema imune e a tolerância a quimioterapia. O palmitato de retinol (PR) participa em diversos processos biológicos, como na manutenção da homeostase corporal, prevenção e tratamento de várias doenças, incluindo as doenças dermatológicas e o câncer (SOUGANIDIS et al., 2013). Porém os possíveis efeitos deletérios do PR em diferentes doses ainda não estão bem evidenciados (OLIVEIRA, 2015).

Assim, o biomonitoramento, por meio de testes toxicogênicos, que avaliam a ocorrência de danos e anormalidades nucleares, a exemplo do teste cometa e do teste de micronúcleos possibilita o acompanhamento dos efeitos de agentes estressores ao material genético em inúmeros tipos de sistemas biológicos (BONASSI, et al., 2011; EL-ZEIN et al., 2014). Em culturas de células, o uso de linhagens de células tumorais, como as de Sarcoma 180 funciona como um controle da eficácia de terapias em saúde, por exemplo, na incorporação de substâncias em protocolos quimioterápicos (GHAZARYAN et al., 2015; PATRA et al., 2016). Entretanto, a escassez de publicações científicas sobre o uso de antioxidantes durante a meia vida de ação dos antineoplásicos ainda suscita novas pesquisas (DRAGNEV; PETTY; DMITROVSKY, 2003; CONKLIN, 2004; CHAMBIAL et al., 2013). O objetivo da pesquisa foi a bioprospecção dos efeitos modulatórios do PR sobre os danos toxicogênicos induzidos pela CPA e DOX e suas associações no protocolo AC (CPA e DOX), em linhagens de células tumorais de Sarcoma 180, e em células não tumorais de camundongos *Mus musculus* em tratamento com os antineoplásicos (**Figura 1**).

Figura 1. Esquema dos grupos de tratamento em células de *S-180* e camundongos *Mus musculus* tratados com os antineoplásicos e PR.



2 Materiais e Métodos

2.1 Químicos

Os químicos foram obtidos em uma farmácia de manipulação em Teresina, PI. As diluições da ciclofosfamida, doxorubicina e protocolo de associação AC foram preparadas em solução fisiológica 0,9% (estéril) até a concentração final de 20 µg/mL, 2 µg/mL e 20/2 µg/mL respectivamente, escolhidas conforme Freedman e Partridge (2011). A solubilização do palmitato de retinol nas concentrações de 1, 10 e 100 UI/mL, foi obtida em solução fisiológica 0,9% acrescida de DMSO à 10% para o teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese - CBMN. As diluições direcionadas para os testes *in vivo* seguiram as mesmas proporções, mas as doses, em unidades, dos antineoplásicos foi de mg/kg e do palmitato foi de 100 UI/kg.

2.2 Aspectos legais e éticos

Os testes pré-clínicos foram anteriormente autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí - UFPI, e iniciados com a liberação dos animais pelo Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da UFPI, sob documento de aprovação com o número 081/2014.

2.3 Preparo das linhagens tumorais de Sarcoma 180

As linhagens de células tumorais de *S-180* foram mantidas em camundongos *Mus musculus* através de passagens intraperitoneais semanais. O líquido ascítico, com células de *S-180* germinadas por 7 a 9 dias, foi aspirado da cavidade intraperitoneal em condições assépticas e centrifugado (500 RPM, 5 min, 4° C) para obtenção do *pellet* celular. A concentração celular para a cultura em RPMI foi ajustada a $0,5 \times 10^6$ células/mL (FERREIRA et al., 2011). Em frascos de cultura contendo 1 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 ($0,5 \times 10^6$ /mL).

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

A viabilidade celular foi analisada com a aplicação do teste de exclusão celular por meio da coloração com azul de Tripán. Após 72 h de exposição, tanto as células sem tratamento quanto aquelas sob tratamento com os antineoplásicos e co-tratamento com o palmitato de retinol foram direcionadas para a aplicação da técnica. Foram retirados das culturas 90 μ L da suspensão de células e acrescidos de 10 μ L do azul de Tripán aos diferentes grupos de tratamento. A análise microscópica sob o aumento de 40X, com o auxílio de câmara de Neubauer, permitiu a contagem e diferenciação das linhagens. De forma contrária às células não viáveis, as células viáveis não apresentaram uma coloração azulada devido às suas capacidades de expulsarem o azul de Tripán.

2.5 Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese (CBMN) em linhagens de S-180

Após a realização das culturas, os frascos contendo as células de S-180 em meio RPMI foram organizados em 16 grupos, 4 controles e 12 testes, tratados e co-tratados com os antineoplásicos DOX e CPA; e uma variação de 3 concentrações do PR (**Figura 1**), onde em cada frasco de cultura foram adicionados 10 μ L das soluções e levadas para a estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Decorridas 44 h de incubação foram adicionados às culturas 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Citocalasina B (Sigma, St. Louis, MO), retornando os frascos à incubação por mais 28h, afim de que o processo de divisão citoplasmática fosse interrompido. Ao final de 72 h, as culturas foram transferidas para tubos criogênicos 12 x 45mm graduados (2,0 mL) com rosca externa 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 1 mL de fixador (metanol: ácido acético | 5:1) gelado e 3 gotas de formaldeído aos tubos. O procedimento foi repetido por 2 vezes utilizando fixador 3:1 também gelado e sem o formaldeído. O sobrenadante foi desprezado, para o gotejamento da suspensão celular sobre lâminas de vidro, posteriormente coradas com Giemsa 5%. A análise microscópica sob o aumento de 1000X considerou os danos citogenéticos presentes em 1000 células/lâmina. Teste realizado em duplicata.

2.6 IDNC dos grupos testados no teste de CBMN

O índice de divisão nuclear considerando a citotoxicidade (IDNC) auxilia a compreensão da interferência dos tratamentos à mitose celular de Sarcoma 180. O seu cálculo foi realizado por meio da fórmula:

$$\text{IDNC} = \frac{(\text{Apoptose} + \text{Necrose} + \text{M1} + 2\text{x}(\text{M2}) + 3\text{x}(\text{M3}) + 4\text{x}(\text{M4}))}{\text{Número total de células}}$$

Nota: “**Apoptose**” representa o número de células apoptóticas, “**Necrose**” o número de células necróticas, “**M1**” o número de células viáveis com 1 núcleo, “**M2**” o número de células viáveis com 2 núcleos, “**M3**” o número de células viáveis com 3 núcleos, “**M4**” o número de células viáveis com 4 núcleos, e “**Número total de células**” representa o número total de células analisadas, 1.000 por lâmina.

2.7 Teste cometa em sangue periférico de camundongos *Mus musculus*

Camundongos *Mus musculus* foram usados nos experimentos, sendo 40 machos e 40 fêmeas, com cerca de 60 dias, todos da linhagem Swiss, albinos, com peso entre 25 a 30 g. Para os experimentos os animais foram divididos em 8 tipos de tratamento (n=10/grupo, com igual proporção de gêneros) (**Figura 1**). Os antineoplásicos e o PR foram administradas por via intraperitoneal após o período de meia-vida dos antineoplásicos, sendo de 7 horas para CPA e 48 horas para DOX. Os animais foram eutanasiados com pentobarbital sódico (150 mg/kg). O teste cometa foi realizado segundo Singh et al (1988), com adaptações de Tice et al (2000) e de Hartmann et al (2003), para avaliação de danos genotóxicos em sangue periférico obtido por meio de punção caudal. Agarose *low melting* (com baixo ponto de fusão) e sangue (10:1) foram homogeneizados e dispersados sobre lâminas de pré-cobertura com agarose sob ponto de fusão normal a 0,75%. Após a ruptura dos envoltórios celulares em solução de lise, corrida de eletroforese em pH > 13, neutralização em tampão Tris, fixação e coloração das lâminas com nitrato de prata (0,02%), a análise microscópica sob o aumento de 400X considerou os danos genotóxicos, por classe (0, 1, 2, 3 e 4) presentes em 100 células. Esta avaliação gerou a mensuração do índice de danos (ID), que varia de 0 a 400, e da frequência de danos (FD), que varia de 0 a 100, em porcentagem. O teste foi realizado em duplicata.

2.8 Modulação do PR frente a ação dos antineoplásicos

Os valores do percentual de modulação do PR sobre os danos toxicogénicos induzidos pelos antineoplásicos ciclofosfamida e doxorrubicina, bem como associados no protocolo AC foram calculados, em porcentagem, de acordo com a fórmula:

$$M (\%) = (A - (B + PR)) / A \times 100$$

Nota: “A” representa os valores para cada tipo de dano toxicogénico induzido pelos antineoplásicos, e “B + PR” representa os valores dos danos toxicogénicos induzidos pelos antineoplásicos quando associados ao palmitato de retinol.

2.9 Análise estatística

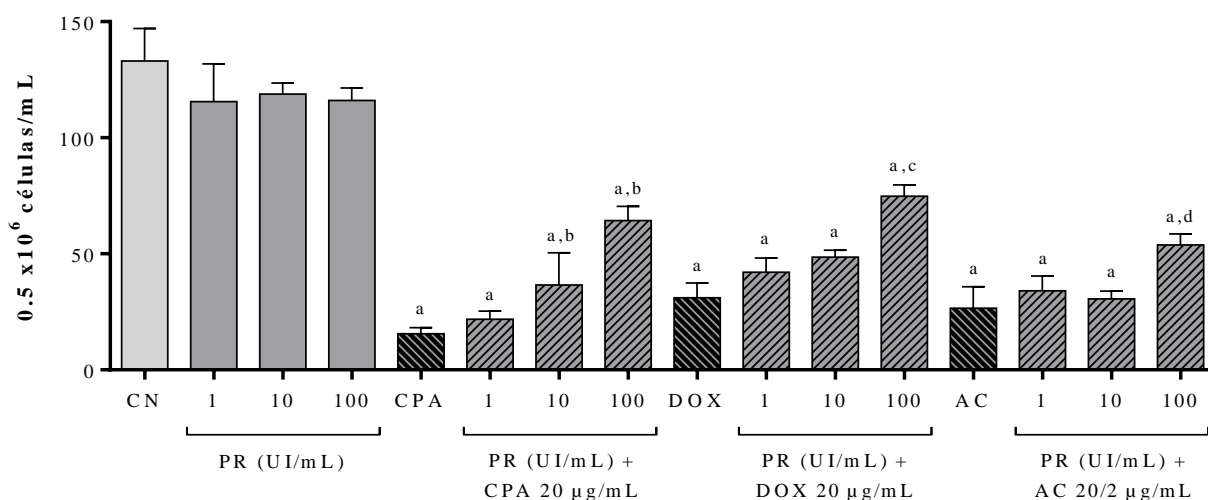
Os resultados foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) com aplicação do teste de Bonferroni como *post hoc* teste por meio do programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego California USA). Significância na correlação estatística para 95%.

3 Resultados e Discussão

3.1 Viabilidade em azul de tripan das células tumorais de S-180

Todos os grupos testados contendo os antineoplásicos (com ou sem associação) promoveram significantes decréscimos ($P < 0,05$) sobre a viabilidade celular em comparação ao grupo sem tratamento. Esses dados corroboram com o fundamento para o uso terapêutico de antitumorais alquilantes ao DNA e inibidores da topoisomerase II, como a CPA e DOX, respectivamente (HOFMAN et al., 2015; NAITO et al., 2015). Entretanto, o estudo revelou que o palmitato de retinol, na maior concentração, quando associado aos antineoplásicos, reduz significativamente ($P < 0,05$) o decréscimo da viabilidade das células tumorais em comparação aos grupos expostos somente aos fármacos (**Figura 2**).

Figura 2. Viabilidade das células de Sarcoma 180 expostas ao palmitato de retinol (PR: 1, 10 e 100 UI/mL), ciclofosfamida (CPA: 20 $\mu\text{g/mL}$), doxorrubicina (DOX: 2 $\mu\text{g/mL}$), e ao Protocolo AC (CPA e DOX: 20/2 $\mu\text{g/mL}$). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância de $P < 0,05$ para ^a comparado ao controle negativo (CN), ^b comparado CPA, ^c comparado à DOX e ^d comparado ao protocolo AC.



O papel citoprotetor dos antioxidantes é comumente observado em estudos *in vitro* e *in vivo*, a exemplo em ratos Wistar (PANCHUK et al., 2014). Estudos apontam que compostos antioxidantes inibem a ação citotóxica da DOX entre 10 a 30%, devido a inibição do radical superóxido produzido pelo antineoplásico. Os antioxidantes, a exemplo das vitaminas, podem prevenir a formação ou capturar radicais livres pela ação da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase evitando reações oxidativas, e ainda podem agir sobre

proteínas envolvidas no reparo de DNA ou que medeiam a ativação de vias apoptóticas (SINDHI et al., 2013; TREMANTE et al., 2015).

3.2 Danos toxicogénicos da CPA, DOX e protocolo AC em linhagens de células tumorais de S-180 e os efeitos do PR

O teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese, CBMN, é um biomarcador clássico para testes de suscetibilidade genética, sendo amplamente utilizado para mensurar danos, de variadas classes, ao DNA (EL-ZEIN et al., 2014). Os antineoplásicos CPA e DOX e a associação no protocolo AC induziram significantes danos citogénicos ($P < 0,05$) em células tumorais de S-180, por meio da técnica de CBMN, para todos os biomarcadores de mutagenicidade: micronúcleos, pontes e brotos quando em comparação ao grupo não tratado com os antineoplásicos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Avaliação da mutagenicidade sobre células de S-180 induzida por ciclofosfamida (CPA), doxorrubicina (DOX) e protocolo AC (CPA + DOX), e os efeitos do palmitato de retinol (PR) avaliados por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.

<i>Danos Mutagénicos & Alterações Citogénicas #</i>			
<i>Tratamentos</i>	<i>Micronúcleos</i>	<i>Pontes Nucleoplásmicas</i>	<i>Brotos nucleares</i>
Sem tratamento	6,00 ± 1,41	4,00 ± 1,41	5,50 ± 0,71
PR 1 UI/mL	6,50 ± 0,70	5,00 ± 1,41	6,00 ± 1,41
PR 10 UI/mL	7,00 ± 2,82	4,50 ± 0,70	6,50 ± 0,70
PR 100 UI/mL	7,50 ± 2,12	4,50 ± 0,70	7,50 ± 0,71
CPA 20 µg/mL ^b	27,00 ± 4,24 ^a	39,00 ± 1,41 ^a	26,00 ± 1,41 ^a
CPA + PR 1 UI/mL	21,00 ± 2,82 ^a	18,50 ± 4,95 ^{a,b}	20,00 ± 1,41 ^{a,b}
CPA + PR 10 UI/mL	18,50 ± 0,70 ^a	16,50 ± 0,70 ^{a,b}	13,50 ± 0,70 ^{a,b}
CPA + PR 100 UI/mL	18,00 ± 0,00 ^a	15,50 ± 0,70 ^{a,b}	12,50 ± 0,71 ^{a,b}
DOX 2 µg/mL ^c	32,00 ± 4,24 ^a	37,50 ± 2,12 ^a	25,00 ± 1,42 ^a
DOX + PR 1 UI/mL	23,00 ± 1,41 ^a	25,00 ± 2,82 ^{a,c}	19,50 ± 0,70 ^a
DOX + PR 10 UI/mL	20,00 ± 1,41 ^{a,c}	21,50 ± 0,70 ^{a,c}	12,50 ± 0,71 ^{a,c}
DOX + PR 100 UI/mL	19,00 ± 1,42 ^{a,c}	16,00 ± 1,41 ^{a,c}	11,50 ± 0,70 ^{a,c}
AC 20/2 µg/mL ^d	31,00 ± 7,07 ^a	39,00 ± 2,82 ^a	28,50 ± 2,12 ^a
AC + PR 1 UI/mL	29,50 ± 0,71 ^a	23,50 ± 2,12 ^{a,d}	13,00 ± 2,83 ^{a,d}
AC + PR 10 UI/mL	24,50 ± 0,70 ^a	17,00 ± 2,82 ^{a,d}	12,50 ± 0,71 ^{a,d}
AC + PR 100 UI/mL	20,50 ± 0,71 ^a	16,00 ± 1,41 ^{a,d}	13,00 ± 1,41 ^{a,d}

#PR (1, 10 e 100 UI/mL). CPA (20 µg/mL). DOX (2 µg/mL). Protocolo AC (CPA e DOX: 20/2 µg/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores significantes (MD±DP) de $P < 0,05$ para ^a comparado ao grupo sem tratamento (dano basal), ^b à CPA, ^c à DOX e ^d ao protocolo AC.

Os biomarcadores citogenéticos são parâmetros biológicos utilizados como objeto de estudo para avaliação de processos fisiológicos normais ou patológicos, dietas alimentares, estilo de vida, respostas farmacológicas e intervenções terapêuticas em saúde. Estes indicadores além de permitir a mensuração de riscos ambientais e ocupacionais, contribuem com os avanços em terapias clínicas por meio da detecção e quantificação de alterações citológicas, genéticas e moleculares em células ou organismos expostos a inúmeros tipos de agentes (TORRES-BUGARÍN et al., 2014; BOLOGNESI et al., 2015).

