



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

O ÁCIDO ASCÓRBICO COMO MODULADOR DA AÇÃO DOS QUIMIOTERÁPICOS
5-FLUOROURACIL E CISPLATINA EM TESTES PRÉ-CLÍNICOS

JOSEMAR JOSÉ DA SILVA JÚNIOR

TERESINA – PIAUÍ
MARÇO /2017

JOSEMAR JOSÉ DA SILVA JÚNIOR

**O ÁCIDO ASCÓRBICO COMO MODULADOR DA AÇÃO DOS QUIMIOTERÁPICOS
5-FLUOROURACIL E CISPLATINA EM TESTES PRÉ-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.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva

TERESINA – PIAUÍ

MARÇO /2017

JOSEMAR JOSÉ DA SILVA JÚNIOR

**O ÁCIDO ASCÓRBICO COMO MODULADOR DA AÇÃO DOS QUIMIOTERÁPICOS
5-FLUOROURACIL E CISPLATINA EM TESTES PRÉ-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 22 / 02 / 17

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante (Examinador Interno)
Departamento de Bioquímica e Farmacologia – UFPI

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

Ana Paula Peron (Examinador Externo)
Campus Senador Helvidio Nunes de Barros – UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

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

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

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

Prof. Dra. Marcília Pinheiro da Cunha

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

A **Deus** por minha vida, família e amigos.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Agradeço a minha mãe **Maria do Carmo Rodrigues Pessoa Silva** e meu pai **Josemar José da Silva**, heróis que me deram apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva**, pela orientação, apoio e confiança.

Aos professores **João Marcelo de Castro e Sousa**, **Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante** e **Paulo Michel Pinheiro Ferreira** pelo apoio na elaboração deste trabalho.

Meus agradecimentos aos amigos **Leonardo Rocha**, **Ag-Anne Melo**, **Tonny Braga**, **Raí Pablo**, **Rosália Torres**, **Ricardo Melo**, **Antonielly Campinho**, **Nárcia Mariana**, dentre outros companheiros de trabalho do **Laboratório de Pesquisas em Genética Toxicológica – LAPGENIC**.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

-Paulo Freire

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS.....	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVO	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1. Genética do câncer.....	19
3.2. Quimioterapia	22
3.3. Os antineoplásicos.....	23
3.3.1. 5-Fluorouracil.....	23
3.3.2. Cisplatina.....	24
3.4. Estresse oxidativo e os antioxidantes.....	25
3.5. Ácido ascórbico e sua participação na quimioterapia	28
3.6. Teste Cometa.....	30
3.7. Sarcoma 180 como modelo de estudo farmacológico.....	31
3.8. Saccharomyces cerevisiaes como modelo de estudo farmacológico	32
REFERÊNCIAS.....	34

4. CAPÍTULO I: Drogas antineoplásicas e o tratamento alternativo com ácido ascórbico para o câncer: uma revisão.....	45
RESUMO.....	46
ABSTRACT.....	47
4.1. Introdução.....	47
4.2. Metodologia.....	48
4.2.1. Tipo de estudo	48
4.2.2. Coleta de dados.....	48
4.2.3. Critérios de inclusão e exclusão	49
4.2.4. Análise dos dados	49
4.3. Resultados e Discussões	50
Referências.....	57
5. CAPITULO II: Ácido ascórbico como modulador da ação da Cisplatina e 5-Fluorouracil em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Alium cepa</i>	64
RESUMO.....	65
ABSTRACT.....	66
5.1. Introdução.....	66
5.2. Metodologia.....	67
5.2.1. Linhagens de leveduras utilizadas	67
5.2.2. Teste do disco central em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
5.2.3. Avaliação da modulação do ácido ascórbico sobre os antineoplásicos	69
5.2.4. Análise estatística	69
5.3. Resultados e Discussão.....	69
5.3.1. Avaliação dos efeitos oxidante da cisplatina e 5-Fluorouracil por meio do teste de <i>S. cerevisiae</i>	69
5.4. Conclusão	77

Referências.....	78
6. CAPITULO III: Avaliação de danos genotóxicos induzidos por Cisplatina e 5-Fluorouracil ou associados em modelos in vivo de sarcoma 180.....	85
RESUMO.....	86
ABSTRACT.....	87
6.1. Introdução.....	88
6.2. Matérias e Métodos.....	89
6.2.1. Aspectos éticos	89
6.2.2. Animais	89
6.2.3. Delineamento do experimento.....	89
6.2.4. Ensaio cometa.....	90
6.2.5. Parâmetros hematológicos e bioquímicos	90
6.2.6. Análises Estatísticas.....	90
6.3. Resultados e discussão	90
6.3.1. Caracterização dos animais quanto ao peso corporal, peso do tumor e órgãos	90
6.3.2. Correlação com parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	94
6.3.3. Perfil de danos ao DNA em células da medula óssea de animais tratados com cisplatina, 5-FU ou vitamina C por meio do Teste Cometa	97
6.4. Conclusão	101
Referências.....	102
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL-UFPI.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU – 5-Fluorouracil
AA – Ácido Ascórbico
ALT – Alanina Aminotransferase
AST – Aspartato Aminotransferasei
CAT - Catalase
CDC – Centro para Controle e Prevenção de Doenças
CDDP - Cisplatina
CM – Teste Cometa
dTMP - Deoxitimidina Monofosfato
ERCs – Espécies Reativas de Cloro
ERNs - Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
FDA – Administração de Drogas e Alimentos
FdUMP – Fluorodeoxiuridina Monofosfato
FdUTP – Fluorodeoxiuridina Trifosfato
FN – Frequência de Danos
GLUTs – Glicose Independente de Sódio
GSH – Glutationa
GSH-Pxs – Glutationa Peroxidase
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HOCl – Ácido Hipocloroso
INCA – Instituto Nacional do Câncer
IPCS – Programa Internacional de Segurança Química
NO – Óxido Nítrico
NO[•] - Radical Óxido Nítrico
NO₂ – Radical Dióxido de Nitrogênio
NO₂Cl – Cloreto de Nitrila
NPPM – Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais

O^{2-} – ânion superóxido

OH^{\cdot} - Radical Hidroxila

$ONOO^{\cdot}$ - Peroxinitrito

PXCô - Proteína Quinase Cô

QT - Quimioterapia

RLs – Radicais Livres

S180 – Sarcoma 180

SCGE – Eletroforese em Gel de uma Única Célula

SOD – Superóxido Desmutase

SVCT – Transportador de Vitamina C dependente de Sódio

UFPI – Universidade Federal do Piauí

UNEP – Programa Ambiental das Nações Unidas

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estudados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma	19
Figura 2. As marcas registradas do câncer	20
Figura 3. Estrutura química do 5-FU e seus metabólitos.	24
Figura 4. Estrutura química da cisplatina	25
Figura 5. Manutenção do status redox	27
Figura 6. Estrutura química do Ácido Ascórbico	29

CAPITULO I

Figura 1. Tabelas com a relação dos artigos encontrados, utilizados e descartados.	49
---	----

CAPITULO II

Figura 1. Disposição das linhagens de leveduras utilizadas no teste	68
Figura 2. Potencial oxidativo do 5-Fluorouracil (5-FU) isolado ou em associação com ácido ascórbico (AA) em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> em co-tratamento (0) e pós-tratamento (8). Os gráficos representam os halos de inibição mensurados em mm nas linhagens <i>SODWT</i> , <i>Sod1</i> , <i>Sod2</i> , <i>Sod1Sod2</i> , <i>Cat1</i> e <i>Sod1Cat1</i> . Valores em média± desvio padrão dos halos de inibição (0-40 mm). ANOVA, one-way, pós-teste de Bonferroni. ^a p≤0,05 comparado ao CN; ^b p≤0,05 comparado ao H ₂ O ₂ ; ^c p≤0,05 comparado ao 5-FU 10µg/mL; ^d p≤0,05 comparado ao 5-FU 20µg/mL.	71
Figura 3. Potencial oxidativo da cisplatina (CDDP) isolado ou em associação com ácido ascórbico (AA) em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> em co-tratamento (0) e pós-tratamento (24). Os gráficos representam os halos de inibição mensurados em mm nas linhagens <i>SODWT</i> , <i>Sod1</i> , <i>Sod2</i> , <i>Sod1Sod2</i> , <i>Cat1</i> e <i>Sod1Cat1</i> . Valores em média± desvio padrão dos halos de inibição (0-40 mm). ANOVA, one-way, pós-teste de Bonferroni. ^a p≤0,05 comparado ao CN; ^b p≤0,05 comparado ao H ₂ O ₂ ; ^c p≤0,05 comparado ao CDDP 10µg/mL; ^d p≤0,05 comparado ao CDDP 20µg/mL.	72

CAPITULO III

- Figura 1.** Peso (g) do tumor para os diferentes grupos de tratamento. ANOVA, one-way seguido de Tukey. Significância de a $P < 0,05$ comparado ao grupo CN; b $P < 0,05$ comparado ao grupo CDDP; c $P < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU. 91
- Figura 2.** Peso (g) do rim e fígado para os diferentes grupos de tratamento. ANOVA, one-way seguido de Turkey. Significância de a $P < 0,05$ comparado ao grupo CN; b $P < 0,05$ comparado ao grupo CDDP; c $P < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU. 92
- Figura 3.** Avaliação dos danos genotóxicos induzidos por cisplatina (CDDP), 5 – Fluorouracil (5-FU) e a modulação destes pela vitamina C em células de medula óssea por meio do ensaio Cometa. ANOVA, one-way seguido de Tukey. Significância de ^a $P < 0,05$ comparado ao grupo CN; ^b $P < 0,05$ comparado ao grupo CDDP; ^c $P < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU. 93
- Figura 4.** Avaliação da modulação da vitamina C nos danos genotóxicos induzidos por cisplatina (CDDP), 5 – Fluorouracil (5-FU) em células de medula óssea por meio do ensaio Cometa. ANOVA, one-way seguido de Tukey. Significância de ^a $P < 0,05$ comparado ao grupo CN; ^b $P < 0,05$ comparado ao grupo CDDP. 98

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

- Tabela 1.** Resultados da pesquisa realizadas sobre os principais antineoplásicos usados no tratamento contra o câncer feita nos principais bancos de dados online 52

CAPITULO II

- Tabela 1.** As linhagens de levedura *S. cerevisiae* que foram utilizadas neste trabalho. 68
- Tabela 2.** Índice de modulação do ácido ascórbico frente os antineoplásicos. 73

CAPITULO III

Tabela 1. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Mus musculus* tratados com diferentes concentrações dos quimioterápicos cisplatina e 5-FU (1 mg/mL; 10 mg/mL e 50 mg/mL), e a modulação destas pela vitamina C. ANOVA, one-way seguido de Tukey. Significância de ^a $P < 0,05$ comparado ao grupo CN; ^b $P < 0,05$ comparado ao grupo CDDP; ^c $P < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU. Todos comparados em relação ao mesmo parâmetro.

RESUMO

Uma das doenças com maior mortalidade no mundo é o câncer. Atualmente, os principais tipos de tratamentos utilizados no câncer são a cirurgia, radioterapia e a quimioterapia. Devido aos efeitos colaterais dos quimioterápicos, a prescrição de suplementação vitamínica como o ácido ascórbico (AA) está sendo muito usada ultimamente. Essa suplementação pode ocasionar um efeito antagônico aos efeitos dos antineoplásicos interferindo em sua ação e eficácia e podendo atuar intensificando enzimas de reparo de DNA. Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar a influência do ácido ascórbico sobre os danos citogenéticos e genotóxicos induzidos pelos antineoplásicos cisplatina (CDDP) e 5-Fluorouracil (5-FU). Para tanto, foi realizada a detecção de atividade oxidante e antioxidante através do teste de leveduras, utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*; teste genotóxico através do teste cometa em células eucarióticas da medula óssea de camundongos Swiss (*Mus musculus*) transplantados com Sarcoma 180. Para o teste de levedura, foram preparadas placas com meio de cultura YEL onde foram semeadas cinco leveduras mutadas em seu sistema de enzimas antioxidante e um selvagem da mesma espécie. Foram adicionados discos de papel filtro com os antineoplásicos isolados ou associados com AA por 48h. O 5-FU e CDDP nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ induziram significantes ($p \leq 0,05$) danos oxidativos nas células de *S. cerevisiae*, quando comparado ao controle negativo. Estes danos foram modulados ($p \leq 0,05$) pelo AA, quando administrado em co-tratamento e após a meia-vida das drogas, na maioria das linhagens da levedura, exceto no duplo mutante SOD1SOD2 tratado com 5-FU. Para o teste com animais, os resultados indicam que a redução no peso corporal e nos tumores de animais tratados com a combinação de 5-FU ou CDDP com AA foi inferior à dos grupos que receberam apenas os fármacos. O ensaio de cometa mostrou que o tratamento com CDDP ou 5-FU induziu danos genotóxicos significativos em células de medula óssea, que foram significativamente moduladas pelo AA. Acredita-se que o efeito modulador de AA em associação com CDDP e 5-FU está relacionado com o seu papel antioxidante, afetando assim a eficácia dos agentes quimioterápicos. Portanto, a utilização do AA como um adjuvante às drogas quimioterápicos convencionais no tratamento do câncer deve ser revista, tendo-se em vista o comprometimento da eficácia da quimioterapia em diferentes sistemas teste.

Palavras-chaves: Cisplatina. 5-Fluorouracil. Ácido Ascórbico. Câncer.

ABSTRACT

One of the diseases with the highest mortality in the world is cancer. Currently, the main types of treatments used in cancer are surgery, radiotherapy and chemotherapy. Due to the side effects of chemotherapy, the prescription of vitamin supplementation such as ascorbic acid (AA) is being used lately. This supplementation may cause an antagonistic effect to the effects of the antineoplastic interfering in its action, efficacy and being able to act intensifying DNA repair enzymes. The aim of this study was to evaluate the influence of ascorbic acid on the cytogenetic and genotoxic damages induced by antineoplastic cisplatin (CDDP) and 5-Fluorouracil (5-FU) by detecting oxidative and antioxidant activity through the yeast test using strains *Saccharomyces cerevisiae*; Besides the genotoxic tests, such as the comet test in eukaryotic cells of the bone marrow of *Mus musculus* rats bearing Sarcoma 180. For the yeast test, plates were prepared with YEL culture medium where 5 yeasts mutated in their antioxidant enzyme system and one wildtype were seeded. Filter paper disks with antineoplastics isolated or associated with AA were added for 48h to measure the growth inhibition halo. 5-FU and CDDP at concentrations of 10 and 20 µg / mL induced significant ($p \leq 0.05$) oxidative damages in *S. cerevisiae* cells, when compared to the negative control. These damages were modulated ($p \leq 0.05$) by AA when given in co-treatment and after a half-life of the drugs in most yeast strains, except for no double SOD1SOD2 treated with 5-FU. For animal testing, the results indicate that the reduction in body weight and tumors treated with a combination of 5-FU or CDDP with AA was lower than the groups receiving only the drugs. The comet assay showed that treatment with CDDP or 5-FU induced significant genotoxic damage in bone marrow cells, which were significantly modulated by AA. It is believed that the modulating effect of AA in combination with CDDP and 5-FU is related to its antioxidant activity, thus affecting the efficacy of chemotherapeutic agents. Therefore, the use of AA as an adjunct to conventional chemotherapy drugs in the treatment of cancer should be reviewed in order to not compromising the efficacy of chemotherapy.

Keywords: Cisplatin. 5-Fluorouracil. Ascorbic acid. Cancer

1. INTRODUÇÃO

Uma das doenças com maior mortalidade no mundo e no Brasil é o câncer. Para o biênio de 2016-2017, estão previstos mais de 58 mil novos casos de câncer no país (INCA, 2016). No Brasil, em ordem de incidência e por gênero, estão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon, reto e estômago, para o sexo masculino, e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide, para o sexo feminino (INCA, 2014).

Atualmente, os principais tipos de tratamentos utilizados no câncer são a cirurgia, radioterapia e a quimioterapia. Menos frequentes, mas em ascensão, podemos citar a imunoterapia e terapia gênica. Dentro estes tratamentos citados, a quimioterapia tem um papel de destaque na eficiência do tratamento, tanto nos casos de neoadjuvância pré-cirúrgicos, como terapia adjuvante pós-cirúrgico (CRUZ-MERINO et al., 2016; SHIN et al., 2017).

Um mecanismo primário de muitos fármacos de quimioterapia contra as células cancerosas é a formação de ROS, ou radicais livres. Os fármacos que formam ROS incluem, mas não estão limitados a agentes alquilantes, antraciclinas, derivados de podofilina, complexos de coordenação de platina e camptotecinas (BLOCK et al 2008). A quimioterapia usa substâncias químicas que atuam eletivamente em células em mitose, visando destruir células cancerosas. Infelizmente, os radicais livres produzidos com quimioterapia são muitas vezes uma fonte de efeitos colaterais graves, tais como a nefrotoxicidade, ototoxicidade, neuropatia periférica, cardiotoxicidade, leucopenia, trombopenia entre outros (BADAJATIA et al. 2010, Spencer et al. 2005).

Devido aos efeitos colaterais dos quimioterápicos, a prescrição de suplementação vitamínica com o ácido ascórbico (AA) está sendo muito usada ultimamente (SUBRAMANI et al., 2014). Entretanto, esta suplementação pode ocasionar um efeito antagônico aos efeitos dos antineoplásicos, interferindo em sua ação e eficácia (WANG; WANG; YU, 2014), ou podendo atuar intensificando enzimas de reparo de DNA (WEAKLEY et al., 2010).

O uso de antioxidantes como terapia suplementar no tratamento contra o câncer é bastante controverso. Estudos clínicos mostraram que altas doses de vitamina C são eficientes como agente antitumoral, sendo parte de terapias complementares para melhorar a qualidade de vida, proteger contra os efeitos secundários da quimioterapia, aumentando a defesa do sistema imunitário e induzindo efeitos anti-proliferativos (VOLLBRACHT et al, 2011), enquanto outros

estudos não mostraram resultados significativos com o uso exclusivo de vitamina C (CREAGAN ET et al 1979, MOERTEL et al 1985, PARROW et al 2013). Por outro lado, a suplementação alimentar em doses não terapêuticas durante o tratamento quimioterápico podem influenciar na ação de agentes antineoplásicos, uma vez que a vitamina C é um antioxidante solúvel em água que desempenha um papel importante no controle do estresse oxidativo (ROS) (PANAYIOTIDIS et al. 1997). Além disso, por ser comumente introduzido na dieta humana, é relevante verificar se ela pode oferecer proteção contra efeitos genotóxicos induzidos por drogas antitumorais.

Nesse sentido, os danos oxidativos e citogenéticos são frequentemente monitorados e estudados através de biomarcadores, como em pesquisas que utilizam células tumorais cultivadas em laboratórios, como o Sarcoma 180, juntamente com o teste cometa, para avaliação de reparo no DNA e genotoxicidade (SILVA et al., 2016; TAYLOR et al., 2011), a avaliação da resistência tumoral, através de culturas de leveduras (PEREGO; JIMENEZ; GATTI, 2000), e avaliação de citotoxicidade dos antineoplásicos pelas raízes de *Allium cepa* (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo contribuir para a compreensão dos danos citogenéticos e genotóxicos da cisplatina e 5-fluorouracil em Sarcoma 180 e efeitos modulatórios do ácido ascórbico em doses não terapêuticas sobre os mesmos por meio da detecção de atividade oxidante e antioxidante através do teste de leveduras utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*; genotoxicidade pelo teste cometa em células eucarióticas da medula óssea de ratos *Mus musculus* portadores de Sarcoma 180, e o teste citogenético em células meristemáticas de *Allium cepa*.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a influência do ácido ascórbico sobre os danos citogenéticos e genotóxicos induzidos pelos antineoplásicos cisplatina (CDDP) e 5-Fluorouracil (5-FU), por meio da detecção de atividade oxidante e antioxidante através do teste de leveduras utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*; além dos testes genotóxicos, como o teste cometa em células eucarióticas da medula óssea de ratos *Mus musculus* portadores de Sarcoma 180.

2.2. Objetivos específicos

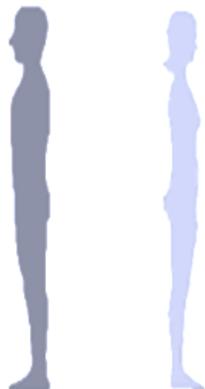
- Avaliar a interferência do ácido ascórbico no tratamento tumoral através da análise do tamanho dos tumores.
- Avaliar a interferência do ácido ascórbico nos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos camundongos.
- Avaliar os prováveis efeitos oxidativos dos antineoplásicos CDDP e 5-FU em linhagens leveduriformes de *Saccharomyces cerevisiae*;
- Avaliar possíveis modulações do ácido ascórbico sobre danos oxidativos induzidos pela CDDP e 5-FU em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*;
- Identificar danos genotóxicos da CDDP e 5-FU em células de medula óssea de camundongos portadores de Sarcoma 180 por meio dos ensaios cometa;
- Identificar a ocorrência de efeitos modulatórios do ácido ascórbico sobre os danos genotóxicos da CDDP e 5-FU em células medulares de camundongos portadores de Sarcoma 180 por meio dos ensaios cometa;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Genética do câncer

O câncer (CA) é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento. Segundo o CDC (Centers for Disease Control and Prevention), até 2025 são esperados mais de 19 milhões de novos casos de câncer no mundo a cada ano. De acordo com as estimativas de câncer para o biênio 2016-2017, do Instituto Nacional do Câncer José Alencar de Gomes da Silva (INCA), no Brasil, são esperados cerca de 420 mil novos casos de câncer, com exceção do câncer de pele não-melanoma. Ainda, no país, o câncer de próstata será o mais incidente na população masculina (cerca de 28,6% dos casos), enquanto que o câncer de mama será o mais frequente em mulheres (28,1% dos casos) (**Figura 1**).

Figura 1. Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estudados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma

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: Adaptado de INCA, 2015

*Números arredondados para múltiplos de 10

O CA é resultado de uma coleção de mecanismos patológicos complexos, durante os quais as células sofrem alterações nos processos de divisão celular (MERLO et al., 2006). Como consequência, as células passam a se dividir e crescer descontroladamente e passam a desempenhar anormalidades metabólicas e funcionais. Neste processo, a transformação maligna

pode ser resultado do acúmulo de mutações somáticas ou modificações epigenéticas (WATSON et al., 2013).

Segundo Hanahan & Weinberg (2011) todo tumor apresenta, ao menos, dez marcas registradas (Figura 2). Dentre elas, a principal característica de células cancerosas é sua habilidade de se proliferarem, mesmo na ausência de sinais estimuladores de crescimento, além de não responderem a indução de parada do ciclo celular por fatores supressores de crescimento. Esta característica está diretamente relacionada à capacidade da célula cancerosa se reprogramar metabolicamente, de modo prover a energia necessária para o crescimento do tumor. Estas células também desenvolvem mecanismos próprios de resistência à morte celular, conseguindo evadir aos processos de estimulação de apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2. As marcas registradas do câncer



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

A geração de tumores macroscópicos se deve à capacidade de células tumorais serem indestrutíveis, sugerindo que o potencial replicativo sem limite é um fenótipo essencial para progressão do tumor. Para que o tumor seja mantido, estas células também são capazes de induzir angiogênese, devido a sua capacidade intrínseca de promover o crescimento de vasos sanguíneos

(HANAHAN; WEINBERG, 2011). E, em uma fase mais avançada do tumor, células provenientes das massas tumorais são capazes de se deslocar, invadir tecidos adjacentes e alcançar lugares de longa distância para formar novas colônias no organismo. Alguns tumores apresentam infiltrados de células imunes inatas e adaptativas, capazes de promover condições inflamatórias nos tecidos normais. E a aquisição de todas estas capacidades se dá por meio da aquisição, direta ou indireta, de mudanças no genoma, através de mutações em genes específicos, levando a instabilidade genômica (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer pode surgir a partir de células que adquiriram mutações genéticas em genes de importância que controlam o ciclo celular, a morte celular e reparo do DNA (MCCARTHY, 2010). As mutações podem ser causadas por agentes genotóxicos, ou seja, que afetam a integridade estrutural do DNA, resultando na quebra das fitas de DNA, instabilidade cromossômica e anormalidades nas enzimas de reparo, contribuindo para a carcinogênese (OMABE; OKOROOCHA, 2010; PAZ-Y-MIÑO et al., 2012).

Além disso, agentes mutagênicos, que induzem alterações permanentes nos genes do DNA, podem levar à substituição, deleção ou adição de pares de bases. Substâncias mutagênicas podem reagir diretamente com o DNA nuclear, incorporar ao DNA durante a replicação celular ou interferir nos processos de divisão celular (SLOCZYNSKA et al., 2014). Devido à instabilidade genética causada por estas mutações, os tumores podem conter clones que se diferem citogeneticamente (HANAHAN; WEINBERG, 2010).

As modificações epigenéticas, por outro lado, ocorrem durante a meiose e/ou mitose, e consistem em alterações na expressão dos genes, sem que haja mudanças na sequência de bases do DNA (GROSSNIKLAUS et al., 2013). Exemplos de eventos epigenéticos que podem levar a carcinogênese incluem modificações no DNA e na cromatina, tais como metilação, modificação de histonas e alto nível de reorganização da cromatina (WEI; SCHATTEN; SUN, 2014). As metilações ao DNA podem alterar a expressão de certos genes, tornando-os silenciados, enquanto que as modificações de histonas e remodelação de nucleossomas podem alterar a organização usual do DNA, promovendo também o silenciamento de regiões promotoras de importância (KAITHOJU, 2014; HARB-DE LA ROSA et al., 2015).

O estresse oxidativo também pode interagir com os processos que levam ao câncer, facilitando o processo de carcinogênese. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) podem: 1) induzir danos ao DNA no estágio de iniciação, por meio da indução de mutações, alterações na estrutura

e mau funcionamento dos mecanismos do DNA; 2) contribuir para expressão anormal de genes, bloqueio da comunicação celular e modificações nos sistemas de sinalização, promovendo o aumentando da proliferação celular durante o estágio de promoção; ou, 3) podem participar nos estágios de progressão do câncer, por meio da promoção de novas mutações (REUTER et al., 2010; SOSA et al., 2016).

O acúmulo de mutações e de alterações epigenéticas no DNA, assim como a exposição do mesmo a EROs, associado a defeitos da maquinaria de reparo podem afetar irreversivelmente as células, podendo levar ao câncer, para o qual são adotados diferentes tipos de terapias (SWIFT; GOLSTEYN, 2014).

3.2. Quimioterapia

A maioria das células cancerosas se divide com mais frequência que as células normais e, por causa desta característica, o processo de divisão celular é o principal alvo da terapia do câncer. Desta forma, o principal objetivo do tratamento é promover a parada do ciclo celular e/ou induzir morte de células cancerosas usando agentes citotóxicos, na quimioterapia, ou radiações ionizantes, por meio da radioterapia (BROWMAN et al., 2001). Além disso, a ideia de induzir o sistema imune do hospedeiro a destruir células cancerosas é o fundamento base da imunoterapia, a qual também consiste em uma terapia alternativa no tratamento do câncer (FARKONA; DIAMANDIS; BLASUTIG, 2016).

A quimioterapia (QT) é uma forma relativamente nova no tratamento do câncer e, até 1940, não havia sido desenvolvida nenhuma droga contra o câncer. A partir deste referido ano, começaram a serem realizados estudos clínicos testando os efeitos do gás mostarda de nitrogênio em pacientes com doença de Hodgkin e linfomas, levando ao desenvolvimento de agentes alquilantes, e os efeitos do ácido fólico em crianças com leucemia linfoblástica aguda, levando ao desenvolvimento de agentes antifolatos (SHAMBAUGH et al., 2003).

O melhor entendimento sobre o câncer no decorrer dos anos, levou ao desenvolvimento de agentes quimioterápicos que agem, principalmente, por meio da interferência da síntese de DNA e da mitose, levando à inibição de reprodução de células e induzindo as mesmas a parada do crescimento (agentes citostáticos) ou a morte (agentes citotóxicos) (FREEDMAN; PATRIDGE, 2011). O mecanismo de ação de drogas citotóxicas é, principalmente, causar danos ao DNA, cujos danos podem levar a célula cancerosa à morte (SWIFT; GOLSTEYN, 2014). No

entanto, a grande dificuldade no tratamento de câncer por agentes quimioterápicos se deve a grande semelhança existente entre as células neoplásicas e células normais, o que compromete a ação seletiva dos antineoplásicos, levando ao surgimento de efeitos adversos (DE ALMEIDA et al., 2005).