Os tratamentos que associaram antineoplásicos com o PR continuaram a induzir de forma significativa ($P < 0,05$) danos citogenéticos em relação ao dano basal. As variações de média \pm desvio padrão oscilaram de $11,50 \pm 0,70$ na associação do PR 100 UI/mL com a doxorrubicina, diminuindo significativamente ($P < 0,05$) a indução de brotos nucleares; a $340,00 \pm 9,89$ no tratamento do PR 1 UI/mL com a doxorrubicina, não interferindo de forma significativa sobre o número de apoptoses induzidas por este antineoplásico quando isolado. Entretanto, o palmitato de retinol, em todas as concentrações testadas, interferiu sobre os mecanismos terapêuticos dos antineoplásicos testados pela atenuação significativa ($P < 0,05$) da indução de danos toxicogénicos sobre células tumorais de Sarcoma 180 para todas as alterações nucleares, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares; assim como para a indução de morte celular por apoptose e necrose, exceto sobre a ocorrência de micronúcleos (**Tabelas 1 e 2**).

Os micronúcleos são fragmentos ou cromossomos acêntricos derivados de erros na anáfase da divisão nuclear, não sendo destinados para uma nova célula (BOLOGNESI; FENECH, 2012). Já as falhas em rearranjos cromossômicos ou a fusão de extremidades cromossomais, telômeros, permitem a formação de filamentos de cromatina que ligam dois núcleos distintos chamados de pontes nucleoplasmáticas (FENECH et al., 2011) e os brotos nucleares estão associados à amplificação do DNA, e a não segregação do núcleo, apresentando-se como prolongamentos do próprio espaço nuclear (BITGEN et al., 2016). Os danos citogenéticos estão ligados ao mecanismo de ação antitumoral dos próprios aneoplásicos, incluindo especialmente a indução de morte celular (ZAVALA-AGUIRRE et al., 2010; KEY et al., 2015).

A doxorrubicina induz danos celulares em larga escala, e de forma crítica sobre o material genético, induzindo as células a entrarem em apoptose (MANTAWY et al., 2014). A ciclofosfamida por ser um composto lesivo ao material genético gera de forma intensa a

formação de micronúcleos e outras anormalidades nucleares (ZAVALA-AGUIRRE et al., 2010). As anormalidades nucleares e os eventos celulares característicos de morte celular, detectados pelo teste citogenético de CBMN são indicativos de falhas no processo de divisão celular, mutagenicidade, citotoxicidade e genotoxicidade, efeitos diretamente ligados ao desencadeamento e prognóstico do câncer (LUE et al., 2015).

O IDNC indicou a acentuada citotoxicidade ($P < 0,05$) dos antineoplásicos, isolados ou em associação, sobre as células de Sarcoma 180 tratadas em relação ao dano basal. Os efeitos toxicogénicos destes antineoplásicos também foram evidenciados no presente estudo pelas significantes ($P < 0,05$) induções de anormalidades nucleares e eventos indicativos de morte celular, em linhagens de células neoplásicas de *S-180*, tendo em vista a necessidade da interferência sobre a estrutura e a funcionalidade das células neoplásicas (**Tabela 2**).

Tabela 2. IDNC (índice de danos nucleares indicativos de citotoxicidade), frequência de apoptose e necrose celular em células de S-180 induzidos por ciclofosfamida (CPA), doxorubicina (DOX) e protocolo AC (CPA + DOX), e os efeitos do palmitato de retinol (PR) avaliados por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.

<i>Danos Toxicogénicos #</i>			
<i>Tratamentos</i>	<i>IDNC</i>	<i>Apoptose</i>	<i>Necrose</i>
Sem tratamento ^a	0,98 ± 0,01	29,50 ± 3,53	16,00 ± 2,82
PR 1 UI/mL	0,97 ± 0,01	31,50 ± 2,12	16,50 ± 4,95
PR 10 UI/mL	0,98 ± 0,01	32,00 ± 4,24	15,50 ± 0,70
PR 100 UI/mL	0,95 ± 0,01	36,00 ± 5,65	15,50 ± 2,12
CPA 20 mg/mL ^b	0,47 ± 0,03 ^a	302,00 ± 4,24 ^a	109,00 ± 11,31 ^a
CPA + PR 1 UI/mL	0,64 ± 0,03 ^{a,b}	294,00 ± 5,65 ^a	91,50 ± 4,95 ^a
CPA + PR 10 UI/mL	0,64 ± 0,06 ^{a,b}	260,50 ± 6,36 ^{a,b}	84,00 ± 9,89 ^a
CPA + PR 100 UI/mL	0,70 ± 0,06 ^{a,b}	238,00 ± 8,48 ^{a,b}	70,00 ± 2,82 ^{a,b}
DOX 2 mg/mL ^c	0,46 ± 0,05 ^a	350,00 ± 12,72 ^a	101,00 ± 5,65 ^a
DOX + PR 1 UI/mL	0,53 ± 0,01 ^a	340,00 ± 9,89 ^a	80,50 ± 4,95 ^a
DOX + PR 10 UI/mL	0,62 ± 0,02 ^{a,c}	299,00 ± 1,41 ^{a,c}	62,50 ± 4,95 ^{a,c}
DOX + PR 100 UI/mL	0,69 ± 0,05 ^{a,c}	236,00 ± 5,65 ^{a,c}	60,50 ± 0,70 ^{a,c}
AC 20/2 mg/mL ^d	0,35 ± 0,01 ^a	400,00 ± 12,72 ^a	95,00 ± 9,89 ^a
AC + PR 1 UI/mL	0,46 ± 0,05 ^a	294,00 ± 5,65 ^{a,d}	70,50 ± 14,84 ^a
AC + PR 10 UI/mL	0,50 ± 0,01 ^{a,d}	260,00 ± 7,07 ^{a,d}	60,00 ± 1,41 ^{a,d}
AC + PR 100 UI/mL	0,62 ± 0,04 ^{a,d}	238,00 ± 9,19 ^{a,d}	51,50 ± 3,53 ^{a,d}

#PR (1, 10 e 100 UI/mL). CPA (20 µg/mL). DOX (2 µg/mL). Protocolo AC (CPA e DOX: 20/2 µg/mL). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. Valores significantes (MD±DP) de $P < 0,05$ para ^a comparado ao grupo sem tratamento (dano basal), ^b à CPA, ^c à DOX e ^d ao protocolo AC.

Os processos indicativos de morte celular, estão principalmente relacionados à auto-ativação enzimática para degradação de proteínas citoplasmáticas e do material genético, apoptose; e a resposta inflamatória tecidual associada a desintegração da membrana celular, eventos indicativos de necrose. A morte celular quando biologicamente programada é dividida entre apoptose, tipo I de morte programada, e autofagia, tipo II de morte programada, sendo todos estes tipos de mortes celulares vias determinantes para a mensuração da eficácia terapêutica de um fármaco (TORRICELLI et al., 2012; MOE; MARÍN-GARCÍA, 2016).

Os análogos e derivados da vitamina A, quando utilizados de forma concomitante aos antineoplásicos nas terapias oncológicas, podem agir como compostos antioxidantes, reduzindo ou removendo danos ao DNA causados por esta classe de drogas (HONG et al., 2011; CHANG; SHEEN; LEI, 2015). A associação com o PR, exceto na concentração de 1 UI/mL, modulou de forma acentuada ($P < 0,05$) praticamente todas as variedades de alterações citogenéticas analisadas, interferindo sobre o número total de pontes citoplasmáticas, brotos nucleares, apoptose e necrose, derivados da ação antineoplásica dos fármacos isolados ou associados sobre as células neoplásicas estudadas. O percentual de modulação do PR sobre os danos derivados dos efeitos tóxicos dos antineoplásicos variou conforme o tipo de alteração citogenética e concentração vitamínica. Quanto aos marcadores de mutagenidade, em 2000 células analisadas, o índice de modulação do palmitato de retinol sobre os efeitos lesivos ao DNA dos antineoplásicos para o número de micronúcleos variou de 04,90%, na concentração de 1 UI/mL, a 40,70%, na concentração de 100 UI/mL em comparação ao protocolo AC e DOX, respectivamente. Levando-se em conta a quantificação de pontes citoplasmáticas, o índice de modulação do PR variou de 33,33%, na concentração de 1 UI/mL, a 60,26%, na concentração de 100 UI/mL em comparação a DOX e CPA isoladas. Por fim, o percentual de interferência do palmitato de retinol sobre a indução de brotos nucleares oscilou entre 22,00 e 56,20%, para a DOX isolada e protocolo AC, nas concentrações de 1 e 10 UI/mL, respectivamente (**Figura 3**).

Quanto aos eventos celulares indicativos de morte celular decorrentes a exposição de compostos citotóxicos, a modulação do PR oscilou entre 2,65%, na concentração de 1 UI/mL para CPA, e 40,38%, na concentração de 100 UI/mL, em comparação ao protocolo AC, quanto à avaliação de apoptose. Para a avaliação da modulação do mesmo composto vitamínico sobre a indução de necroses pelos antineoplásicos, constatou-se a variação no percentual de atenuação dos efeitos tóxicos de 16,06%, na concentração de 1 UI/mL, a 45,79% na concentração de 100

UI/mL, em comparação à CPA e ao protocolo AC isolados, respectivamente (**Figura 3**). Os antineoplásicos podem alterar o ciclo celular e/ou induzir a morte celular pela ativação das caspases, necroses e alterações no citoesqueleto de forma dependente ao estresse oxidativo como mecanismo de ação antitumoral (ZAVALA-AGUIRRE et al., 2010; MANTAWY et al., 2014). De forma oposta, o palmitato de retinol protegeu as linhagens celulares de Sarcoma 180 da sinalização de morte celular pelas vias apoptóticas e necróticas (**Figura 4**). Possivelmente interferindo sobre a degradação de detritos tóxicos, organelas e proteínas deformadas, reduzindo a ação de enzimas lisossômicas modulando os efeitos apoptóticos e necróticos dos antineoplásicos, o que envolve a regulação da multiplicação celular pela inibição de proteínas quinases, serinas/treoninas, do complexo Atg1/ULK1 (SHIMIZU et al., 2014; LIN; BAEHRECKE, 2015).

Embora relatos científicos apontem os micronutrientes vitamínicos, entre estes os derivados da Vitamina A, como agentes em potencial associação com o risco de acometimento de cânceres, por oscilarem entre os efeitos pró e antioxidantes, o palmitato de retinol, em todas as concentrações testadas, preveniu ou atrasou os processos oxidativos dos fármacos testados podendo interferir sobre a eficácia terapêutica dos mesmos. Estes efeitos permitiram a redução da frequência de alterações relacionadas a ação mutagênica e toxicogenética da CPA e DOX, efeitos citogenéticos ligados ao mecanismo de ação antitumoral dos próprios antineoplásicos (HUANG et al., 2003; ZAVALA-AGUIRRE et al., 2010; KEY et al., 2015).

Figura 3. Modulação (%) do palmitato de retinol (PR: 1, 10 e 100 UI/mL) sobre o número de biomarcadores de mutagenicidade e alterações citogenéticas (A), micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares; e de morte celular (B), apoptose e necrose; induzidos por ciclofosfamida (CPA: 20 µg/mL), doxorubicina (DOX: 2 µg/mL) e protocolo AC (CPA e DOX: 20/2 µg/mL) em linhagens tumorais de S-180.

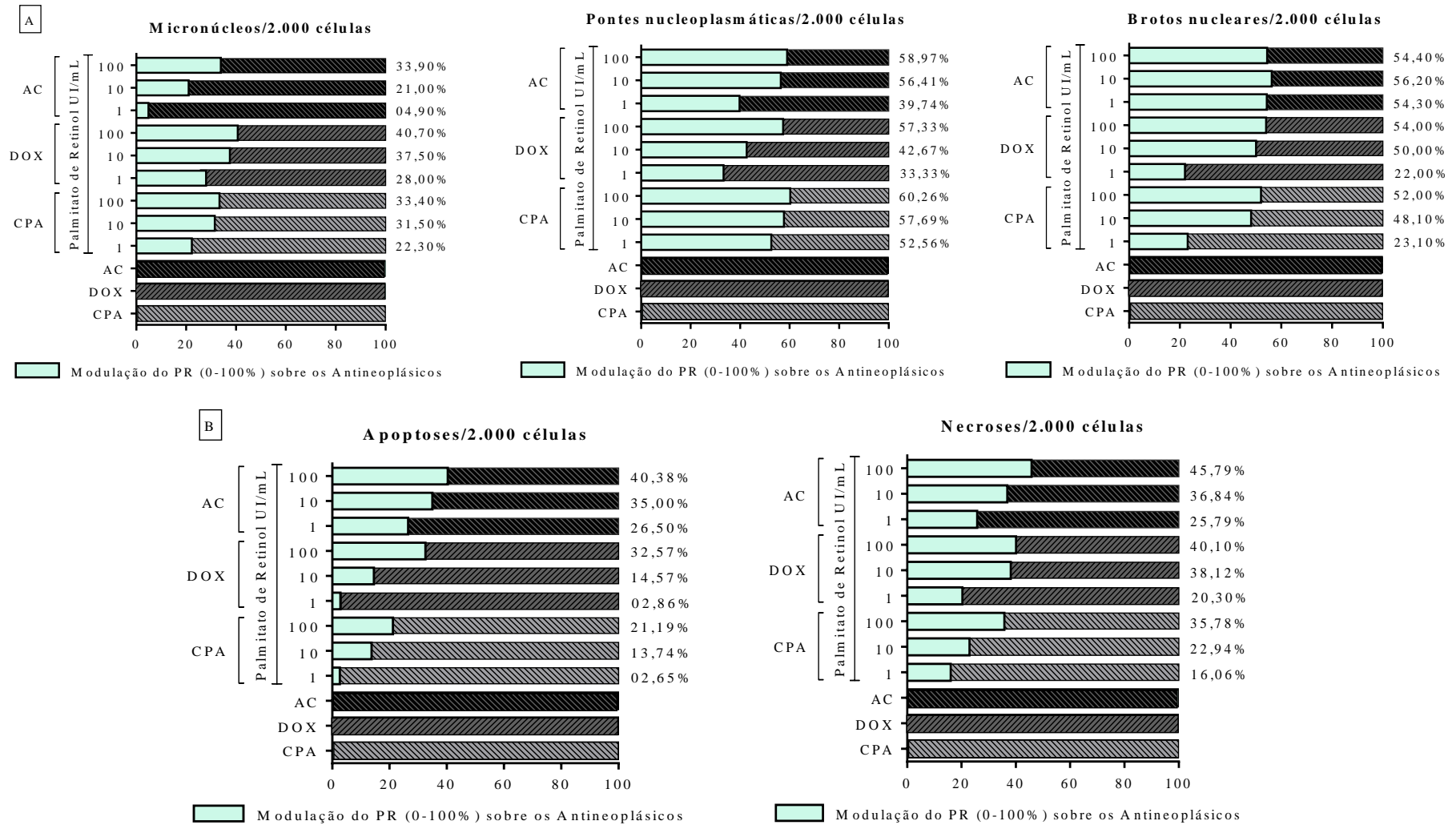
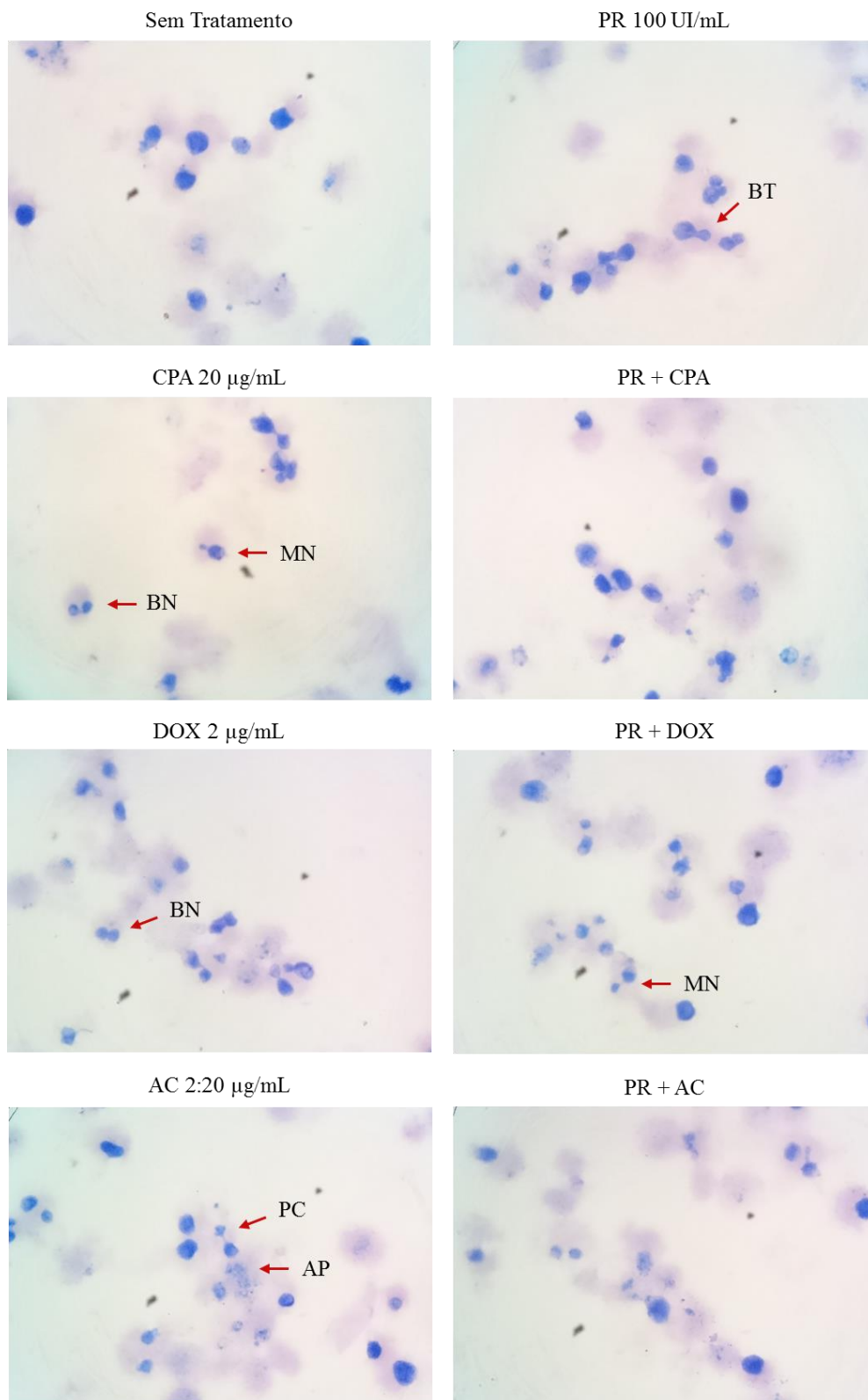


Figura 4. Perfil fotomicrográfico das linhagens de Sarcoma 180 tratadas com os antineoplásicos ciclofosfamida (CPA: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), doxorubicina (DOX: 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e protocolo AC (CPA e DOX: 20/2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), assim como pelo palmitato de retinol (PR), analisadas por meio do teste de CBMN. Coloração com giemsa a 10% e aumento de 1000X ao microscópio óptico. BN: células binucleadas. MN: micronúcleos. BT: brotos nucleares. PT: pontes citoplasmáticas. AP: apoptose.



3.3 Danos genotóxicos da CPA, DOX e protocolo AC em células sanguíneas não tumorais de camundongos *Mus musculus* e os efeitos do PR.

O teste cometa por apresentar grande versatilidade para o monitoramento em saúde tem sido aplicado na avaliação preditiva da resposta de indivíduos a quimioterapia. Esta técnica, já associada a medicina personalizada é eficiente em mensurar a fragmentação inicial ou severa do material genético ocasionada, por exemplo, pela influência de drogas antineoplásicas sobre a estrutura do DNA. Sendo a interferência sobre a conformação morfo-funcional do material genético avaliada por meio da mensuração dos danos ao material genético das células analisadas (APOSTOLOU et al., 2014). O intenso potencial genotóxico da CPA e DOX, isoladas e em associação sobre o DNA de células eucarióticas foi comprovado pelos significantes ($P < 0,001$) índices e frequências de danos (ID e FD) em células não neoplásicas de camundongos em comparação ao grupo de animais não tratados com os quimioterápicos, corroborando aos efeitos genotóxicos já esperados dos fármacos. Seus efeitos oxidativos foram tão intensos que os tratamentos que levaram a associação dos fármacos com o PR continuaram a induzir de forma significativa ($P < 0,001$) danos genotóxicos em relação ao grupo sem tratamento (**Tabela 3**).

A CPA é uma droga citostática que reprime a divisão celular através da interação com as moléculas de DNA. Os mecanismos de ação da doxorubicina estão ligados a inibição da síntese, a alquilação e a quebra de DNA pela interferência sobre a ação das topoisomerases II no processo de duplicação do material genético. A intensa liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a consequente peroxidação lipídica, como mecanismos de citotoxicidade e genotoxicidade asseguram a estes antineoplásicos sua potente ação antitumoral (ČESEN et al., 2016; MANJANATHA et al., 2013). No entanto, assim como na avaliação dos danos toxicogenéticos dos antineoplásicos em células neoplásicas de Sarcoma 180, o PR reduziu de forma significativa ($P < 0,001$) os efeitos lesivos dos fármacos testados ao material genético de células não tumorais de *Mus musculus*. A análise das classes de danos ao DNA, para ID e FD em células não neoplásicas de sangue periférico de camundongos machos e fêmeas revelou um decréscimo do potencial oxidativo da CPA, DOX e do protocolo de AC, de associação entre os dois fármacos, quando estes foram co-tratados com o PR na concentração de 100 UI/kg (**Tabela 3**).

Tabela 3. Avaliação dos danos genotóxicos induzidos por ciclofosfamida (CPA), doxorubicina (DOX), e protocolo AC (CPA + DOX), e a modulação destes pelo palmitato de retinol (PR) em células não tumorais de *Mus musculus* por meio do teste cometa.

		<i>Genotoxicidade</i> #		
		<i>Tratamentos</i>	<i>Índice de Dano (0-400)</i>	<i>Frequência de Dano (0-100%)</i>
<i>Machos</i>		Sem tratamento	14,60 ± 1,56	6,00 ± 1,04
		PR 100 UI/kg	17,60 ± 0,76	7,80 ± 0,43
		CPA 20 mg/kg	260,52 ± 1,62 ^a	99,00 ± 0,54 ^a
		CPA+PR	117,10 ± 2,99 ^{a,b}	45,80 ± 1,12 ^{a,b}
		DOX 2 mg/kg	288,04 ± 6,80 ^a	98,26 ± 0,48 ^a
		DOX+PR	189,50 ± 4,86 ^{a,c}	75,40 ± 2,99 ^{a,c}
		AC 20/2 mg/kg	260,00 ± 6,76 ^a	96,26 ± 1,01 ^a
		AC + PR	200,80 ± 2,89 ^{a,d}	81,00 ± 2,40 ^{a,d}
<i>Fêmeas</i>		Sem tratamento	14,00 ± 1,64	6,00 ± 1,04
		PR 100 UI/kg	15,50 ± 0,85	7,20 ± 0,25
		CPA 20 mg/kg	292,52 ± 9,20 ^a	99,26 ± 0,37 ^a
		CPA+PR	107,20 ± 3,55 ^{a,b}	41,80 ± 1,48 ^{a,b}
		DOX 2 mg/kg	300,26 ± 3,98 ^a	98,00 ± 0,83 ^a
		DOX+PR	179,20 ± 1,84 ^{a,c}	67,70 ± 1,42 ^{a,c}
		AC 20/2 mg/kg	352,40 ± 8,83 ^a	94,52 ± 1,50 ^a
		AC + PR	197,40 ± 3,66 ^{a,d}	81,90 ± 2,21 ^{a,d}

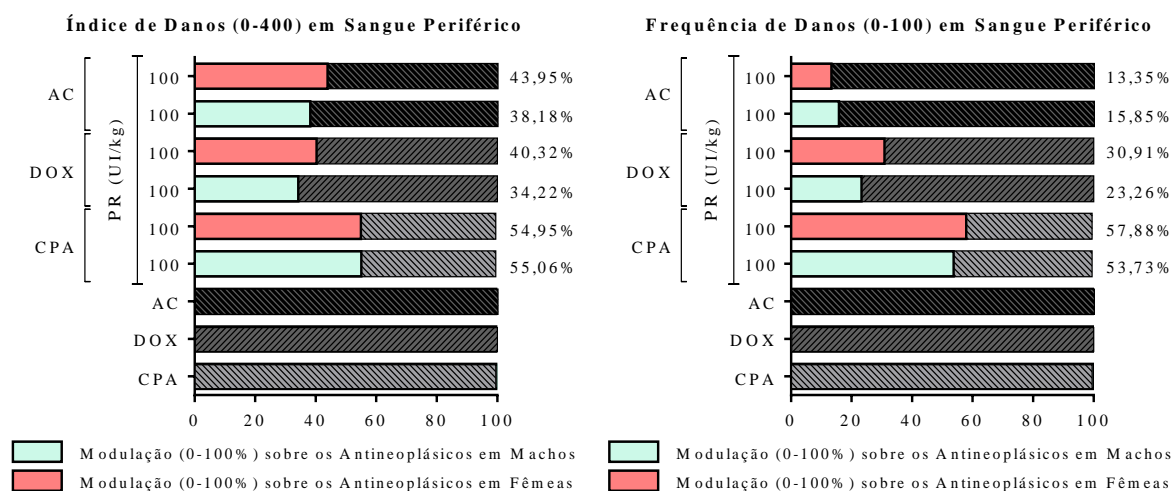
#PR (100 UI/kg). CPA (20 mg/kg). DOX (2 mg/kg). Protocolo AC (CPA e DOX: 20/2 mg/kg). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. *n*=5. Valores significantes (MD±DP) de *P*<0,001 para ^a comparado ao grupo sem tratamento (dano basal), ^b à CPA, ^c à DOX e ^d ao protocolo AC.

A avaliação da influência do PR sobre a ação genotóxica dos antineoplásicos por meio da análise do índice de danos (0-400) no teste cometa de sangue periférico de camundongos machos demonstrou que as taxas de média ± desvio padrão oscilaram, de 117,10 ± 2,99 a 200,80 ± 2,89, para associação do PR na concentração de 100 UI/mL com a CPA e o protocolo AC, respectivamente. Para a análise de frequência de danos (0-100%), a variação, também para machos foi de 45,80 ± 1,12 a 81,00 ± 2,40 para as mesmas associações medicamentosas. Na avaliação das classes de danos em células de sangue periférico de camundongos fêmeas, as variações foram de 107,20 ± 3,55 a 197,40 ± 3,66 para o índice de danos; e de 41,80 ± 1,48 a 81,90 ± 2,21, para a frequência de danos, ambas para associação do PR com a CPA e o protocolo AC (**Tabela 3**).

Os efeitos antioxidantes do PR modularam (0-100%) de forma significativa a ação oxidante dos fármacos sobre o DNA dos roedores independente do sexo do animal. Para o percentual de modulação do PR, na análise do material genético de células de sangue periférico,

de camundongos machos expostos aos antineoplásicos, o índice de danos variou de 34,22%, na influência do PR sobre a DOX, a 55,06% na influência do palmitato de retinol sobre a CPA. Para a análise do índice de danos em camundongos do sexo feminino, a modulação do palmitato de retinol variou de 40,32%, sobre os efeitos da DOX, a 54,95% na atenuação dos efeitos genotóxicos da CPA administrada de forma isolada. Quanto a avaliação da modulação do PR, sobre a frequência de danos em células de sangue periférico de camundongos machos, frente aos efeitos genotóxicos dos fármacos isolados, a variação foi de 15,85% a 53,73% para a influência atenuadora do PR sobre o protocolo AC e ciclofosfamida, respectivamente. Para a análise da frequência de danos, em camundongos fêmeas, o percentual de modulação do palmitato de retinol variou de 13,35% a 57,88%, também sobre os efeitos oxidantes do protocolo AC e CPA isolados nas células tratadas (**Figura 5**).

Figura 5. Modulação (%) do palmitato de retinol (PR: 100 UI/kg) sobre o número de danos genotóxicos induzidos por ciclofosfamida (CPA: 20 mg/kg), doxorrubicina (DOX: 2 mg/kg) e protocolo AC (CPA e DOX: 20/2 mg/kg) em camundongos *Mus musculus* sadios por meio do teste cometa.



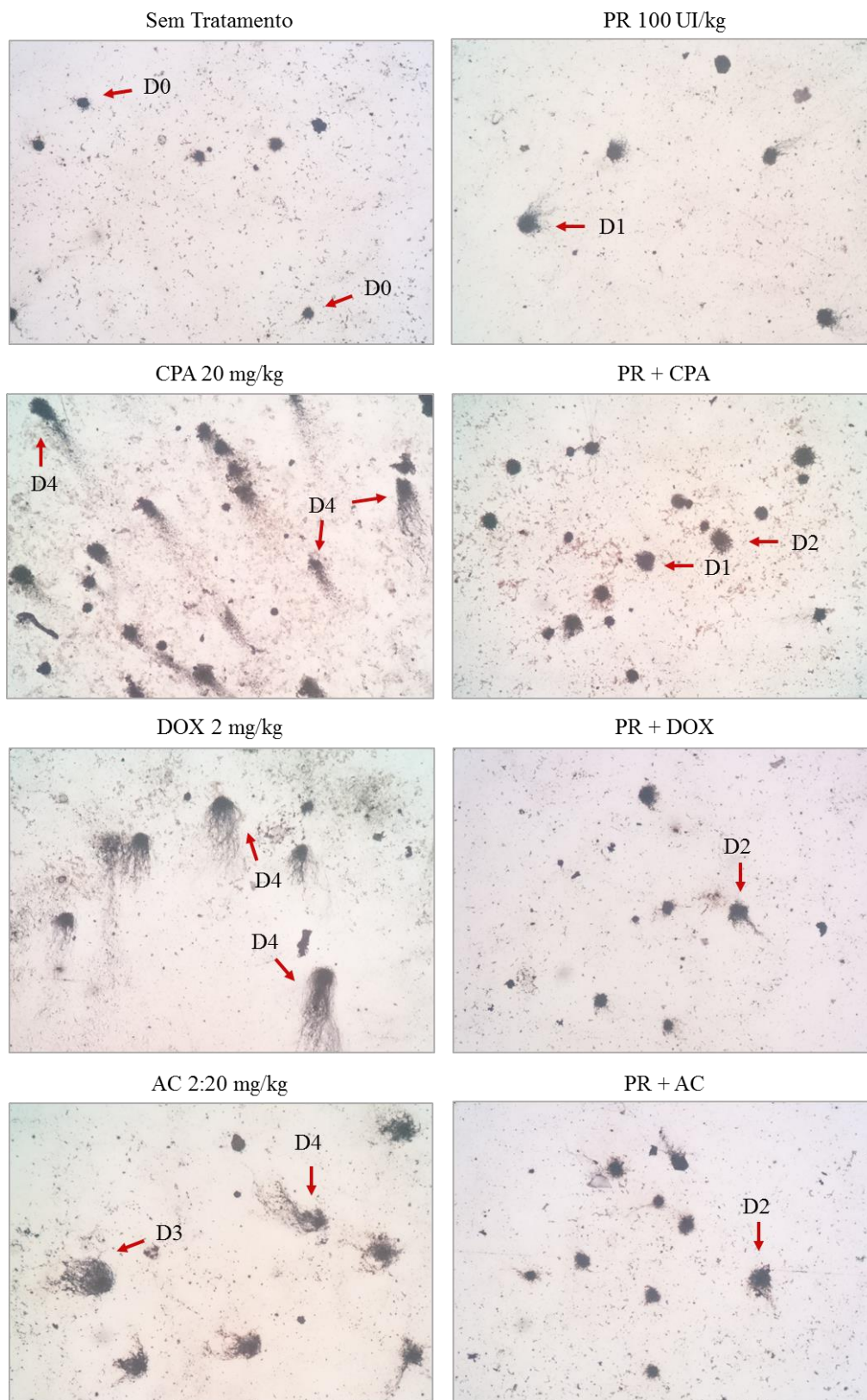
Dentro desta perspectiva, a avaliação da suplementação nutricional do palmitato de retinol, também em células sadias de camundongos *Mus musculus* revelou que sua atividade antioxidante sobre os efeitos genotóxicos da CPA e da DOX, isoladas e em associação, promoveram uma eficiente proteção do material genético celular. Compostos antioxidantes, como as vitaminas A (retinol), C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), agem justamente limitando os níveis intracelulares de radicais livres, impedindo ou reduzindo a indução de danos oxidativos sobre as moléculas biológicas (BOUAYED; BOHN, 2010). Os radicais livres,

espécies reativas a inúmeros compostos biológicos, proteínas, lipídeos, carboidratos e ao material genético são gerados em larga escala devido a influência de mecanismos oxidantes intrínsecos ou extrínsecos. A ação das EROs é peça fundamental para promoção do envelhecimento celular, lipoperoxidação, morte celular e hiper-regulação com consequente proliferação de células tronco cancerígenas. Entretanto, a própria descompensação do estado redox corporal é responsável por desencadear respostas dos mecanismos de defesas antioxidantes, resultantes de fatores endógenos ou exógenos, por meio de substâncias funcionais e/ou alimentos (ELEAZU et al., 2013; LIU; WANG, 2015; CIRCU; AW, 2010).

O palmitato é um composto sintético análogo do retinol, apresentando-se como um sal ou éster do ácido palmítico, da vitamina A. Obtido por meio da suplementação dietética, interage com proteínas de ligação e ativa-se com os receptores retinóides, podendo, a partir desse ponto induzir a diferenciação celular, bloquear a própria proliferação celular ou exercer sua potente ação quimiopreventiva (RO et al., 2015). Embora, estes achados em células sadias de roedores, se discutidos de forma isolada possam ser equiparados a prováveis melhoras no quadro clínico de pacientes em terapias oncológicas, levando-se em conta a interferência do palmitato de retinol sobre os efeitos lesivos da ciclofosfamida e da doxorrubicina sobre o material genético celular de células não neoplásicas, vale ressaltar que a mesma interferência foi comprovada sobre células de linhagens cancerígenas de *S-180*.

O PR quando associado concomitantemente aos antineoplásicos consegue modular seus efeitos toxicogênicos (**Figura 6**), podendo reduzir seus efeitos terapêuticos esperados. Nesse contexto, a ação de alguns compostos alimentares, a exemplo das vitaminas, sugeridas por meio de suplementação nutricional em variados tratamentos oncológicos, ainda gera inúmeras controvérsias devido a carência de protocolos e métodos seguros de intervenções terapêuticas por meio do uso de vitaminas antioxidantes paralelas a terapêutica contra o câncer (PISOSCHI; POP, 2015; ALENCAR et al., 2016).