Exemplos de agentes citotóxicos incluem radiações ionizantes, agentes alquilantes (ciclofosfamidas, clorambucila, estreptozicina, mostardas de nitrogênio), drogas de platina (cisplatina, carboplatina, oxaplatina), antimetabólitos (5-fluorouracil, gencitabina, tegafur, mercaptopurina), inibidores de topoisomerases (irinotecano, topotecano, camptotecina) (DE FALCO; DE LUCA, 2010). A maioria destas drogas, exceto as inibidoras de topoisomerases e as radiações ionizantes, promove o bloqueio da maquinaria de replicação, levando a quebras das fitas de DNA (HELLEDAY et al., 2008).

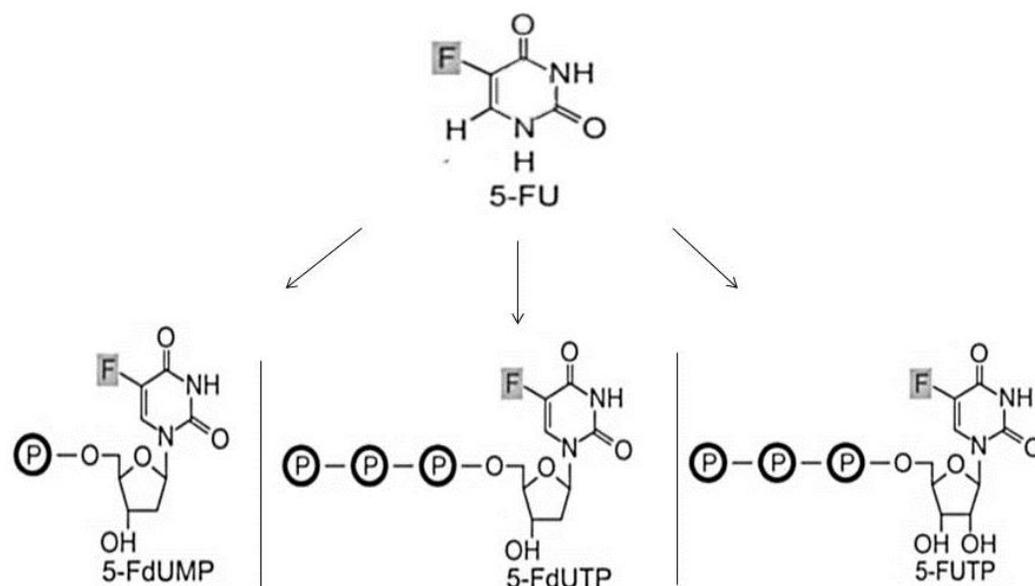
3.3. Os antineoplásicos

3.3.1. 5-Fluorouracil

O 5-fluorouracil é um agente antineoplásicos amplamente utilizado na prática clínica oncológica (CHEN et al., 2016). É utilizado no tratamento de câncer de mama, estômago, esôfago e também empregado como tratamento de primeira linha de câncer colorretal metastático (PEREIRA et al., 2015). Desenvolvido em 1957, o 5-FU é um análogo de pirimidina e, por este motivo, interage diretamente na sequência de ácidos nucleicos, interferindo na síntese de DNA e RNA (DER KRAAK et al., 2016).

A metabolização de 5-FU leva à formação dos nucleotídeos fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP), fluorouridina trifosfato (FUTP), que estão relacionados com a citotoxicidade da droga (**Figura 3**) (GARCÍA et al., 2011). O maior efeito citotóxico da droga em humanos é por meio da ligação estável de 5-FdUMP à timidilato-sintase (TS) e à deoxitimidina monofosfato (dTMP), resultando em inibição da síntese e do reparo de DNA, levando à morte celular programada (ZHANG et al., 2008; DANENBEG et al., 2016). A formação de 5-FdUTP ocasiona na incorporação deste nucleotídeo ao DNA, promovendo a quebra da fita de DNA, levando à apoptose (GROVES et al., 2017). Já em nível de RNA, a incorporação de 5-FUTP inibe o processamento e a maturação de rRNA, tRNA e precursores de mRNA (KAEHLER et al., 2014).

Figura 3. Estrutura química do 5-FU e seus metabólitos.



Fonte: Adaptado de Kline; El-Deiry (2013)

A extensão da citotoxicidade do antineoplásico varia dentre os diferentes tipos de câncer, perfis genéticos individuais e esquemas de administração (SILVERSTEIN; DE VALDIVIA; VISA, 2011). No entanto, a utilização do 5-FU pode afetar células normais e cerca de 30% dos pacientes apresentam efeitos adversos, tais como diarreia, vômito, queda de apetite, fotosensibilidade, neutropenia e trombocitopenia (GROVESA et al., 2016).

3.3.2. Cisplatina

A cisplatina (*cis*-diamminedichloro-platinum II/ CDDP) é um composto molecular de platina, inicialmente desenvolvido para inibir o crescimento bacteriano, e atualmente é utilizada no tratamento do câncer (YAN et al., 2016). Foi criada em meados do século 19 por Michel Peyrone, e os primeiros estudos clínicos com a droga aconteceram em 1971 (FLOERA; BÜSSELBERG, 2011).

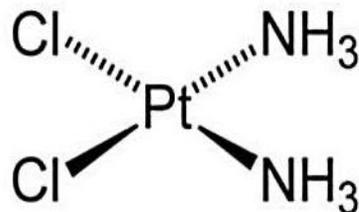
Em 1978, foi a primeira droga baseada em platina aprovada pelo FDA (*Food and Drugs Administration*) como agente quimioterápico e tem sido amplamente utilizada até os dias atuais (DASARI; TCHOUNWOU et al., 2014). O tratamento com CDDP consiste na terapia mais

eficiente de câncer cervical avançado ou recorrente, e também é empregada no tratamento de outros diversos tipos de câncer, como câncer de testículo, pulmão, mama, ovário e bexiga (CALLEJO et al., 2015).

Os mecanismos de ação anticâncer da cisplatina estão associados a múltiplas vias de sinalização inter-relacionadas (DUGBARTEY; PEPPONE; GRAAF, 2016). A CDDP é altamente reativa e se liga covalentemente às bases purínicas do DNA (posição N7) para formar adutos de cisplatina ao DNA (ZHU et al., 2016). Estes induzem danos ao material genético, causando interferência dos mecanismos de transcrição e replicação que, uma vez não reparados, levam a célula à apoptose (ACILAN et al., 2016). Estudos também têm demonstrado uma possível indução de citotoxicidade da cisplatina por meio da indução de estresse oxidativo e autofagia em células cancerosas (MA et al., 2014; LEE et al., 2016).

Os principais efeitos limitantes relacionados ao uso clínico da CDDP (**Figura 4**) estão relacionados ao surgimento de nefrotoxicidade, cardiotoxicidade e ototoxicidade, além do desenvolvimento de mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos (ASTOLFI et al., 2013; OJHA et al., 2016). Para superar os mecanismos de resistência à terapia, a cisplatina é comumente utilizada em combinação com outras drogas, como plactaxel, doxorrubicina, tergafur-uracil, no tratamento de diferentes tipos de câncer (DASARI; TCHOUNWOU et al., 2014).

Figura 4 - Estrutura química da cisplatina



Fonte: Adaptado de Dasari e Tchounwou et al. (2014).

3.4. Estresse oxidativo e os antioxidantes

Os radicais livres (RLs) são moléculas químicas instáveis e altamente reativas, que contém um ou mais elétrons não pareados, produzidos a partir de reações não enzimáticas de compostos orgânicos ou reações induzidas por agentes exógenos, como radiações ionizantes

(ULLAH; KHAN; KHAN, 2015). São essenciais nos processos de manutenção da homeostase celular, sinalização, expressão de genes e ativação de receptores (NOORI, 2012).

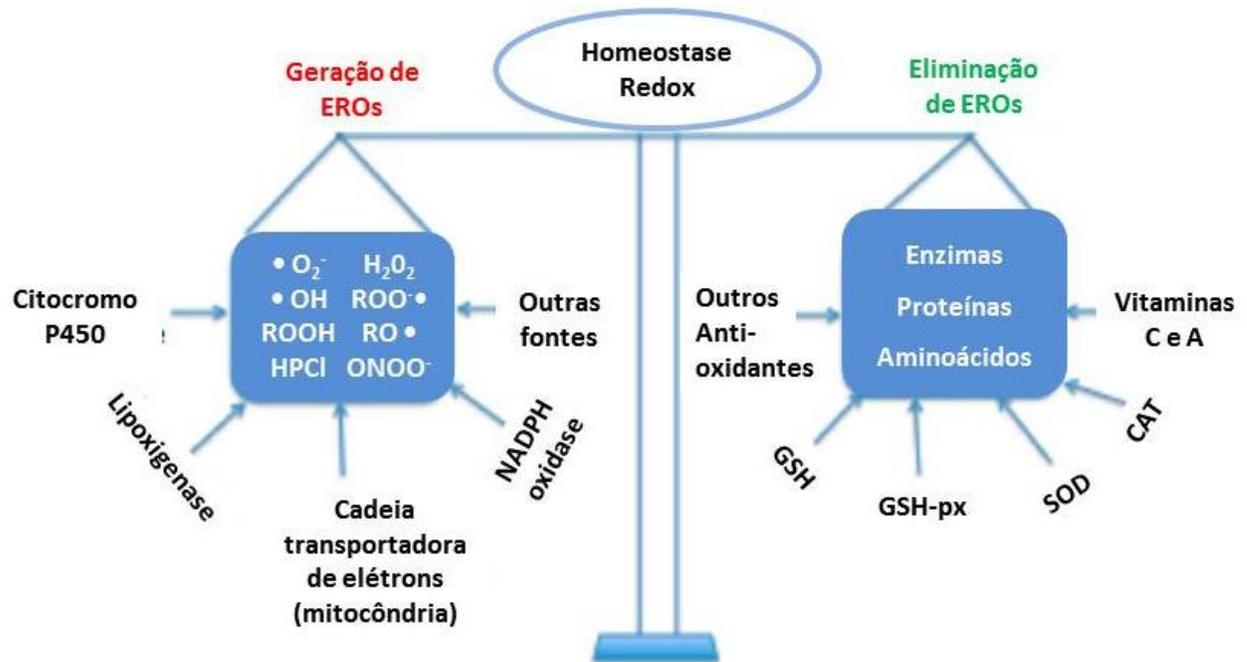
No entanto, devido a sua alta reatividade, os RLs podem promover a oxidação de componentes e moléculas celulares (HAYASHI; CORTOPASSI, 2015). Exemplos de radicais livres incluem, principalmente, Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) e Espécies Reativas de Cloro (ERCs) (HUSSAIN et al., 2016).

Durante o processo fisiológico de respiração celular nas mitocôndrias, ocorre a formação de radicais livres altamente reativos a partir do oxigênio, chamados de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (PANTH; PAUDEL; PARAJULI, 2016). Tais radicais incluem o ânion superóxido (O^{2-}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot), os quais são de fundamental importância nos processos de sinalização celular e proteção contra patógenos (MATEEN et al., 2016). No entanto, quando em excesso nas células, as EROs podem oxidar lipídios, proteínas, DNA e RNA (BHATTACHARYA, 2015).

ERNs e ERCs também causam a oxidação por meio da geração de mecanismos que interferem nos processos fisiológicos normais (GANGULY et al., 2014). Em condições de hipóxia, o óxido nítrico (NO) pode ser produzido durante as reações da cadeia respiratória, levando à formação de ERNs: radical ácido nítrico (NO^\cdot), peroxinitrito ($ONOO^\cdot$), radical dióxido de nitrogênio (NO_2^\cdot) e outros óxidos de nitrogênio (WEIDINGER; KOZLOV, 2015). ERCs, como o ácido hipocloroso (HOCL), podem reagir com nitrito para formar cloreto de nitrila (NO_2Cl), um radical altamente reativo (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2014).

Para evitar e combater os efeitos deletérios causados por radicais livres, o organismo desenvolve mecanismos de defesas antioxidantes, enzimáticas ou não enzimáticas, capazes de retardar ou retardar a oxidação de um substrato por radicais livres, mantendo a homeostase do status redox (equilíbrio nos processos de oxidação e redução) do organismo (RACCHI, 2013). As principais defesas antioxidantes enzimáticas são as superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GSH-Pxs), responsáveis por reduzir H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (PAMPLONA; COSTANTIN et al., 2011). Os antioxidantes não enzimáticos incluem compostos de baixo peso molecular, como o ácido ascórbico (Vitamina C), α -tocoferol (Vitamina E), glutatona (GSH) e carotenóides (BIRBEN et al., 2012). Abaixo estão representadas algumas das fontes que geram EROs, assim como as principais formas de defesa antioxidantes envolvidas na eliminação destes radicais, envolvidas na manutenção do equilíbrio do status redox (**Figura 5**).

Figura 5. Manutenção do status redox



Fonte: Adaptado de Li et al. (2015)

O desequilíbrio entre a produção de radicais livres, principalmente EROs e ERNs, e de defesas antioxidantes nas células e tecidos leva a um processo conhecido como estresse oxidativo (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATE, 2016). Neste processo, pode ocorrer a desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica e degradação de nucleotídeos, resultando em danos ou morte celular (ORTEGA-VILLASANTE et al., 2016). Até o momento, a patogênese de mais de cinquenta doenças, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, envelhecimento e até mesmo o câncer têm sido relacionadas a radicais livres (MOUTHUY et al., 2016).

Sob condições de estresse, tais como estresse oxidativo, EROs podem mediar apoptose por meio da regulação da expressão de várias proteínas pró-apoptóticas, tais como caspases, p21 e p53, e por meio da ativação de receptores para morte celular (CIRCU; AW, 2010). A ativação da proteína p53 promove a parada do ciclo celular na fase G1, por meio da indução da transcrição de p21, que é uma inibidora de quinase dependente de ciclina (AL-SARAN et al., 2016). Ainda, na presença de estímulos apoptóticos induzidos por EROs, a proteína pró-apoptótica Bid causa a

oligomerização das proteínas pró-apoptóticas Bax/Bak, que causam a formação de grandes poros na membrana mitocondrial. Logo em seguida, é formado o complexo apoptossomo no citoplasma, ativando as caspases 9 e 3, as quais executam os processos finais de indução de apoptose (STOJNEV; RISTIÛ-PETROVIÛ; JANKOVIÛ-VELIÐKOVIÛ, 2013). EROs também podem levar a ativação de esfingomielinase ácida, que convertem esfingomielina em ceramidas, levando ao agrupamento de receptores, os quais se ativam e transmitem sinais apoptóticos para o interior da célula (FORMAN; FUKUTO; TORRES, 2004).

Estudos demonstram que células cancerosas podem funcionar sob altos níveis de estresse oxidativo, expressando uma grande variedade de genes que respondem a altos níveis de EROs, que conferem alguma capacidade de resistência destas células ao tratamento quimioterápico (DAYEM, 2010). Natham e colaboradores (2011) observaram um aumento nível de estresse oxidativo e status antioxidante reduzido em células de sarcoma. Recentemente, Samuel et. al., (2016) demonstraram que o estresse oxidativo crônico é uma característica do microambiente de proliferação de células B na leucemia linfocítica crônica, que pode elevar os níveis de p53, porém até um nível abaixo do ideal para indução de parada do ciclo e apoptose destas células.

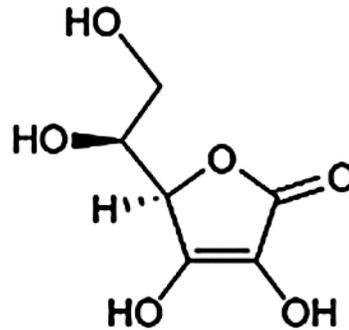
Apesar da resistência de células cancerosas a altos níveis de estresse oxidativo e a apoptose, têm-se sido utilizados na terapêutica quimioterápicos pró-oxidantes que atuam aumentando os níveis de EROs para além do limiar suportado por estas células, induzindo apoptose das mesmas (AKLADIOS; ADREW; PARKINSON, 2015). No entanto, o aumento do estresse oxidativo pode causar danos às células normais e, associada a quimioterapia, o ácido ascórbico tem sido utilizado como suplemento vitamínico, com o objetivo de minimizar os efeitos adversos desenvolvidos durante o tratamento (MCCORMICK et al., 2016).

3.5. Ácido ascórbico e sua participação na quimioterapia

O ácido ascórbico (AA) (**Figura 6**), também conhecido como vitamina C, é uma substância antioxidante não-enzimática de alta solubilidade em água, capaz de remover espécies reativas de oxigênio, podendo, por exemplo, proteger lipídios contra a oxidação e promover a redução de oxidantes no estômago (ASAIKKUTTIA et al., 2016). O AA pode ser absorvido por diferentes tipos de células, por meio de transportadores de vitamina C dependentes de sódio (SVCT-1 e SVCT-2) ou por ácido desidroascórbico, sendo acumulado via transportadores

facilitadores de glicose independentes de sódio (GLUTs), seguindo de sua redução intracelular (AZZOLINI et al, 2013).

Figura 6. Estrutura química do Ácido Ascórbico



Fonte: Ahmada et al., 2017

No entanto, o organismo humano não é capaz de sintetizar o AA endogenamente e, portanto, deve ser obtido a partir de fontes exógenas, tais como frutas, verduras ou na sua forma industrializada (KUO, 2013; STINCO et al., 2014). Esta vitamina participa de processos fisiológicos importantes, como promoção da absorção do ferro, formação de colágeno, cicatrização de feridas, efeitos anti-inflamatórios e potencializa a resposta inflamatória (CHEN et al., 2016). A deficiência desta vitamina pode levar à deformação de ossos ou outros tecidos duros do organismo (EL-SHAFEI; SALEH, 2016).

Doses intravenosas de vitamina C têm sido utilizadas como suplementação dietária durante o tratamento do câncer, uma vez que pode aumentar a circulação periférica e a resposta imunológica (DUCONGE et al., 2007). Quando o AA é administrado oralmente, suas concentrações plasmáticas são fortemente controladas, enquanto que as injeções intravenosas ultrapassam o sistema de absorção intestinal, podendo aumentar sua concentração citoplasmática, a qual pode levar a uma citotoxicidade no tumor (PIRES et al., 2016)

No entanto, sua utilização durante a terapia ainda é controversa, uma vez que o AA pode apresentar diferentes papéis durante os processos oxidativos, agindo como antioxidante ou oxidante (VAN DER REEST; GOTTLIEB, 2016). Segundo Lee (2009), o AA pode: 1) proteger células e tecidos contra efeitos do estresse oxidativo, por via antioxidante, reduzindo a concentração intracelular de EROs; ou, 2) acelerar o metabolismo oxidativo, por via pró-oxidante, ajudando a inibir a proliferação de células tumorais, mas não de células normais.

Mikirova et al. (2012) demonstraram que altas doses intravenosas de vitamina C promoveram a modulação da inflamação de pacientes com câncer, a qual estava diretamente relacionada a redução de marcadores tumorais nestes pacientes. Guerriero e colaboradores (2014) analisaram o efeito da associação de vitamina C com o mitoxantrone e observaram que a vitamina potencializa o efeito do antineoplásico, induzindo altos níveis de citotoxicidade em células tumorais. Park et al. (2012) também observou efeitos positivos na combinação de placitaxel com ácido ascórbico, demonstrando que o ácido ascórbico reduziu a toxicidade de placitaxel, sem que houvesse interferência nos efeitos do antineoplásico, em modelos *in vivo* de sarcoma.

Em contrapartida, um estudo realizado por Heaney et al. (2008) evidenciou que a administração de vitamina C antagonizou os efeitos citotóxicos induzidos pelas drogas, por meio da inibição da despolarização da membrana mitocondrial, afetando a resposta terapêutica. Mais recentemente, Fukumura e colaboradores (2012) demonstraram que o AA inibiu potencialmente a produção de EROs por antineoplásicos em células de câncer de próstata, comprometendo a eficácia das drogas. Desta forma, observa-se o efeito controverso da utilização da vitamina C durante a quimioterapia.

3.6. Teste cometa

Diversos agentes endógenos e exógenos podem comprometer a integridade do DNA celular, resultando em quebras, modificação de bases, *crosslinks* DNA-DNA e DNA-proteína, gerando mutações ou levando a morte celular (DEUTSCHMANN et al., 2016). A maioria destes danos é induzida por radicais livres, tais como EROs e ERNs, os quais constituem fatores de risco para câncer, envelhecimento, doenças neurodegenerativas e outras indisposições (REDZADUTORDOIR; AVERILL-BATE, 2016).

Neste contexto, o Teste Cometa (CM), ou Eletroforese em Gel de uma única célula (SCGE – *Single Cel Gel Electrophoresis*), é um teste simples, barato, rápido e sensível na caracterização de danos ao DNA. Por isso, é amplamente utilizado como um biomarcador genotóxico (DEUTSCHMANN et al., 2016). Além disto, este teste requer uma baixa quantidade de células por amostras e apresenta uma alta sensibilidade para detectar níveis pequenos de danos ao DNA (GANAPATHY et al., 2016)

Por estes motivos, o teste CM é extensivamente aplicado durante a análise genotóxica de novos químicos, monitoramento ambiental, biomonitoramento humano e epidemiologia molecular, além de diagnóstico de doenças genéticas e pesquisas em dano e reparo ao DNA. As diferentes variações desta técnica permitem a identificação de diferentes tipos de danos, tais como quebras de fita simples, quebra de fitas duplas e outras. Após realização do teste, as células são exibidas em forma de cometas, os quais são escorados quantitativamente e qualitativamente, e são mais exuberantes quanto maior o dano (GLEI; SCHNEIDER; SCHLÖRMANN, 2016).

O efeito genotóxico de diversas substâncias e drogas utilizadas na quimioterapia tem sido testado por meio do teste cometa. Logeshwaran et al. (2016) demonstraram o efeito genotóxico de produtos utilizados no combate a incêndios por meio do teste cometa em células meristemais das raízes de *Allium cepa*. Ghassemi-Barghi e colaboradores (2016) realizaram a análise da fragmentação de DNA em células HepG2 por meio do teste cometa. O efeito genotóxico dos antineoplásicos azidotimidina, acetilaminofluoreno, isobutiraldeído e cisplatina também foi verificado por teste cometa em células hepáticas e do estômago de ratos machos em um estudo realizado por Kraynak et al. (2016).

3.7. Sarcoma 180 como modelo de estudo farmacológico

Descoberto em 1914 nos Estados Unidos, o Sarcoma 180 (S-180), também conhecido como tumor de Crocker, é um tipo de tumor que se originou espontaneamente em ratos e, desde então, têm sido mantido a partir de sucessivos transplantes (ZUCKERBERG et al., 1973). S180 é uma das linhagens de células mais frequentemente utilizadas em pesquisas *in vivo* e *in vitro* de estudos do câncer (BEZERRA et al., 2006).

O sarcoma constitui um grupo heterogêneo tumores originados a partir de células ou tecidos mesenquimais (ossos, cartilagem) ou tecidos conectivos (musculo, gordura, nervos periféricos, fibrosos), para os quais foram constatados mais de 70 subtipos diferentes (LIM et al., 2016). Sarcomas são doenças raras, correspondendo a menos que 1% de todos os tumores malignos, mas corresponde ao terceiro tipo de tumor mais comum em crianças (PAN et al., 2016).

A partir de uma perspectiva genética e molecular, os sarcomas podem ser classificados em dois tipos: sarcomas com cariótipos parcialmente diploides, com translocações e mutações específicas, e sarcomas com cariótipos complexos e não uniformes, com instabilidade genômica e

heterogeneidade de aberrações dentre os tumores (TAYLOR et al., 2011). Dependendo do tipo de tecido afetado, a Organização Mundial de Saúde (WHO – *World Health Organization*) classifica os sarcomas como sarcomas de tecidos moles (lipossarcomas, dermatofibrossarcomas, angiossarcomas, etc) e sarcomas ósseos (condrossarcoma, fibrossarcoma do osso, sarcoma de Ewing, etc), descrevendo as características clinicopatológicas e genéticas para cada tipo de tumor (DOYLE, 2014).

S-180 cresce rapidamente em mais de 90% dos animais nos quais é inoculado, por isso é amplamente utilizado para indução de câncer em modelos *in vivo* de sarcoma (SATO et al., 2006). Atividade antitumoral de diferentes compostos, naturais ou sintéticos, tem sido avaliada em modelos *in vivo* e em cultura de células de S180 (PARK et al., 2011; DA COSTA et al., 2015; GHAZARYAN et al., 2016; FACCHINI et al., 2016).

3.8. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo farmacológico

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma espécie de levedura com sistema eucariótico unicelular, existente no solo, ar, plantas, frutos e alimentos. Esta espécie apresenta crescimento ideal entre 25° e 30° C e se reproduz assexuadamente por brotamento ou por cissiparidade (BRACONI; BERNARDINI; SANTUCCI, 2016). A *S. cerevisiae* tem sido amplamente utilizada como modelo eucariótico no estudo da elucidação de mecanismos metabólicos, por conta da semelhança da sua maquinaria celular e dos processos metabólicos desempenhados pela levedura, e da fácil manipulação genética (KARATHIA et al., 2011; GONZALEZ-PEREZ et al., 2012; TONGUL; TARHAN, 2016).

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

O estresse oxidativo pode resultar em degeneração genética e disfunção fisiológica, levando à morte das células desta levedura (WU et al., 2011). Nestas circunstâncias, esta levedura responde ao estresse oxidativo usando uma série de respostas celulares que garantem a sobrevivência das células após a exposição aos oxidantes (MORANO et al., 2012). Estas

respostas envolvem mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, resultando na ativação de respostas enzimáticas e não enzimáticas, que reduzem as taxas de produção de EROs, e repara os danos causados (ODRIOZOLA-SERRANO et al., 2016).

Semelhantemente a eucariotos superiores, a *S. cerevisiae* dispõe de uma variedade de enzimas antioxidantes, que estão presentes em diferentes compartimentos subcelulares e podem ser superexpressadas em resposta à exposição a EROs (MORANO et al., 2012). As principais enzimas incluem: dois tipos de catalase (CAT1 peroxissomal e CAT2 citoplasmática), que convertem H_2O_2 em H_2O e O_2 ; duas superóxido dismutases (Cu, Zn-SOD citoplasmática e Mn-SOD mitocondrial), que converte o ânion superóxido em H_2O_2 , para ser utilizado como substrato por outras enzimas; a glutatona que, dentre outros processos metabólicos, participa ativamente do metabolismo de EROs e manutenção do status redox da célula; 3 classes de glutatona transferases, que são codificadas em situações de estresse oxidativo, e outras enzimas (STEPHEN; JAMIESON, 1996; ESCOTÉ et al., 2012; KWOLEK-MIREK; ZADRAG-TECZA; BARTOSZ, 2012). Antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico e polifenóis são compostos que também podem proteger as células da levedura contra agentes oxidantes, mas os mecanismos que levam a esta resposta ainda não estão bem esclarecidos (GAMERO-SANDEMETRIO et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- ABU, N.E.; MBA, K. Mutagenicity testing of pharmaceutical effluents on *Allium cepa* root tip meristems. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 3, p.44-51, 2011.
- ACILAN, C.; ADIGUZEL, Z.; CEVATEMRE, B.; KARAKAS, D.; ULUKAYA, E.; RIBEIRO N. et al. Synthesis, biological characterization and evaluation of molecular mechanisms of novel copper complexes as anticancer agents. **BBA - General Subjects**, v. 61, Supplement 1, p. 137–138, 2016.
- AHMADA, I.; QADEERA, K.; HAFEEZB, A.; ZAHIDA, S. et al. Effect of ascorbic acid on the photolysis of cyanocobalamin and aquocobalamin/hydroxocobalamin in aqueous solution: A kinetic study. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 332, p. 92–100, 2017.
- AKLADIOS, F.N.; ANDREW, S.D.; CHRISTOPHER J. PARKINSON, C.J. Selective Induction of Oxidative Stress in Cancer cells via Synergistic Combinations of Agents Targeting Redox Homeostasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, Issue 13, p. 3097–3104 2015.
- AL-SARAN, N.; SUBASH-BABU, P.; AL-NOURI, D. M.; ALFAWAZ, H. A.; ALSHATWI, A. A. Zinc enhances CDKN2A, pRb1 expression and regulates functional apoptosis via upregulation of p53 and p21 expression in human breast cancer MCF-7 cell. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 47, p.19–27, 2016.
- ARYA, S.; MUKHERJEE, A. Sensitivity of *Allium cepa* and *Vicia faba* towards cadmium toxicity. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 14, p. 447-458, 2014.
- ASAIKKUTTIA, A.; BHAVANA, P. S.; VIMALAB, K.; KARTHIKA, M.; CHERUPARAMBATHCACRUSTACEAN, P. Effect of different levels dietary vitamin C on growth performance, muscle composition, antioxidant and enzyme activity of freshwater prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 229–236, 2016.
- ASTOLFI, L.; GHISELLI, S.; GUARAN, V.; CHICCA, M.; SIMONI, E.; OLIVETTO, E. et al. Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation. **Oncology Reports**, v. 29, p. 1285-1292, 2013.
- AZAD, G. K.; SINGH, V. TOMAR, R. S. Assessment of the Biological Pathways Targeted by Isocyanate Using N-Succinimidyl N-Methylcarbamate in Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.
- AZZOLINI, C.; FIORANI, M.; CERIONI, L.; GUIDARELLI, A.; CANTONI, O. Sodium dependent transport of ascorbic acid in U937 cell mitochondria. **IUBMB Life**, v. 65, p. 149–53, 2013.
- BEZERRA, D. P.; CASTRO, F.O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES M. O.; SILVEIRA E. R. et al. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two

alkaloid amides from Piper. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p.801-807, 2006.

BHATTACHARYA, Susinjan. Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System. **Free Radicals in Human Health and Disease**, p. 17-29, 2015.

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

BRACONI, D.; BERNARDINI, G.; SANTUCCI, A. Saccharomyces cerevisiae as a model in ecotoxicological studies: A post-genomics perspective. **Journal of Proteomics**, v. 137, p. 19–34, 2016.

BROWMAN, G. P.; HODSON, D. I.; MACKENZIE, R. J.; BESTIC, N.; ZURAW, L. Choosing a concomitant chemotherapy and radiotherapy regimen for squamous cell head and neck cancer: A systematic review of the published literature with subgroup analysis. **Head & Neck**, v. 23, n. 7, p. 579-589, 2001.

CALLEJO, A.; SEDÓ-CABEZÓN, L.; JUAN, I. D.; LLORENS, Jordi. Cisplatin-Induced Ototoxicity: Effects, Mechanisms and Protection Strategies. **Toxics**, v. 3, p. 268-293, 2015.

CAMARGO, B. C. V.; ANGELIS, D. F.; MORALE, M. A. M. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. **Chemosphere**, v. 161, p. 325-332, 2016.

CHEN, Y.; ZHENG, H.; ZHANG, J.; WANG, L.; JIN, X.; GAO, W. Protective effect and potential mechanisms of Wei-Chang-An pill on high-dose 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 90, p. 200-211, 2016.

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.

COSTA, D. N. B.; CARDOSO, J. C.; BASTOS, T. S. et al. Apoptosis-related Antitumor Effect of Aqueous Extract of *punica granatum* Linn. In the Sarcoma 180 Murine Model. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**. v.120, Issue 2, 2015.

CREAGAN, E. T.; FLEMING, T. R.; EDMONSON, J. H.; INGLE, J. N. Phase II evaluation of maytansine in patients with advanced head and neck cancer. **Cancer Treat Rep**, v. 63, n. 11-12, p. 2061-2062, 1979.

CRUZ-MERINO, L.; CHIESA, M.; CABALLERO, R.; ROJO, F.; PALAZÓN, N.; CARRASCO, F.H.; SÁNCHEZ-MARGALET, V. Breast Cancer Immunology and Immunotherapy: Current Status and Future Perspectives. **International Review of Cell and Molecular Biology**, 2016.

- DANENBERGA, P. V.; GUSTAVSSON, B.; JOHNSTON, P.; LINDBERG, P.; MOSERE, R.; ODIN, E. et al. Folates as adjuvants to anticancer agents: Chemical rationale and mechanism of action. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 106, p. 118–131, 2016.
- DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 740, p.364-78, 2014.
- DAYEM, A.A. Role of oxidative stress in stem, cancer, and cancer stem cells. **Cancers**, v. 2, p. 859-884. 2010.
- DE ALMEIDA, V.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- DE FALCO, M.; DE LUCA, A. Cell cycle as a target of antineoplastic drugs. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 12, p. 1417-1426, 2010.
- DER KRAAK, L. V. D.; GOEL, G.; RAMANAN, K.; KALTENMEIER, C.; ZHANG, L.; NORMOLLE, D. P. et al. 5-Fluorouracil upregulates cell surface B7- H1 (PD-L1) expression in gastrointestinal cancers. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 4, n. 65, 2016.
- DEUTSCHMANN, B.; KOLAREVIC, S.; BRACK, W.; KAISAREVIC, S.; KOSTIC, J.; KRACUN-KOLAREVIC, M. Longitudinal profile of the genotoxic potential of the River Danube on erythrocytes of wild common bleak (*Alburnus alburnus*). **Science of The Total Environment**, 2016.
- DOYLE, L. A. Sarcoma Classification: An Update Based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. **Cancer**, v. 120, p. 1763–74, 2014.
- DUCONGE, J.; MIRANDA-MASSARI, J. R.; GONZÁLEZ, M. J.; TAYLOR, P. R.; RIORDAN H. D.; RIORDAN, N. H. et al. Vitamin C pharmacokinetics after continuous infusion in a patient with prostate cancer. **Ann Pharmacother**, v. 41, n. 6, p.1082–1083, 2007.
- DUGBARTEY, G. J.; PEPPONE, L. J.; GRAAF, I. A. M. An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. **Toxicology**, v. 4, n. 371, p. 58-66, 2016.
- EL-SHAHABY, O.; MIGID, H. M. A.; SOLIMAN, M.; MASHALY, I. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium* chromosome aberration assay. **Pakistan Journal of Biological Sciences.**, v 6, p. 23-28, 2003.
- ESCOTÉ, X.; MIRANDA, M.; MENOYO, S.; RODRÍGUEZ-PORRATA, B.; CARMONA-GUTIÉRREZ, D.; JUNGWIRTH, H. et al. Resveratrol induces antioxidant defence via transcription factor Yap1p. **Yeast**, v. 29, p. 251-263, 2012.

- FACCHINIA, J. M.; ALVES, E. P.; AGUILERA, C.; GERN, R. M. M. Antitumor activity of Pleurotus ostreatus polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.68, p. 72–77, 2014.
- FARKONA, S.; DIAMANDIS, E. P.; BLASUTIG, I. M. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? **BMC Medicine**, v. 14, n. 73, 2016.
- FLOREA, A. M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. **Cancers**, v. 3, p. 1351-1371, 2011.
- FORMAN, H. J.; FUKUTO, J.; TORRES, M. Signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species: pathways and chemical principles. **Springer Science & Business Media**, 2004.
- 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.
- FUKUMURA, H.; SATO, M.; KEZUKA, K.; SATO, I.; FENG, X.; OKUMURA, S. et al. Effect of ascorbic acid on reactive oxygen species production in chemotherapy and hyperthermia in prostate cancer cells. **The Journal of Physiological Science**, v. 62, p. 251–257, 2012.
- GAMERO-SANDEMETRIO, E.; GÓMEZ-PASTOR, R.; MATALLANA, E. Antioxidant defense parameters as predictive biomarkers for fermentative capacity of active dried wine yeast. **Biotechnology Journal**, v. 9, p. 1055–1064, 2014
- GANAPATHY, S.; MURALEEDHARAN, A.; SATHIDEVI, P. S.; CHAND, P.; RAJKUMAR, R. P. Comet: An automated tool for the detection and quantification of DNA damage using comet assay image analysis. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 133, p. 143–154, 2016.
- GANGULY, N.K.; Jindal, S. K.; Biswal, S.; Barnes, P.; PAWANKAR, R. Studies on Respiratory Disorders, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. In: Chapter 2- Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations. New York: Springer Science Business Media, 2014.
- GARCÍA, M.A.; CARRASCO, E. AGUILERA, M.; ALVAREZ, P.; RIVAS C. CAMPOS, J.M. et al. The Chemotherapeutic Drug 5-Fluorouracil Promotes PKR-Mediated Apoptosis in a p53-Independent Manner in Colon and Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- GHASSEMI-BARGHI, N.; VARSHOSAZ, J.; ETEBARI, M.; JAFARIAN-DEHKORDI, A. Role of recombinant human erythropoietin loading chitosan-tripolyphosphate nanoparticles in busulfan-induced genotoxicity: Analysis of DNA fragmentation via comet assay in cultured HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 36, p. 46-52 2016.
- 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, n. 5, p. 340–345, 2015.

- GIANNATTASIO, S.; GUARAGNELLA, N.; ŽDRALEVICAND, M.; MARRA, E. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. **Frontiers in microbiology**, v. 4, n. 33, 2013.
- GLEI, M.; SCHNEIDER, T.; SCHLÖRMANN, W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. **Archives of Toxicology**, 2016.
- GONENC, A.; HACISEVKI, A.; TAVIL, Y.; CENGEL, A.; TORUN, M. Oxidative stress inpatients with essential hypertension: a comparison of dippers and non-dippers. **European Journal of Internal Medicine**, v. 24, n. 2, p. 139-144, 2013.
- GROSSNIKLAUS, U.; KELLY, B.; FERGUSON-SMITH, A. C.; PEMBREY, M.; LINDQUIST, S. Transgenerational epigenetic inheritance: how important is it? **Genetics**, v.14, p. 228-235, 2013.
- GROVESA, T. R.; FARRIS R.; ANDERSONA, J. E.; ALEXANDERA, T. C.; KIFFER, F.; CARTERA, G.; WANGA, J. et al. 5-Fluorouracil chemotherapy upregulates cytokines and alters hippocampal dendritic complexity in aged mice. **Behavioural Brain Research**. v. 316, p. 215–224, 2017.
- GUERRIERO, E.; SORICE, A.; CAPONE, F.; NAPOLITANO, V.; COLONNA, G.; STORTI, G. et al. Vitamin C Effect on Mitoxantrone-Induced Cytotoxicity in Human Breast Cancer Cell Lines. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, 2014.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer Review. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, 2011.
- HANIGAN, M. H.; DELA CRUZ, B. L.; SHORD, S. S.; MEDINA, P. J.; FAZILI, J.; THOMPSON, D. M. Optimizing chemotherapy: concomitant medication lists. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 89, n. 1, p. 114-119, 2011.
- HARB-DE LA ROSA, A.; ACKER, M.; KUMAR, R.A.; MONOHARAN, M.; Epigenetics application in the diagnosis and treatment of bladder cancer. **The Canadian Journal of Urology**, v.22, n. 5, 2015.
- HAYASHI, G. GINOCORTOPASSI, G. Oxidative stress ininherited mitochondrial diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p.10–17, 2015.
- HEANEY, M. L.; GARDNER, J. R.; KARASAVVAS, N.; GOLDE D. W.; SCHEINBERG, D. A.; SMITH, E. A. et al. Vitamin C Antagonizes the Cytotoxic Effects of Antineoplastic Drugs. **Cancer Research**, v. 68, n. 19, 2008. October 1, 2008.
- HÖFERL, M.; STOILOVA, I.; SCHMIDT, E.; WANNER, J.; JIROVETZ, L.; TRIFONOVA, D. et al. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Juniper Berry (*Juniperus communis*

L.) Essential Oil. Action of the Essential Oil on the Antioxidant Protection of *Saccharomyces cerevisiae* Model Organism. **Antioxidants**, v. 3, p. 81-98, 2014.

HUSSAIN, T.; TAN, B.; YIN, Y.; BLACHIER, F.; TOSSOU, M. C. B.; RAHU, N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-24042016.pdf>. Acessado em: 18 nov 2016.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA). Incidência de Câncer no Brasil – Estimativa 2014. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>. Data do Acesso: 16 nov 2016.

KAEHLER, C.; ISENSEE, J.; HUCHO, T.; LEHRACH, H.; KROBITSCH, S. 5-Fluorouracil affects assembly of stress granules based on RNA incorporation. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 10, p. 6436–6447, 2014.

KAITHOJU, S. Epigenetics and Cancer Therapy. **Journal of Cancer Biology & Research**, v. 2, n. 3, p. 1052. 2014.

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

KLINE, C. L. B.; EL-DEIRY, W. S. Personalizing Colon Cancer Therapeutics: Targeting Old and New Mechanisms of Action. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 988-1038, 2013.

KRAYNAK, A. R.; BARNUM, J. E.; CUNNINGHAM, C. L.; NG, A.; YKORUK, B. A.; BENNET, B. et al. Alkaline comet assay in liver and stomach, and micronucleus assay in bone marrow, from rats treated with 2-acetylaminofluorene, azidothymidine, cisplatin, or isobutyraldehyde. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 786-788, p. 77-86 2015.

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

KWOLEK-MIREK, M.; ZADRAG-TECZA, R.; BARTOSZ, G. Ascorbate and thiol antioxidants abolish sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to disulfuram. **Cell Biology and Toxicology**, v. 28, p. 1-9, 2012.

- LEE, C.; RAFFAGHELLO, L.; BRANDHORST, S.; SAFDIE, F.M.; BIANCHI, G.; MARTIN-MONTALVO, A. et al. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 124, p. 124-127, 2012.
- LEE, W. J. The Prospects of Vitamin C in Cancer Therapy. **Immune Netw**, v. 9, n. 5, p. 147-152, 2009.
- LEE, Y. J.; LEE, G. J.; YI, S. S.; HEO, S. H.; PARK, C. R.; NAM, H. S. et al. Cisplatin and resveratrol induce apoptosis and autophagy following oxidative stress in malignant mesothelioma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, 2016.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, Issue 1, p. 71–81, 2009.
- LI, S.; TAN, H.; WANG, N.; ZHANG, Z.; LAO, L.; WONG, C. et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases International. **Journal of Molecular Sciences.**, v. 16, p. 26087–26124, 2015.
- LIM, H.; WANG, X.; CROWE, P.; GOLDSTEIN, D; YAN, J. Targeting the PI3K/PTEN/AKT/mTOR Pathway in Treatment of Sarcoma Cell Lines. **Anticancer Research**, v. 36, p. 5765-5772, 2016.
- LOGESHWARAN, P.; SIVARAM, A. K.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Evaluation of cyto- and genotoxic effects of Class B firefighting foam products: Tridol-S 3% AFFF and Tridol-S 6% AFFF to *Allium cepa*. **Environmental Technology & Innovation**, v. 6, p. 185–194, 2016.
- MA, J.; YANG, J.; WANG, C.; ZHANG, N.; DONG, Y.; WANG, C. et al. Emodin Augments Cisplatin Cytotoxicity in Platinum-Resistant Ovarian Cancer Cells via ROS-Dependent MRP1 Downregulation. **BioMed Research International**, v. 2014, p 1-8, 2014.
- MATEEN, S; MOIN, S.; ZAFAR, A.; KHAN, A. Q. Redox signaling in rheumatoid arthritis and the preventive role of polyphenols. **Clinica Chimica Acta**, v. 6, n. 463, p. 4-10, 2016.
- MCCORMICK, B.; LOWES, D. A.; COLVIN, L.; TORSNEY, C.; GALLEY, H. F. MitoVitE, a mitochondria-targeted antioxidant, limits paclitaxel-induced oxidative stress and mitochondrial damage in vitro, and paclitaxel-induced mechanical hypersensitivity in a rat pain model. **British Journal of Anaesthesia**, v. 117, n. 5, p. 659–66, 2016.
- MIKIROVA, N.; CASCIARI, J.; ROGERS, A.; TAYLOR, P. Effect of high-dose intravenous vitamin C on inflammation in cancer patients. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 189, 2012.
- MOERTEL, C. G.; FLEMING, T. R.; CREAGAN, E.T.; RUBIN, J.; O'CONNELL, M. J.; AMES, M. M. High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy. A randomized double-blind comparison. **N Engl J Med**, v. 312, n. 3, p. 137-141, 1985.

MORANO, K. A.; GRANT, C. M.; MOYE-ROWLEY, W. S. The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, p. 1157–1195, 2012.

NATHENSON, M. J.; SAUSVILLE E. Looking for answers: the current status of neoadjuvant treatment in localized soft tissue sarcomas. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 2016.

NICOLA, M. C. Metastasis: Self-renewal migrates onwards. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 6-7, 2010.

NOORI, Shafaq. An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. **Open Access Scientific Reports**, v. 1, n. 8, p. 413, 2012.

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

OJHA, S.; VENKATARAMAN, B.; KURDI, A.; MAHGOU, E.; SADEK, B.; RAJESH, M. Plant-Derived Agents for Counteracting Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-27, 2016.

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

ORTEGA-VILLASANTE, C.; BURÉN, S.; BARÓN-SOLA, A.; MARTÍNEZ, F.; HERNÁNDEZ, L. E. In vivo ROS and redox potential fluorescent detection in plants: present approaches and future perspectives. **Methods**, v. 15, n. 109, p. 92-104, 2016.

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

PAN, X.; YOSHIDA, A.; KAWAI, A.; KONDO, T. Current status of publicly available sarcoma cell lines for use in proteomic studies. **Expert Review of Proteomics**, 2016.

PANAYIOTIDIS, M.; COLLINS, A. R. Ex vivo assessment of lymphocyte antioxidant status using the comet assay. **Free Radical Res**, v. 27, p. 533–537, 1997.

PANTH, N.; PAUDEL K. R.; PARAJULI, K. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. **Advances in Medicine**, p. 1-12, 2016,

PARK, J.; DAVIS, K. R.; LEE, G.; JUNGE, M.; JUNGE, Y.; PARKE, J. et al. Ascorbic acid alleviates toxicity of paclitaxel without interfering with the anticancer efficacy in mice. **Nutrition Research**, v. 32, n. 11, p. 873-883, 2012.

PARROW NL.; LESHIN JA, LEVINE M. Parenteral ascorbate as a cancer therapeutic: a reassessment based on pharmacokinetics. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 17, 2141-2156, 2013.

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

PEREGO, P.; JIMENEZ, G.S.; GATTI, L.; HOWELL, S.B.; ZUNINO, F. Yeast mutants as a model system for identification of determinants of chemosensitivity. **Pharmacology Reviews**, v. 52, n. 4, p. 477-492, 2000.

PEREZ, D. G.; RUIZ, E. G.; ALCALDE, M. *Saccharomyces cerevisiae* in directed evolution: An efficient tool to improve enzymes. **Bioengineered Bugs**, v. 3, n. 3, p. 172–177, 2012.

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

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

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

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, 2016.

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

SADOWSKA-BARTOSZ, C.; OTT, T. BARTOSZ, G.; BARTOSZ, G. Posttranslational protein modifications by reactive nitrogen and chlorine species and strategies for their prevention and elimination. **Free Radical Research**, v. 48, n. 11, p. 1267-1284, 2014.

SAMUEL, J.; JAYNE, S.; CHEN, Y.; MAJID, A.; WIGNALL, A.; WORMULL, T. et al. Post-transcriptional Up-regulation of p53 by Reactive Oxygen Species in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Cancer Research**, v. 76, n. 21, p. 6311-6319, 2016.

SATO, D.; WAL, R.; OLIVEIRA, C. C.; CATTANEO, R.; MALVEZZI, M.; GABARDO, J. et al. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**, v. 94, p. 26–32, 2005.

SHAMBAUGH, E. M. et al. **Self-instructional manual for tumor registrars**. 8^a ed., U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 2003.

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

SILVA, R G.; ALENCAR, M. V. O. B.; TEIXEIRA, J. S.; SILVA, R. R.; PAZ, M. F. C. J.; SOUSA, J. M. C. Genotoxicity and DNA Repair Indicative in Blood Cells after Occupational Exposure to Ionizing Radiation. **International Archives of Medicine**, v. 9, n. 121, p. 1-13, 2016.

SILVERSTEIN, R. A.; DE VALDIVIA, E. G.; VISA, N. The Incorporation of 5-Fluorouracil into RNA Affects the Ribonucleolytic Activity of the Exosome Subunit Rrp6. **Molecular Cancer Research**, v. 9, n. 3, p. 332–40, 2011.

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

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

STEPHEN D. W.S., JAMIESON, D. J. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 141, p. 207-212, 1996.

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

STÖHR, W.; PAULIDES, M.; BIELACK, S.; JÜRGENS, H.; KOSCIELNIAK, E.; ROSSI, R. et al. Nephrotoxicity of Cisplatin and Carboplatin in Sarcoma Patients: A Report From the Late Effects Surveillance System. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 48, p. 140–147, 2007.

STOJNEV, S.; RISTIÜ-PETROVIÜ , A.; JANKOVIÜ-VELIPKOVIÜ, L. Reactive oxygen species, apoptosis and cancer. **Vojnosanitetski Pregled**, v. 70, n. 7, p. 675–678, 2013.

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

SWIFT, L. H.; GOLSTEYN, R. M. Genotoxic Anti-Cancer Agents and Their Relationship to DNA Damage, Mitosis, and Checkpoint Adaptation in Proliferating Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 3403-3431, 2014.

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

THOMAS, S. A. et al. Adverse effects of 5-fluorouracil: focus on rare side effects. **Can Cell Microenviron**, v.3, 2016.

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

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

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

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

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

WEI, Y.; SCHATTEN, H.; SUN, QY. Environmental epigenetic inheritance through gametes and implications for human reproduction. **Human Reproduction Update**, v.0, n.0, p. 1–15, 2014.

WEIDINGER, A.; KOZLOV, A. V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. **Biomolecules**, v. 5, p. 472-484, 2015.

WU, M. J.; O'DOHERTY, P. J.; MURPHY, P. A.; LYONS V.; CHRISTOPHERSEN, M.; ROGERS, P. J. et al. Different Reactive Oxygen Species Lead to Distinct Changes of Cellular Metal Ions in the Eukaryotic Model Organism *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 8119-8132, 2011.

YAN, D.; An, G. Y.; KUO, M. T. C-Jun N-terminal kinase signalling pathway in response to cisplatin. **Journal of Cellular and Molecular Medecine**. v. 20, n. 11, p. 2013-2019, 2016.

ZHANG, N.; YIN, Y.; XU, S. J.; CHEN, W. S. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. **Molecules**, v. 13, p. 1551-1569, 2008.

ZHU, H.; LUO, H.; ZHANG, W.; SHEN, Z.; HU, X.; ZHU, X. Molecular Mechanisms of Cisplatin Resistance in Cervical Cancer. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 1885–1895, 2016.

ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of Sarcoma 180. **Cancer Research**, v. 33, p. 2278-2282, October 1973.

**4. CAPÍTULO I: Drogas antineoplásicas e o tratamento alternativo com ácido
ascórbico para o câncer: uma revisão**

Drogas antineoplásicas e o tratamento alternativo com ácido ascórbico para o câncer: uma revisão

Antineoplastic drugs and alternative treatment with ascorbic acid for cancer: a review

Josemar José da Silva Júnior¹
Nárcia Mariana Fonseca Nunes¹
Leonardo da Rocha Sousa¹
Paulo Michel Pinheiro Ferreira²
Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva²

RESUMO

O câncer é uma das doenças mais frequentes no mundo e representa a 2^a maior causa de morte no Brasil perdendo somente para as doenças cardiovasculares. Dentre os tratamentos do câncer, a utilização de drogas antineoplásicas é reconhecida pelo o sucesso do aumento da capacidade de sobrevivência e os resultados terapêuticos positivos para muitos dos cânceres. O objetivo do estudo foi realizar um levantamento literário sobre os efeitos dos principais antineoplásicos, Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Cisplatina e 5-Flourouracil, utilizados em associação com o ácido ascórbico na terapia alternativa. Para a revisão, foram utilizados artigos das seguintes bases de dados: MEDLINE/PUBMED (Medical Literature Analysis and Retrievel System Online), ScienceDirect, SCIELO (Scientific Eletronic Library) e LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde). Pode-se observar que alguns estudos demonstraram que o AA não alterou o mecanismo de ação de algumas drogas, além de ele não terem apresentado nenhum benefício ao paciente quando utilizadas em associação com as drogas estudadas. Porém, na maioria dos estudos analisados, um efeito benéfico nos tratamentos de vários tipos de câncer diminuindo a toxicidade dos quimioterápicos sobre as células normais, amenizando assim, as reações adversas e consequentemente um aumento na eficiência da terapia e na qualidade de vida do paciente. Contudo, em alguns estudos, a vitamina teve um efeito antagonista em relação ao quimioterápico, comprometendo o tratamento.

Palavras-chave: Câncer; Antineoplásicos; Ácido ascórbico.

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

²Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí - UFPI.

ABSTRACT

Cancer is one of the most frequent diseases in the world and represents the 2nd largest cause of death in Brazil, losing only to cardiovascular diseases. Among cancer treatments, the use of antineoplastic drugs is recognized by the success of increasing survival capacity and the positive therapeutic results for many cancers. The objective of the study was to perform a literary survey on the effects of the main antineoplastic drugs, Doxorubicin, Cyclophosphamide, Cisplatin and 5-Fluorouracil, used in association with ascorbic acid in alternative therapy. For the review, articles from the following databases were used: MEDLINE / PUBMED (Scientific Literature Analysis and Retrieval System Online), ScienceDirect, SCIELO (Scientific Electronic Library) and LILACS (Latin American and Caribbean Literature in Health Sciences). It can be observed that some studies have shown that AA did not alter the mechanism of action of some drugs, besides that they did not present any benefit to the patient when used in association with the drugs studied. However, in most of the studies analyzed, a beneficial effect in the treatment of various types of cancer decreasing the toxicity of the chemotherapeutic drugs on normal cells, thus reducing adverse reactions and consequently an increase in the efficiency of therapy and the quality of life of the patient. Furthermore, in some studies, the vitamin had an antagonistic effect on chemotherapy, compromising treatment.

Keywords: Cancer; Antineoplastic; Ascorbic acid.

4.1. Introdução

O câncer é uma das doenças mais frequentes no mundo e representa a 2ª maior causa de morte no Brasil perdendo somente para as doenças cardiovasculares (ARAÚJO; GALVÃO, 2010). Dentre os tratamentos do câncer, a utilização de drogas antineoplásicas é reconhecida pelo o sucesso do aumento da capacidade de sobrevivência e os resultados terapêuticos positivos para muitos dos cânceres (INCA,2014). A quimioterapia é a terapia sistêmica de grande impacto e de comum uso, após a ressecção cirúrgica, empregada no manejo clínico do câncer cujo objetivo primário é destruir as células neoplásicas, preservando as normais e sua ação pode atuar de forma direta ou indireta sobre as células tumorais. (ZENG; MORGENSTERN; NYSTRÖM, 2014).

Os quimioterápicos podem ser classificados em agentes alquilantes, antimetabólitos, compostos de platina, antibióticos, produtos vegetais, hormônios e análogos e agentes diversos (MALUF; ERDTMANN, 2000). Os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer incluem Doxorubicina, Cisplatina, 5-Fluorouracil e Ciclofosfamida (GALLUZZI et al., 2012; CHENNURU; SALEEM, 2013; WANG et al., 2015;). O tratamento moderno do câncer compreende

cada vez mais a quimioterapia combinada, e às vezes, em associação com outros métodos de tratamento, incluindo terapias alvo, terapias gênicas e imunoterapia (MIOIA; PERVELLINI, 2000; LUTTERBECK; MACHADO; KUMMERER, 2015).

Dentre os tratamentos adjuvantes do câncer, o Ácido Ascórbico (AA) ou Vitamina C é considerado um potente antioxidante que pode contribuir para qualidade de vida das pessoas no que se refere em reduzir danos e efeitos colaterais não intencionais produzidos pelas EROs, capacidade de resposta imune (SUBRAMANI, 2014) e também ser utilizado como co-factor para várias enzimas (HERST et al., 2012).