Figura 6. Perfil fotomicrográfico das células de camundongos tratados com os antineoplásicos ciclofosfamida (CPA: 20 mg/kg), doxorubicina (DOX: 2 mg/kg), e protocolo AC (CPA e DOX: 20/2 mg/kg), assim como pelo palmitato de retinol (PR: 100 UI/kg), analisadas por meio do teste cometa. Coloração com nitrato de prata e aumento de 400X ao microscópio óptico. D0: Dano 0. D1: Dano 1. D2: Dano 2. D3: Dano 3. D4: Dano 4.



4 Conclusão

Os fármacos CPA, DOX e suas associações induziram danos toxicogenéticos sobre células de linhagens cancerígenas de S-180 pelo aumento das frequências de micronúcleos, pontes, brotos e alterações nucleares indicativas de morte celular: apoptose e necrose. De forma similar os antineoplásicos CPA, DOX e sua associação no protocolo AC promoveram efeitos genotóxicos, por meio da avaliação de danos sobre o material genético em células de sangue periférico de camundongos *Mus musculus* sadios. Entretanto, o PR, um micronutriente derivado da vitamina A, modulou os efeitos tóxicos dos antineoplásicos isolados e em associação, em dois modelos de estudo, nos testes não-clínicos de CBMN em células tumorais e avaliação de danos ao DNA, com o teste cometa. Como relatado, inúmeros estudos indicam a combinação de antioxidantes, a exemplo do PR durante terapias oncológicas, especialmente para minimizar os efeitos colaterais e adversos dos antineoplásicos. Porém, os efeitos antioxidantes destes compostos nutricionais podem influenciar na eficácia das terapias oncológicas, já que os mesmos conseguem interferir sobre os mecanismos citogenéticos de ação dos antineoplásicos.

Referências

ALENCAR, M. V. O. B.; ISLAM, MD. T.; ROCHA, L. M. C.; QUEIROZ, J. L.; SILVA, M. B. S.; MATA, A. M. O. F.; CARVALHO, R. M.; JÚNIOR, A. L. G.; MORAES, G. P.; PAZ, M. F. C. J. P.; CERQUEIRA, G. S.; DANTAS, S. M. M. M.; SOUSA, I. J. O.; FERREIRA, P. M. P.; CAVALCANTE, A. A. C. M. Ascorbic Acid Modulates Doxorubicin and Cyclophosphamide-Induced Cytogenetic Damages in Sarcoma 180 Cells. **International Archives of Medicine**, v. 9, n. 181, 2016.

APOSTOLOU, P.; TOLOUDI, M.; KOURTIDOU, E.; MIMIKAKOU, G.; VLACHOU, I.; CHATZIOANNOU, M.; PAPASOTIRIOU, I. Use of the comet assay technique for quick and reliable prediction of *in vitro* response to chemotherapeutics in breast and colon cancer. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, v. 21, n. 14, 2014.

ARAN, V.; VICTORINO, A. P.; THULER, L. C.; FERREIRA, C. G. Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. **Clinical Colorectal Cancer**, In Press, Corrected Proof, 2016.

AUDERGON, P. N. CATANIA, S.; KAGANSKY A.; TONG, P.; SHUKLA, M.; PIDOUX, A. L.; ALLSHIRE, R. C. Restricted epigenetic inheritance of H3K9 methylation. **Science**, v. 3, n. 348, p. 132-135, 2015.

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

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

BITGEN, N.; DONMEZ-ALTUNTAS, H.; BAYRAM, F.; ÇAKIR, I.; HAMURCU, Z.; DIRI, H.; BASKOL, G.; SENOL, S.; DURAK, A. C. Increased micronucleus, nucleoplasmic bridge, nuclear bud frequency and oxidative DNA damage associated with prolactin levels and pituitary adenoma diameters in patients with prolactinoma. **Biotechnic & Histochemistry**, vol. 91, i. 2, p. 128-136, 2016.

BOLOGNESI, C.; BONASSI, S.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M.; BRUZZONE, M.; LANDO, C.; CEPPI, M. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and meta-analysis. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 766, p. 20-31, 2015.

BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Mussel micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v.7, n. 6, p. 1125-1137, 2012.

BONASSI, S.; EL-ZEIN, R.; BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 93-100, 2011.

BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 4, p. 228-237, 2010.

ČESEN, M.; ELERŠEK, T.; NOVAK, M.; ŽEGURA, B.; KOSJEK, T.; FILIPIČ, M.; HEATH, E. Ecotoxicity and genotoxicity of cyclophosphamide, ifosfamide, their metabolites/transformation products and their mixtures. **Environmental Pollution**, v. 210, p. 192-201, 2016.

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.

CHANG, H.; SHEEN, L.; LEI, Y. The protective role of carotenoids and polyphenols in patients with head and neck cancer. **Journal of the Chinese Medical Association**, vol. 78, p. 89–95, 2015.

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

CLARKE, N.; GERMAIN, P.; ALTUCCI, L.; GRONEMEYER, H. Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. **Expert Rev Mol Med**, v. 6, p. 1–23, 2004.

CONKLIN, K. A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**, v.3, n. 4, p.294-300, 2004.

DRAGNEV, K. H.; PETTY, W. J.; DMITROVSKY, E. Retinoid targets in cancer therapy and chemoprevention. **Cancer Biol Ther**, v. 2, p. S150–156, 2003.

ELEAZU, C. O.; ELEAZU, K. C.; CHUKWUMA, S.; ESSIEN, U. N. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, vol. 12, n. 60, 2013.

EL-ZEIN, R. A.; LOPEZ, M. S.; D'AMELIO JR, A. M.; LIU, M.; MUNDEN, R. F., CHRISTIANI, D.; SU, L.; TEJERA-ALVERAZ, A.; ZHAI, R.; SPITZ, M. R.; ETZEL C. J. The Cytokinesis Blocked Micronucleus Assay as a Strong Predictor of Lung Cancer: Extension of a Lung cancer risk prediction model. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 23, n°. 11, p. 2462–2470, 2014.

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**, vol. 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. et al. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1045–1058, 2011.

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.

FRITZ, H.; KENNEDY, D.; FERGUSSON, D.; FERNANDES, R.; DOUCETTE, S.; COOLEY, K. et al. Vitamin A and Retinoid Derivatives for Lung Cancer: A Systematic Review and Meta Analysis. **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-11, 2011.

GHAZARYAN, N. A.; GHULIKYAN, L. A.; KISHMIRYAN, A. V.; KIRAKOSYAN, G. R.; NAZARYAN, O. H.; GHEVONDYAN, T. H.; ZAKARYAN, N. A.; AYVAZYAN, N. M. Anti-tumor effect investigation of obtustatin and crude *Macrovipera lebetina obtusa* venom in S-180 sarcoma bearing mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 764, p. 340-345, 2015.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2003.

HOFMAN, J.; SKARKA, A.; HAVRANKOVA, J.; WSOL, V. Pharmacokinetic interactions of breast cancer chemotherapeutics with human doxorubicin reductases. **Biochemical Pharmacology**, v. 96, n. 3, p. 168–1781, 2015.

HONG, S. D.; KIM, Y. K.; KIM, H. N.; LEE, S. R.; AHN, J. S.; YANG, D. H.; LEE, J. J.; LEE, I. K.; SHIN, M. G.; KIM, H. J. Treatment outcome of all-trans retinoic acid/anthracycline combination chemotherapy and the prognostic impact of FLT3/ITD mutation in acute promyelocytic leukemia patients. **The Korean Journal of Hematology**, vol. 46, p. 24–30, 2011.

HUANG, H.; ALBERG, A. J.; NORKUS, E. P.; HOFFMAN, S. C.; COMSTOCK, G. W.; HELZLSOUER, K. J. Prospective Study of Antioxidant Micronutrients in the Blood and the Risk of Developing Prostate Cancer. **American Journal of Epidemiology**, vol. 157, n. 4, p. 335-344, 2003.

KEY, T. J.; APPLEBY, P. N.; TRAVIS, R. C.; ALBANES, D.; ALBERG, A. J.; BARRICARTE, A. et al. Carotenoids, retinol, tocopherols, and prostate cancer risk: pooled analysis of 15 studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 102, n. 5, p. 1142-1157, 2015.

LIN, L.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy, cell death, and cancer. **Molecular & Cellular Oncology**, vol. 2, n. 3, 2015.

LIU, J.; WANG, Z. Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015.

LUE, S. W.; REPIN, M.; MAHNKE, RYAN; BRENNER, D. J. Development of a High-Throughput and Miniaturized Cytokinesis-Block Micronucleus Assay for Use as a Biological Dosimetry Population Triage Tool. **Radiation Research**, v. 184, p. 134–142, 2015.

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

MANJANATHA, M. G.; BISHOP, M. E.; PEARCE, M. G.; KULKARNI, R.; LYN-COOK, L. E.; DING, W. Genotoxicity of doxorubicin in F344 rats by combining the comet assay, flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, and pathway-focused gene expression profiling. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 1, p. 24-34, 2013.

MANTAWY, E. M.; EL-BAKLY, W. M.; ESMAT, A.; BADR, A. M.; EL-DEMERDASH, E. CHRYSIN. Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. **European Journal Pharmacology**, vol. 5; n. 728, p. 107-118, 2014.

MELONI, M. The social brain meets the reactive genome: neuroscience, epigenetics and the new social biology. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 8, p. 1-12. 2014.

MOE, G. W.; MARÍN-GARCÍA, J. Role of cell death in the progression of heart failure. **Heart Failure Reviews**, vol. 21, i. 2, p. 157–167, 2016.

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

OLIVEIRA, M. R. Vitamin A and Retinoids as Mitochondrial Toxicants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-13, 2015.

PANCHUK, R.; SKOROKHYD, N.; CHUMAK, V.; STOIKA, R. Specific antioxidant compounds differentially modulate cytotoxic activity of doxorubicin and cisplatin: In vitro and in vivo study. **Croatian Medical Journal**, v. 55, n. 3, p. 206-217, 2014.

PATRA, K.; JANA, S.; SARKAR, A.; KARMAKAR, S.; JANA, J.; GUPTA, M.; MUKHERJEE, G.; DE, U. C.; MANDAL, D. P.; Bhattacharjee, S. Parkia javanica Extract Induces Apoptosis in S-180 Cells via the Intrinsic Pathway of Apoptosis. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 4, p. 689-707, 2016.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

RO, J.; KIM, Y.; KIM, H.; PARK, K.; LEE, K.; KHADKA, P.; YUN, G.; PARK, J.; CHANG, S. T.; LEE, J.; JEONG, J. H.; LEE, J. Pectin Micro- and Nano-capsules of Retinyl Palmitate as Cosmeceutical Carriers for Stabilized Skin Transport. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 19, n.1, p. 59-64, 2015.

SHIMIZU, S.; YOSHIDA, T.; TSUJIOKA, M.; ARAKAWA, S. Autophagic Cell Death and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 15, p. 3145-3153, 2014.

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

SINDHI, V.; GUPTA, V.; SHARMA, K.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, R.; DHAKA, N. Potential applications of antioxidants—a review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 828–835, 2013.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SOUGANIDIS, E.; LAILLOU, A.; LEYVRAZ, M.; MOENCH-PFANNER, R. A. Comparison of Retinyl Palmitate and Red Palm Oil β -Carotene as Strategies to Address Vitamin A Deficiency. **Nutrients**, v. 5, p. 3257-3271, 2013.

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

TICE, R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HART-MANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TORRES-BUGARÍN, O.; ZAVALA-CERNA, M. G.; NAVA, A.; FLORES-GARCÍA, A.; RAMOS-IBARRA, M. L. Potential Uses, Limitations, and Basic Procedures of Micronuclei and Nuclear Abnormalities in Buccal Cells. **Disease Markers**, 2014.

TORRICELLI, C.; SALVADORI, S.; VALACCHI, G.; SOUČEK, K.; SLABÁKOVÁ, E.; MUSCETTOLA, M.; VOLPI, N.; MAIOLI, E. Alternative Pathways of Cancer Cell Death by Rottlerin: Apoptosis versus Autophagy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-12, 2012.

TREMANTE, E.; SANTARELLI, L.; MONACO, E. L.; SAMPAOLI, C.; INGEGNERE, T.; GUERRIERI, R.; TOMASETTI, M.; GIACOMINI, P. Sub-apoptotic dosages of pro-oxidant vitamin cocktails sensitize human melanoma cells to NK cell lysis. **Oncotarget**, 6 (31): p. 31039–31049, 2015.

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

ZAVALA-AGUIRRE, J. L.; TORRES-BUGARÍN, O.; BUELNA-OSBEN, H. R.; FLORES-KEHN, L. P.; RAMOS-IBARRA, M. L.; ZUNIGA-GONZALEZ, G.; OGURA, T. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities by cyclophosphamide and colchicine in *Xenotoca melanosoma* (Pisces, Goodeidae) from Lake la Alberca in Michoacan, Mexico. **Journal of Environmental Science and Health**, vol. 45, n. 1, p. 75–81, 2010.

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



Capítulo IV

O PALMITATO DE RETINOL COM AÇÃO ANTIGENOTÓXICA, ANTIMUTAGÊNICA E ANTICITOTÓXICA FRENTE A ANTINEOPLÁSICOS

Artigo aceito pela Revista Experimental and Toxicologic Pathology

Fator de Impacto 1.716 – Qualis B2 para Farmácia

**O PALMITATO DE RETINOL COM AÇÃO ANTIGENOTÓXICA,
ANTIMUTAGÊNICA E ANTICITOTÓXICA FRENTE A
ANTINEOPLÁSICOS**

Ricardo Melo de Carvalho^{1*}; Rai Pablo Sousa de Aguiar¹; MD. Torequul Islam¹; Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar ¹; Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata¹; Jadson Texeira e Silva²; Antonio Lima Braga¹; Josemar José da Silva Júnior²; Leonardo da Rocha Sousa^{1,2}; Rosália Maria Tôrres de Lima^{1,2}; João Marcelo de Castro e Sousa¹; Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante¹

¹ Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica, LAPGENIC - Universidade Federal do Piauí, UFPI, Ininga, CEP: 64.049-550, Teresina/PI – Brasil. * E-mail: ricardo_carvalho50@hotmail.com

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, IFPI, Av. Presidente Jânio Quadros, 330 – Santa Isabel, CEP: 64053-390, Teresina/Piauí – Brasil.

RESUMO

O câncer é uma patologia multifatorial de importância para a saúde pública, devido seu alto índice de mortalidade. A ciclofosfamida e a doxorrubicina são fármacos clássicos aplicados na terapia oncológica, usados de forma isolada ou em associação. Os antineoplásicos apresentam agressividade toxicogenética que leva a instabilidade genética. O estudo avaliou os possíveis efeitos antígeno-tóxicos, antimutagênicos e anticitotóxicos do palmitato de retinol frente aos efeitos tóxicos induzidos pela doxorrubicina (2 mg/kg), ciclofosfamida (20 mg/kg) e protocolo AC (2/20 mg/kg) em camundongos *Mus musculus*, por meio do teste cometa e do teste de micronúcleos em células não tumorais de medula óssea. 80 animais saudáveis, divididos igualmente por gênero, receberam a administração por via intraperitoneal dos químicos. Após o período de meia-vida dos fármacos, os animais foram eutanasiados para a punção da medula óssea nos ossos femurais. Os quimioterápicos induziram aumentos significativos do índice e frequência de danos, efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos pelo aumento de micronúcleos, assim como apresentaram citotoxicidade pela interferência sobre a relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos em células de medula óssea de *Mus musculus* saudáveis. No entanto, o palmitato de retinol, na concentração de 100 UI/kg, reduziu significativamente as ações oxidativas dos quimioterápicos, modulando os seus efeitos genotóxicos de 30,54% a 59,60%; mutagênicos, de 20,00% a 44,54%; e citotóxicos. Os resultados apontam que o palmitato de retinol interfere sobre os mecanismos de ação dos antineoplásicos. Dessa forma, o uso de vitaminas antioxidantes ainda exige ressalvas, devido as interações metabólicas e efeitos sinérgicos com os fármacos, especialmente durante a meia-vida destes, o que pode influenciar a terapia oncológica.

Palavras-chave: Doxorrubicina; Ciclofosfamida; Protocolo AC; Efeitos tóxicos; Palmitato de retinol.

ABSTRACT

Cancer is a multifactorial pathology of importance to public health, because of its high mortality rate. Cyclophosphamide and doxorubicin are classic drugs used in cancer therapy, used in isolation or in association. The antineoplastic feature aggressive toxicogenética which leads to genetic instability. The study evaluated the possible effects antigenotóxicos, antimutagênicos and anticitotóxicos of the retynil palmitate front tóxicogenéticos effects induced by doxorubicin (2 mg/kg), cyclophosphamide (20 mg/kg) and AC protocol (2/20 mg/kg) in mice *Mus musculus*, by means of the Comet assay and micronucleus test in bone marrow tumor cells. 80 healthy animals, divided evenly by gender, received the intraperitoneal administration of the chemicals. After the half-life period of pharmaceuticals, the animals were eutanasiados to the bone marrow puncture in femoral bone. The chemotherapy induced significant increases in the index and frequency of damage, clastogênicos and/or aneugênicos effects by increasing of microkernels, as presented by cytotoxicity interference on the ratio of normochromatic to polychromatic erythrocytes and bone marrow cells of *Mus musculus* healthy. However, retinol palmitate, at a concentration of 100 IU/kg, significantly reduced the oxidative action of chemotherapy by modulating their genotoxic effects of 30.54% 59.60%; mutagens, 44.54% 20.00%; and cytotoxic. The results indicate that the retinol palmitate interferes on the mechanisms of action of antineoplastic. In this way, the use of antioxidant vitamins still requires reservations due to metabolic interactions and synergistic effects with drugs, especially during the half-life of these, which can influence the cancer therapy.