O uso do AA como terapia do câncer ou adjuvante à quimioterápica convencional ainda é bastante controverso. Estudos mostram que a suplementação com vitamina C pode induzir a formação de genotoxinas de hidroperóxidos e resultar em danos ao DNA e iniciação da carcinogênese quando o uso é diário, mesmo em doses moderadas (LEE; OE; BLAIR, 2001; UETAKI et al., 2015), potencializando a citotoxicidade de alguns antineoplásicos, a qual pode estar relacionada à produção extracelular de peróxido de hidrogênio, comprometendo na eficácia da terapia (MA et al., 2014).

O objetivo do estudo foi realizar um levantamento literário sobre os efeitos dos principais antineoplásicos, Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Cisplatina e 5-Flourouracil, utilizados em associação com o ácido ascórbico na terapia alternativa.

4.2. Metodologia

4.2.1. Tipo de estudo

Trata-se de uma revisão sistemática de literatura, baseada numa pesquisa qualitativa descritiva com embasamento teórico em artigos científicos publicados nos últimos anos.

4.2.2. Coleta de dados

Os dados foram todos obtidos dos principais sites de periódicos conhecidos no meio acadêmico, considerando a questão norteadora os efeitos dos principais antineoplásicos, Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Cisplatina e 5-Flourouracil, utilizados em associação com o ácido ascórbico na terapia alternativa. As bases de dados como MEDLINE/PUBMED (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), ScienceDirect, SCIELO (Scientific Eletronic Library) e LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde). Nos diferentes bancos de dados,

utilizaram-se as seguintes combinações de termos, em português e inglês, para a pesquisa: 1) “Cisplatina” ou “Cisplatin” e “vitamina C” ou “vitamin C” ou “ácido ascórbico” ou “ascorbic acid”; 2) “5-Fluorouracil” ou “5-FU” e “vitamina C” ou “vitamin C” ou “ácido ascórbico” ou “ascorbic acid”; 3) “Ciclofosfamida” ou “Cyclophosphamide” e “vitamina C” ou “vitamin C” ou “ácido ascórbico” ou “ascorbic acid”; 4) “Doxorrubicina” ou “Doxorubicin” e “vitamina C” ou “vitamin C” ou “ácido ascórbico” ou “ascorbic acid”.

4.2.3. Critérios de inclusão e exclusão

Para a construção da revisão, foram utilizados apenas os artigos que relatavam acerca dos efeitos da associação de diferentes antineoplásicos com a vitamina C em humanos ou modelos animais, publicados nos últimos 10 anos. Os trabalhos que não se encaixavam nestes critérios pré-determinados foram descartados (**Figura 1**).

Figura 1. Tabelas com a relação dos artigos encontrados, utilizados e descartados.

DOXORRUBICINA + VIT. C				CICLOFOSFAMIDA + VIT. C			
PUBMED	ScienceDirect	SciELO	LILACS	PUBMED	ScienceDirect	SciELO	LILACS
71 artigos encontrados	16 artigos encontrados	1 artigos encontrados	52 artigos encontrados	61 artigos encontrados	14 artigos encontrados	4 artigos encontrados	35 artigos encontrados
6 artigos utilizados	2 artigos utilizados	0 artigos utilizados	3 artigos utilizados	4 artigos utilizados	2 artigos utilizados	1 artigos utilizados	3 artigos utilizados
65 artigos descartados	14 artigos descartados	1 artigos descartados	49 artigos descartados	57 artigos descartados	12 artigos descartados	3 artigos descartados	32 artigos descartados
CISPLATINA + VIT. C				5-FLUOROURACIL + VIT. C			
PUBMED	ScienceDirect	SciELO	LILACS	PUBMED	ScienceDirect	SciELO	LILACS
85 artigos encontrados	55 artigos encontrados	0 artigos encontrados	79 artigos encontrados	24 artigos encontrados	9 artigos encontrados	1 artigos encontrados	40 artigos encontrados
17 artigos utilizados	8 artigos utilizados	0 artigos utilizados	11 artigos utilizados	3 artigos utilizados	2 artigos utilizados	1 artigos utilizados	3 artigos utilizados
68 artigos descartados	47 artigos descartados	0 artigos descartados	68 artigos descartados	21 artigos descartados	7 artigos descartados	0 artigos descartados	37 artigos descartados

4.2.4. Análise dos dados

Os artigos escolhidos foram tabulados em planilhas no Word/Excel para melhor demonstração dos resultados e foram feitas comparações cruzadas entre os dados de diversos autores para o enriquecimento do conteúdo.

4.3. Resultados e Discussão

Ao total, foram utilizados 36 artigos para a construção da **Tabela 1**: 20 acerca dos efeitos da associação de cisplatina e vitamina C, seis artigos sobre a associação de 5-FU à vitamina, 5 sobre a associação de ciclofosfamida à vitamina C, sete artigos sobre os efeitos da associação de vitamina C à Doxorubicina. Vale salientar que, durante o levantamento de dados, alguns artigos foram exibidos em diferentes bancos de dados e um artigo relatava acerca da associação de vários antineoplásicos com a vitamina C, além de alguns apresentarem os resultados similares.

Apesar de alguns ensaios pré-clínicos e casos clínicos terem a terapia suplementar com vitamina C como um ponto positivo no tratamento do câncer, essa terapia alternativa ainda está em debate na comunidade científica, tendo-se em vista que provas científicas sobre a segurança e efetividade desta vitamina, além de muitas outras evidências terapêuticas, ainda não terem sido clinicamente investigadas (FUCHS-TARLOVSKY et al., 2011); HOFFER et al., 2015; LI; ZHANG; TANG, 2016).

Foi observado que alguns estudos demonstraram que o AA não alterou o mecanismo de ação de algumas drogas como a cisplatina e a ciclofosfamida, além de não apresentar nenhum benefício ao paciente quando utilizadas em associação com as drogas estudadas. Também foi visto que o AA possui, na maioria dos estudos analisados, um efeito benéfico nos tratamentos de vários tipos de câncer diminuindo a toxicidade dos quimioterápicos sobre as células normais, amenizando assim, as reações adversas e conseqüentemente um aumento na eficiência da terapia e na qualidade de vida do paciente. Contudo, em alguns estudos, a vitamina teve um efeito antagonista em relação ao quimioterápico, comprometendo o tratamento (Tabela 1).

O 5-Fluorouracil (5-FU) é um análogo da uracila e timina diferenciando apenas o átomo de flúor na posição C-5 em vez de hidrogênio (KAEHLER et al., 2014). É uma droga amplamente utilizada sozinha ou em combinação no tratamento de várias patologias (LONGLEY; KARKIN; JOHNSTON, 2003; TUMMALA, KUMAR, PRAKASH, 2014). Seu mecanismo de ação é baseado na sua capacidade de inibição à síntese de DNA e RNA, na condução à paragem do ciclo celular levando a apoptose, bem como, na inibição da enzima timidilato sintetase utilizada na síntese de nucleotídeos (LONGLEY; KARKIN; JOHNSTON, 2003; KANDIOLER et al., 2015).

No estudo realizado por Al-Asmari et al., (2015) observou-se que, o AA quando associado com ao 5-FU, atua de forma antioxidante modulando do estresse oxidativo provocado pela antineoplásico através da ativação de fatores de transcrição sensíveis a

alterações no status redox e a regulação da transcrição de moléculas alvo. Dessa forma, a vitamina C atenua a toxicidade causada por 5-FU, principalmente nas células hepáticas, dado um efeito protetivo (ABOU-ZEID, 2014).

Em contrapartida, da mesma forma que o efeito antioxidante do AA atua na diminuição de hepatotoxicidade causado pelo 5-FU, esse mesmo mecanismo de ação pode causar inferências no tratamento, devido o principal mecanismo de ação do 5-FU ser o aumento do estresse oxidativo em células tumorais. Em um trabalho realizado por Fu et al. (2014) demonstrou que a vitamina C (50µg/kg) reduziu o efeito citotóxico de 5-FU em células de câncer de cólon, por meio da regulação da fosforização de caspase-7 dependente de Src.

Tabela 1. Resultados da pesquisa realizadas sobre os principais antineoplásicos usados no tratamento contra o câncer feita nos principais bancos de dados online

Tipo de Associação	Dose de vit. C	Efeitos	Referencias	Bancos de dados
Diferentes antineoplásicos + vitamina C	20 U/ μ mol	Pré-tratamento com vitamina C atenua a citotoxicidade de drogas antineoplásicas em linhagens de células de linfoma e leucemia. Efeito antagonista da droga.	Heaney et al., (2008)	PUBMED
5-FU + Vitamina C	Solução aquosa 1%	Redução dos níveis de GSH, tornando células tumorais de linfoma de Dalton mais susceptíveis a morte celular induzida por 5-FU.	Prasad et al., (2010)	LILACS
5-FU ou Ciclofosfamida ou Doxorrubicina + Vitaminas C	500mg	Aumento nos níveis de defesas antioxidantes e redução de danos ao DNA em pacientes com câncer de mama.	Suhail et al., (2012)	PUBMED/LILACS
5-FU + Vitamina C	12 mg/kg	Atenuação da hepatotoxicidade causada por 5-FU em camundongos. Efeito protetivo da vitamina C.	Abou-Zeid, (2014)	Science Direct
5-FU + Vitamina C	500 mg/kg	Redução da toxicidade gastrointestinal em ratos tratados com o antineoplásico.	Al-Asmari et al., (2015)	Science Direct
5-FU + Vitamina C	500 mg/kg	Atenua a geração de radicais livres e mediadores inflamatórios pela droga. Redução da toxicidade hepática de ratos.	Al-Asmari et al., (2016)	PUBMED/Science Direct
Cisplatina + vitamina C	500mg/kg	Efeito nefroprotetor da vitamina	Ajith et al., (2007)	Science Direct
Cisplatina + Vitaminas C	500mg/kg	Doses únicas ou múltiplas da associação de vitaminas melhora os danos renais causados pela cisplatina em ratos.	Ajith et al., (2009)	PUBMED
Cisplatina + Vitamina C	10 mg/kg	A vitamina reduz parcialmente os efeitos gonodotóxicos causados pela cisplatina em camundongos	Narayana et al., (2009)	PUBMED
Cisplatina + Vitamina C	10 mg/kg	A vitamina não tem efeito sobre a citotoxicidade do antineoplásico em células de camundongos.	Narayana (2010)	PUBMED/Science Direct
Cisplatina + Vitamina C	100 mg/kg	A associação de antioxidantes preveniu o número de células apoptóticas em tecidos testiculares de ratos que receberam tratamento com a droga.	Ahmed et al., (2011)	PUBMED/Science Direct

Cisplatina + Vitamina C	Solução aquosa 1%	Aumento da peroxidação lipídica de mitocôndrias de células de linfoma de Dalton. Aumento da atividade tumoral da cisplatina.	Martha et al., (2011)	PUBMED/LILACS
Cisplatina + Vitamina C	100µg/ml	A vitamina C aumenta a apoptose de células humana de câncer de cólon tratadas com a droga.	An et al., (2011)	PUBMED/LILACS
Cisplatina + vitamina C	0,1mg/kg	Danos ao DNA e fosforilação de p53 em células hepáticas são mitigados pela vitamina C. Efeito hepatoprotetor.	Narayna (2012)	PUBMED/LILACS/ Science Direct
Cisplatina + vitamina C	500mg/kg	Efeito hepatoprotetor da vitamina em camundongos.	Bhattacharyya e Mehtab (2012)	PUBMED/LILACS
Cisplatina + vitamina C	250mg/kg	Vitamina C não apresenta efeito nefroprotetor em ratas ooforectomizadas.	Nematbakhsh et al., (2012)	PUBMED
Cisplatina + vitamina C	50mg/kg	Vitamina reduz a ototoxicidade induzida pela droga em ratos.	Tokgöz et al., (2012)	LILACS/PUBMED
Cisplatina + vitamina C	50mg/kg e 100 mg/kg.	Efeito protetivo contra anemia induzida pela droga.	Gao et al., (2013)	LILACS
Cisplatina + coquetel de antioxidantes	50mg/kg	Antioxidantes protegem e aumentam a recuperação das funções testiculares de ratos após a quimioterapia.	Kilarkaje et al., (2013)	PUBMED
Cisplatina + vitamina C	100 mg/ml	Administração intratimpanica da vitamina previne ototoxicidade.	Celebi et al., (2013)	PUBMED/ LILACS
Cisplatina + vitamina C	200mg/kg e 1000mg/kg	Vitamina C reduz os efeitos adversos em camundongos portadores de câncer de pulmão tratados com cisplatina, sem comprometer a eficácia da droga.	Chen et al., (2014)	PUBMED/LILACS
Cisplatina + coquetel de antioxidantes	50mg/kg	Aumento da síntese de testosterona em ratos que receberam a quimioterapia.	Kilarkaje (2014)	PUBMED
Cisplatina + vitamina C	25 mg/kg	Pré-tratamento com a vitamina reduz nefrotoxicidade e melhora qualidade de vida de camundongos.	Guindon et al., (2014)	PUBMED/LILACS
Cisplatina + Vitamina C	100mg/kg	Prevenção de estresse oxidativo causado pela droga em ratas.	Aksoy et al., (2015)	LILACS/MEDLINE/PUBMED
Cisplatina + vitamina C	17.65 a 19.20 mg	Redução da toxicidade nos tecidos de camundongos portadores de linfoma de Dalton.	Longchar e Prasad (2015)	Science Direct

Cisplatina + Vitamina C	100 µg/ml	Indução de morte de células de câncer cervical via alteração do status redox e ativação de p53.	Leekha et al., (2016)	PUBMED/LILACS
Ciclofosfamida + vitamina C	Solução aquosa 1%	Redução dos níveis de GSH reduzida, tornando células tumorais de linfoma de Dalton mais susceptíveis a morte celular induzida por ciclofosfamida.	Prasad et al., (2010)	PUBMED/LILACS/Science Direct
Ciclofosfamida + vitamina C	200mg/kg	Efeito protetivo da vitamina contra a toxicidade causada pela droga em ovários de ratas.	Gürgen et al., (2013)	PUBMED/LILACS/Science Direct
Ciclofosfamida + vitamina C	200mg/kg	Administração oral de vitamina C atenua cistite hemorrágica induzida pela droga em ratos.	Farshid et al., (2013)	PUBMED/LILACS
Ciclofosfamida + vitamina C	50mg/kg	A vitamina não apresentou efeito protetivo contra os danos oxidativos ocasionados pelo antineoplásico em camundongos	Araújo et al., (2016)	SCIELO
Doxorrubicina + Vitaminas C	250 mg/kg	Suplementação crônica com vitaminas aumenta a sobrevivência e melhora parâmetros bioquímicos em ratos.	Santos et al., (2007)	PUBMED
Doxorrubicina + Vitamina C	25 µM	Modulação da cardiotoxicidade induzida pelo antineoplásico pela redução de p53 e ativação de proteína quinase.	Ludke et al., (2010)	Science Direct
Doxorrubicina + Vitamina C	5 - 100 µM	Efeito protetivo da vitamina em células do miocárdio de ratos.	Ludke et al., (2012)	PUBMED/LILACS
Doxorrubicina + Vitamina C	20 mg/kg	Efeito cardioprotetor na toxicidade do miocárdio induzida pela doxorrubicina em ratos.	Swamy et al., (2015)	PUBMED
Doxorrubicina + Vitamina C	25 µM	A vitamina reduz o estresse nitrosativo induzido pela droga. Efeito cardioprotetor.	Akolkar et al., (2015)	Science Direct
Doxorrubicina + Vitamina C	100µMol/kg	Efeitos protetivos no miocárdio por via antioxidante.	Wang et al., (2016)	PUBMED/LILACS

A cisplatina, incluída no grupo dos agentes alquilantes, é um complexo neutro inorgânico e planar e seu mecanismo de ação envolve a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), as quais induzem a formação de lesões oxidativas no DNA, levando à quebras simples ou duplas na estrutura destas moléculas (GEORGIADIS et al., 2016; KANG et al., 2012). A ação citotóxica da cisplatina é descrita pela sua interação com sítios nucleofílicos N-7 das purinas no DNA, formando interações proteína-DNA, ligações cruzadas inter- e intrafitas e monoaddutos com o DNA, os quais são as principais lesões responsáveis pela morte celular (WANG; LIPPARD, 2005).

Em associação com a cisplatina, a vitamina C intensifica a ação citotóxicas da droga em células humanas de câncer de cólon (AN et al., 2011) e da linhagem de células SiHa (LEEKHA et al., 2016), por meio do aumento da expressão de p53 e de aumento de peróxido de hidrogênio, levado ao aumento de apoptose nestas células. Outros estudos também demonstram que esta vitamina, quando usada em combinação a cisplatina, acentua a toxicidade induzida pela droga, sem afetar nos seus efeitos quimioterápicos (DE MARTINIS; BISNCHI, 2001; FATIMA; ARIVARASU; MAHMOOD, 2007; LONGCHAR; PRASAD, 2016).

No estudo realizado por Heaney et al. (2008) demonstrou que, quando a vitamina C é administrada antes da cisplatina, ela antagoniza a eficácia terapêutica da droga em um modelo humano de câncer hematopoiético, por meio da preservação do potencial de membrana na mitocôndria, levando a uma redução dos níveis de apoptose nas células cancerosas tratadas com os antineoplásicos.

Por este motivo, a utilização da vitamina C em concomitância com agentes usados no tratamento do câncer, tais como a cisplatina e 5-FU, levam ao aumento na produção de EROs, na indução de citotoxicidade de células tumorais potencializando os efeitos de antineoplásicos, por meio da geração EROS, por via pró-oxidante ou controversamente atenuar as atividades de antineoplásicos que induzem a produção de EROs, por via antioxidante (GONZÁLEZ et al., 2005; LI et al., 2014).

A ciclofosfamida, ainda no grupo dos agentes alquilantes, é uma classe de moléculas citotóxicas, que possuem, em comum, uma habilidade de tornar-se compostos eletrofílicos fortes, que formam ligações covalentes com os grupos do DNA. O mecanismo de ação consiste na acilação com substituição nucleofílica (SN1 ou SN2) do DNA, preferencialmente a 7N-guanina, 6O-guanina e 3N-citosina (KOROKOLVAS; KOROKOLVAS; CUNHA, 2002; HAUBITZ et al., 2002).

A combinação da ciclofosfamida com o AA produz uma redução dos níveis de GSH, tornando células tumorais mais susceptíveis a morte celular induzida pela ciclofosfamida (PRASAD et al., 2010). Essa associação também produz um efeito protetivo contra citotoxicidade do antineoplásico nas células reprodutivas, digestivas e renais, diminuindo o efeito adversos e melhorando a qualidade vida do paciente que reagem melhor a terapia (GÜRGEN et al., 2013, FARSHID et al., 2013). Na pesquisa realizada por Araújo et al., (2016), a vitamina C não apresentou efeito protetivo contra os danos oxidativos ocasionados pelo antineoplásico em camundongos. Contudo, também não se observou nenhum efeito prejudicial aos camundongos.

A Doxorrubicina atua na inibição da topoisomerase I e II, responsáveis pela separação das cadeias duplas de DNA durante a replicação produz espécies reativas de oxigênio (EROs) conduzindo danos ao DNA, morte celular por apoptose, estimulação da ligação a p53-DNA, ativação da cascata de caspase, e reticulação do DNA (MINOTTI et al., 2004, CORTES-FUNES; CORONADO, 2007). Danos no DNA topoisomerase II é seguido por paragem do crescimento em G 1 e G 2 e morte celular programada (ATTIA; BAKHEET, 2013).

A associação da Doxorrubicina com a vitamina C não apresenta nenhum efeito sobre a ação citotóxica do antineoplásico em uma variedade de células tumorais (SWAMY et al., 2015). Isso sugere que a produção de EROs pode não ser o principal mecanismo subjacente a atividade antitumoral da Doxorrubicina (TAKEMURA; FUJIWARA; 2007). Porém, Wang et al. (2016), em seu estudo, demonstrou que a vitamina C modula os efeitos cardiotoxícos induzidos pelo antineoplásico pela redução de p53 e ativação de proteína quinase em ratos sem o comprometimento da quimioterapia.

Então, deve-se levar em consideração a utilização da vitamina C como agente antioxidante, uma vez que ele proporciona uma redução dos efeitos adversos induzidos na quimioterapia, mas em alguns casos pode apresentar o potencial de reduzir a efetividade da quimioterapia em células cancerosas. Dessa forma, são necessários estudos específicos para cada antineoplásico para um melhor entendimento de sua interação com os diferentes antineoplásicos (SUBRAMANI et al., 2014).

4.4. Considerações Finais

Devido ao limitado número e complexidade dos estudos clínicos sobre o efeito de antioxidantes do ácido ascórbico na modulação tratamento do câncer, muitos pesquisadores e oncologistas acreditam que o concomitante uso de antioxidantes

suplementares devem ser evitados durante o tratamento convencional do câncer, pois os antioxidantes podem interferir com quimioterapia, impedindo com que células cancerosas sejam mortas por espécies reativas de oxigênio (EROS).

No entanto, em defesa dos antioxidantes, estudos experimentais têm demonstrado que a vitamina C induz seletivamente a apoptose em células cancerosas, mas não em células normais. Além disso, estudos mostram um aumento da eficácia de muitos agentes quimioterapêuticos, bem como uma diminuição dos efeitos tóxicos adversos quando administrado concomitantemente com antioxidantes como a vitamina C, o que sugere um potencial papel adjuvante na terapia do câncer.

A teoria mais aceita pelos estudos mais recentes é que o ácido ascórbico, quando utilizado em baixas doses com os antineoplásicos, apresenta um efeito antioxidante, atenuando assim a ação destes fármacos (AKOLKAR et al., 2015; WANG et al., 2016). Já quando utilizado em altas doses, apresenta um efeito pró-oxidante, atuando assim em sinergismo com os antineoplásicos, potencializando a terapia anticâncer (NA et al., 2011; MARTHA et al., 2011).

REFERÊNCIAS

ABOU-ZEID, N.R.A. Ameliorative effect of vitamin C against 5-fluorouracil-induced hepatotoxicity in mice: A light and electron microscope study. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, n. 4, v. 67, p: 109–118, 2014.

AHMED, E.A.; OMAR, H.M.; ELGHAFAR, S.K.; RAGB, S.M. et al. The antioxidant activity of vitamin C, DPPD and L-cysteine against Cisplatin-induced testicular oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, n. 49, v. 5, p:1115-1121, 2011.

AJITH, T.A.; ABHISHEK, G.; ROSHNY, D.; SUDHEESH, N.P. Co-supplementation of single and multi doses of vitamins C and E ameliorates cisplatin-induced acute renal failure in mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, n. 61, v. 6, p: 565-571, 2009.

AJITH, T.A.; USHA, S.; NIVITHA, V. Ascorbic acid and α -tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: a comparative study. **Clinica Chimica Acta**, v. 375, p: 82–86, 2007.

AKOLKAR, G.; BAGCHI, A.; JASSAL, D.; SINGAL, P. Vitamin C reduces doxorubicin-induced nitrosative stress by regulation of nitric oxide synthase. **Canadian Journal of Cardiology**, n. 10, v. 31, p: S66, 2015.

AKSOY, A.N.; KUCUR, S.K.; BATMAZ, G.; GÖZÜKARA, I. et al. The role of antioxidant activity in the prevention and treatment of infertility caused by Cisplatin in rats. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, n.79, v. 2, p: 119-125, 2015.

AL-ASMARI, A.K.; KHAN, A.Q.; AL-MASRI. Mitigation of 5-fluorouracil-induced liver damage in rats by vitamin C via targeting redox-sensitive transcription factors. **Human and Experimental Toxicology**, n. 1, v. 11, 2016.

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

AN, S.H.; KANG, J.H.; KIM, D.H.; LEE, M.S. Vitamin C increases the apoptosis via up-regulation p53 during cisplatin treatment in human colon cancer cells. **BMB Reports**, n. 44, v. 3, p:211-216, 2011.

ARAÚJO, A. P. S.; GALVÃO, D. C. A. Câncer ósseo: enfoque sobre a biologia do câncer. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 3, n. 3, p. 359-363, 2010.

ARAUJO, E.S.; GARCIA, R.S.; DAMBRÓS, B.; PIENIZ, S. ET AL. Impacto da suplementação de vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutatona reduzida em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida. **Revista de Nutrição**, n. 4, v. 29, p:579-587, 2016.

ATTIA, S. M.; BAKHEET, S. A. Effect of dihydrokainate on the capacity of repair of DNA damage and apoptosis induced by doxorubicin. *Mutagenesis*, v. 28, p. 257-261, 2013.

BHATTACHARYYA, S.; MEHTA, P. The hepatoprotective potential of Spirulina and vitamin C supplementation in cisplatin toxicity. **Food & Function**, n. 3, v. 2, p: 164-169, 2011.

CARVALHO, M.C.M. *Construindo o Saber: Metodologia Científica, Fundamentos e Técnicas*. 24 ed. Campinas: Papyrus, 2012.

CELEBI, S.; GURDAL, M.M.; OZKUL, M.H.; YASAR, H.; et al. The effect of intratympanic vitamin C administration on cisplatin-induced ototoxicity. **European Archives of Otorhinolaryngology**, n. 270, v.4, p: 1293-1297, 2013.

CHEN, M.F.; YANG, C.M.; SU, C.M.; HU, ML. Vitamin C protects against cisplatin-induced nephrotoxicity and damage without reducing its effectiveness in C57BL/6 mice xenografted with Lewis lung carcinoma. **Nutrition and Cancer**, n. 66, v.7, p: 1085-1091, 2014.

CHENNURU, A; SALEEM, M. T. Antioxidant, lipid lowering and membrane stabilization effect of sesamol against doxorubicin- induced cardiomyopathy in experimental rats. *BioMed Research International*, v. 20, n. 13, p. 205-220, 2013.

CORTÉS-FUNES, H.; CORONADO, C. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovascular Toxicology*, v. 7, n. 2, p. 56-60, 2007.

DE MARTINIS, B. S.; BIANCHI, M.D. Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats. **Pharmacological Research**, v. 44, p. 317-320, 2011.

FARSHID, A. A.; TAMADDONFARD, E.; RANJBAR, S. Oral administration of vitamin C and histidine attenuate cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, n. 45, v. 2, p: 126–129, 2013.

FU, Y.; YANG, G.; ZHU, F.; PENG, C.; LI, W.; LI, H. et al. Antioxidants decrease the apoptotic effect of 5-Fu in colon cancer by regulating Src-dependent caspase-7 phosphorylation. *Cell Death and Disease*, v. 5, n. 983, 2014.

FUCHS-TARLOVSKY, V.; BEJARANO-ROSALES, M.; GUTIÉRREZ-SALMEÁN, G.; CASILLAS, M.A.; LÓPEZ-ALVARENGA, J.C., CEBALLOS-REYES, G.M. Effect of antioxidant supplementation over oxidative stress and quality of life in cervical cancer. *Nutrición Hospitalaria*, v. 26, n. 4, p. 819-826, 2011.

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

GAO, L.P.; LI, Z.; GUO, Z.Y.; ZHAO, Y, M. The effects of vitamin C on DDP-induced anemia in rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, n. 23, v. 6, p:383-388, 2013.

GEORGIADIS, M. M.; CHEN, Q.; MENG, J.; GUO, C.; WIREMAN, R.; REED, A. Small molecule activation of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 reduces DNA damage induced by cisplatin in cultured sensory neurons. *DNA Repair (Amst)*, v. 41, p. 32-41, 2016.

GUINDON, J.; DENG, L.; FAN, B.; WAGER-MILLER, J. et al. Optimization of a cisplatin model of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in mice: use of vitamin C and sodium bicarbonate pretreatments to reduce nephrotoxicity and improve animal health status. **Molecular Pain**, n.4, v.10, p:56, 2014.

GÜRGEN, S.G.; ERDOĞAN, D.; ELMAS, C.; KAPLANOĞLU, G.T et al. Chemoprotective effect of ascorbic acid, α -tocopherol, and selenium on cyclophosphamide-induced toxicity in the rat ovarium. **Nutrition**, n. 29, v. 5, p:777-784, 2013.

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

HEANEY, M.L.; GARDNER, J.R.; KARASAVVAS, N.; GOLDE, D.W. et al. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. **Cancer Research**, n. 68, v. 19, p:8031-8038, 2008.