Palavras-chave: Doxorubicin; Cyclophosphamide; AC protocol; Toxics Effects; Retynil palmitate.

1 Introdução

O câncer é um termo coletivo para mais de 200 patologias caracterizadas por um intenso processo proliferativo de células neoplásicas. A quimioterapia apresenta-se como o tratamento de patologias que afetam processos fisiológicos celulares, no qual sua terapêutica é aplicada prioritariamente contra o potencial agressivo e invasivo de células que tendem a formar tumores. Embora os principais tipos de quimioterapia sejam as antineoplásicas ou antitumorais, empregadas na terapia oncológica, existem quimioterapias usadas para o controle de doenças auto-imunes e também para a imunossupressão de pacientes após a rejeição de transplantes (INCA, 1999; FARSI, 2016; HASSAN et al., 2016).

Os químicos aplicados nestas finalidades, usados de forma isolada ou em associação terapêutica são denominados quimioterápicos ou antineoplásicos. Esta classe de compostos compreende fármacos com variados mecanismos de ação antitumoral. Os agentes alquilantes impedem a multiplicação celular pela incorporação de grupos alquil sobre sua cadeia metabólica. Os antimetabólitos são responsáveis por inibir a biossíntese de DNA e RNA. Os antibióticos citotóxicos e inibidores da topoisomerase, interferem tanto no ciclo celular como na duplicação do material genético. Os agentes hormonais são usados na terapêutica de neoplasias malignas hormônio-sensíveis principalmente quanto aos níveis de estrogênio e progesterona, e os anticorpos monoclonais agem simulando o sistema imunológico do paciente oncológico atrapalhando o desenvolvimento tumoral (FERRARI et al., 2010; CECILIO et al., 2015; BASANG et al., 2016).

A doxorubicina (DOX) é um antibiótico da família das antraciclina que age por dois mecanismos principais. São eles: intercalação a molécula de DNA, por meio da inibição da síntese do próprio DNA ou da sua interação com a TOP2A, topoisomerase II; e formação de radicais livres que provocam danos oxidativos sobre membranas celulares e também sobre o material genético. A ciclofosfamida (CPA) na verdade é um pró-fármaco, pois só apresenta atividade antitumoral após a bioativação hepática. É uma mostarda nitrogenada que possui como mecanismo de ação a inibição da duplicação do DNA. Por promover a alquilação de grupos nucleofílicos, como o N7 guanina na fita dupla do DNA, a CPA é considerada um agente alquilante e oxidante (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009; CHENNURU; SALEEM, 2013).

Embora sejam aplicados vários critérios para a indicação da quimioterapia, os efeitos citotóxicos, oxidantes e mutagênicos dos fármacos não são específicos a células tumorais. Até

mesmo tecidos biológicos que se renovam com rapidez, como a medula óssea, sofrem com a ação oxidante dos quimioterápicos, independente das inúmeras modificações sobre protocolos de associação quimioterápica e intervenções nos ciclos periódicos dos tratamentos (INCA, 1999; BROWN, 2016).

Com o intuito de atenuar os efeitos tóxicos dos quimioterápicos, a suplementação nutricional de compostos antioxidantes tem dado ao controle dietético de pacientes oncológicos maiores chances de melhoras terapêuticas. O palmitato de retinol (PR), $C_{36}H_{60}O_2$, é uma variação sintética da vitamina A comumente aplicado em produtos de natureza cosmética e estética por estimular a produção de elastina e colágeno, o que retarda o envelhecimento cutâneo. Tendo em vista que a estrutura química básica dos derivados e metabólitos do retinol é a mesma, e os seus ésteres, como o palmitato de retinol, apresentam uma maior estabilidade na presença de luz e oxigênio. Compostos estes, conhecidos por seus potentes efeitos antioxidantes no combate aos radicais livres (NIH, 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

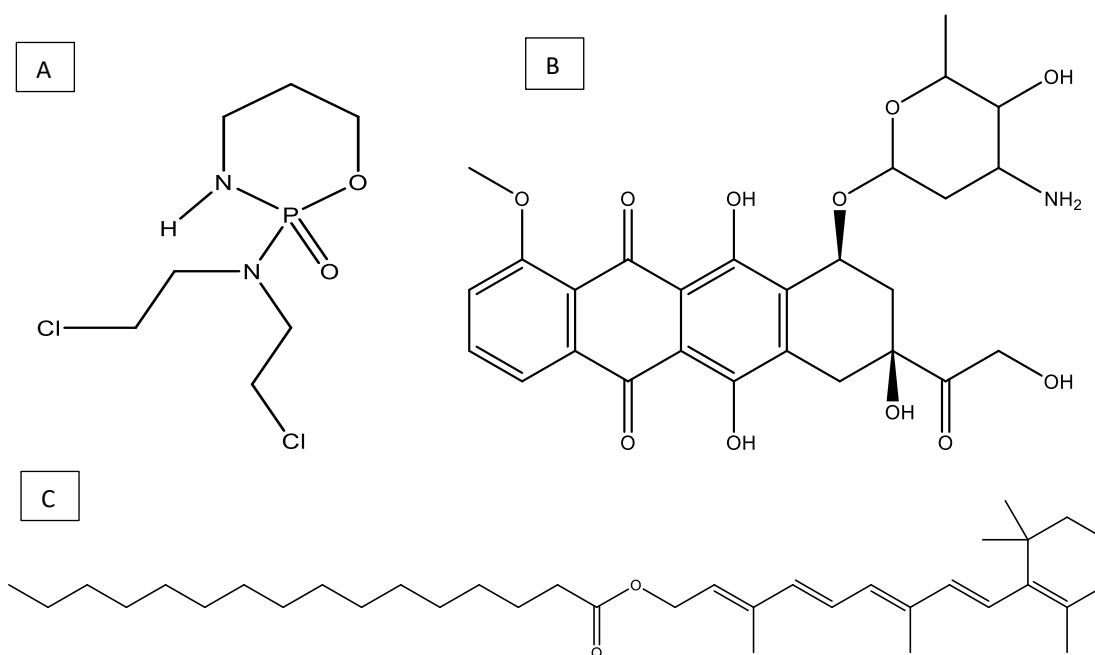
Os biomarcadores citogenéticos são importantes para o biomonitoramento de organismos sob a ação lesiva e tóxica de agentes químicos. Entretanto, a pesquisa com seres humanos enfrenta grandes entraves metodológicos e principalmente éticos para aprovação e realização. Nesse contexto, os modelos de estudo não-clínicos, apresentam-se irrevogavelmente como ferramentas eficazes na compreensão de inúmeros processos biológicos e farmacodinâmicos, como também toxicogenéticos, especialmente sobre os efeitos da associação medicamentosa de antineoplásicos com compostos vitamínicos (BOLOGNESI et al., 2013; AKYIL; KONOK, 2015). Portanto, o estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos antígeno-tóxicos, antimutagênicos e anticitotóxicos do PR frente aos mecanismos de ação antitumoral da DOX, da CPA e do protocolo AC (associação terapêutica entre DOX e CPA) em medula óssea de roedores saudáveis, durante o período de meia-vida dos fármacos, por meio da aplicação dos testes cometa e micronúcleos em camundongos *Mus musculus*.

2 Materiais e Métodos

2.1 Preparo dos fármacos e do palmitato de retinol

Os antineoplásicos foram diluídos em solução fisiológica estéril 0,9% até a concentração final de 20 mg/kg para ciclofosfamida (CPA), 2 mg/kg para doxorubicina (DOX), sob o nome comercial de adriamicina e 2/20 mg/kg para o protocolo de associação entre os dois fármacos (AC). O palmitato de retinol (PR) também foi solubilizado para a administração de 100 UI/kg, por via intraperitoneal, tendo em vista que doses superiores a 1.000 UI/kg de PR administrados isoladamente em roedores *Wistar* adultos apresentam efeitos pró-oxidantes (**Figura 1**) (OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 1. Estrutura química da CPA (A), DOX (B) e PR (C).



Adaptação de HADI et al., 2012; NIH, 2012 e de BASU et al., 2015.

2.2 Tratamento dos animais com os químicos.

Os experimentos *in vivo* foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI, sob documento de aprovação com o número 081/14. Foram utilizados para os experimentos 80 camundongos (*Mus musculus*), da linhagem Swiss, albinos, com igual número de machos e fêmeas, pesando entre 25 a 30 g, com aproximadamente 2 meses

de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias - CCA da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a 22 ± 1 °C, com livre acesso à ração tipo pellets (Purina®) e água, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas cada. Os animais foram divididos em 8 tipos de tratamento e o período de exposição aos antineoplásicos foi definido com base na meia-vida dos fármacos, aproximadamente: 7 h para CPA e 48 h para DOX (**Tabela 1**).

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

Grupos	Tratamentos	n de animais #
<i>Controle Negativo</i>	Sem tratamento	<i>n = 10</i>
<i>Controle Positivo</i>	CPA: 20 mg/kg	
	DOX 2 mg/kg Protocolo AC: 2/20 mg/kg	
<i>Grupos Teste</i>	PR 100 UI/kg	
	CPA + PR 100 UI/kg	
	DOX + PR 100 UI/kg	
	AC + PR 100 UI/kg	

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

2.3 Teste cometa em medula óssea de camundongos *Mus musculus*

Os antineoplásicos, DOX e CPA e o antioxidante PR foram administrados por via intraperitoneal. Após os testes, os animais foram eutanasiados pela administração de pentobarbital sódico (150 mg/kg). O teste cometa foi realizado segundo Hartmann et al (2003) e Uno et al (2015), a partir da obtenção de células da medula óssea de camundongos *Mus musculus*. 10 µL das amostras de medula óssea foi misturado a 90 µL de agarose *low melting* (com baixo ponto de fusão) a 0,75% sob uma temperatura de 37°C. O homogenato foi disposto sobre lâminas de pré-cobertura com agarose sob ponto de fusão normal a 0,75%, cobertas com lamínulas (24 x 60 mm), e mantidas em temperatura ambiente até a solidificação. Retirou-se a lamínula e mergulhou-se a lâmina em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) a 4°C e protegida da luz, por 72 horas. Em seguida, realizou-se a corrida de eletroforese com a solução de eletroforese (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13), sob banho de gelo para a manutenção da temperatura em torno de 4°C, por 20 minutos, para o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição

dos sítios alcalino-lábeis. A eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA, por 20 minutos na presença de luminárias com baixo comprimento de onda. Posteriormente, as lâminas foram retiradas da cuba de eletroforese e mergulhadas na solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos; e expostas por 10 minutos, à solução fixadora (Ácido tricloroacético 15%, Sulfato de zinco heptahidratado 5%, e Glicerol 5%). Após secas, as lâminas foram coradas com solução de Nitrato de Prata (0,02%) e lavadas com água destilada por 3 vezes. Adicionou-se a solução de parada (ácido acético) por 5 minutos, lavou-se as lâminas 3 vezes com água destilada, sendo estas deixadas em bandejas para secagem em temperatura ambiente. Para cada grupo, $n = 5$, foram fotografadas 100 células por lâmina, sendo 2 lâminas por animal. A avaliação foi realizada a partir da análise do tamanho e intensidade de degradação e arraste do material genético, onde 5 classes de danos foram identificadas: classe 0, material genético sem dano ou intacto; classe 1, classe 2; classe 3; até o máximo de dano, classe 4. Por fim, calculou-se o índice de dano (ID), variando de 0 a 400, segundo a fórmula:

$$ID = \sum 0x(C0) + 1x(C1) + 2x(C2) + 3x(C3) + 4x(C4)$$

Nota: “**C0**” representa o número de núcleos em Classe 0, “**C1**” representa o número de núcleos em Classe 1, “**C2**” representa o número de núcleos em Classe 2, “**C3**” representa o número de núcleos em Classe 3 e “**C4**” representa o número de núcleos em Classe 4; em 100 núcleos avaliados. Também foi calculada a frequência de dano (FD), variando de 0 a 100%, segundo a fórmula: $FD = 100\% - \text{danos de classe 0}$.

$$FD (\%) = 100 - C0$$

Nota: “**C0**” representa o número de células em Classe 0, em 100 núcleos avaliados.

*2.4 Teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongos *Mus musculus**

Os dois ossos fêmurais de cada roedor foram retirados e lavados internamente com soro bovino fetal (20%), para lavagem da medula óssea. 25 μ L da suspensão celular foram direcionados a lâminas de vidro, para fixação e coloração com Giemsa 10%. A análise microscópica sob o aumento de 1000 X considerou os danos nucleares presentes em 1000 células/lâmina. Teste foi realizado em duplicata.

2.5 Cálculo da relação eritrocítica em medula óssea

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

$$\text{Relação Eritrocítica} = \frac{EPC}{ENC + EPC}$$

2.6 Modulação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos da CPA, DOX e protocolo AC pela influência do palmitato de retinol

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

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

Legenda: “**X**” representa os valores para cada tipo de danos induzidos pelos quimioterápicos, e “**Y + PR**” representa os valores dos danos toxicogenéticos induzidos pelos quimioterápicos quando associados ao palmitato de retinol.

2.7 Análise estatística

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

3 Resultados e Discussão

3.1 Avaliação antigenotóxica do PR frente a CPA, DOX e protocolo AC.

O teste cometa, quando realizado sob pH alcalino recebe esta denominação por avaliar através de uma técnica eletroforética a presença de quebras nas moléculas de DNA, de lesões em sítios alcalino-sensíveis e em sítios de reparo por excisão incompleta, em células de mamífero. Por ser um teste aplicável para o controle de inúmeros tipos de substâncias, como fármacos já em comercialização, o teste cometa representa uma versatilidade no monitoramento de protocolos terapêuticos para mensuração do potencial genotóxico de drogas isoladas ou em associação (CASH et al., 2014). Devido aos fatores ligados as ações tóxicas da doxorubicina e da ciclofosfamida, este trabalho aponta, através da análise das classes de danos estruturais sobre o material genético de células sadias de medula óssea de *Mus musculus*, a genotoxicidade da CPA, DOX, e do protocolo AC pelo significativo aumento ($P < 0,001$) do índice e da frequência de danos genotóxicos nas células analisadas quando comparadas ao grupo de animais não tratados com os mesmos quimioterápicos (**Tabela 2**).

A genotoxicidade é um termo geral empregado ao potencial lesivo de compostos endógenos ou exógenos sobre a conformação morfo-funcional do ácido desoxirribonucléico (DNA). Metabólitos de bioprodutos, modificações espontâneas da base nitrogenada, radiações ultra-violetas, radiações ionizantes e agentes químicos são fontes de danos ao material genético, que quando não corrigidos pelos mecanismos intrínsecos de reparo tornam-se mutágenos cruciais para o comprometimento da estabilidade genômica (ABBOTTS; THOMPSON; MADHUSUDAN, 2014). Os efeitos antitumorais dos quimioterápicos apresentam grande habilidade de causar danos ao material genético. Esses efeitos lesivos estão relacionados principalmente a ação de radicais livres, agentes alquilantes a molécula de DNA, a inibição da atividade de enzimas relacionadas a divisão celular, como as topoisomerases e a inibição farmacológica dos mecanismos de reparo de danos sobre o DNA, o que pode resultar na indução à morte celular (ABBOTTS; THOMPSON; MADHUSUDAN, 2014; YARD et al., 2016).

Tabela 2. Avaliação antigenotóxica do PR diante dos danos genotóxicos induzidos por ciclofosfamida (CPA), doxorubicina (DOX), e protocolo AC (CPA + DOX), e a modulação destes pelo palmitato de retinol (PR) em medula óssea de *Mus musculus* por meio da aplicação do teste cometa.

		<i>Genotoxicidade</i> #		
		<i>Tratamentos</i>	<i>Índice de Dano (0-400)</i>	<i>Frequência de Dano (0-100%)</i>
Machos	Sem tratamento		13,80 ± 0,86	5,40 ± 0,51
	PR 100 UI/kg		20,20 ± 0,33	9,10 ± 0,24
	CPA 20 mg/kg		260,54 ± 1,62 ^a	96,80 ± 1,98 ^a
	CPA+PR		118,70 ± 3,99 ^{a,b}	45,90 ± 1,88 ^{a,b}
	DOX 2 mg/kg		262,54 ± 8,96 ^a	96,75 ± 1,82 ^a
	DOX+PR		147,30 ± 4,75 ^{a,c}	51,80 ± 0,95 ^{a,c}
	AC 2/20 mg/kg		309,26 ± 11,40 ^a	97,00 ± 1,30 ^a
	AC + PR		170,40 ± 7,24 ^{a,d}	65,40 ± 1,13 ^{a,d}
Fêmeas	Sem tratamento		13,20 ± 0,97	5,40 ± 0,51
	PR 100 UI/kg		20,90 ± 0,85	9,40 ± 0,57
	CPA 20 mg/kg		292,54 ± 9,20 ^a	97,60 ± 1,60 ^a
	CPA+PR		118,30 ± 3,29 ^{a,b}	44,80 ± 1,25 ^{a,b}
	DOX 2 mg/kg		260,54 ± 25,34 ^a	97,00 ± 1,84 ^a
	DOX+PR		141,00 ± 6,62 ^{a,c}	51,10 ± 1,82 ^{a,c}
	AC 2/20 mg/kg		252,26 ± 20,15 ^a	97,60 ± 1,28 ^a
	AC + PR		168,30 ± 5,64 ^{a,d}	67,80 ± 2,11 ^{a,d}

#PR (100 UI/kg). CPA (20 mg/kg). DOX (2 mg/kg). Protocolo AC (DOX e CPA: 2/20 mg/kg). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. *n*=5. Valores significantes (MD±DP) de *P*<0,001 para ^a comparado ao grupo sem tratamento, ^b à CPA, ^c à DOX e ^d ao protocolo AC.

Os tratamentos em associação do PR com os quimioterápicos continuaram a induzir de forma significativa (*P*<0,001) danos genotóxicos em relação ao grupo não tratado com os quimioterápicos pelo aumento dos índices e frequências de danos, em medula óssea. Entretanto, o PR, na concentração de 100 UI/kg, reduziu de forma significativa (*P*<0,001) os efeitos genotóxicos dos antineoplásicos testados. A análise das classes de danos ao DNA, para determinação do ID (0-400) e FD (0-100%) em células não tumorais de medula óssea de roedores, tanto para camundongos machos quanto para fêmeas revelou um decréscimo do potencial genotóxico da CPA, da DOX e do protocolo de associação AC, quando estes fármacos sofreram influências do PR devido as interações químicas (**Tabela 2**).

A avaliação da influência do PR sobre a ação genotóxica dos antineoplásicos por meio da análise do ID no teste cometa em células de medula óssea de camundongos machos

demonstrou que as taxas MD±DP oscilaram, de $118,70 \pm 3,99$ a $170,40 \pm 7,24$, respectivamente, para a associação do PR com a CPA e com o protocolo AC. Para a análise da FD (%), a variação, também para machos foi de $45,90 \pm 1,88$ a $65,40 \pm 1,13$ para as mesmas interações medicamentosas. Na análise do índice de danos para *Mus musculus* fêmeas os valores de MD ± DP oscilaram, de $118,30 \pm 3,29$, para associação do PR com a CPA, a $168,30 \pm 5,64$, para associação do PR com o protocolo AC. Para a análise da frequência de danos, a variação também para fêmeas foi de $44,80 \pm 1,25$ a $67,80 \pm 2,11$ para as mesmas associações medicamentosas (**Tabela 2**).

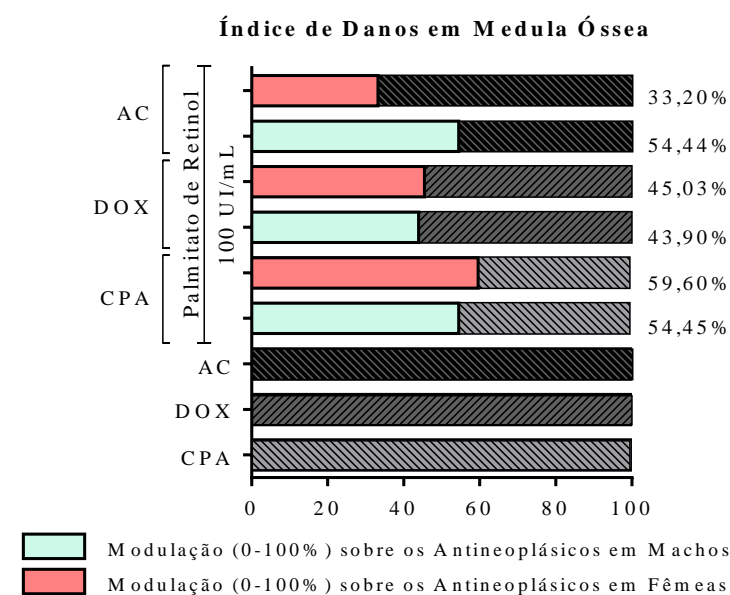
Os efeitos antigenotóxicos do PR modularam (0-100%) de forma significativa ($P < 0,001$) a ação de mecanismos genotóxicos, incluindo danos oxidativos, dos antineoplásicos sobre o DNA de medula óssea dos roedores independente do sexo do animal. Na análise da modulação do PR em células de medula óssea dos camundongos machos, o ID oscilou de 43,90%, na influência do palmitato de retinol sobre a DOX, a 54,45% na influência do PR sobre a CPA. Quanto a mesma análise em camundongos do sexo feminino, a oscilação foi de 33,20%, na associação do PR com o protocolo AC, a 59,60% na associação do PR com a CPA, levando-se em comparação ao fármaco isolado. Na avaliação da modulação do PR sobre a FD (%) em machos, a variação foi de 32,58%, na associação do PR com o protocolo AC, comparado ao protocolo isolado, a 52,59% na associação do PR com a CPA, comparando-se com o fármaco isolado. Quanto a análise da FD em camundongos fêmeas, o percentual de modulação variou de 30,54%, sobre o protocolo AC, a 54,10% levando-se conta a atenuação dos efeitos sobre a CPA isolada (**Figura 2**).

A quimioterapia gera intenso estresse genotóxico e danos diretos ao DNA de células não neoplásicas (**Tabela 2**). Os agentes quimioterápicos inibidores das topoisomerasas, usando NAD⁺ disponíveis, conseguem modificar proteínas responsáveis pelo reparo por excisão de bases, promovendo o acúmulo de danos ao material genético. Drogas desta classe, a exemplo da doxorrubicina, ainda desregulam a correta reparação de lesões dupla-fitas no DNA, o que pode acarretar em aneuploidias, aberrações genéticas e morte celular (KELLEY; LOGSDON; FISHEL, 2014). A terapia para o câncer, a partir do uso de mostardas nitrogenadas foi justificada principalmente após o fim da Primeira Guerra Mundial, onde a supressão da medula óssea, pela redução do número de glóbulos vermelhos foi detectada após a exposição a estes químicos. Não obstante, os agentes alquilantes ao DNA representam uma das classes mais

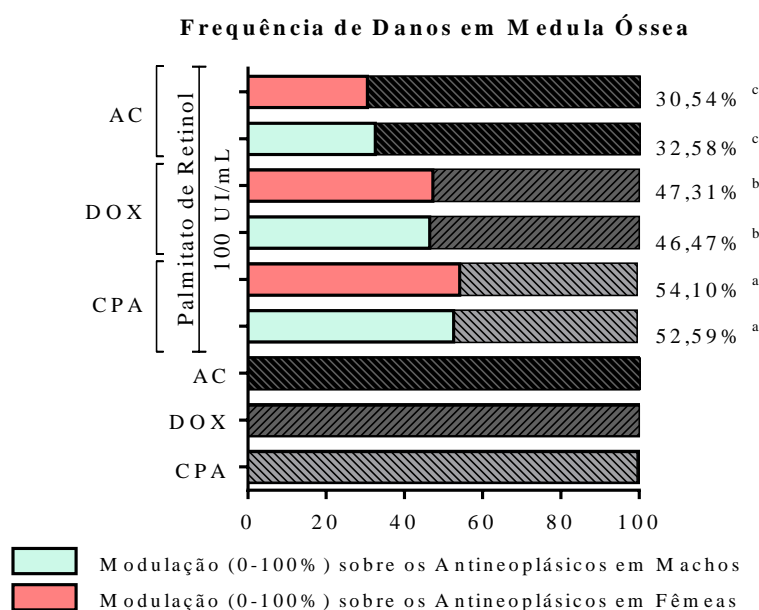
velhas de drogas antineoplásicas e são liberados pela FDA para o tratamento de neoplasias hematológicas, como leucemias e linfomas (TORGOVNICK; SCHUMACHER, 2015).

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

A



B

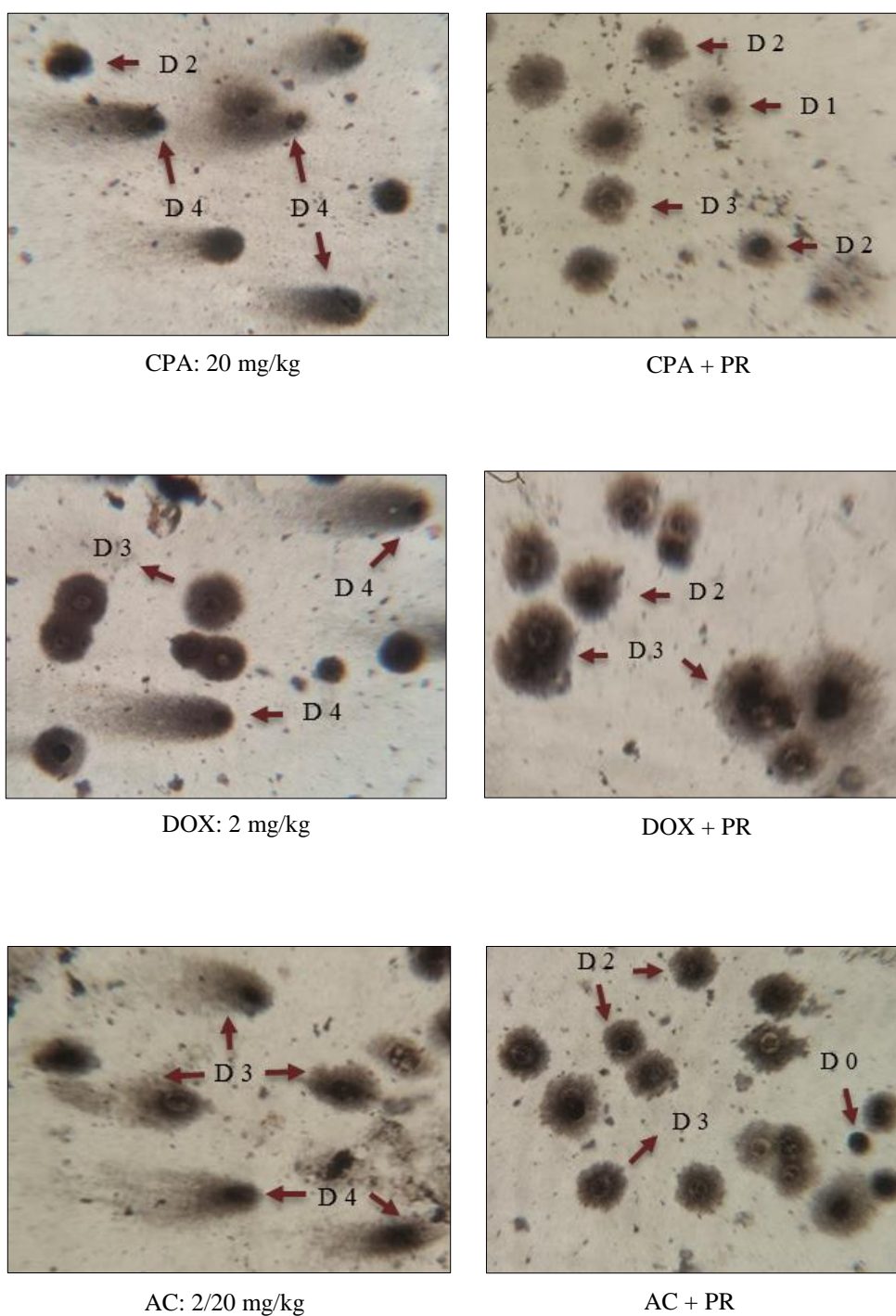


As drogas responsáveis por inserir grupos alquil em moléculas biológicas não agem especificamente sobre o DNA, também formam reativos intermediários no RNA, proteínas e lipídeos. Podem ser mono ou bifuncionais, sendo reativas a mais de um sítio ativo. Interferem durante todas as fases do ciclo celular, interagindo com vários grupos estruturais de bases púricas e pirimídicas, como N7 e O6 em guaninas; N1, N3, N6 e N7 em adeninas; N3 e O2 em citosinas; e em posições O2, N3, e O4 de timinas. Neste espectro, a atividade anticancerígena da ciclofosfamida apresenta grande potencial mutagênico, como corroborado com os dados apresentados por sua genotoxicidade sobre células hematológicas (**Tabela 2**) (KONDO et al., 2010; PUYO; MONTAUDON; POURQUIER, 2014).

Para avaliar o potencial genotóxico de substâncias e químicos em geral, a OECD assegura o teste cometa na versão alcalina (pH >13) como um teste eficiente em avaliar o risco de instabilidade genética em modelos de estudo *in vivo*. A intensidade da migração do material genético após a aplicação da eletroforese em gel de agarose, aponta a danificação seriada do DNA por meio da corrida protéica em inúmeros tecidos biológicos (**Figura 3**). O arraste do material analisado comprova lesões sobre a estrutura do material genético, pela ocorrência de mecanismos citotóxicos e mutagênicos/genotóxicos das substâncias testadas, capazes de diminuir a viabilidade das células em análise pela indução de apoptose e necrose celular (CASH et al., 2014; UNO et al., 2015).

A integridade do genoma, em células normais, após a exposição a agentes genotóxicos aponta uma eficiente sinalização de danos ao material genético, por meio de pontos de verificação em todo o ciclo celular e a existência de eficazes vias de reparação do próprio DNA lesionado. Com esta função os compostos vitamínicos são associados não apenas ao combate dos efeitos oxidativos de radicais livres, no citosol celular, para as vitaminas hidrossolúveis, e na proteção da peroxidação lipoprotéica, para as vitaminas lipossolúveis, mas também na proteção do material genético, tendo em vista que os radicais livres interagem fortemente com grupos nucleofílicos (BROUSTAS; LIEBERMAN, 2014). Frente a processos oxidativos em macromoléculas essenciais, a vitamina A recebe a influência de sinalizadores celulares para a sua metabolização. Os compostos derivados da estrutura do retinol, modulam inúmeros processos biológicos, incluindo a interferência sobre a funcionalidade do ciclo celular, sobre a diferenciação e proliferação de células, assim como a própria indução de morte celular por apoptose, resposta fisiológica comum a danos genotóxicos de grande intensidade (MARCATO et al., 2015).

Figura 3. Fotomicrografias apontando a ação antígenotóxica, do palmitato de retinol frente aos danos genotóxicos da ciclofosfamida, doxorrubicina, e do protocolo AC em células de medula óssea de *Mus musculus* analisadas por meio do teste cometa. PR: palmitato de retinol. CPA: ciclofosfamida. DOX: doxorrubicina. AC: protocolo de associação. D 0: dano 0. D 1: dano 1. D 2: dano 2. D 3: dano 3. D 4: dano 4. Coloração com nitrato de prata no teste cometa e análise microscópica de 100 células/lâmina sob o aumento de 400 X ao microscópio óptico. Teste realizado em duplicata.



O PR foi eficiente em modular os efeitos genotóxicos pelas diferenças observadas entre os tipos e intensidade de danos nucleares, como observados nas fotomicrografias (**Figura 3**). Alguns mecanismos de ação do PR podem possivelmente ser associados a sua interferência no estresse oxidativo e na indução de apoptoses foram inferidos devido ao uso do teste cometa na sua versão alcalina. Os antineoplásicos são indutores de apoptose celular, efeitos terapêuticos desejados no controle de neoplasias em paciente oncológicos. No entanto, existem relatos que podem determinar que o efeito antioxidante do PR tenha acentuado as etapas fisiológicas de reparação de fatores transcricionais e de danos a molécula de DNA, processos intensamente afetados pelos efeitos genotóxicos dos antineoplásicos (SASTRE-SERRA et al., 2010; WANG; DUSZA; LIM, 2010).

3.2 Avaliação antimutagênica e anticitotóxica do PR frente aos mecanismos tóxicos da CPA, DOX e protocolo AC.

A indução de micronúcleos pelos antineoplásicos foi significativa ($P < 0,001$) em relação ao grupo sem tratamento, para todos os grupos de animais expostos a ciclofosfamida, doxorrubicina e ao protocolo de associação entre os dois antineoplásicos. Evidenciou-se assim, o potencial mutagênico dos quimioterápicos. No entanto, enfatizamos a ação antimutagênica do PR, pela significativa ($P < 0,05$) redução da quantificação de MN em células de medula óssea de camundongos indicando seus possíveis efeitos antineogênicos e anticlastogênicos (**Tabela 3**).

A pesquisa em genética toxicológica surge como um campo relativamente novo, mas essencial dentro da análise e controle de medicamentos. Vale ressaltar que este campo vai bem além da análise de toxicidade aguda e crônica de compostos, apresentando inclusive relação direta com o campo da citogenética como base para a mensuração de interferências induzidas sobre a estrutura tridimensional e funcional do material genético, o que pode gerar efeitos não silenciosos aos organismos (TORRES-BUGARÍN et al., 2014). Os quimioterápicos, quando ativados metabolicamente induzem a formação de radicais livres, que ao interagirem com moléculas de oxigênio geram radicais superóxido. Estes, interagem com o peróxido de hidrogênio e formam radicais hidroxila altamente reativos a componentes de membranas celulares, lipoproteínas, carboidratos, RNA e DNA. Processos oxidativos que caracterizam o potencial citotóxico e mutagênico da doxorrubicina e da ciclofosfamida (POWIS, 1989; FURTADO et al., 2008), como averiguados neste trabalho (**Tabela 3**).

Tabela 3. Avaliação da ação antimutagênica e anticitotóxica do palmitato de retinol frente a ação tóxica induzida por ciclofosfamida (CPA), doxorubicina (DOX), e protocolo AC (CPA + DOX) em células de medula óssea não tumorais de *Mus musculus* por meio do teste de micronúcleos (MN).