HERST, P. M. et al. Pharmacological concentrations of ascorbate radiosensitize glioblastoma multiforme primary cells by increasing oxidative DNA damage and inhibiting G2/M arrest. *Free Radicals Biology and Medicine*, v. 52, n.5, p. 1486–1493, 2012.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA).

Incidência de Câncer no Brasil – Estimativa 2014. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>.

Data do Acesso: 16 mar 2014.

KAEHLER, C.; ISENSEE, J. O.; HUCHO, T.; LEHRACH, H.; KROBITSCH, S. 5-Fluorouracil affects assembly of stress granules based on RNA incorporation. *Nucleic Acids Research*, v. 42, p. 106436–106447, 2014.

KANG, M. A.; SO, E-Y.; SIMONS, A.L., SPITZ, D. R.; OUCHI, T. DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway. *Cell Death and Disease*, v. 3, 2012.

KANDIOLER, D. et al. TP53 Mutational Status and Prediction of Benefit from Adjuvant 5-Fluorouracil in Stage III Colon Cancer Patients. *E BioMedicine*, v. 22, p. 213-230, 2015.

KILARKAJE, N. Effects of combined treatment of α -tocopherol, L-ascorbic acid, selenium and zinc on bleomycin, etoposide and cisplatin-induced alterations in testosterone synthesis pathway in rats. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, n.74, v.6, p:1175-1189, 2014.

KILARKAJE, N.; MOUSA, A.M.; AL-BADER, M.M.; KHAN, K.M. Antioxidants enhance the recovery of three cycles of bleomycin, etoposide, and cisplatin-induced testicular dysfunction, pituitary-testicular axis, and fertility in rats. **Fertility and Sterility**, n.100, v. 4, p:1151-1159, 2013.

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

LAKATOS, E.V; MARCONI, M.A. Fundamento de Metodologia Científica. 7 ed. São Paulo; Atlas, 2010.

LAL, S. et al. Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review. *Current Drug Metabolism*, v. 11, p. 115–128, 2010.

LEE, S. H.; OE, T.; BLAIR, I. A. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science*, v. 292, n. 5524, p. 2083-2086, 2001.

LEEKHA, A.; GURJAR, B.S.; TYAGI, A.; RIZVI, M.A. et al. Vitamin C in synergism with cisplatin induces cell death in cervical cancer cells through altered redox cycling

and p53 upregulation. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, n. 142, v.12, p: 2503-2514, 2016.

LONGCHAR, A.; PRASAD, S.P. Biochemical changes associated with ascorbic acid–cisplatin combination therapeutic efficacy and protective effect on cisplatin-induced toxicity in tumor-bearing mice. **Toxicology Reports**, v. 2, p: 489–503, 2015.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, p. 330-338, 2003.

LUDKE, A.; SHARMA, A.K.; BAGCHI, A.; SINGAL, P.Q. Vitamin C modulates doxorubicin-induced cardiotoxicity by reducing P53 and map kinase activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, 2010.

LUDKE, A.; SHARMA, A.K.; BAGCHI, A.K.; SINGAL, P.K. Subcellular basis of vitamin C protection against doxorubicin-induced changes in rat cardiomyocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n. 360, v. 1-2, p: 215-224, 2012.

LUTTERBECK, C. A.; MACHADO, E. L.; KUMMERER, K. Photodegradation of the antineoplastic cyclophosphamide: a comparative study of the efficiencies of UV/H₂O₂, UV/Fe²⁺/H₂O₂ and UV/TiO₂ processes. *Chemosphere*, v. 120, n.7, p. 538-546, 2015.

MA, Y. et al. High dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy. *Science Translational Medicine*, v. 6, n. 222, p. 222, 2014.

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

MARTHA, K.R.; ROSANGKIMA, G.; AMENLA, L.; RONGPI, T. et al. Cisplatin- and dietary ascorbic acid-mediated changes in the mitochondria of Dalton's lymphoma-bearing mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, n. 27, v. 3, p: 329-338, 2011.

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

NARAYANA, K. Cisplatin induces duplex 3' overhangs and 5' blunt ends in epididymal epithelium in a Bax-dependent manner without any protection from L-ascorbic acid. **European Journal of Pharmacology**, n. 1, v. 641, p: 238-245, 2010.

NARAYANA, K. Effects of L-ascorbic acid on two cycles of cisplatin-induced DNA double-strand breaks and phosphorylation of p53 in the liver. **Experimental and Toxicologic Pathology**, n. 64, v. 5, p:495-502, 2012.

NARAYANA, K.; VERGHESE, S.; JACOB, S.S. L-Ascorbic acid partially protects two cycles of cisplatin chemotherapy-induced testis damage and oligo-asthenoteratospermia in a mouse model. **Experimental and Toxicologic Pathology**, n. 61, v.6, p:553-563, 2009.

NEMATBAKHSI, M.; PEZESHKI, Z.; ESHRAGHI-JAZI, F. et al. Vitamin E, Vitamin C, or Losartan is not nephroprotectant against cisplatin-induced nephrotoxicity in presence of estrogen in ovariectomized rat model. **International Journal of Nephrology**, v. 2012, 2012.

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

SANTOS, R.V.; BATISTA, M.L. JR.; CAPERUTO, E.C.; ROSA, L.F.C. Chronic supplementation of creatine and vitamins C and E increases survival and improves biochemical parameters after Doxorubicin treatment in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, n. 34, v. 12, p: 1294-1299, 2007.

SUBRAMANI, T. et al. Vitamin C suppresses cell death in MCF-7 human breast cancer cells induced by tamoxifen. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 18, n. 2, p. 305-313, 2014.

SUHAIL, N.; BILAL, N.; KHAN, H.Y.; HASAN, S. et al. Effect of vitamins C and E on antioxidant status of breast-cancer patients undergoing chemotherapy. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, n. 37, v. 1, p:22-26, 2012.

SWAMY, A.H.V.; WANGIKAR, U.; KOTI, B.C.; THIPPESWAMY, A.H. et al. Cardioprotective effect of ascorbic acid on doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, n. 43, v. 5, p: 507-511, 2011.

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in Cardiovascular Diseases*, v. 49, n. 5, p. 330–352, 2007.

TOKGÖZ, S.A.; VURALKAN, E.; SONBAY, N.D.; ÇALIŞKAN, M. et al. Protective effects of vitamins E, B and C and L-carnitine in the prevention of cisplatin-induced ototoxicity in rats. **The Journal of Laryngology & Otology**, n. 126, v. 5, p: 464-469, 2012.

TUMMALA, S.; KUMAR, M. N. S.; PRAKASH, A. Formulation and characterization of 5-Fluorouracil enteric coated nanoparticles for sustained and localized release in treating colorectal cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 32, p. 312-329, 2014.

UETAKI, M.; TABATA, S.; NAKASUKA, F.; SOGA, T.; TOMITA, M. Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin C-induced oxidative stress. *Nature: Scientific Reports*, v. 5, 2015.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v. 4, p. 307-320, 2005.

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

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

ZENG, X.; MORGENSTERN, R.; NYSTRÖM, A. M. Nanoparticle-directed sub cellular localization of doxorubicin and the sensitization breast cancer cells by circumventing GST-mediated drug resistance. *Biomaterials*, v. 35, n. 4, p. 1227-1239, 2014.

**CAPITULO II: Ácido ascórbico como modulador da ação da Cisplatina e 5-
Flourouracil em *S. cerevisiae* e *Allium cepa***

Ácido ascórbico como modulador da ação da Cisplatina e 5-Flourouracil em *S. cerevisiae* e *Allium cepa*

Ascorbic acid as a modulator of Cisplatin and 5-Flourouracil action in *S. cerevisiae* and *Allium cepa*

Josemar José da Silva Júnior¹, Leonardo da Rocha Sousa¹, Antonio Lima Braga¹, Ag-Anne Pereira Melo de Meneses¹, Rosália Maria Torres de Lima², João Marcelo de Castro e Sousa³, Ana Paula Peron³, Edilson Carvalho de Sousa Junior³, Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva³, Paulo Michel Pinheiro Ferreira³, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcanti³

RESUMO

A quimioterapia tem sido um dos principais tratamentos contra o câncer. Em muitos casos, a terapia do câncer provoca uma elevação nos níveis de estresse oxidativo em células e tecidos saudáveis, levando a danos no DNA e efeitos colaterais. Grande parte dos efeitos colaterais provocados pelos quimioterápicos pode ser amenizada pelo uso de agentes antioxidantes, porém pouco se sabe se seu uso não terapêutico tem potencial de diminuir os efeitos da quimioterapia nas células malignas. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e a atividade antioxidante da Cisplatina (CDDP) e 5-Flourouracil (5-FU) isolados e associados com ácido ascórbico (AA) (2 μ M) em *S. cerevisiae*. Para o teste de levedura, foram preparadas placas com meio de cultura YEL onde foram semeadas 5 leveduras mutadas em seu sistema de enzimas antioxidante e um selvagem da mesma espécie. Foram adicionados discos de papel filtro com os antineoplásicos isolados ou associados com AA por 48h. Depois se mediu o halo de inibição de crescimento. O 5-FU e CDDP nas concentrações de 10 e 20 μ g/mL induziram significantes ($p \leq 0,05$) danos oxidativos nas células de *S. cerevisiae*, quando comparado ao controle negativo. Estes danos foram modulados ($p \leq 0,05$) pelo AA, quando administrado em co-tratamento e após a meia-vida das drogas, na maioria das linhagens da levedura, exceto no duplo mutante SOD1SOD2 tratado com 5-FU. Os resultados indicam que o efeito modulatório do AA se deve a sua propriedade antioxidante. Portanto, o AA pode interferir na ação oxidativa e antitumoral da CDDP e 5-FU, podendo comprometer a eficácia do tratamento, especialmente durante o período de ação das drogas.

Palavras-Chaves: Cisplatina. 5-Flourouracil. Ácido Ascórbico. *Saccharomyces cerevisiae*. *Allium cepa*.

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

2 Doutoranda do Programa RENOBIO da Universidade Federal do Piauí - UFPI

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

ABSTRACT

Chemotherapy has been the major cancer treatment. In many cases, cancer therapy causes elevated levels of oxidative stress in healthy cells and tissues, leading to DNA damage and side effects. A large part of the side effects caused by chemotherapy can be alleviated using antioxidant agents, but little it is known whether its non-therapeutic use has the potential to reduce chemotherapy effects on malignant cells. Thus, the aim of this study was to evaluate the cytotoxicity and antioxidant activity of Cisplatin (CDDP) and 5-Fluorouracil (5-FU) isolated and associated with low doses of ascorbic acid (AA) (2 μ M) in *Saccharomyces cerevisiae*. For the yeast test, plates were prepared with YEL culture medium, where 5 yeasts cell lineage mutated in their antioxidant enzyme system and one wildtype were seeded. Filter paper discs were added with antineoplastics isolated or associated with AA for 48h, and the halo of growth inhibition was measured. In *S. cerevisiae* cells, 5-FU and CDDP at concentrations of 10 and 20 μ g/mL, induced significant ($p \leq 0.05$) oxidative damages when compared to the negative control. These damages were modulated ($p \leq 0.05$) by AA when it was administrated in co-treatment and after the half-life of the drugs, in most yeast strains except the double mutant SOD1SOD2 treated with 5-FU. The results indicate that the modulatory effect of AA is due to its antioxidant properties. Therefore, AA may interfere with the oxidative and antitumor action of CDDP and 5-FU, which may compromise the efficacy of the treatment especially during the period of drug action.

Keywords: Cisplatin. 5-Fluorouracil. Ascorbic Acid. *Saccharomyces cerevisiae*. *Allium cepa*.

5.1. Introdução

A quimioterapia tem sido um dos principais mecanismos tratamento contra o câncer. Porém, a mesma também possui um lado negativo, relacionado aos seus efeitos secundários, os quais em muitos casos podem se apresentar de forma muito agressiva, ocasionando problemas renais, hepáticos, gastrointestinais e outros (PETERSON et al., 2016; SPENCER, 2016, HSIU et al., 2016). A citotoxicidade causada pelos antineoplásicos pode ser provocada pelo aumento de substâncias, como espécies reativa de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). Essas substâncias elevam o nível de estresse oxidativo no tecido onde se encontram, podendo causar lesões ou danos no material genético (PUJARI, 2010).

Um antineoplásico frequentemente utilizado no tratamento do câncer é a cisplatina (CDDP), um alquilante que tem como mecanismo de ação induzir um aumento excessivo de EROs em células cancerígenas, os quais causam danos ao DNA, impedindo que a célula se replique, levando-a a apoptose (MA et al., 2014, LEE et al., 2016). Outro antineoplásico importante é o 5-FU, uma droga que possui um alto grau de citotoxicidade principalmente para as células renais, cardíacas e fígado. Sua citotoxicidade se deve ao aumento do estresse

oxidativo também em células normais, resultado em morte celular (MIURA et al., 2010; RASHID et al., 2014).

No entanto, nosso organismo possui um sistema de defesa que impede que os agentes oxidantes atuem danificando as células e tecidos. As enzimas antioxidantes atuam impedindo o aumento de EROS nas células normais, diminuindo o estresse oxidativo. Algumas dessas enzimas são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPX) e a glutathione (GSH) (ARANGIÍZ et al., 2009). Outra substância que ajuda na diminuição dos níveis de estresse oxidativo é o ácido ascórbico, um agente antioxidante que quando em baixas concentrações, age se ligando aos radicais livres, impedindo os mesmos de causarem danos (TRABER; STEVENS, 2012; FRANKE et al, 2013; CARR; VISSERS, 2013).

Uma forma simples e rápida de mensurar citotoxicidade e atividades oxidantes é o uso de bioensaios através da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os testes com leveduras, em geral, utilizam a espécie *S. cerevisiae* com defeitos (mutações) em algumas enzimas antioxidantes, as quais são homólogas às dos seres humanos, com o objetivo de observar o efeito antioxidante ou oxidativo da substância a ser testada (GUARIENT; BERTOLIN; COSTA, 2010).

Nesse sentido, este estudo tem como objetivo avaliar alterações nos níveis de citotoxicidade e de atividade oxidativa da Cisplatina e 5-Flourouracil quando em associação com baixas doses de ácido ascórbico em dois sistemas testes, *S. cerevisiae* e *Allium cepa*.

5.2. Metodologia

5.2.1. Linhagens de leveduras utilizadas

Seis linhagens de levedura foram utilizadas para avaliar atividades antioxidantes. A linhagem selvagem utilizada não apresentava nenhuma mutação nas enzimas de defesa contra substâncias oxidativas, enquanto que as outras cinco linhagens selecionadas apresentavam defeitos em pelo menos uma enzima antioxidativa. A linhagem EG118 é mutada na enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD – produto do gene SOD1), a EG110 é mutada na SOD mitocondrial (MnSOD – produto do gene SOD2); a EG133 possui uma mutação em duas enzimas a SOD1 e SOD2; a EG223 mutada em CAT1 e EG mutada em SOD1 e CAT1 (**Tabela 1**)

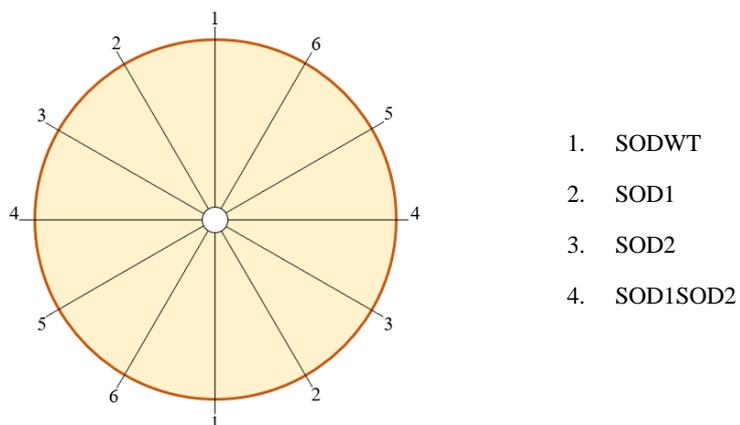
Tabela 1. As linhagens de levedura *S. cerevisiae* que foram utilizadas neste trabalho.

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

Fonte: Adaptado de Oliveira et al., 2014.

5.2.2. Teste do disco central em *S. cerevisiae*

O teste foi realizado no meio de cultura YEL como descrito por Oliveira et al. (2014) (**Figura 1**). Resumidamente, a inoculação foi realizada em linha reta iniciando das extremidades ao centro da placa evitando a contaminação entre as linhagens. Após a finalização da placa, um disco de filtro estéril foi colocado no centro da placa e adicionado em sua superfície 100µL das concentrações (10 µg/mL e 20 µg/mL) de antineoplásicos para os testes das drogas isoladas e para as associações de droga e AA foi adicionado mais 10µL de AA na concentração de 2 µM em co e pós-tratamento.

Figura 1. Disposição das linhagens de leveduras utilizadas no teste

As placas ficaram incubadas por 48h em uma estufa a 30°C. Após a incubação, os halos de inibição foram medidos, em milímetros, desde a margem do papel filtro até a extremidade do halo onde se inicia o crescimento celular (AKBARI; JAVAR, 2013; DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

5.2.3. Avaliação da modulação do ácido ascórbico sobre os antineoplásicos

O percentual de modulação do ácido ascórbico frente aos danos causados pelos antineoplásicos CDDP e 5-FU foi calculado de acordo com a fórmula: $\%M = \frac{A-B+AA}{A} \times 100$ onde, “A” é o valor de inibição de crescimento induzidos pelos antineoplásicos e “B+AA” é o valor de crescimento induzidos pelos antineoplásicos associados ao AA.

5.2.4. Análise estatística

Os resultados que obedecerem a uma distribuição paramétrica foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA), pelo teste One-way e pós-teste de Tukey através do programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, Copyright ©.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Avaliação dos efeitos oxidante da cisplatina e 5-Fluorouracil por meio do teste de *S. cerevisiae*

Os resultados da avaliação do potencial oxidativo da cisplatina e do 5-fluorouracil em *S. cerevisiae* demonstram que todos os antineoplásicos em todas as doses induziram danos oxidativos significantes ($p < 0,05$) em todas as linhagens testadas, quando comparados ao controle negativo. Contudo, os danos oxidativos induzidos pelos antineoplásicos nas suas diferentes doses foram significantemente ($p < 0,05$) modulados pelo ácido ascórbico na maioria das linhagens.

O 5-FU nas doses de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ induziu significantemente ($p \leq 0,05$) danos oxidativos em todas as linhagens de *S. cerevisiae*, quando comparado ao controle negativo. Na observação do efeito do AA frente aos danos induzidos por 5-FU e cisplatina em linhagens de *S. cerevisiae* proficientes ou mutadas em defesas antioxidantes, observou-se que o AA administrado em co-tratamento ou pós- tratamento (8 horas) modulou significantemente ($p \leq 0,05$) os danos induzidos por 5-FU nas doses de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$, exceto nas linhagens com duplo mutante SOD1SOD2 (**Figura 2**).

De forma similar ao 5-FU, os resultados do presente estudo demonstram que a cisplatina (CDDP) também induziu significantes ($p \leq 0,05$) danos oxidativos nas diferentes linhagens de *S. cerevisiae*. Estes danos foram significantemente ($p \leq 0,05$) modulados pelo AA

administrado em có-tratamento ou pós- tratamento (24 horas) nas diferentes linhagens, quando comparados ao controle positivo ou ao tratamento com a cisplatina apenas (**Figura 3**).

Figura 2. Potencial oxidativo do 5-Fluorouracil (5-FU) isolado ou em associação com ácido ascórbico (AA) em linhagens de *S. cerevisiae* em co-tratamento (0) e pós-tratamento (8). Os gráficos representam os halos de inibição mensurados em mm nas linhagens *SODWT*, *Sod1*, *Sod2*, *Sod1Sod2*, *Cat1* e *Sod1Cat1*. Valores em média± desvio padrão dos halos de inibição (0-40 mm). ANOVA, one-way, pós-teste de Bonferroni. ^a $p \leq 0,05$ comparado ao CN; ^b $p \leq 0,05$ comparado ao H_2O_2 ; ^c $p \leq 0,05$ comparado ao 5-FU 10 μ g/mL; ^d $p \leq 0,05$ comparado ao 5-FU 20 μ g/mL.

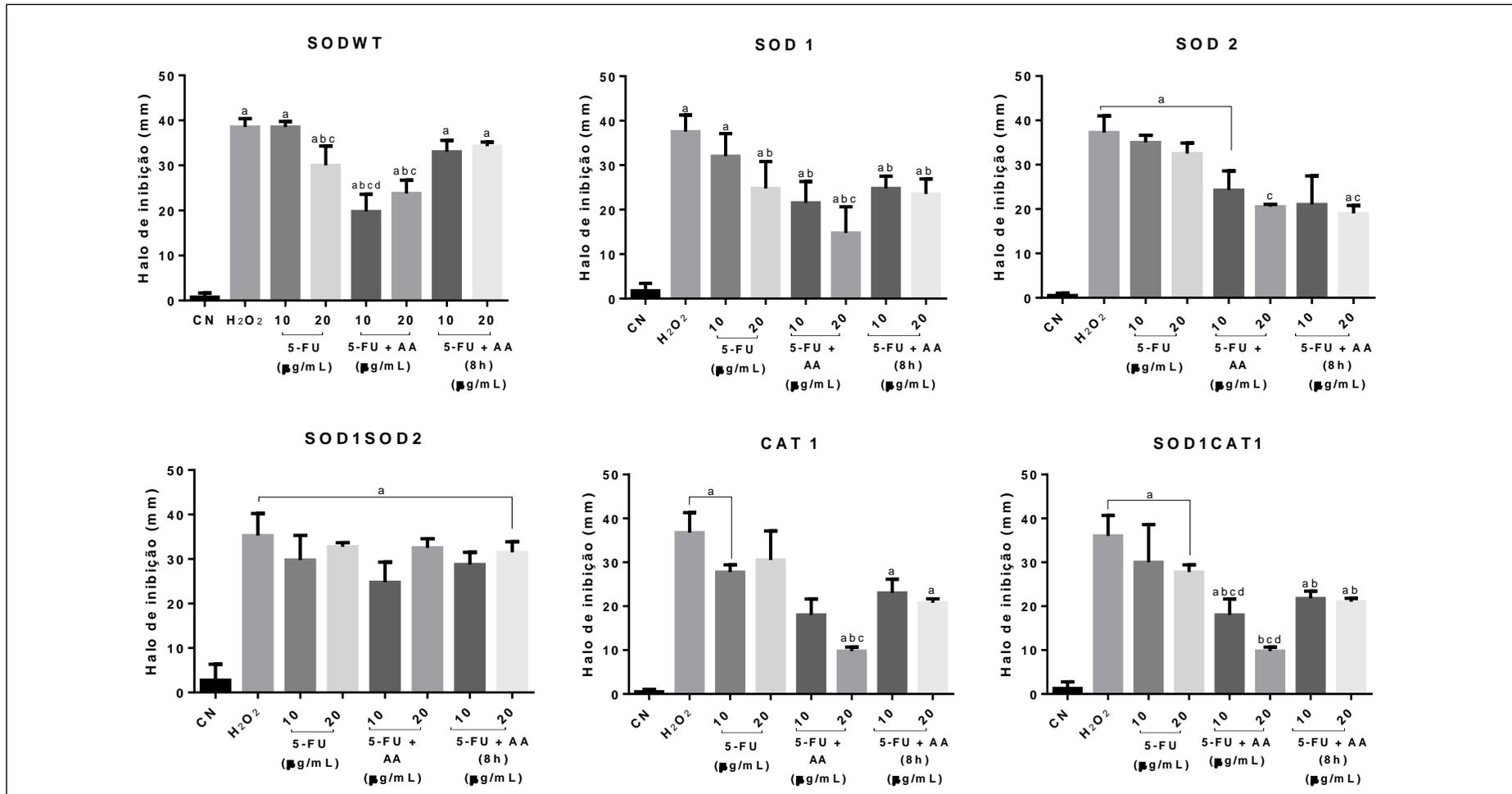
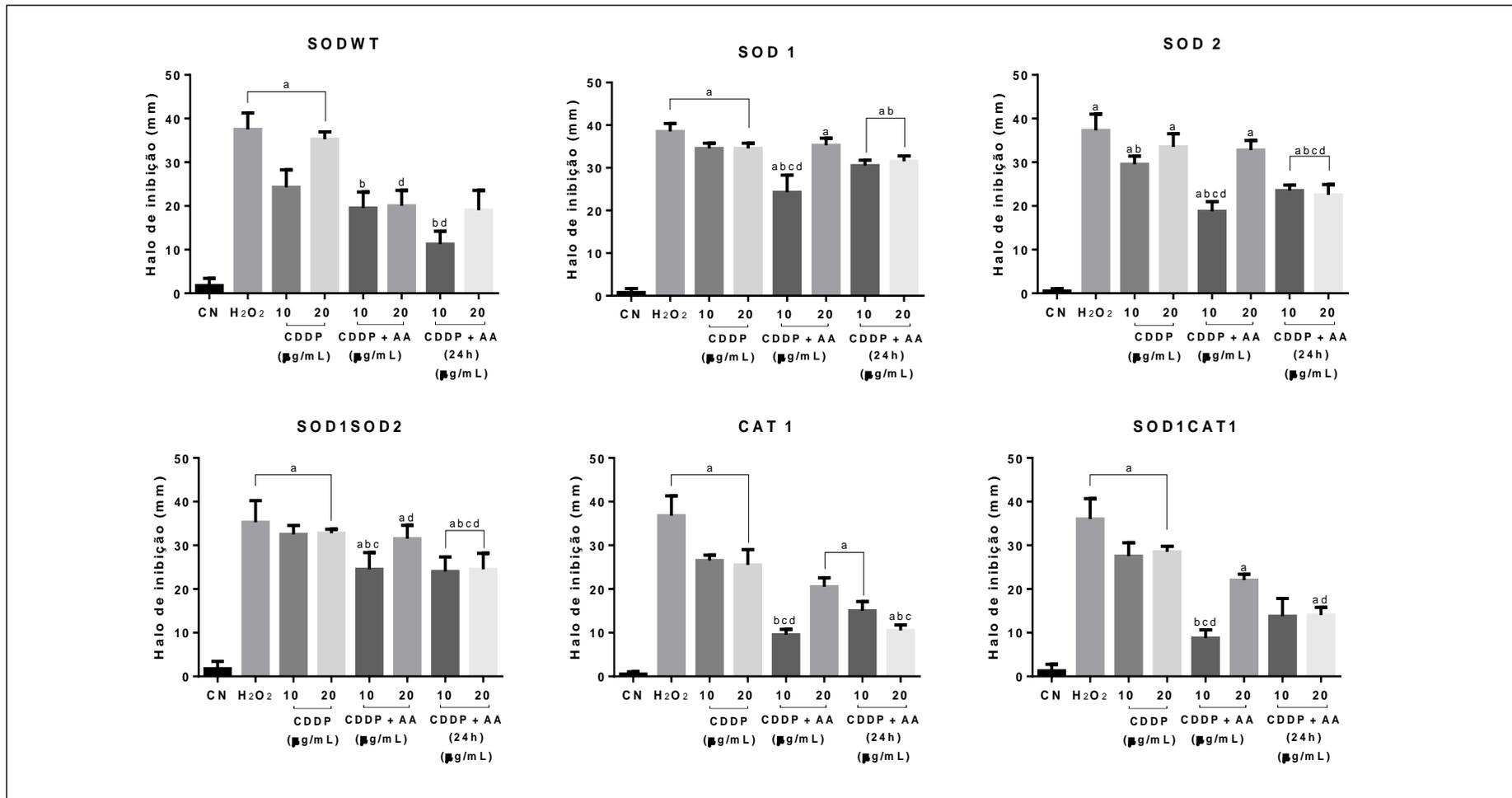


Figura 3. Potencial oxidativo da cisplatina (CDDP) isolado ou em associação com ácido ascórbico (AA) em linhagens de *S. cerevisiae* em co-tratamento (0) e pós-tratamento (24). Os gráficos representam os halos de inibição mensurados em mm nas linhagens *SODWT*, *Sod1*, *Sod2*, *Sod1Sod2*, *Cat1* e *Sod1Cat1*. Valores em média± desvio padrão dos halos de inibição (0-40 mm). ANOVA, one-way, pós-teste de Bonferroni. ^a $p \leq 0,05$ comparado ao CN; ^b $p \leq 0,05$ comparado ao H_2O_2 ; ^c $p \leq 0,05$ comparado ao CDDP 10 μ g/mL; ^d $p \leq 0,05$ comparado ao CDDP 20 μ g/mL.