<i>Mutagenicidade e Citotoxicidade</i> [#]			
	<i>Tratamentos</i>	<i>Micronúcleos</i>	<i>EPC/EPC+ENC</i>
<i>Machos</i>	Sem tratamento	1,80 ± 0,37	0,84 ± 0,01
	PR 100 UI/kg	2,00 ± 0,32	0,82 ± 0,01
	CPA 20 mg/kg	11,20 ± 0,58 ^a	0,43 ± 0,01 ^a
	CPA+PR	6,20 ± 0,37 ^{a,b}	0,64 ± 0,02 ^{a,b}
	DOX 2 mg/kg	12,80 ± 0,66 ^a	0,44 ± 0,01 ^a
	DOX+PR	8,00 ± 0,70 ^{a,c}	0,63 ± 0,01 ^{a,c}
	AC 2/20 mg/kg	16,00 ± 0,70 ^a	0,47 ± 0,01 ^a
	AC + PR	12,80 ± 0,86 ^{a,d}	0,64 ± 0,02 ^{a,d}
<i>Fêmeas</i>	Sem tratamento	1,40 ± 0,25	0,85 ± 0,01
	PR 100 UI/kg	2,20 ± 0,20	0,83 ± 0,01
	CPA 20 mg/kg	10,40 ± 0,25 ^a	0,36 ± 0,01 ^a
	CPA+PR	5,80 ± 1,16 ^{a,b}	0,65 ± 0,02 ^{a,b}
	DOX 2 mg/kg	11,60 ± 0,51 ^a	0,44 ± 0,02 ^a
	DOX+PR	8,20 ± 0,86 ^{a,c}	0,62 ± 0,02 ^{a,c}
	AC 2/20 mg/kg	16,00 ± 1,05 ^a	0,52 ± 0,01 ^a
	AC + PR	12,60 ± 0,98 ^{a,d}	0,63 ± 0,02 ^{a,d}

[#]PR (100 UI/kg). CPA (20 mg/kg). DOX (2 mg/kg). Protocolo AC (DOX e CPA: 2/20 mg/kg). Relação entre o número de eritrócitos policromáticos e a soma de eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) em 400 células analisadas (EPC/EPC+ENC). ANOVA-One-way e pós-teste de *Bonferroni*. *n*=5. Valores significantes (MD±DP) de *P*<0,05 para ^a comparado ao grupo sem tratamento, ^b à CPA, ^c à DOX e ^d ao protocolo AC.

O DNA lesionado segue obrigatoriamente três vias fisiológicas a depender da funcionalidade dos mecanismos endógenos relacionados a reparação de danos no material genético. Na ausência de reparo dos danos sobre o DNA, o mesmo perde as atividades que seriam conferidas após a codificação genética daquele segmento. Caso o reparo seja incorreto, mutações podem ser geradas, por exemplo, pelo mal pareamento de bases nitrogenadas. Entretanto, quando o sistema de reparo responde corretamente, o DNA é completamente restaurado (FENECH, 2007; TORRES-BUGARÍN et al., 2014).

As alterações relacionadas a danos ao material genético mais comuns são aquelas que não modificam a quantidade de cromossomos de uma célula, mas podem originar cromossomos

anormais. Nesse sentido, quebras e ampliações do DNA podem ser facilmente detectadas por meio de técnicas citogenéticas em inúmeros modelos de estudo, *ex vivo* e *in vivo*. Nesse contexto, o teste de micronúcleos (MN) é eficiente na detecção de efeitos aneugênicos e clastogênicos por meio da avaliação de anormalidades nucleares induzidas por mutágenos, indutores de alterações estruturais ao DNA passíveis de serem herdadas por novas células durante a divisão celular, em variados tecidos celulares (EL-ZEIN et al., 2014; BOLOGNESI et al., 2015).

A atividade antioxidante do PR, possivelmente, promoveu significantes percentuais de modulações ($P < 0,05$) dos efeitos mutagênicos da ciclofosfamida, da doxorubicina e do protocolo de associação entre estes. O decréscimo da incidência de MN em células não tumorais de medula óssea foi significativo independente do sexo do animal, no qual o percentual de modulação sobre os efeitos mutagênicos variou de 20,00% a 44,64%, para animais machos, e de 21,25% a 44,23%, para fêmeas de *Mus musculus*, caracterizando o potencial antimutagênico do composto frente aos danos cromossômicos dos quimioterápicos (Figuras 4 e 5). Os MN encontrados em eritrócitos de medula óssea são originados pela ocorrência de fragmentações nos cromossomos, não incorporadas pelo núcleo das novas células, logo após a citocinese celular (LUZ et al., 2012).

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

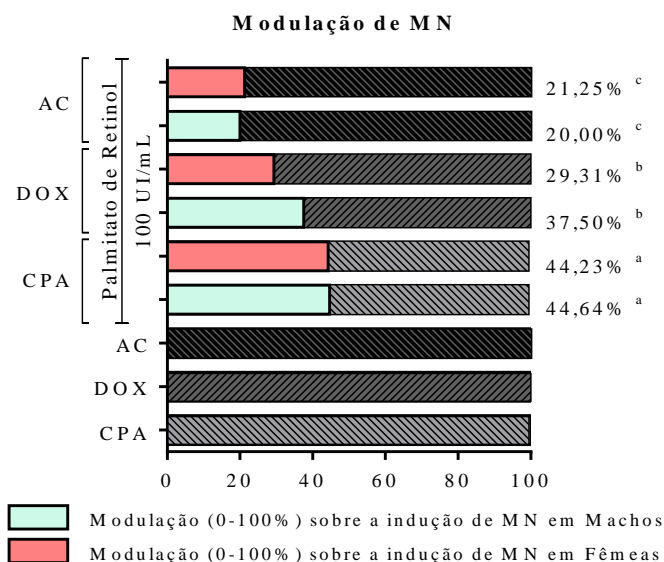
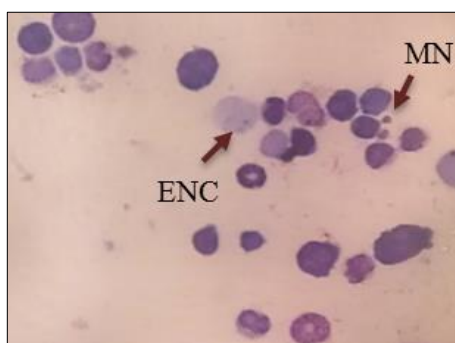
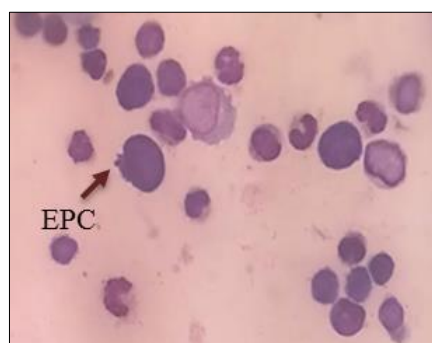


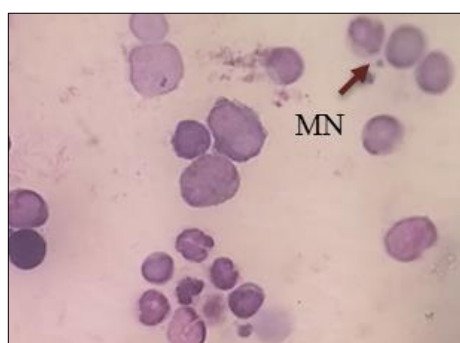
Figura 5. Fotomicrografias apontando a ação antimutagênica e anticitotóxica do palmitato de retinol frente aos efeitos tóxicos da ciclofosfamida, doxorrubicina, e do protocolo AC em células de medula óssea de *Mus musculus* analisadas por meio do teste de micronúcleo. PR: palmitato de retinol. CPA: ciclofosfamida. DOX: doxorrubicina. AC: protocolo de associação. MN: micronúcleo. ENC: eritrócito normocromático. EPC: eritrócito policromático. Coloração com Giemsa a 10% no teste de micronúcleo e análise microscópica de 1000 células/lâmina sob o aumento de 1000X ao microscópio óptico. Teste realizado em duplicata.



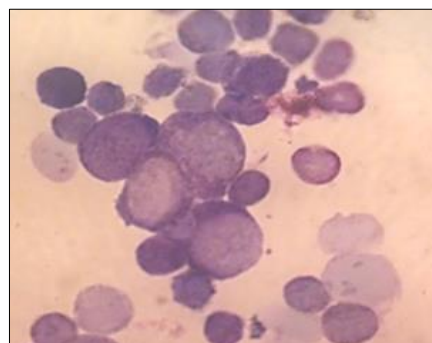
CPA: 20 mg/kg



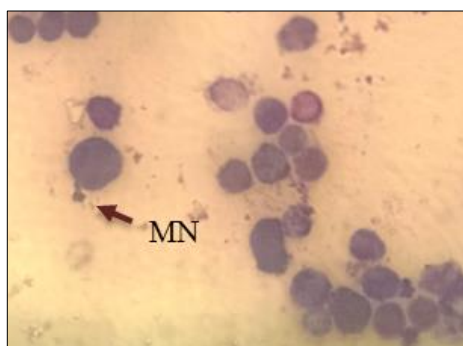
CPA + PR



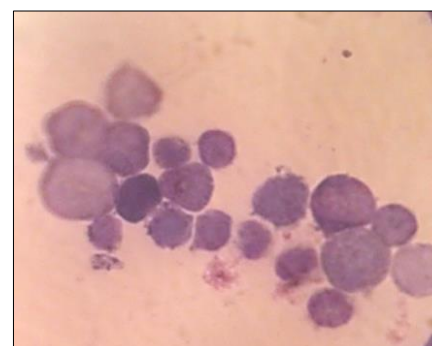
DOX: 2 mg/kg



DOX + PR



AC: 2/20 mg/kg



AC + PR

Devido a seus potenciais efeitos citotóxicos, os antineoplásicos, mesmo em células não tumorais promoveram significantes ($P < 0,05$) decréscimos da relação *EPC/EPC+ENC* em células de medula óssea em comparação ao grupo sem tratamento quimioterápico (**Tabela 3**). A interferência sobre a relação entre células jovens da linhagem eritróide da medula óssea, avaliada pela quantificação dos números de eritrócitos policromáticos em relação ao número total de eritrócitos, soma dos eritrócitos normocromáticos e policromáticos, apresenta uma eficiente representatividade da indução de danos tóxicos a linhagens celulares hematológicas (FURTADO et al., 2008; LUZ et al., 2012).

A citotoxicidade é determinada como uma propriedade nociva de um composto em relação à células. O efeito tóxico que tem capacidade de interferir sobre o metabolismo de linhagens celulares, por meio de estudos *ex vivo*; ou em células teciduais, em estudos *in vivo*, alterando a sua proliferação e viabilidade celular, confere a um agente o potencial caracterizado citotóxico. Drogas citotóxicas podem influenciar sobre a maturação e diferenciação de células, desencadeando ou não em resposta fisiológica para morte celular. CPA e DOX são drogas comprovadamente tóxicas a células sanguíneas. Causam leucopenia, neutropenia e trombocitopenia, o que compromete a homeostase corporal principalmente pelo acometimento de desordens funcionais imuno-hematológicas (FERRARI et al., 2010; CECILIO et al., 2015).

Todavia, o PR protegeu as células sadias de camundongos dos efeitos citotóxicos dos quimioterápicos testados, pelo significativo ($P < 0,05$) aumento da relação hematológica, assim como dos efeitos mutagênicos dos mesmos antineoplásicos. Derivados sintéticos da vitamina A, com o ATRA, exercem influência sobre a diferenciação de células mielóides e induzem uma proteção óssea (BEHR et al., 2012; ZHANG et al., 2014). O PR, comumente aplicado em produtos farmacêuticos na cosmética e estética, apresenta efeito antioxidante comprovado na proteção de células da derme e epiderme contra o envelhecimento precoce (OLIVEIRA et al., 2014; IBRAHIM et al., 2016). A vitamina A e os retinóides ainda exercem outras atividades de destaque, como interação a receptores nucleares, por meio da ativação ou bloqueio da expressão de genes-alvo; ou a regulação da sinalização de vias dependentes da fosforilação alvo-específica, por meio da regulação de eventos celulares não dependentes de regulação gênica, mas associados a ação de fosfatases e proteínas quinases. Resultando em respostas celulares variadas a inúmeros tipos de estímulos (NAPOLI, 2012; EVANS; MANGELSDORF, 2014; LOO-BOUWMAN; NABER; SCHAAFSMA, 2014).

Tendo em vista a atuação destes compostos na homeostase corporal, pode-se compreender a ação protetora do PR frente aos efeitos tóxicos dos antineoplásicos analisados neste estudo em células hematopoiéticas de camundongos *Mus musculus*. Os retinóides, micronutrientes essenciais, derivados da vitamina A, em aplicações clínicas apresentam relação direta com a regulação ou hiperestimulação do estado redox mitocondrial e parâmetros bioenergéticos. Os compostos associados a vitamina A atuam sobre o ciclo celular, indução do estresse oxidativo e nitrosativo, disfunção mitocondrial e apoptose celular em variados modelos de estudo experimentais. Entretanto seus mecanismos de ação não são claros e específicos (O'REILLY; BAILEY; LANE, 2008; OLIVEIRA, 2015). A administração e/ou ingestão suplementar de vitaminas, naturais ou nutracêuticas pode representar uma alternativa clínica-nutricional no combate a agressividade dos antineoplásicos durante a quimioterapia. Entretanto, a probabilidade da indução de efeitos sinérgicos destes compostos quando associados aos quimioterápicos ainda comprova a ausência de um consenso literário e clínico que corrobore na segurança terapêutica desta proposta (CENCIC; CHINGWARU, 2010; ALENCAR et al., 2016).

Muito embora os efeitos antioxidantes dos compostos associados a vitamina A sejam extremamente discutidos, existem relatos que o PR também possa apresentar efeitos pró-oxidativos, quando ativos em meio a exposição a luz. Foto-genotoxicidade, foto-mutagenicidade, foto-citotoxicidade e foto-carcinogenicidade já foram detectados como efeitos oxidantes do palmitato de retinol em variados modelos de estudo (DUFOUR et al., 2009; MEI et al., 2009; IBRAHIM et al., 2016). Portanto, a funcionalidade de cada composto associado ao retinol, dentre outros fatores, depende da especificidade de sua identificação molecular e de sua responsividade ao combate de radicais livres, ERO's: ânion superóxido, radicais hidroxila e hidroperoxila contra grupos orgânicos, como o material genético (ZEEGERS; GOLDBOHM; VAN DEN BRANDT, 2001; DOLDO et al., 2015). Nesse contexto, não apenas atividades benéficas dos precursores, metabólitos ou derivados da vitamina A, sobre sistemas biológicos são evidenciadas e comprovadas em pesquisas científicas.

A suplementação ou a carência de compostos retinóides promove não apenas efeitos antioxidantes, em linhagens celulares ou organismos vivos, o que depende da dose/concentração usada, do tecido-alvo de escolha, dos modelos de experimentação, como também das interações medicamentosas que possam configurar efeitos sinérgicos ou antagônicos sobre o estado redox corporal. Fatos que exprimem cautela na administração/incorporação do palmitato de retinol como agente atenuante do estresse

oxidativo promovido por quimioterápicos durante terapias oncológicas (SCHNORR et al., 2011; IBRAHIM et al., 2016).

4 Conclusão

Os biomarcadores citogenéticos indicados pelos testes cometa (índice e frequência de danos ao DNA) e de micronúcleos (aneuploidia e/ou clastogenia) foram eficientes no estudo toxicogenético da ciclofosfamida (CPA), da doxorubicina (DOX) e do protocolo AC sobre camundongos. Entretanto, o PR ($C_{36}H_{60}O_2$) uma variação da vitamina A modulou os danos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos dos quimioterápicos em medula óssea de *Mus musculus*. Os dados obtidos apontam que o PR tem ação: (1) antigenotóxica, por possíveis mecanismos antioxidantes; (2) antimutagênicas, por prováveis efeitos anticlastogênicos e/ou antianeugênicos e (3) anticitotóxica, como evidenciado pela interferência na relação entre eritrócitos normocromáticos e policromáticos. Portanto, os resultados corroboram com os alvos clínico-terapêuticos buscados durante terapias oncológicas. No entanto, o envolvimento de vitaminas antioxidantes, sobre a regulação do estado redox, torna a incorporação destes compostos uma incógnita quanto a segurança da ausência de efeitos sinérgicos aos próprios quimioterápicos. Esses possíveis mecanismos de ação do PR precisam ser melhor compreendidos, inicialmente em estudos não clínicos, principalmente durante o período de meia-vida dos quimioterápicos, onde podem ser ocasionados prejuízos a eficácia da quimioterapia e do prognóstico oncológico.