No que diz respeito ao percentual de modulação do AA, houve uma modulação de 48,7% e 20,8% aos danos induzidos por 5-FU nas concentrações de 10µg/mL e 20 µg/mL, respectivamente, quando em co-tratamento (0h), em SODWT. Na linhagem SOD1, o AA modulou em 32,8% e 40,4% os danos induzidos por 5-FU nas concentrações de 10µg/mL e 20 µg/mL, respectivamente, quando em co-tratamento. Na linhagem SOD2, o AA modulou em 36,9% e 41,5% os danos induzidos por 5-FU a 20µg/mL, em co-tratamento e pós-tratamento, respectivamente. Na linhagem CAT, a modulação do AA foi de 68,9% em co-tratamento com 5-FU na concentração de 20 µg/mL. Já na linhagem duplo mutante SOD1CAT, o AA modulou em 40% e 64,9% os danos oxidativos induzidos por 5-FU nas concentrações de 10 e 20 µg/mL, respectivamente (**Tabela 2**).

Tabela 2. Percentual de modulação do ácido ascórbico frente os antineoplásicos.

LINHAGENS	5-FU + AA		5-FU + AA (8h)		CDDP + AA		CDDP + AA (24h)	
	10 µg/mL	20 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
SODWT	48.7%	20,8%	14,3%	0%	19,6%	43.3%	53.6%	46.1%
SOD1	32.8%	40,4%	22,7%	5.1%	29.9%	0%	11.6%	8.7%
SOD2	30.7%	36,9%	40%	41,5%	36.4%	2.2%	20.3%	32.8%
SOD1SOD2	16,8%	0,8%	3,4%	3,8%	24.6%	3.8%	26.2%	25.2%
CAT1	35.1%	68%	17.1%	32%	64.2%	19.6%	43.4%	58.8%
SOD1CAT	40%	64,9%	27.5%	24,3%	68.2%	22.8%	50%	50.9%

Em relação ao antineoplásico CDDP, a linhagem selvagem SODWT, quando em co-tratamento com cisplatina (20 µg/mL), o AA modulou em 43,3% os danos induzidos pela droga, enquanto que a modulação do AA foi de 53,6%, quando administrado 24h após o tratamento com o antineoplásico na concentração de 10 µg/mL. Quando em administrado juntamente com a CDDP (10 µg/mL) na linhagem SOD1, o AA modulou em 29,9% os danos oxidativos induzidos pelo antineoplásico. Em SOD2, a modulação

do AA foi de 36,4% nos danos induzidos por CDDP (10 µg/mL) em co-tratamento. Na mesma linhagem, o AA modulou em 20,3% frente 32,8% os danos induzidos pela droga nas concentrações de 10 e 20 µg/mL, respectivamente, quando em pós-tratamento.

Durante o co-tratamento com cisplatina na linhagem deficiente em SOD1SOD2, a modulação de AA foi de 24,6% e 3,8% frente aos danos induzidos pela droga nas concentrações de 10 e 20 µg/mL, respectivamente. Seguidas 24h após a administração da droga, o AA modulou em 26,2% os danos induzidos por CDDP a 10 µg/mL e em 25,2% os danos induzidos pelo antineoplásico na concentração de 20 µg/mL. Na linhagem deficiente em CAT1, o AA modulou em 64,2% os danos induzidos por CDDP (10 µg/mL) durante co-tratamento, e em 58,8% os danos induzidos pela droga (20 µg/mL) durante pós-tratamento. Já na linhagem deficiente em SOD1CAT1, o percentual de modulação do AA foi de 68,2% frente aos danos induzidos pela cisplatina (10µg/mL) em co-tratamento e de 50,9% frente aos danos induzidos por esta droga na concentração de 20 µg/mL em pós-tratamento.

Devido à grande semelhança com o metabolismo de eucariotos superiores, linhagens da levedura *S. cerevisiae* têm sido amplamente utilizadas em estudos de estresse oxidativo e efeito de antioxidantes (YI et al., 2016; SHI et al., 2016; KITICHANTAROPAS et al., 2016; GÜVEN et al., 2016). No presente estudo, foi observado que 5-FU e CDDP apresentam um potencial efeito oxidativo, o qual pode contribuir no efeito citotóxico das drogas frente as células da levedura *S. cerevisiae* utilizadas como modelo biológico. Neste caso, tanto o 5-FU quanto a cisplatina atuaram de modo a limitar a proliferação de células de diferentes linhagens de levedura, proficientes ou mutadas nestas defesas antioxidantes.

Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que, além de mecanismos de ação particulares, o 5-FU também pode induzir citotoxicidade de células eucarióticas por meio do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, levando a uma condição de estresse oxidativo persistente na célula (Zhang et al., 2008). O estudo realizado por Numazawa e colaboradores (2010) demonstrou que o tratamento com 5-FU causou um aumento significativo de biomarcadores de estresse oxidativo, além da redução dos níveis da glutathiona, uma enzima antioxidante endógena, levando a mielosupressão da medula óssea de camundongos em consequência do estresse oxidativo gerado. Resultados semelhantes foram relatados, nos quais foi observado que o estresse oxidativo intracelular gerado por 5-FU induziu apoptose de células cardíacas de ratos (LAMBERTI et al., 2012) e células endoteliais (FOCAC CETI et al., 2015). O 5-FU

também pode provocar disfunções mitocondriais que contribuem para a indução de morte celular via ativação de caspases (LIU et al., 2016). Contudo, a produção de EROs por 5-FU está associado a promoção de efeitos adversos durante o tratamento, tais como cardiotoxicidade, e mucosite (POLK et al., 2013; THOMAS et al., 2016).

Estudos também têm demonstrado que a citotoxicidade induzida por cisplatina pode ocorrer por meio da promoção de estresse oxidativo nas mitocôndrias, levando a apoptose de células renais (MARTINS et al., 2008). Esta promoção é independente da quantidade de danos induzidos pela droga ao nDNA, contribuindo para a citotoxicidade do antineoplásico (MARULLO et al., 2013). Além da indução de danos ao DNA, há relatos de que a cisplatina também pode induzir a produção de EROs e inibir diversas enzimas antioxidantes, levando a apoptose causada por estresse oxidativo (GLEZERMAN; JAIMES, 2016). Segundo Kim et al. (2013), a fosforilação de quinase regulada extracelular (ERK) através de ROS produzidos pela cisplatina está envolvida na indução da expressão de p53 e do fator de necrose tumoral α (TNF- α), que induzem apoptose em macrófagos de murinos. Todavia, a produção excessiva de EROs pela CDDP, e consequente geração de estresse oxidativo, também está envolvida em muitos dos efeitos adversos provocados pela droga, como nefrotoxicidade e ototoxicidade (PERES; JÚNIOR; 2013; KIM et al., 2010; NASR, SALEH, 2014).

Na tentativa de melhorar os efeitos adversos induzidos pelo aumento intracelular de EROs durante a quimioterapia, é feita a terapia nutricional com antioxidantes, como a vitamina C (ROHENKOHL; CARNIEL; COLPO, 2011). Aqui, observou-se que a vitamina C atuou de modo a modular os danos oxidativos induzidos por ambos antineoplásicos em estudo em algumas linhagens da levedura, provavelmente por via antioxidante. Isto significa que esta vitamina pode reduzir os danos citotóxicos induzidos pela cisplatina e pelo 5-FU, indicando que a sua administração em baixas doses em concomitância com os antineoplásicos podem comprometer os efeitos da droga. Ainda são escassos estudos a cerca da influência de antioxidantes no efeito anticâncer de antineoplásicos, mas há relatos a cerca da utilização de vitamina C na redução da toxicidade em células normais induzidas pelas drogas.

Em contraste aos nossos resultados, Runtuwene e colaboradores (2015) demonstraram que altas concentrações de antioxidantes (8 mM por gavagem) podem aumentar o efeito inibitório induzido por 5-FU em células cancerosas. Outros estudos também demonstram que a vitamina C pode atenuar a toxicidade hepática e gastrointestinal causada pela droga em modelos *in vivo*, via modulação de estresse

oxidativo (ABOU-ZEID, 2014; AL-ASMARI et al., 2015). Por outro lado, em concordância com os resultados obtidos no presente estudo, Fu et al. (2014) mostrou que a associação de 5-fluorouracil a antioxidantes não é efetiva durante o tratamento de pacientes com câncer de cólon, uma vez que a produção de EROs por 5-FU é significativamente reduzida, indicando que antioxidantes podem reduzir o efeito apoptótico induzido pela droga.

Choung e Kong (1994) demonstraram que a vitamina C (0,5 e 10 mg/kg por via intraperitoneal), por meio de sua capacidade de remover radicais livres, reduziu diretamente a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina, sem comprometer a atividade anticâncer da droga. Mais recentemente, estudos têm demonstrado que o pré-tratamento de camundongos com vitamina C reduz os efeitos mutagênicos induzidos pela cisplatina, uma vez que reduz consideravelmente a peroxidação lipídica e aumento de glutathiona e outras defesas antioxidantes em células hepáticas (LONGCHAR, PRASAD, 2015; LONGCHAR, PRASAD, 2016).

Um estudo *in vitro* com linhagens de células de leucemia e linfoma evidenciou que o pré-tratamento com vitamina C (250 mg/kg por via intravenosa) causa uma atenuação dose-dependente da citotoxicidade induzida por cisplatina e outros antineoplásicos por meio da inibição da despolarização da membrana mitocondrial, vindo a antagonizar a eficácia terapêutica da droga. Neste estudo, os autores concluem que a suplementação com vitamina C durante a terapia do câncer pode afetar consideravelmente a resposta terapêutica (HEANEY et al., 2008).

Matsumoto et al. (2015) demonstrou o efeito citotóxico *in vitro* de 5-FU em diferentes linhagens de células cancerosas. Também há relatos acerca do efeito citotóxico de cisplatina em linhagens de células derivadas de diferentes tumores e em células normais do rim (GERMAIN et al., 2010; YAO et al., 2007). A indução de citotoxicidade é um dos principais mecanismos de ação de drogas antineoplásicas, durante a qual são induzidos danos ao DNA, que podem levar a morte de células cancerosas (SWIFT; GOLSTEYN, 2014).

A citotoxicidade do 5-FU aqui observada pode ser explicada pelo fato de que a metabolização do antineoplásico resulta da incorporação destes seus metabólitos ao DNA, e RNA, resultando em quebras das fitas de DNA, bloqueio dos processos de transcrição, tradução e de mecanismos de reparo, levando as células à morte (MARTINS; WAGNER; LINDEN, 2013). Segundo a literatura, o mecanismo de

indução de citotoxicidade da cisplatina está relacionado a sua interação com os sítios nucleofílicos N7 de bases purínicas do DNA, formando ligações interfitas DNA-DNA e DNA-proteína, além de *crosslinks* intrafitas, que culminam em morte celular, explicando os resultados observados no presente estudo (SIDDIK, 2003; CEPEDA et al., 2007; DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

No entanto, corroborando com os resultados encontrados no ensaio de *S. cerevisiae*, a associação de vitamina C aos antineoplásicos, tanto em co-tratamento como em pós-tratamento, reverteu o efeito das drogas, o que foi observado pelo aumento do índice mitótico das células, quando comparadas aos grupos tratados apenas com as drogas. Estes resultados apontam, mais uma vez, para o efeito antagônico da vitamina frente aos efeitos anticâncer desempenhados pelos quimioterápicos.

Estudos mostram que qualquer antioxidante capaz de reduzir a toxicidade causada nas células saudáveis, pode também ter o potencial de diminuir a efetividade do quimioterápico nas células malignas (HACISEVKI, 2009; SIRMALI et al., 2014). De outra forma, a literatura também relata que a vitamina C também pode desempenhar um efeito protetivo dose-dependente, prevenindo as células normais dos efeitos danosos causados pelo estresse oxidativo induzido por antineoplásicos sem comprometer a ação destas drogas (BHATTACHARYYA, MEHTA, 2000; ANTUNES; DARIN; BIANCHI, 2000). Assim, como evidenciado nos resultados do presente estudo e na literatura, os dados acerca do efeito da vitamina C no tratamento do câncer ainda são conflitantes, uma vez que a vitamina pode atuar de modo a potencializar ou antagonizar os efeitos das drogas, e estudos clínicos que demonstrem os seus efeitos ainda são escassos (UNLU et al., 2016).

5.4. Conclusão

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* constituiu em um modelo biológico conveniente para estudo de estresse oxidativo, permitindo observar que a terapia com cisplatina ou 5-FU causa danos oxidativos em células eucarióticas, os quais podem ser modulados pela vitamina C, quando administrada concomitantemente ou após a meia-vida das drogas. Os resultados do presente estudo apontam para os riscos de dietas ricas em antioxidantes, em especial, o AA, que pode antagonizar a ação antitumoral de agentes quimioterápicos, comprometendo a eficácia da terapêutica dos pacientes oncológicos. Assim, ressalta-se a necessidade de novos estudos para melhor elucidar os

mecanismos de ação do AA e os possíveis efeitos de sua administração durante o tratamento do câncer.

Referências

ABOU-ZEID, N.R.A. Ameliorative effect of vitamin C against 5-fluorouracil-induced hepatotoxicity in mice: A light and electron microscope study. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 67, n. 4, p. 109-118, 2014.

ABOU-ZEID, N.R.A. Ameliorative effect of vitamin C against 5-fluorouracil-induced hepatotoxicity in mice: A light and electron microscope study. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 67, n.4, p. 109-118, 2014.

AHMED, E.A.; OMAR, H.A.; ELGHAFAR, S.K.A.; RAGB, S.M.M.; NASSER, A.Y. The antioxidant activity of Vitamin C, DPPD and L-cysteine against Cisplatin-induced testicular oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 5, p. 1115-1121, 2011.

AJITHA, T.A.; ABHISHEKA, G.; ROSHNYA, D.; SUDHEESHB, N.P. Co-supplementation of single and multi doses of vitamins C and E ameliorates cisplatin-induced acute renal failure in mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 61, n. 6, p. 565-571, 2009.

AKBARI, R.; JAVAR, H.A. Efficacy of Capecitabine and 5-Fluorouracil (5-FU) on the human breast cancer cell line (MCF7) – effect of concentration. **American Journal of Research Communication**, v. 1, n. 6, p. 75-91, 2013.

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

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

ANTUNES, L.M.G.; DARIN, J.D.C.; BIANCHI, M.L.P. Protective effects of vitamin c against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. **Pharmacological Research**, v. 41, n. 4, p. 405-411, 2000.

ANTUNES, L.M.G.; DARIN, J.D.C.; BIANCHI, M.L.P. Protective effects of vitamin c against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. **Pharmacological Research**, v. 41, n. 4, 2000.

- ARANGUIZ, F.; GAETE, H.; HIDALGO, M.E.; LOBOS, G. Daño oxidativo en la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* expuesta a aguas receptoras de un efluente minero en del Río Blanco. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2417-2422, 2009.
- BARRITA, J.L.S.; SÁNCHEZ, M.S.S. Antioxidant role of ascorbic acid and his protective effects on chronic diseases. In: Morales-González, J.A. **Oxidative stress and chronic degenerative diseases - a role for antioxidants**. InTech, 2013. Cap. 18.
- BHATTACHARYYA, S.; MEHTA, P. The hepatoprotective potential of Spirulina and vitamin C supplementation in cisplatin toxicity. **Food & function**, v.3, n. 2, p.164-169, 2000.
- BIRBEN, E.; SAHINER, U.M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, p.9-19, 2012.
- CARR A.C.; VISSERS, M.C.M. Synthetic or food-derived vitamin c - are they equally bioavailable? **Nutrients**, v. 5, n. 11, p. 4284-4294, 2013.
- CEPEDA, V.; FUERTES, M.A.; CASTILLA, J.; ALONSO, C.; QUEVEDO, C.; PÉREZ, J.M. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 3-18, 2007.
- CHOUNG, S-E.; KONG, J-M. Protective effects of Vitamin C on cisplatin nephrotoxicity. **Archives of Pharmacal Research**, v. 17, n. 11, 1994.
- CULOTTA, V.C.; YANG, M.; O'HALLORAN, T.V. Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, n. 7, p. 747-758, 2006.
- DASARI, S.; TCHOUNWOU, P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, n.740, p. 364-378, 2014.
- DEAVALL, D.G.; MARTIN, E.A.; HORNER, J.M.; ROBERTS, R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. **Journal of Toxicology**, v. 2012, p.1-14, 2012.
- DUMBRAVĂ, D-G.; MOLDOVAN, C.; RABA, D-N.; POPA, M-V. Comparative analysis of vitamin C content and antioxidante activity of some fruits extracts. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 18, n. 3, p. 223-228, 2012.
- FARBSTEIN, KOZAK-BLICKSTEIN, A.; LEVY, A.P. Antioxidant vitamins and their use in preventing cardiovascular disease. **Molecules**, v. 15, p. 8098-8110, 2010.
- FISKESJÔ, G. The *Allium* test as a stardard in environment monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.
- FLOREA, A-M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. **Cancers**, v. 3, p. 1351-1371, 2011.

FOCAC CETTI, C.; BRUNO, A.; MAGNANI, E.; BARTOLINI, D.; PRINCIPI, E, DALLAGLIO K. et al. (2015) Effects of 5- Fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ros production in endothelial cells and cardiomyocytes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0115686, 2015.

FU, Y.; YANG, G.; ZHU, F.; PENG, C.; LI, W.; LI, H. et al. Antioxidants decrease the apoptotic effect of 5-Fu in colon cancer by regulating Src-dependent caspase-7 phosphorylation. **Nature - Cell Death & Disease**, v. 9, n. 5, p. e983, 2014.

FU, Y.; YANG, G.; ZHU, F.; PENG, C.; LI, W.; LI, H., et al. Antioxidants decrease the apoptotic effect of 5-Fu in colon cancer by regulating Src-dependent caspase-7 phosphorylation. **Death and Disease**, v. 5, p. e983, 2015.

GANGA, U.K.; KISHORI, B.; REDDY, P.S. Cisplatin and/or etoposide induces oxidative stress in testicular, hepatic and kidney tissues in male albino mice. **Journal of Biology and Earth Sciences**, v. 3, n. 2, 2013.

GERMAIN, C.S.; NIKNEJAD, N.; MA, L.; GARBUIO, K.; HAI, T.; DIMITROULAKOS, J. Cisplatin induces cytotoxicity through the mitogen-activated protein kinase pathways and activating transcription factor 3. **Neoplasia**, v. 12, p. 527–538, 2010.

GLEZERMAN, I.G.; JAIMES, E.A. Chemotherapy and kidney injury. In: Onco-Nephrology Curriculum. **American Society of Nephrology**, 2016. Cap. 11. Disponível em: < <https://www.asn-online.org/education/distancelearning/curricula/onco/>>.

GONZÁLEZ, M.J.; MIRANDA-MASSARI, J.R. DUCONGE, J. Vitamin C and cancer: what can we conclude - 1,609 patients and 33 years later: comment on the article by cabanillas. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v. 29, n. 4, p. 410-411, 2010.

GONZÁLEZ, M.J.; ROSARIO-PÉREZ, G.; GUZMÁN, A.M.; MIRANDA-MASSARI, J.R.; DUCONGE, J.; LAVERGNE, J. et al. Mitochondria, energy and cancer: the relationship with ascorbic acid. **Journal of Orthomolecular Medicine**, v. 25, n. 1, p. 29-38, 2010.

GUARIENTI, C.; BERTOLIN, E.T.; COSTA, J.A.V. Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquat / Antioxidant capacity of the *Spirulina platensis* microalgae on *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells exposed to paraquat stressor. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 106-111, 2010.

GÜVEN, E.; PARNELL, L.A.; JACKSON, E.D.; PARKER, M.C.; GUPTA, N.; RODRIGUES, J.; QIN, H. Hydrogen peroxide induced loss of heterozygosity correlates with replicative lifespan and mitotic asymmetry in *Saccharomyces cerevisiae*. **Peer J**, v. 4, n. e2671, 2016.

HACISEVKI, A. An overview of ascorbic acid biochemistry. **Journal of the Faculty of Pharmacy of Ankara**, v. 38, n. 3, p. 233-255, 2009.

- HEANEY, M.L.; GARDNER, J.R.; KARASAVVAS, N.; GOLDE, D.W.; SCHEINBERG, D.A.; SMITH, E.A.; O'CONNOR, O.A. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. **Cancer Research**, v. 68, n. 19, p. 8031-8038, 2008.
- HOFFER, L.J.; ROBITAILLE, L.; ZAKARIAN, R.; MELNYCHUK, D.; KAVAN, P.; AGULNIK, J. et al. High-dose intravenous vitamin c combined with cytotoxic chemotherapy in patients with advanced cancer: a phase i-ii clinical trial. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0120228, 2015.
- HSIU, C. L.; WEI, Y. C.; WEN, T.; KUO, C. C.; YU, F. T.; CHUNG, H. H.; CHAO, J. T. S. et al. Impact of Adjuvant Chemotherapy in Elderly Breast Patients in Taiwan, A Hospital-Based Study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 10, p. 4591-4597, 2016.
- JABŁOŃSKA-RYŚ, E.; ZALEWSKA-KORONA, M.; KALBARCZYK, J. Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 17, n. 2, p. 115-120, 2009.
- KIM, H-J.; LEE, J-H.; KIM, S-J.; OH, G.S.; MOON, H-D.; KWON, K-B. et al. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n.11, p. 3933–3946, 2010.
- KIM, S.; YAMAMOTO, K.; NAKAMURA, Y.; OTOYO, Y.; YAMATODANI, A. A possible mechanism of cisplatin-induced tumor necrosis factor (tnf)- α production in murine macrophages. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, p. 146-151, 2013.
- KITICHANTAROPAS, Y.; BOONCHIRD, C.; SUGIYAMA, M.; KANEKO, Y.; HARASHIMA, S.; AUESUKAREE, C. Cellular mechanisms contributing to multiple stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential use in high-temperature ethanol fermentation. **AMB Express**, v. 6, n. 107, 2016.
- LAMBERTI, M.; PORTO, S.; MARRA, M.; ZAPPAVIGNA, S.; GRIMALDI, A.; FEOLA, D. et al. 5-Fluorouracil induces apoptosis in rat cardiocytes through intracellular oxidative stress. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 31, n. 60, 2012.
- LEE, Y. J.; LEE, G. J.; YI, S. S.; HEOD, S. H.; PARKA, C. R.; NAME, H. S et al. Cisplatin and resveratrol induce apoptosis and autophagy following oxidative stress in malignant mesothelioma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 96–107, 2016.
- LI, W.; TANUMIHARDJAC, J.; MASUYAMAD, T.; KORSHIN, G. Examination of the kinetics of degradation of the antineoplastic drug 5-fluorouracil by chlorine and bromine. **Journal of Hazardous Materials**, v. 282, p. 125–132, 2015.
- LIU, M-P.; LIAO, M.; DAI, C.; CHEN, J-F.; YANG, C-J.; LIU, M. et al. *Sanguisorba officinalis* L synergistically enhanced 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells by promoting a reactive oxygen species-mediated, mitochondria-caspase-dependent apoptotic pathway. **Scientific Reports**, v. 6, n. 34245, 2016.

LONGCHAR, A.; PRASAD, S.B. Ascorbic Acid (Vitamin C)-mediated protection on mutagenic potentials of cisplatin in mice bearing ascites Dalton's lymphoma. **Research Journal of Mutagenesis**, v.6, n. 1, p. 1-21, 2016.

LONGCHAR, A.; PRASAD, S.B. Biochemical changes associated with ascorbic acid–cisplatin combination therapeutic efficacy and protective effect on cisplatin-induced toxicity in tumor-bearing mice. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 489-503, 2015.

MA, J.; YANG, J.; WANG, C.; ZHANG, N.; DONG, Y.; WANG, C. et al. Emodin augments cisplatin cytotoxicity in platinum-resistant ovarian cancer cells via ROS-dependent MRP1 downregulation. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 107671, 2014.

MANELA-AZULAY, M.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; PEREZ, M.A.; FILGUEIRA, A.L.; CUZZI, T. Vitamina C. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 3, p. 265-274, 2003.

MARTINIS, B.S.; BIANCHI, M.L. Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 4, P. 371-320, 2001.

MARTINS, C.G.; WAGNER, S.C.; LINDEN, R. Individualização farmacocinética das doses de 5-fluoruracil no câncer colorretal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59, n. 2, p. 271-280, 2013.

MARTINS, N.M.; SANTOS, N.A.; CURTI, C.; BIANCHI, M.L.; SANTOS, A.C. Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n.3, p. 337-344, 2008.

MARULLO, R.; WERNER, E.; DEGTYAREVA, N.; MOORE, B.; ALTAVILLA, G.; RAMALINGAM, S.S.; DOETSCH, P.W. Cisplatin induces a mitochondrial-ros response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e81162, 2013.

MATSUMOTO, Y.; RODRIGUEZ, V.; WHITFORD, T.A.; BEEHARRY, N.; IDE, H.; TOMKINSON, A.E. Synergistic enhancement of 5-fluorouracil cytotoxicity by deoxyuridine analogs in cancer cells. **Oncoscience**, v. 2, n. 3, 2015.

MIURA, K.; KINOUCI, M.; ISHIDA, K.; FUJIBUCHI, W.; NAITOH, T.; OGAWA, H. et al. 5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. **Cancers**, v. 2, p. 1717–1730, 2010.

MONTECINOS, V.; GUZMA, P.; BARRA, V.; VILLAGRA, V.; MUÑOZ-MONTESINO, C.; SOTOMAYOR, K. et al. Vitamin C is an essential antioxidant that enhances survival of oxidatively stressed human vascular endothelial cells in the presence of a vast molar excess of glutathione. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 21, p. 15506-15515, 2007.

NASR, A.Y.; SALEH, H.A.M. Aged garlic extract protects against oxidative stress and renal changes in cisplatin-treated adult male rats. **Cancer Cell International**, v.14, n. 92, 2014.

NICOLSON, G.L.; SETTINERI, R. Lipid Replacement Therapy: a functional food approach with new formulations for reducing cellular oxidative damage, cancer-associated fatigue and the adverse effects of cancer therapy. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 4, p. 135-160, 2011.

NUMAZAWA, S.; SUGIHARA, K.; MIYAKE, S.; TOMIYAMA, H.; HIDA, A.; HATSUNO, M. et al. Possible Involvement of Oxidative Stress in 5-Fluorouracil-Mediated Myelosuppression in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.108, n. 1, p. 40–45, 2011.

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

PADAYATTY, S.J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O.; LEE, J-H. et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 18–35, 2003.

PERES, L.A.B.; JÚNIOR, A.D.C. Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: Mecanismos moleculares. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 35, n. 4, p. 332-340, 2013.

PETERSON, L. L.; HURRIA, A.; FENG, T.; MOHILE, S. G.; OWUSU, C.; KLEPIN HD5.; GROSS, C. P. et al. Association between renal function and chemotherapy-related toxicity in older adults with cancer. **Journal of Geriatric Oncology**, v. 1879-4068, n. 16, p. 30139-30134, 2016.

POLK, A.; VAAGE-NILSEN, M.; VISTISEN, K.; NIELSEN, D. Cardiotoxicity in cancer patients treated with 5-fluorouracil or capecitabine: a systematic review of incidence, manifestations and predisposing factors. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 8, p. 974-984, 2013.

RASHID, S.; ALI, N.; NAFEES, S.; HASAN, S.K.; SULTANA, S. Mitigation of 5-Fluorouracil induced renal toxicity by chrysin via targeting oxidative stress and apoptosis in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.66, p. 185–193, 2014.

ROHENKOHL, C.C.; CARNIEL, A.P.; COLPO, E. Consumo de antioxidantes durante tratamento quimioterápico. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 24, n. 1, p.107-112, 2011.

RUBERA, I.; DURANTON, C.; MELIS, N.; COUGNON, M.; MOGRABI, B.; TAUC, M. Role of CFTR in oxidative stress and suicidal death of renal cells during cisplatin-induced nephrotoxicity. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. e817, 2013.

RUNTUWENE, J.; AMITANI, H.; AMITANI, M.; ASAKAWA, A.; CHENG, K.C.; INUI, A. Hydrogen-water enhances 5-fluorouracil-induced inhibition of colon cancer. **Peer J**, v. 7, n. 3, p. e859, 2015.

SIDDIK, Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, p. 7265–7279, 2003.

SIMONE II, C.V.; SIMONE, N.L.; SIMONE, V.; SIMON, C.B. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 2. **Alternative Therapies**, v. 13, n. 2, 2007.

SIRMALI, R.; GİNİŞ, Z.; SIRMALI, M.; SOLAK, O.; ŞELİMAN, B.; AĞAÇKIRAN, Y. et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role on pulmonary contusion experimental model. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 44, p. 905-913, 2014.

SPENCER, N. J. Motility patterns in mouse colon: gastrointestinal dysfunction induced by anticancer chemotherapy. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 28, n.12, p. 1759-1764, 2016.

THOMAS, S.A.; GRAMI, Z.; MEHTA, S.; PATEL, K. Adverse effects of 5-fluorouracil: Focus on rare side effects. **Cancer Cell & Microenvironment**, v. 3, n. e1266, 2016.

TOLBA, M.F.; ABDEL-RAHMAN, S.Z. Pterostilbine, an active component of blueberries, sensitizes colon cancer cells to 5-fluorouracil cytotoxicity. **Scientific Reports**, v. 5, n. 15239, 2015.

TRABER, M. G.; STEVENS, J. F. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 5, p. 1000-1013, 2012.

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

UNLU, A.; KIRCA, O.; OZDOGAN, M.; NAYIR, E. High-dose vitamin C and câncer. **Journal of Oncological Science**, v. 1, p. 10-12, 2016.

YI, D.G.; KIM, M.J.; CHOI, J.E.; LEE, J.; JUNG, J.; HUH, W.K.; CHUNG, W.H. Yap1 and Skn7 genetically interact with Rad51 in response to oxidative stress and DNA double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, n. 101, p. 424-433, 2016.

ZHANG, N.; YIN, Y.; XU, S-J.; CHEN, W-S. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. **Molecules**, v. 13, p. 1551-1569, 2008.

6. CAPITULO III: Avaliação de danos genotóxicos induzidos por Cisplatina e 5-Flourouracil ou associados com ácido ascórbico em modelos *in vivo* de sarcoma 180

Avaliação de danos genotóxicos induzidos por Cisplatina e 5-Fluorouracil, isolados ou associados com ácido ascórbico em modelos *in vivo* de sarcoma 180

Evaluation of genotoxic damages induced by isolated or ascorbic acid-associated Cisplatin and 5-Fluorouracil in S180 model, in vivo

Josemar José da Silva Júnior¹, Leonardo da Rocha Sousa¹, Antonio Lima Braga¹, Ag-Anne Pereira Melo de Meneses¹, Rosália Maria Torres de Lima², João Marcelo de Castro e Sousa³, Ana Paula Peron³, Edilson Carvalho de Sousa Junior³, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcanti³, Paulo Michel Pinheiro Ferreira³, Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva³

RESUMO

Apesar dos avanços no tratamento do câncer, a quimioterapia clássica ainda tem sido o tratamento de primeira linha para uma variedade de tumores. Embora muito eficaz na redução de tumores, principalmente iniciais, prevenção de metástases e reincidências, seus efeitos colaterais associados ainda são um problema para a sua utilização e um dos maiores responsáveis pelo abandono do tratamento. Nesse sentido, o uso de agentes antioxidantes tem sido bastante utilizados para reduzir os efeitos colaterais associados, porém pouco se sabe sobre sua associação com a quimioterapia e seus possíveis efeitos antagônicos. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do tratamento com o quimioterápico cisplatina (CDDP) e 5-fluorouracil (5-FU) em camundongos transplantados com Sarcoma 180 e dos efeitos da associação do ácido ascórbico (AA) com esses antineoplásicos. Os animais foram divididos em 9 grupos de estudo (n=5), nos quais, foram induzidos com o sarcoma 180 na região axilar. Os animais receberam um tratamento com CDDP ou 5-FU isolados ou em associação com AA. Após 7 dias de tratamento, os animais foram sacrificados para análises. Os resultados indicam que a quimioterapia com cisplatina reduziu significativamente ($p<0,05$) o peso corporal e o peso dos tumores, além de induzir leucopenia, danos hepáticos e renais. A redução do peso corporal e dos tumores dos animais tratados com a associação de 5-FU ou CDDP com AA foi menor quando comparado aos grupos que receberam apenas as drogas. O teste cometa permitiu observar que o tratamento com CDDP ou 5-FU induziu significantes ($p<0,05$) danos genotóxicos em células da medula óssea, os quais foram significativamente ($p<0,05$) modulados pela vitamina. Acredita-se que o efeito modulatório da vitamina frente a ação da CDDP e 5-FU esteja relacionado seu papel antioxidante afetando assim, a eficácia dos antineoplásicos. Os resultados sugerem que utilização do AA como um adjuvante às drogas quimioterápicas convencionais no tratamento do câncer deve ser avaliada com cuidado, tendo-se em vista o comprometimento da ação dos quimioterápicos em modelo animal.

Palavras-Chaves: Sarcoma 180. Cisplatina. 5-Fluorouracil. Ácido Ascórbico.

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

² Doutoranda do Programa RENOBIO da Universidade Federal do Piauí - UFPI

³ Laboratório de Cancerologia Experimental - UFPI

ABSTRACT

Despite advances in cancer treatment, classical chemotherapy has still been the first-line treatment for a variety of tumors. Although very effective in reducing tumors, especially early tumors, metastasis prevention and relapses, their associated side effects are still a problem for their use and one of the biggest responsible for stopping the treatment. In this sense, the use of antioxidants has been widely used to reduce the associated side effects, but little is known about its association with chemotherapy and its possible antagonistic effects. Therefore, this study aims to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects of cisplatin (CDDP) and 5-fluorouracil (5-FU) in mice transplanted with Sarcoma 180 and the effects of the association of ascorbic acid (AA) with antineoplastic agents. The animals were divided into 9 study groups (n = 5), in which a solid tumor (sarcoma 180) was induced in the axillary region. Animals were treated with CDDP or 5-FU isolated or in combination with AA. After seven days of treatment, the animals were sacrificed for testing. The results indicate that cisplatin chemotherapy significantly reduced (p <0.05) body weight and tumor weight as well as induced leukopenia, hepatic and renal damage. The reduction in body weight and tumors of animals treated with the combination of 5-FU or CDDP with AA was lower than those compared to the groups which received only the drugs. The comet assay showed that treatment with CDDP or 5-FU induced significant (p <0.05) genotoxic damage in bone marrow cells, which were significantly (p <0.05) modulated by the AA. It is believed that the modulatory effect of AA in association with CDDP and 5-FU is related to its antioxidant role thus affecting the efficacy of chemotherapy agents. The results showed that use of AA in association with conventional chemotherapy for cancer treatment caused reduced treatment efficacy in animal models, suggesting further studies in dietary options for cancer patients.

Key Words: Sarcoma 180. Cisplatin. 5-Fluorouracil. Ascorbic acid.

6.1.Introdução

A quimioterapia é uma das formas mais usada para combater o desenvolvimento do câncer. Essa forma de tratamento demonstra uma eficiência na cura de certos tumores, como também na prevenção de metástase ou sua reincidência. Todavia, os efeitos colaterais da quimioterapia ainda é um problema para a sua utilização (COLLING; DUVAL; SILVEIRA, 2012; RODRIGUES; POLIDORI, 2012).

O 5-Fluorouracil é o antineoplásico de primeira linha mais utilizado no mundo o qual possui um mecanismo de ação diretamente relacionado com o bloqueio de produções de enzimas essenciais ao metabolismo (LI et al., 2014; LI et al., 2015). O 5-FU apresenta uma grande propriedade citotóxica principalmente para as células renais, cardíacas e fígado. Sua citotoxicidade se deve a não seletividade de sua ação sobre as células anormais e normais ocasionando o aumento do estresse oxidativo e morte celular (MIURA et al., 2010; RASHID et al., 2014). Outro antineoplásico usado no tratamento do câncer é a cisplatina. Ele é produzido utilizando como base a platina e tem como seu mecanismo de ação induzir um aumento excessivo de EROs em células cancerígenas, provocando a ativação dos processos de morte celular e a eliminação das células demasiadamente danificadas (MA et al., 2014, LEE et al., 2016).

Estudos sugerem que a suplementação dietética com antioxidantes pode influenciar a resposta à quimioterapia, bem como o desenvolvimento de efeitos colaterais adversos que resultam do tratamento com agentes antineoplásicos. A administração de agentes antineoplásicos resulta em stress oxidativo, isto é, na produção de radicais livres e outras espécies reactivas de oxigênio (EROs) que causam a redução das atividades de enzimas antioxidativas no organismo (REUTER et al., 2010). A ausência dessas enzimas provoca um aumento de radicais livres que se ligam as moléculas de DNA gerando danos irreversíveis devido a sua alta reatividade (AKLADIOS; ADREW; PARKINSON,2015).

EROs podem causar ou contribuir para certos efeitos secundários que são comuns a muitos medicamentos anticancerígenos, tais como toxicidade gastrointestinal, cardiotoxicidade e nefrotoxicidade (CONKLIN, 2000). Os antioxidantes, dentre eles, o ácido ascórbico, podem reduzir ou prevenir muitos destes efeitos secundários, porém pouco se sabe se sua suplementação pode interferir nos efeitos citotóxicos dos agentes quimioterápicos.

Uma forma de avaliar e monitorar os danos provocados por estresse oxidativo é com o ensaio cometa (DUSINSKA; COLLINS, 2008, FANG et al., 2015). Este ensaio vem sendo utilizado desde o final do século XX para avaliar a toxicidade de alguns compostos terapêuticos, ações antioxidantes de algumas substâncias e para determinar a capacidade de

reparo de DNA em humanos (SPIVAK et al., 2009). É um teste de fácil realização e possui uma alta sensibilidade para avaliar a quebra do DNA em um pequeno número de células (KAWAGUCHI et al., 2010; WANG et al., 2013).

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os danos genotóxicos induzidos pela cisplatina e 5-FU e os efeitos antioxidantes do ácido ascórbico na modulação desses quimioterápicos no tratamento de camundongos transplantados com sarcoma 180.

6.2. Matérias e Métodos

6.2.1. Aspectos éticos

Este trabalho foi submetido e aprovado a sua execução ao Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí - UFPI. O número de protocolo de aprovação do experimento pelo comitê de ética é 076/15.

6.2.2. Animais

Foram utilizados neste experimento camundongos da linhagem Swiss e espécie *Mus musculus*, todos machos, albinos, em torno de dois meses de idade, com peso entre 20 a 30g adquiridos do Biotério do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, com livre acesso a ração tipo pellets (Purina®) e água, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 05h30 às 17h30.

6.2.3. Delineamento do experimento

Os animais foram organizados em nove grupos onde cada grupo possui $n=5$ de animais e foram dispostos como a seguir: CN = grupo negativo, Cisplatina (5mg/kg/dia), 5-Fluorouracil (5mg/kg/dia), Vit C $2\mu\text{M}$, Vit C $10\mu\text{M}$, Cisplatina (5mg/kg/dia) + Vit C $2\mu\text{M}$, Cisplatina (5mg/kg/dia) + Vit. C $10\mu\text{M}$, 5-Fluorouracil (5mg/kg/dia) + Vit C $2\mu\text{M}$, 5-Fluorouracil (5mg/kg/dia) + Vit C $10\mu\text{M}$. Em todos os grupos foram induzidos sarcoma sólido periaxilar. Exceto no grupo negativo, os demais grupos foram tratados com cisplatina ou 5-fluorouracil durante sete dias com uma única dose por dia. Após o tratamento os ratos foram pesados em uma balança analítica e eutanasiados para a realização dos testes. O tumor, os rins e o fígado foram extraídos pesados e fixados em formol a 10%.

6.2.4. Ensaio cometa

O teste cometa utilizado foi a versão alcalina de acordo com Tice et al. (2000). Uma alíquota de 10 uL de medula foram misturados com uma fina camada de agarose lowmelting 0,75% e disposta sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%; em seguida, as lâminas foram imersas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% DMSO na hora do uso), por 48h a 40°C, para a lise das membranas celulares. Após a lise celular, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos e em seguida aplicado em uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos em uma cuba de eletroforese de DNA. Imediatamente a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com Giemsa.

6.2.5. Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Para análise bioquímica, as amostras de sangue total foram coletadas e armazenadas em tubos de ensaios e depois centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos. Logo após, foram dosados os seguintes parâmetros: uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT). Os ensaios foram realizados em aparelho semiautomático Analisador Bioquímico Bioplus semiautomático Modelo BIO-2000 IL (BR).

Para análise hematológica, as amostras foram coletadas em tubos de ensaios com anticoagulante EDTA e foram rapidamente analisados os seguintes parâmetros: hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos, RDW, leucócitos e plaquetas. Os ensaios foram realizados em aparelho semiautomático Analisador Hematológico automático Mindray Modelo BC-2800 (EUA).

6.2.6. Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA), pelo teste One-way e pós-teste de Tukey através do programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, Copyright ©.

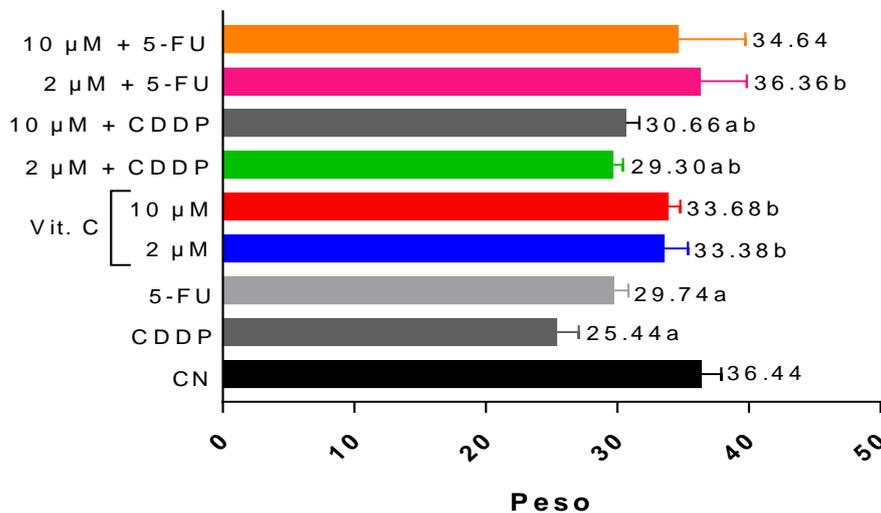
6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Caracterização dos animais quanto ao peso corporal, peso do tumor e órgãos

Os resultados indicam que os animais tratados com os antineoplásicos apresentaram um menor peso corporal ($p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle. Os grupos tratados

com cisplatina e vitamina C nas doses de 2 e 10 μ M apresentaram um peso significativamente ($p < 0,05$) maior quando comparados aos grupos que receberam apenas cisplatina. O grupo tratado com 5-FU e vitamina C na dose de 2 μ M também apresentou um peso significativamente maior ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo que recebeu apenas 5-FU. Diferentemente, o grupo que recebeu 5-FU e vitamina C na dose de 10 μ M não apresentou diferença de peso significativa em relação aos outros grupos (**Figura 1**).

Figura 1. Peso (g) corporal para os diferentes grupos de tratamento. ANOVA one-way, seguido de Tukey. Significância de a $P < 0,05$ comparado ao grupo CN; b $P < 0,05$ comparado ao grupo CDDP; c $P < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU.



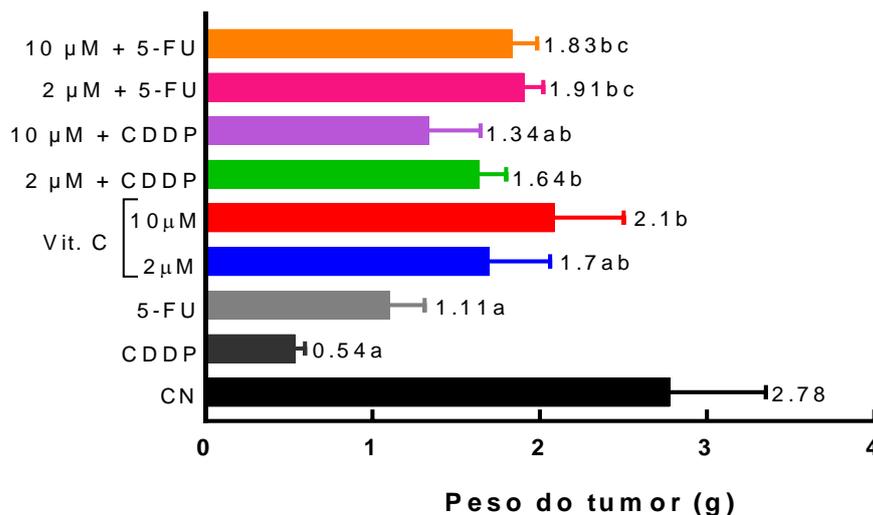
Os resultados deste estudo indicam que a terapia com antineoplásicos influencia no peso dos animais. A cisplatina foi a droga que mais promoveu a redução de peso corporal, quando comparado a 5-FU. No entanto, quando associada com vitamina C, esta substância parece atuar de maneira protetiva, de modo a diminuir a perda de peso nos animais.

Existem relatos de que o tratamento com quimioterápicos promove a redução de peso em animais. Segundo Garcia et al. (2013), a cisplatina reduz o peso corporal, gorduras (com a redução do diâmetro e tamanho de adipócitos) e a massa magra. Outros estudos também têm demonstrado que a cisplatina reduz significativamente a ingestão de alimentos e o peso corporal de animais (HOLLAND et al., 2014; GUINDON et al., 2014). De Martinis (2001) observou que a administração de 100 mg/kg de vitamina C em associação com cisplatina demonstrou um possível efeito protetivo, reduzindo a perda de peso nos animais que receberam o tratamento. No entanto, no estudo realizado por Guindon et al. (2014) não houve diferença de peso corporal entre o grupo tratado apenas com cisplatina e o grupo que recebeu tratamento de cisplatina e vitamina C (25 mg/kg s.c.).

Há relato de que o tratamento com 5-FU não revelou diferenças significantes no peso corporal de camundongos tratados, quando comparado aos que não receberam tratamento (SHARMA; ADAM; SCHUMACHER, 1997). Contudo, Goto et al. (2004) observou que a administração oral de 5-FU provocou significativa redução de peso de modelos de ratos com sarcoma de Yoshida portadores de câncer de cólon que receberam o tratamento. Em concordância com os resultados observados neste estudo, resultados semelhantes também foram encontrados por Abd et al. (2014) e Runtuwene et al. (2014).

O peso dos tumores também foi mensurado e observou-se que a cisplatina e 5-FU reduziram significativamente os pesos dos tumores ($p < 0,05$), quando comparados ao controle negativo (**Figura 2**).

Figura 2. Peso (g) do tumor para os diferentes grupos de tratamento. ANOVA, one-way seguido de Tukey. Significância de a $P < 0,05$ comparado ao grupo CN; b $P < 0,05$ comparado ao grupo CDDP; c $P < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU.



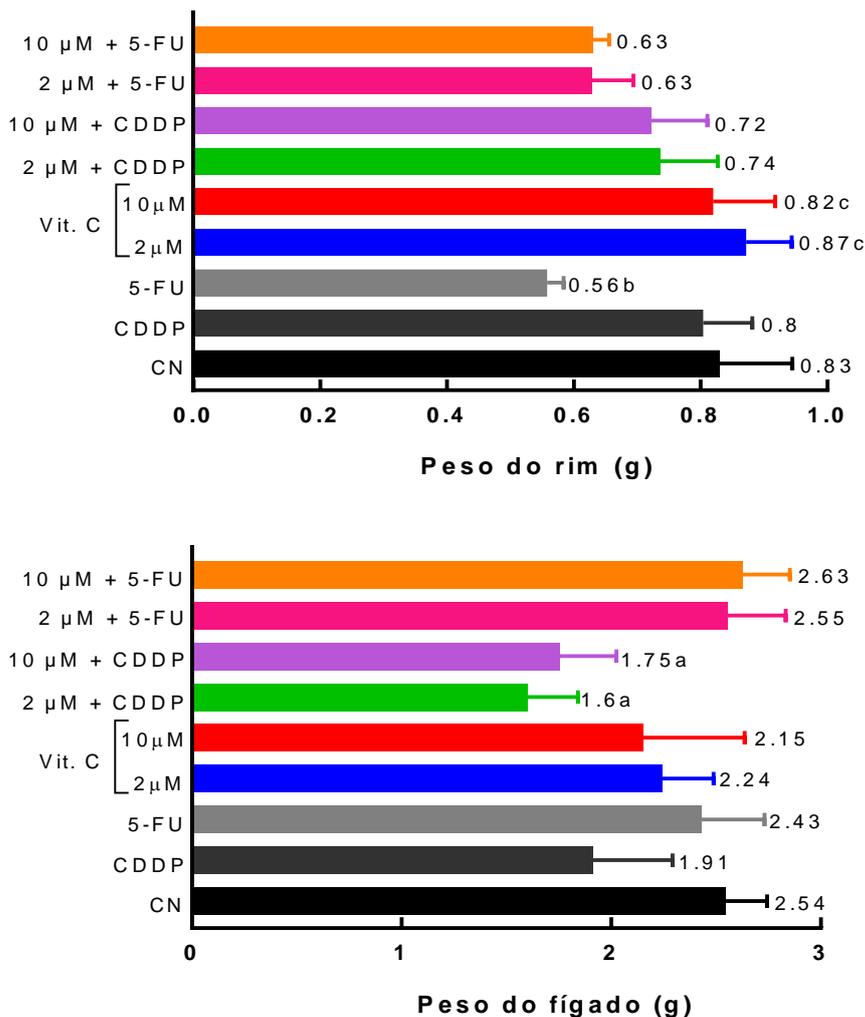
Os resultados apontam para os efeitos antitumorais de cisplatina e 5-FU, que reduziram o peso dos tumores dos animais que receberam o tratamento. Os resultados observados no presente estudo corroboram com os relatos na literatura. O estudo realizado por Park et al. (2009) demonstrou a cisplatina (4mg/kg) reduziu o tamanho e peso de tumores sólidos em camundongos portadores de melanoma. Sharma e colaboradores (1997) observaram que, após 4 dias consecutivos recebendo 3 doses diárias de 5-FU (50mg/kg), o antineoplásico reduziu significativamente o peso do tumor de cólon. Runtuwene et al. (2014) também observou redução do tumor de cólon após tratamento com 5-FU em ratas fêmeas.

O tratamento com a combinação de vitamina C, tanto na dose de 2µM como na dose de 10 µM, com a cisplatina ou 5-FU não promoveu redução do peso dos tumores, quando

comparado aos grupos que foram tratados apenas com as drogas. Estes resultados indicam que a vitamina C pode ter antagonizado os efeitos antitumorais induzidos pela cisplatina e 5-FU. Na literatura há relatos de que a vitamina C pode reduzir a efetividade de drogas antineoplásicas, afetando o retardo do crescimento tumoral induzido pelas drogas em murinos portadores de tumor (HEANEY et al., 2008; PERRONE et al., 2009).

Os pesos do rim e fígado dos animais de todos os grupos de tratamento também foram avaliados. Em geral, não houve variação significativa no peso do rim ou fígado entre os animais que receberam tratamento e o grupo controle. Apenas os animais tratados com cisplatina em associação com vitamina C apresentaram uma significativa ($p < 0,05$) redução do peso do fígado, quando comparados ao controle negativo (**Figura 3**).

Figura 3. Peso (g) do rim e fígado para os diferentes grupos de tratamento. ANOVA, one-way seguido de Turkey. Significância de a $P < 0,05$ comparado ao grupo CN; b $P < 0,05$ comparado ao grupo CDDP; c $P < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU.



O estudo realizado por Aketa et al. (2013) aponta resultados que discordam com os encontrados neste estudo. Os autores demonstraram que houve significativa redução do peso do fígado de camundongos tratados com 5-FU. Garcia (2013) e Nasr (2013) também observaram que o tratamento de animais com cisplatina promoveu a diminuição do peso do fígado destes animais, sugerindo algum grau de hepatotoxicidade causada pela droga.

Adicionalmente, Nematbakhsh et al. (2013) demonstrou que cisplatina pode induzir nefrotoxicidade, durante a qual são observados aumento do peso dos rins, acompanhado de aumento da intensidade de danos no tecido renal, além de aumento de marcadores plasmáticos para danos renais. Nasri (2013) também relatam alterações no peso dos rins após tratamento com cisplatina, que pode causar nefrotoxicidade via geração de estresse oxidativo.

6.3.2. Correlação com parâmetros hematológicos e bioquímicos

Para se avaliar a segurança da terapia com antineoplásicos em associação com o AA, níveis plasmáticos de parâmetros bioquímicos e exames hematológicos foram avaliados. No que diz respeito aos parâmetros hematológicos, observou-se significativa ($p < 0,05$) leucopenia, com presença de neutropenia, em todos os grupos tratados com as drogas isoladas ou em associação com AA, quando comparados ao grupo controle, exceto nos grupos tratados apenas com AA. Não houve alterações significantes nos demais parâmetros hematológicos analisados (**Tabela 1**).

Em concordância com estes resultados, diversos autores têm relatado acerca da mielossupressão causada por ambos antineoplásicos (KOJIMA et al., 2003; PARK et al., 2012; ASTOLFI et al., 2013; CAO et al., 2014; QIAN et al., 2015). A literatura relata que a citotoxicidade induzida pela quimioterapia suprime o sistema hematopoiético, observando-se principalmente neutropenia severa, o que leva a predisposição dos pacientes em tratamento à infecções (CRAWFORD; DALE; LYMAN, 2003).

Além disso, houve significantes ($p < 0,05$) alterações tanto dos marcadores renais (uréia e creatinina) quanto dos marcadores hepáticos (AST e ALT) nos grupos que foram tratados com as drogas sozinhas ou em associação com o AA, quando comparados ao grupo controle, exceto o grupo tratado apenas com AA. Aparentemente, o uso de AA não foi capaz de reduzir os níveis de ureia e creatinina causado pelos agentes neoplásicos.

A cisplatina induz citotoxicidade induzida por EROs, causando aumento nos níveis plasmáticos de creatinina e, conseqüentemente, uma redução nos níveis urinários de creatinina, como demonstrado neste estudo (DE MARTINIS; BIANCHI, 2001). Para avaliar

injúrias agudas no rim em 50 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, recebendo cisplatina, Peres et al. (2014) coletaram sangue para analisar os níveis plasmáticos de creatina e uréia. Os autores observaram que 78% dos pacientes desenvolveram injúria renal aguda, apresentando aumento dos níveis de creatinina e ureia no soro, em concordância com os resultados aqui observados. Também há relatos a cerca de altos níveis de uréia em pacientes tratados com 5-FU (CHEN; HO, 2012).

Corroborando com os resultados deste estudo, Mir et al. (2015) demonstrou os efeitos da cisplatina sobre os hepatócitos e enzimas hepáticas de ratos, observando níveis significativamente elevados das enzimas hepáticas ASL e ALT, confirmando os danos causado nos hepatócitos pela droga, demonstrando a hepatotoxicidade induzida pela cisplatina. Outros estudos também demonstraram resultados semelhantes (LU; CEDERBAUM, 2005; ARHOGHRO; IKEH; PROHP, 2014). Também há relatos a cerca do aumento dos níveis plasmáticos de enzimas hepáticas induzidas por 5-FU, indicando um grau de toxicidade da droga nas células do fígado (ABDEL-HAMID et al., 2011). Em contraste com os resultados obtidos neste estudo, AKETA et al. (2013) não observou alterações bioquímicas (ALT, bilirrubila, albumina ou creatinina) após tratamento com 5-FU.