Referências

- ABBOTTS, R.; THOMPSON, N.; MADHUSUDAN, S. DNA repair in cancer: emerging targets for personalized therapy. **Cancer Management and Research**, v. 6, p. 77–92, 2014.
- AKYIL, D.; KONUK, M. Detection of genotoxicity and mutagenicity of chlorthiophos using micronucleus, chromosome aberration, sister chromatid exchange, and Ames tests. **Environmental Toxicology**, v. 30, n. 8, p. 937-945, 2015.
- ALENCAR, M. V. O. B.; ISLAM, MD. T.; ROCHA, L. M. C.; QUEIROZ, J. L.; SILVA, M. B. S.; MATA, A. M. O. F. et al. Ascorbic Acid Modulates Doxorubicin and Cyclophosphamide-Induced Cytogenetic Damages in Sarcoma 180 Cells. **International Archives of Medicine**, v. 9, n. 181, 2016.
- BA-SANG, D. Z.; LONG, Z. W.; TENG, H.; ZHAO, X. P.; QIU, J.; LI, M. S. A network meta-analysis on the efficacy of sixteen targeted drugs in combination with chemotherapy for treatment of advanced/metastatic colorectal cancer. **Oncotarget**, 2016.
- BEHR, G. A.; SCHNORR, C. E.; SIMÕES-PIRES, A.; MOTTA, L. L.; FREY, B. N.; MOREIRA, J. C. F. Increased cerebral oxidative damage and decreased antioxidant defenses in ovariectomized and sham-operated rats supplemented with vitamin A. **Cell Biology and Toxicology**, v. 28, p. 317–330, 2012.
- BOLOGNESI, C.; KNASMUELLER, S.; NERSESYAN, A.; FENECH, M. F. et al. The HUMNxl scoring cells types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – na update and expanded photogallery. **Mutation Research**, v. 753, n. 2, p. 100-113, 2013.
- BOLOGNESI, C.; BONASSI, S.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M.; BRUZZONE, M.; LANDO, C.; CEPPI, M. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 766, p. 20-31, 2015.
- BROUSTAS, C. G.; LIEBERMAN, H. B. DNA Damage Response Genes and the Development of Cancer Metastasis. **Radiation Research**, v. 181, p. 111–130, 2014.
- BROWN, C. An Elusive Cancer Target. **Nature**, v. 537, 2016.
- CASH, S. W.; BERESFORD, S. A. A.; VAUGHAN, T. L.; HEAGERTY, P. J.; BERNSTEIN, L.; WHITE, E.; NEUHOUSER, M. L. Recent physical activity in relation to DNA damage and repair using the comet assay. **Journal of Physical Activity and Health**, v. 11, n.4, p. 770–776, 2014.
- CECILIO, A. P. TAKAKURA, E. T.; JUMES, J. J.; SANTOS, J. W.; HERRERA, A. C.; VICTORINO, V. J.; PANIS, C. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 7, p. 43–49, 2015.
- CENCIC, A.; CHINGWARU, W. The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health. **Nutrients**, v. 2, p. 611-625, 2010.

- CHENNURU, A.; SALEEM, M. T. S. Antioxidant, Lipid Lowering, and Membrane Stabilization Effect of Sesamol against Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Experimental Rats. **BioMed Research International**, 2013.
- DOLDO, E.; COSTANZA, G.; AGOSTINELLI, S.; TARQUINI, C.; FERLOSIO, A.; ARCURI, G.; PASSERI, D.; SCIOLI, M. G.; ORLANDI, A. Vitamin A, Cancer Treatment and Prevention: The New Role of Cellular Retinol Binding Proteins. **Biomed Research International**, p. 1–14, 2015.
- DUFOUR, E. K.; WHITWELL, J.; NOHYNEK, G. J.; KIRKLAND, D.; TOUTAIN, H. Retinyl palmitate is non-genotoxic in Chinese hamster ovary cells in the dark or after pre-irradiation or simultaneous irradiation with UV light. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 672, n. 1, p. 21–26, 2009.
- EL-ZEIN, R. A.; LOPEZ, M. S.; D'AMELIO JR, A. M.; LIU, M.; MUNDEN, R. F., CHRISTIANI, D.; SU, L.; TEJERA-ALVERAZ, A.; ZHAI, R.; SPITZ, M. R.; ETZEL C. J. The Cytokinesis Blocked Micronucleus Assay as a Strong Predictor of Lung Cancer: Extension of a Lung cancer risk prediction model. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 23, n°. 11, p. 2462–2470, 2014.
- EMADI, A.; JONES, R. J.; BRODSKY, R. A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 6, p. 638-647, 2009.
- EVANS, R. M.; MANGELSDORF, D. J. Nuclear receptors, RXR, and the big bang. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 255–266, 2014.
- FARSI, D. J. Children Undergoing Chemotherapy: Is It Too Late for Dental Rehabilitation? **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 40, n. 6, p. 503-505, 2016.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1084-1104, 2007.
- FERRARI, S.; PALMERINI, E.; ALBERGHINI, M.; STAALS, E.; MERCURI, M.; BARBIERI, E. et al. Vincristine, doxorubicin, cyclophosphamide, actinomycin D, ifosfamide, and etoposide in adult and pediatric patients with nonmetastatic Ewing sarcoma. Final results of a monoinstitutional study. **Tumori Journal**, v. 96, n. 2, p. 213-218, 2010.
- FURTADO, M. A.; ALMEIDA, L. C. F.; FURTADO, R. A.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 657, p. 150-154, 2008.
- HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2003.
- HASSAN, L. E. A.; DAHAM, S. S.; SAGHIR, S. A. M.; MOHAMMED, A. M. A.; ELTAYEB, N. M.; MAJID, A. M. S. A; MAJID, A. S. A. Chemotherapeutic potentials of the stem bark of *Balanite aegyptiaca* (L.) Delile: an antiangiogenic, antitumor and antioxidant agent. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 396, 2016.

IBRAHIM, T.; ROUBY, M. N. E.; AL-SHERBINI, E. S. A. M.; NOURY, A. H. E.; MORSY, M. E. Photodecomposition, photomutagenicity and photocytotoxicity of retinyl palmitate under He–Ne laser photoirradiation and its effects on photodynamic therapy of cancer cells in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 316–322, 2016.

INCA. **Controle do Câncer: Uma proposta de integração ensino serviço**. 3ª ed. Rio de Janeiro: INCA, 1999.

KELLEY, M. R.; LOGSDON, D.; FISHEL, M. L. Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? **Future Oncology**, v. 10, n. 7, p. 1215–1237, 2014.

KONDO, N.; TAKAHASHI, A.; ONO, K.; OHNISHI, T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. **Journal of Nucleic Acids**, 543531, 2010.

LOO-BOUWMAN, C. A. V.; NABER, T. H. J.; SCHAAFSMA, G. A review of vitamin A equivalency of β -carotene in various food matrices for human consumption. **The British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 12, p. 2153–2166, 2014.

LUZ, A. C.; PRETTI, I. R.; DUTRA, J. C. V.; BATITUCCI, M. C. P. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste *in vivo*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 635–642, 2012.

MARCATO, P.; DEAN, C. A.; LIU, R. Z.; COYLE, K. M.; BYDOUN, M.; WALLACE, M. et al. Aldehyde dehydrogenase 1A3 influences breast cancer progression via differential retinoic acid signaling. **Molecular Oncology**, v. 9, p. 17–31, 2015.

MEI, NAN.; CHEN, T.; GODAR, D. E.; MOORE, M. M. UVA-induced photomutagenicity of retinyl palmitate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 677, p. 105–106, 2009.

NAPOLI, J. L. Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta—Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 1, p. 152–167, 2012.

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

OLIVEIRA, M. R.; OLIVEIRA, M. W. S.; LORENZI, R.; ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C. F. Short-term vitamin A supplementation at therapeutic doses induces a pro-oxidative state in the hepatic environment and facilitates calcium-ion-induced oxidative stress in rat liver mitochondria independently from permeability transition pore formation. **Cell Biol Toxicol.**, v. 25, p. 545–560, 2009.

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

OLIVEIRA, M. R. Vitamin A and Retinoids as Mitochondrial Toxicants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015.

- O'REILLY, K.; BAILEY, S. J.; LANE, M. A. Retinoid-mediated regulation of mood: possible cellular mechanisms. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 3, p. 251–258, 2008.
- POWIS, G. Free radical formation by antitumor quinines. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 6, p. 63–101, 1989.
- PUYO, S.; MONTAUDON, D.; POURQUIER, P. From old alkylating agents to new minor groove binders. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 89, n. 1, p. 43–61, 2014.
- 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 and Medicine**, v. 48, n. 4, p. 506–512, 2010.
- SCHNORR, C. E.; SILVA MORRONE, M.; SIMÕES-PIRES, A.; ROCHA, R. F.; BEHR G. A.; MOREIRA, J. C. Vitamin A supplementation in rats under pregnancy and nursing induces behavioral changes and oxidative stress upon striatum and hippocampus of dams and their offspring. **Brain Research**, v. 1369, p. 60–73, 2011.
- TORRES-BUGARÍN, O.; ZAVALA-CERNA, M. G.; NAVA, A.; FLORES-GARCÍA, A.; RAMOS-IBARRA, M. L. Potential Uses, Limitations, and Basic Procedures of Micronuclei and Nuclear Abnormalities in Buccal Cells. **Disease Markers**, 2014.
- TORGOVNICK, A.; SCHUMACHER, B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. 157, 2015.
- WANG, S. Q.; DUSZA, S. W.; LIM, H. W. Safety of retinyl palmitate in sunscreens: A critical analysis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, p. 903–906, 2010.
- UNO, Y.; KOJIMAB, H.; OMORIC, T.; CORVID, R.; HONMAB, M.; SCHECHTMA, L. M. et al. JaCVAM-organized international validation study of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for detection of genotoxic carcinogens: II. Summary of definitive validation study results. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 786–788, p. 45–76, 2015.
- YARD, B. D.; ADAMS, D. J.; CHIE, E. K.; TAMAYO, P.; BATTAGLIA, J. S.; GOPAL, P. et al. A genetic basis for the variation in the vulnerability of cancer to DNA damage. **Nature Communications**, v. 7, 2016.
- ZEEGERS, M. P.; GOLDBOHM, R. A.; VAN DEN BRANDT, P. Are retinol, vitamin C, vitamin E, folate and carotenoids intake associated with bladder cancer risk? Results from the Netherlands Cohort Study. **British Journal of Cancer**, v. 85, n. 7, p. 977–983, 2001.
- ZHANG, L.; ZHOU, Q.; ZHANG, N.; LI, W.; YING, M.; DING, W.; YANG, B.; HE, Q. E2F1 impairs all-trans retinoic acid-induced osteogenic differentiation of osteosarcoma via promoting ubiquitination-mediated degradation of RAR α . **Cell Cycle**, v. 13, p. 1277–1287, 2014.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os antineoplásicos ciclofosfamida e doxorrubicina, isolados ou em associação induziram danos toxicogénéticos em linhagens de células tumorais e não tumorais em modelos de estudo não-clínicos. A indução de alterações citogenéticas, como micronúcleos, pontes citoplasmáticas e brotos nucleares; de morte celular, por apoptose e necrose; a descompensação do estado redox em linhagens celulares leveduriformes; e a indução de efeitos citotóxicos, mutagénicos e genotóxicos em *Mus musculus* pela CPA, DOX e AC foram detectadas com os modelos de estudo de *S. cerevisiae*, Sarcoma 180 e dos testes de MN, CBMN e cometa. Em síntese, a carência de estudos conclusivos e não conflitantes sobre a ingestão da vitamina A como um antioxidante, isolada ou disposta em formulações de suplementos vitamínicos para prevenir ou tratar o câncer necessita de mais esclarecimentos. Frisa-se ainda que a diminuição da predisposição para certos tipos de cânceres, por consequência deste tipo de suplementação nutricional, não exclui o risco do acometimento de outra desordem corporal, incluindo especialmente os danos ao material genético. O PR, concomitante ao tratamento quimioterápico com ciclofosfamida, doxorrubicina e o protocolo AC, sem considerar a meia-vida dos antineoplásicos, promoveu interferências sobre a apoptose celular, como apontado em modelos de estudos de farmacomonиторamento em células neoplásicas de Sarcoma 180, e em linhagens de *S. cerevisiae*, possivelmente devido a sua ação antioxidante. Também teve ação antigenotóxica/antimugênica em linhagens tumorais de Sarcoma 180 e em linfócitos de sangue periférico de *Mus musculus*. Em medula óssea de *Mus musculus*, o PR teve ação antigenotóxica/antimutagênica e anticitotóxica, como evidenciado pela interferência na relação entre eritrócitos normo e policromáticos. Esses mecanismos de ação do palmitato de retinol podem ser considerados em novos estudos para elucidar as controvérsias do uso de antioxidantes durante as terapias oncológicas.

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: ceeapi@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 Ivetel L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

ANEXO B – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO A *CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS*

Elsevier Editorial System(tm) for Chemo-
Biological Interactions
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: In vitro and ex vivo retinyl palmitate activities on the oxidant mechanisms activated by doxorubicin and/or cyclophosphamide

Article Type: Research paper

Keywords: oxidative stress; antineoplastic; antioxidants; retinyl palmitate.

Corresponding Author: Mr. Md. Toregul Islam, PhD (on going)

Corresponding Author's Institution: Federal University of Piauí

First Author: Ricardo Carvalho

Order of Authors: Ricardo Carvalho; Marcus Alencer; Ana Mata; Md. Toregul Islam, PhD (on going); Ian Sousa; José Ferreira; Paulo Ferreira; Ana Amélia Melo-Cavalcante

Abstract: Antineoplastic agents are known for their inducing capability of oxidative stress in biological systems. Nutrients usage and vitamin supplements are recommended for minimizing the adverse effects of chemotherapy, despite of some controversies about the interference of these substances on the effectiveness of treatment. This study analyzed the retinyl palmitate (RP) action front of oxidative and genotoxic damage by doxorubicin (DOX) and/or cyclophosphamide (CPA) by using comet assay in proficient and mutated *Saccharomyces cerevisiae* strains and Sarcoma 180 cells. On *S. cerevisiae*, the RP was tested at a concentration of 100 IU/mL, while on Sarcoma 180, it was 1, 10 and 100 IU/mL. The DOX and CPA were used as oxidative agents at the concentrations of 20 µg/mL and 2 µg/mL, respectively. Results suggest that, the oxidative damage in the proficient and deficient *S. cerevisiae* (SodWT, Sod1Δ, Sod2Δ, Sod1ΔSod2Δ, Cat1Δ and Sod1ΔCat1Δ) strains was significantly (P<0.05) modulated by RP. Similarly, the genotoxicity induced by the antineoplastics (DOX/CPA) on Sarcoma 180 was also modulated by RP. However, the oxidative damages cause genotoxicity in non-tumor and tumor eukaryotic cells. In conclusion, the antineoplastics with vitamin supplementation of retinyl palmitate-enriched nutrients can impede the efficacy of chemotherapy, by interfering with the cytotoxic mechanisms related to induction of cell death, which is crucial for the tumor regression.

ANEXO C – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO A *EXPERIMENTAL AND TOXICOLOGIC PATHOLOGY*

Submission ETP_2016_152 received by Experimental and Toxicologic Pathology

Experimental and Toxicologic Pathology
<EvisSupport@elsevier.com>

11/29/16

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: ETP_2016_152

Title: Cytogenotoxicological defense of retinyl palmitate in the front damage of antineoplastics

Journal: Experimental and Toxicologic Pathology

Dear Mr. Islam,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Experimental and Toxicologic Pathology. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:

http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=ETP

and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Experimental and Toxicologic Pathology

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2016 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

ANEXO D – PREMIAÇÃO COMO MELHOR TRABALHO CIENTÍFICO NA MODALIDADE ORAL NO V CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ONCOLÓGICA REALIZADO EM NOVEMBRO/2016



**V Congresso Brasileiro de Nutrição Oncológica -
VIII Jornada Internacional de Nutrição Oncológica -
VIII Jornada Luso-brasileira de Nutrição Oncológica**

16-18 novembro 2016 Tema Central: A Multidisciplinaridade da Assistência Nutricional ao Paciente Oncológico

- **Primeiro lugar: Inscrição para o VI Congresso Brasileiro de Nutrição Oncológica 2018 (Rio de Janeiro) + R\$ 1.000,00**

TL53 - MODULAÇÃO DOS DANOS GENOTÓXICOS DA CICLOFOSFAMIDA E DA DOXORRUBICINA PELO PALMITATO DE RETINOL POR MEIO DO ENSAIO COMETA.

CARVALHO, R.M.; MATA, A.M.O.F.; ALENCAR, M.V.O.B.; ISLAM, M.T.; PEREIRA, A.R.S.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C.-
Apresentador: Ana Rafaela Silva Pereira

- **Segundo lugar: Inscrição para o VI Congresso Brasileiro de Nutrição Oncológica 2018 (Rio de Janeiro)**

TL41-MODULAÇÃO TOXICOGENÉTICA DA VITAMINA C QUANDO CONJUGADA AO QUIMIOTERÁPICO CISPLATINA ATRAVÉS DO TESTE DE *Allium cepa*. - **OLIVEIRA, V.A.; OLIVEIRA, C.M.M.S.; CORREIA, D.M.F.; SOUSA, J.M.C.; LIMA, L.H.G.M.; SILVA, F.C.C.**

**ANEXO E – CARTA DA “EXPERIMENTAL AND TOXICOLOGIC PATHOLOGY”
DECLARANDO O ACEITE, SEM CORREÇÕES, DO 4º ARTIGO SUBMETIDO**

Ref:

ETP_2016_152

Title: Cytogenotoxicological defense of retinyl palmitate in the front damage of antineoplastics

Journal: Experimental and Toxicologic Pathology

Dear Mr. Islam,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication. My own comments as well as any reviewer comments are appended to the end of this letter. Now that your manuscript has been accepted for publication it will proceed to copy-editing and production.

Complete author list: **Ricardo Melo de Carvalho, Rai Pablo de Sousa Aguiar, Md. Torekul Islam, Marcus Vinicius Oliveira Barros de Alencar, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, Antonio Lima Braga, Josemar Jose da Silva Junior, Leonardo da Rocha Sousa, Rosália Maria Tôrres de Lima, João Marcelo de Castro e Sousa, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante.**

Thank you for submitting your work to Experimental and Toxicologic Pathology. We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,
Ulrich Mohr
Editor-in-Chief
Experimental and Toxicologic Pathology