Tabela 1. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Mus musculus* tratados com diferentes concentrações dos quimioterápicos cisplatina e 5-FU (1 mg/mL; 10 mg/mL e 50 mg/mL), e a modulação destas pela vitamina C. ANOVA, one-way seguido de Tukey. Significância de ^a $P < 0,05$ comparado ao grupo CN; ^b $P < 0,05$ comparado ao grupo CDDP; ^c $P < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU. Todos comparados em relação ao mesmo parâmetro.

Parâmetros	Tratamento								
	CN	CDDP	5-FU	2 µM Vit.C	10 µM Vit.C	2 µM Vit.C + CDDP	10 µM Vit.C + CDDP	2 µM Vit.C + 5-FU	10 µM Vit.C + 5-FU
	Hematológicos								
GBT	2710±474	1554±237a	966±376a	2524±265	2658±607	2492±956b	1974±846a	1920±639ac	1566±251ac
Neu	1572±347	750±569a	214±127a	964±553	1398±441	1270±734 ^a	848±791ab	430±618a	316±258a
Lin	860±243	700±317	624±278	768±250	1146±301	774±341	804±381	1150±314	900±130
Mon	150±121	106±75.3	99±83	138.8±225	65±75	376±252	290±193	324±223	341.2±323
Eos	8.2±5.2	33.4±44	4.6±3.2	14.6±7.7	26±8.9	68.4±87	31.4±39	8.4±12	4±1.4
Bas	21±11.4	6.4±3.5	6.2±10.5	14.4±8.9	29±8.9	6±4.1	8±7.1	11.4±4.8	13.6±5.9
GV	6.694±0,37	7.582±0.82	7.244±0.76	6.636±0.56	6.688±0.74	8.128±0.55	8.83±0.97	7.054±0.67	7.362±0.39
Hb	11.66±0.56	13.26±1.67	12.52±1.44	11.44±1.25	11.82±0.94	14.12±0.81	15.16±1.6	12.28±1.55	13.24±0.66
Ht	36.14±2.17	40±3.26	39.02±4.85	34.5±3.88	35.98±2.81	43.36±3.1	47.26±5.2	39.12±5.9	42.2±2.4
VCM	53.96±1.44	51.48±1.87	53.76±1.29	51.88±1.78	53.96±1.98	53.4±2.9	53.58±2.7	55.18±3.4	57.34±0.87
HCM	17.42±0.41	16.9±1.17	17.28±0.35	17.22±0.42	17.72±0.69	17.38±0.83	17.2±0.8	17.36±0.65	18±0.17
CHCM	32.3±0.99	32.48±2.36	32.14±1	32.78±0.47	32.86±0.41	32.58±0.52	32.08±0.38	31.52±1.2	31.36±0.37
RDW	14.1±0.56	13.7±0.54	13.62±0.43	13.64±0.47	13.7±0.49	13.02±0.58	13.22±0.37	13.8±0.25	13.38±0.42
PLT	872.2±134	679.6±84.66	680.4±130	839.4±209	804.2±253	623.6±134	681±269	782.4±113	654.8±202
	Bioquímicos								
Ureia	34.6 ± 3.78	69.8 ± 11.30a	66 ± 7.31a	34.6 ± 4.92bc	32.4 ± 3.36bc	60.8 ± 4.54 ^a	59.8 ± 4.14a	57 ± 8.15a	59.6 ± 5.59a
Creatina	0.48 ± 0.08	1.64 ± 0.18a	1.58 ± 0.19a	0.52 ± 0.13bc	0.48 ± 0.08bc	1.38 ± 0.21 ^a	1.26 ± 0.18a	1.36 ± 0.27a	1.28 ± 0.31a
ALT	129.6 ± 7.56	185.8 ± 10.94a	179 ± 20.38a	137 ± 6.05b	135.6 ± 7.02bc	153.8 ± 9.86	163.6 ± 6.2ab	176.6 ± 5.31a	155.4 ± 19.03
AST	49.6 ± 10.16	81.6 ± 5.85a	97.6 ± 13.79a	58.4 ± 5.77bc	41.4 ± 7.16ab	71 ± 12.94	62.4 ± 8.96b	84.8 ± 10.05a	82.4 ± 5.41a

Legenda: CN=controle negativo; CDDP= cisplatina; 5-FU= 5-fluorouracil; Vit.C= Vitamina C; GB= glóbulos brancos totais; Neu= neutrófilos; Lin= linfócitos; Mon= monócitos; Eos= eosinófilos; Bas= basófilos; GV= glóbulos vermelhos; Hb= hemoglobina; Ht= hematócrito; VCM= Volume corpuscular médio; HCM= Hemoglobina corpuscular média; CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW= Distribuição de eritrócitos; PLT= plaquetas; ALT= Alanina aminotransferase; AST= Aspartato aminotransferase

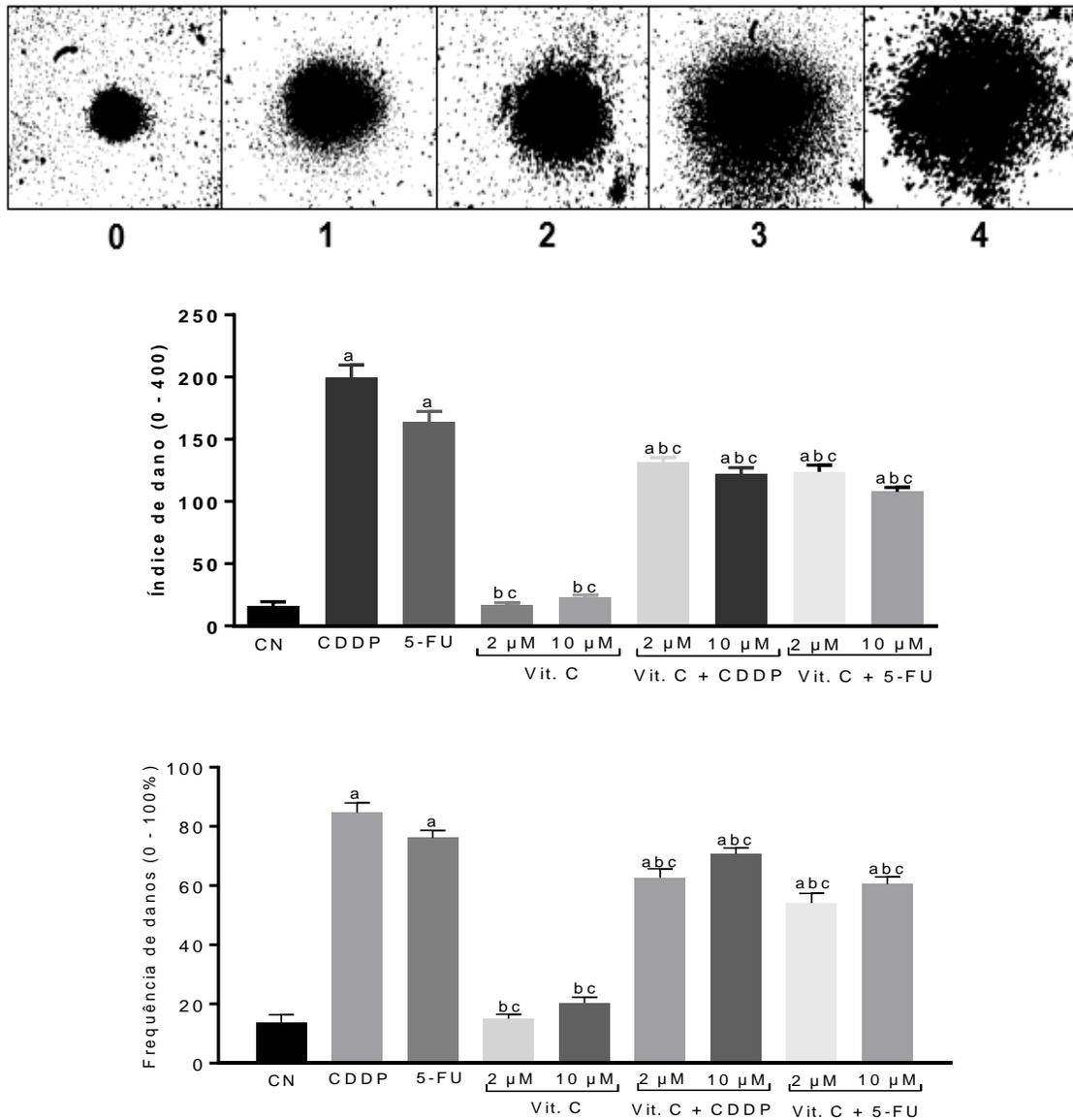
6.3.3. Perfil de danos ao DNA em células da medula óssea de animais tratados com cisplatina, 5-FU ou vitamina C por meio do Teste Cometa

Por meio da aplicação do teste cometa, foram identificados e avaliados os danos genotóxicos induzidos por cisplatina e 5-fluorouracil em células da medula óssea, assim como a modulação dos efeitos destas drogas pela vitamina C, que foram classificadas de acordo com a escala de grau de danos (que varia de 0 a 4) observados nas células cometa. Os danos genotóxicos foram avaliados com base no Índice de Danos (ID) e na Frequência de Danos (FD) observados em cada um dos grupos de tratamento.

Os resultados mostram que os antineoplásicos, especialmente a cisplatina, induziram significativamente ($p < 0,05$) danos ao DNA, observados pelo aumento dos índices e das frequências de danos, quando comparados ao grupo controle. A frequência de danos induzidos pela cisplatina foi de aproximadamente 85%, enquanto que a frequência de danos induzidas por 5-FU foi de mais de 76% (**Figura 4**).

Ainda foram observados que os índices de danos induzidos pela vitamina C, nas doses de 2 e 10 μM , foram significativamente menores ($p < 0,05$), quando comparados aos índices de danos induzidos pela cisplatina e 5-FU. As frequências de danos nos animais tratados apenas com vitamina C foram de aproximadamente 15% e 20% para as doses de 2 e 10 μM , respectivamente, semelhantemente aos danos observados no grupo controle negativo. Ainda, estas frequências de danos foram significativamente menores, quando comparadas as frequências de danos induzidas por ambos antineoplásicos. Os resultados indicam que a AA, nas concentrações de 2 e 10 μM , não induziu danos significativos ao DNA celular.

Figura 4. Avaliação da modulação da vitamina C nos danos genotóxicos induzidos por cisplatina (CDDP), 5 – Fluorouracil (5-FU) em células de medula óssea por meio do ensaio Cometa. ANOVA, one-way seguido de Tukey. Significância de ^a $P < 0,05$ comparado ao grupo CN; ^b $P < 0,05$ comparado ao grupo CDDP; ^c $P < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU.



Nas análises das associações drogas-AA, se verificou a influência desta vitamina nos efeitos citotóxicos induzidas pelas drogas quimioterápicas em questão. Quando administrado juntamente com a cisplatina ou 5-FU, a vitamina C nas doses de 2 e 10 μM modula significativamente o índice e a frequência de danos induzidos por ambas as drogas, com $p < 0,05$, quando comparado às drogas sozinhas (**Figura 4**).

No caso da cisplatina, a frequência de danos (FD) resultante da sua associação com 2 μ M da vitamina foi de aproximadamente 63%, enquanto que da associação com 10 μ M de vitamina C demonstrou uma frequência de danos de 70%. A frequência de danos na associação de vitamina C e cisplatina foi significativamente ($p < 0,05$) menor, quando comparados ao grupo tratado apenas com a droga (FD= 84,6%), assim como o índice de danos. Os resultados indicam que o AA interferiu na indução de danos ao DNA causados pela cisplatina, comprometendo a sua eficácia.

De forma semelhante ao que ocorreu com a cisplatina, os resultados indicam que a vitamina C pode influenciar nos danos genotóxicos induzidos pela 5-FU, de modo a atenuar os efeitos da droga. A associação da vitamina C na dose de 2 μ M e 5-FU induziu uma frequência de danos de aprox. 55%, enquanto que a vitamina C na dose de 10 μ M em concomitância com 5-FU induziu uma frequência de danos de aproximadamente 60%. Estes valores foram significativamente ($P < 0,05$) menores, quando comparados ao grupo que foi tratado apenas com a 5-FU (FD= 76,1%).

A realização do teste cometa demonstrou o efeito genotóxico causado pelos antineoplásicos, assim como o efeito protetivo da vitamina C sobre estes danos. Ainda que as drogas antineoplásicas desempenhem mecanismos de ação particulares na destruição de células cancerosas, a maioria destas drogas interfere na proliferação celular, através da destruição de DNA, interrupção da síntese de RNA e do processo de replicação, induzindo citotoxicidade (SAKHVIDI et al., 2016). Drogas citotóxicas, como a cisplatina e o 5-FU, interagem diretamente ou indiretamente com o DNA, causando danos à molécula, induzindo, conseqüentemente, a morte celular (TROMBINI et al., 2016).

Há relatos acerca do efeito não-nocivo de vitamina C no DNA de células eucarióticas. Farghaly e Abo-Zeid (2009) observaram semelhantes aos encontrados neste estudo. Por meio do teste cometa, os autores observaram que as células da medula óssea de ratos tratados apenas com a vitamina C na dose de 20mg/kg apresentaram uma média comprimento da cauda semelhante a média observada no grupo controle (sem tratamento). Em um estudo realizado por Azqueta e colaboradores (2013), a vitamina C na concentração de 200 μ M não induziu aumento dos níveis de quebras das fitas ou de oxidação de purinas no DNA nuclear de células HeLa, detectada por meio do teste cometa. Ainda, Yoshikawa et al. (2006) demonstrou que esta vitamina, em concentrações milimolares, desempenha um efeito protetivo contra quebras duplas induzidas ao

DNA induzidas por um corante fluorescente, sugerindo que este efeito está associado a suas propriedades antioxidantes, capaz de intervir na ação de EROs, e sua capacidade de interagir diretamente ao DNA, promovendo uma reorganização de alto nível na estrutura da molécula.

Para amenizar os efeitos adversos causados pelos antineoplásicos, via indução de estresse oxidativo, o uso de vitaminas antioxidantes tem sido utilizado concomitantemente à quimioterapia. Os resultados do presente estudo indicam que esta vitamina reduz significativamente a eficácia do 5-FU e cisplatina, por interferir na indução dos danos oxidativos ao DNA causados por estas drogas. Em concordância com o efeito modulatórios da vitamina aqui observado, Heaney et al. (2008) demonstrou que, quando a vitamina C é administrada antes de drogas antineoplásicas (cisplatina, doxorubicina, vincristina, metotrexato e imatinibe), ela antagoniza a eficácia terapêutica das drogas em um modelos humanos de câncer hematopoiético, por meio da preservação do potencial de membrana na mitocôndria, levando a uma redução dos níveis de apoptose nas células cancerosas tratadas com os antineoplásicos. O efeito de modulação da vitamina C no efeito da cisplatina também foi observado em outros estudos (DE MARTINIS; BIANCHI et al., 2001).

Fu et al. (2014) demonstrou que a vitamina C (50µg/kg) reduz o efeito citotóxico de 5-FU em células de câncer de cólon, por meio da regulação da fosforização de caspase-7 dependente de Src. No estudo desenvolvido por Al-Asmari et al. (2015), vitamina C (500mg/kg) atua de forma antioxidante, por meio da modulação do estresse oxidativo, ativação de fatores de transcrição sensíveis a alterações no status redox e regulação da transcrição de moléculas alvo, vindo a modular a toxicidade em ratos tratados com 5-FU. Em contrapartida, foi descrito a ação da vitamina C como um potencial sensibilizador químico de linhagens de células HEp-2 e de fibroblastos de pulmão humano resistentes a 5-FU (NAGY et al., 2003) e linhagens de células esofageais (ABDEL-LATIF et al., 2005), além do seu efeito protetivo contra a hepatotoxicidade induzida pela droga (ABOU-ZEID, 2014).

Em contraste, estudos demonstram que, em associação com a cisplatina, a vitamina C aumenta o efeito citotóxico da droga em células humanas de câncer de cólon (AN et al., 2011) e da linhagem de células SiHa (LEEKHA et al., 2016), por meio do aumento da expressão de p53 e de aumento de peróxido de hidrogênio, levado ao aumento de apoptose nestas células. Outros estudos também demonstram que esta vitamina, quando usada em combinação a cisplatina, acentua a toxicidade induzida pela droga, sem afetar nos seus efeitos quimioterápicos (DE

MARTINIS; BISNCHI, 2001; FATIMA; ARIVARASU; MAHMOOD, 2007; LONGCHAR; PRASAD, 2016).

Em altas concentrações, a vitamina apresenta efeitos antiproliferativos em diferentes tipos de células, sensibiliza células cancerosas à alguns agentes citostáticos e protege contra os efeitos adversos relacionados a quimioterapia (FROMBERG et al., 2010). No entanto, altas doses do AA também estão relacionadas a sua toxicidade no organismo. Altas doses de vitamina C induzem a geração excessiva de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que causa senescência celular, via ativação de proteína quinase C δ (PKC δ), e liberação de citocromo C a partir das mitocôndrias, levando a apoptose (BUETTNER, 2011; UETAKI et al., 2015). Além disso, a produção de H_2O_2 pela vitamina pode alterar o balanço redox da célula, por meio da mudança na proporção de defesas antioxidantes, causando danos à célula (CHEN et al., 2012).

Então, deve-se considerar que qualquer antioxidante que desempenhe um papel antioxidante na redução dos efeitos adversos induzidos na quimioterapia, também pode apresentar o potencial de reduzir a efetividade da quimioterapia em células cancerosas (SUBRAMANI et al., 2014). Desta forma, o efeito modulatório da vitamina C frente aos danos genotóxicos induzidos pela cisplatina e 5-FU observado neste estudo provavelmente está relacionado ao seu potencial antioxidante, quando administrada em baixas concentrações.

6.4. Conclusão

A quimioterapia com cisplatina e 5-fluorouracil reduziu o tamanho dos tumores em modelos in vivo de Sarcoma 180, promovendo perda de peso, leucopenia, danos hepáticos e renais. Quando associadas à vitamina C, os efeitos antitumorais e genotóxicos induzidos pelas drogas foram significativamente modulados pelo antioxidante. Devido ao efeito antagonista do AA frente aos efeitos de agentes quimioterápicos, o presente estudo com roedores sugere que a utilização da vitamina C, como um adjuvante às drogas quimioterápicas convencionais, afeta significativamente a ação destes no tratamento do câncer, tendo-se em vista o comprometimento da eficácia da quimioterapia com 5-FU e cisplatina. Estes achados podem ter relevância clínica significativa devido ao uso indiscriminado de antioxidantes como suplemento nutricional. O uso

de antioxidantes ainda é controverso e os dados recentes garantem estudos clínicos adicionais, avaliando doses não-farmacológicas de AA em pacientes que estão sob tratamento de câncer.

Referências

ABD, A.H.; HUSSEIN, A.G.; MAHMOOD, A.S. Efficacy of intra-peritoneal administration of metformin and 5-fluorouracil in prevention of induced-colorectal aberrant crypt foci in mice.

International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 6, n. 2, 2014.

ABDEL-HAMID, H.F.; SOLIMAN, A.; HELALY, F.M.; RAGAB, S. Cytotoxic potency and induced biochemical parameters in mice serum of new furan derivatives against liver cancer cell line. **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research**, v. 68, n. 4, p. 499-505, 2011.

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

ABOU-ZEID, N.R.A. Ameliorative effect of vitamin C against 5-fluorouracil-induced hepatotoxicity in mice: A light and electron microscope study. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 67, n. 4, p. 109–118, 2014.

AFOLABI, O. K.; ADELEKE, G. E.; UGBAJA, R. N. Crocin Alleviates 5-Fluorouracil-induced Hepatotoxicity through the abrogation of Oxidative Stress in Male Wistar rats. **Asian Pacific Journal of Health Science**, v. 3, n. 2, p. 58-68, 2016.

AFZAL, S.; JENSEN, S.A.; SORENSEN, J.B.; HENRIKSEN, T.; WEIMANN, A.; POULSEN, H.E. Oxidative damage to guanine nucleosides following combination chemotherapy with 5-fluorouracil and oxaliplatin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 1141, n. 69, p. 301–307, 2012.

AHMED, M.; JAMIL, K. Cytotoxicity of neoplastic drugs Gefitinib, Cisplatin, 5-FU, Gemcitabine, and Vinorelbine on human cervical cancer cells (HeLa). **Biology and Medicine**, v. 3, n. 5, p. 60-71, 2011.

AKETA, H.; TATSUMI, T.; KOHGA, K.; TSUNEMATSU, H.; AONO, S.; SHIMIZU, S. et al. The combination therapy of α -galactosylceramide and 5-fluorouracil showed antitumor effect synergistically against liver tumor in mice. **International Journal of Cancer**, v. 133, p. 1126–1135, 2013.

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

AL-MALKI, A. L.; SAYED, A. A. R. Thymoquinone attenuates cisplatin-induced hepatotoxicity via nuclear factor kappa- β . **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 282, 2014.

AN, S.H.; KANG, J.H.; KIM, D.H.; LEE, M.S. Vitamin C increases the apoptosis via up-regulation p53 during cisplatin treatment in human colon cancer cells. **BMB Reports**, v. 44, p. 211-216, 2011.

ARHOGHRO, E.M.; IKEH, C.; PROHP, T.P. Cymbopogon citratus aqueous extract alleviates cisplatin-induced hepatic oxidative stress and toxicity in albino rats. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n.4, p. 586-604, 2014.

ASTOLFI, L.; GHISELLI, S.; GUARAN, V.; CHICCA, M.; SIMONI, E.; OLIVETTO, E. et al Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation. **Oncology Reports**, v. 29, n. 4, p. 1285–1292, 2013.

AZQUETA, A.; COSTA, S.; LORENZO, Y.; BASTANI, N.E.; COLLINS, A.R. Vitamin C in cultured human (HeLa) cells: lack of effect on DNA protection and repair. **Nutrients**, v. 5, p. 1200-1217, 2013.

BASU, A.; GHOSH, P.; BHATTACHARJEE, A.; PATRA, A. R.; BHATTACHARYA, S. Prevention of myelosuppression and genotoxicity induced by cisplatin in murine bone marrow cells: effect of an organovanadium compound vanadium(III)-l-cysteine. **Mutagenesis Advance**, v. 30, n. 4, p. 509-517, 2015.

BELLAGAMBA, B. C.; ABREU, B. R R.; GRIVICICH, I.; MARKARIAN, C. F.; CHEM, E.; CAMASSOLA, M. Human mesenchymal stem cells are resistant to cytotoxic and genotoxic effects of cisplatin in vitro. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 129-134, 2016.

BUETTNER, G. R. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.11, p. 341–346, 2011.

CAO, Z.; ZHANG, Z.; HUANG, Z.; WANG, R.; YANG, A.; LIAO, L. DU, J. Antitumor and immunomodulatory effects of low-dose 5-FU on hepatoma 22 tumor-bearing mice. **Oncology Letters**, v. 7, n. 4, p; 1260–1264, 2014.

CHEN, C. T.; HO, C. L. 5-Fluorouracil-induced Hyperammonemic Encephalopathy-A Case Report and Literature Review. **Journal of Medical Science**, v. 32, n. 6, p. 305-307, 2012.

CHEN, P.; YU, J.; CHALMERS, B.; DRISKO, J.; YANG, J.; LI, B.; CHEN, Q. Pharmacological ascorbate induces cytotoxicity in prostate cancer cells through ATP depletion and induction of autophagy. **Anticancer Drugs**, v. 23, n. 4, p. 437–444, 2012.

CHEUNG-ONG, K.; GIAEVER, G.; NISLOW, C. DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. **Chemistry & Biology**, v. 20, 2013.

CHIORAZZI, A.; SEMPERBONI, S.; MARMIROLI, P. Current View in Platinum Drug Mechanisms of Peripheral Neurotoxicity. **Toxics**, v. 3, p. 304-321, 2015.

CRAWFORD, J.; DALE, D.D.; LYMAN, G.H. Chemotherapy-Induced Neutropenia: Risks, Consequences, and New Directions for Its Management. **American Cancer Society**, v. 15, Issue 100, n. 2, p. 228-237, 2003.

DABLA, P.K. Renal function in diabetic nephropathy. **World Journal of Diabetes**, v. 1, n. 2, p. 48–56, 2010.

DAMRAUER, J.S.; STADLER, M.E.; ACHARYYA, S.; BALDWIN, A.S.; COUCH, M.E.; GUTTRIDGE, D.C. Chemotherapy-induced muscle wasting: association with NF- κ B and cancer cachexia. **Basic Applied Myology**, v. 18, n. 5, p. 139-148, 2008.

DE MARTINIS, B. S.; BIANCHI, M.D. Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats. **Pharmacological Research**, v. 44, p. 317-320, 2001.

DE MARTINIS, B.S.; BIANCHI, M.L.P. Effect of vitamin c supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative dna damage in rats. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 4, 2001.

FARGHALY, A. A.; ABO-ZEID, M. A. M. Evaluation of the Antimutagenic Effect of Vitamin C against DNA Damage and Cytotoxicity Induced By Trimethyltin in Mice. **Nature and Science**, v. 7, n. 12, 2009.

FATIMA, S.; ARIVARASU, N.A.; MAHMOOD, R. Vitamin C attenuates cisplatin-induced alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport. **Human & Experimental Toxicology**, v. 26, p. 419-426, 2007.

FENTON, R.A.; KNEPPER, M.A. Urea and Renal Function in the 21st Century: Insights from Knockout Mice. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, p. 679 – 688, 2007.

FOCAC CETTI, C.; BRUNO, A.; MAGNANI, E.; BARTOLINI, D.; PRINCIPI, E.; DALLAGLIO, K. et al. Effects of 5-Fluorouracil on Morphology, Cell Cycle, Proliferation, Apoptosis, Autophagy and ROS Production in Endothelial Cells and Cardiomyocytes. **PLoS One**, v.10, n. 2, 2015.

FROMBERG, A.; GUTSCH, D.; SCHULZE, D.; VOLLBRACHT, C.; WEISS, G.; CZUBAYKO, F. et al. Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 1157-1166, 2010.

FU, Y.; YANG, G.; ZHU, F.; PENG, C.; LI, W.; LI, H. et al. Antioxidants decrease the apoptotic effect of 5-Fu in colon cancer by regulating Src-dependent caspase-7 phosphorylation. **Cell Death and Disease**, v. 5, n. 983, 2014.

GARCIA, J.M.; SCHERER, T.; CHEN, J-A, GUILLORY, B.; NASSIF, A.; PAPUSHA, V. et al. Inhibition of cisplatin-induced lipid catabolism and weight loss by ghrelin in MALE mice. **Endocrinology**, v. 154, n. 9, p. 3118-3129, 2013.

GIANNINI, E.G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367–379, 2005.

GORRINI, C.; HARRIS, I.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews | Drug Discovery**, v. 12, n. 12, p. 931-47, 2013.

GOTO, T.; TOMIZAWA, N.; KOBAYASHI, E.; FUJIMURA, A. A comparative pharmacology study between the intracolonic and oral routes of 5-FU administration in a colon cancer-bearing Yoshida sarcoma rat model. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 95, n. 2, p.163-73, 2004.

GUINDON, J.; DENG, L.; FAN, B.; WAGER-MILLER, J.; HOHMANN, AG. Optimization of a cisplatin model of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in mice: use of vitamin C and sodium bicarbonate pretreatments to reduce nephrotoxicity and improve animal health status. **Molecular Pain**, v. 10, n. 56, 2014.

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

HOLLAND, R.A.; LEONARD, J.J.; KENSEY, N.A.; HANNIKAINEN, P.A.; DE JONGHE, B.C. Cisplatin induces neuronal activation and increases central AMPA and NMDA receptor subunit gene expression in mice. **Physiology & Behavior**, v. 136, p. 79–85, 2014.

KIM, Y. J; KIM, T. W.; PARK, S. R.; KIM, H. T.; JUNG, D. Y.; RYU, S. Y. et al. Deletion of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 represses Mre11-Rad50-Nbs1 complex protein expression in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 243, p. 22–30, 2016.

KOJIMA, S.; TAKABA, K.; KIMOTO, N.; TAKEDA, T.; KAKUNI, M.; MIZUTANI, M. et al. Protective effects of glutathione on 5-fluorouracil-induced myelosuppression in mice. **Archives of Toxicology**, v. 77, n. 5, p 285–290, 2003.

KOVÁCS, R.; CSENKI, Z.; BAKOS, K.; URBÁNYI, B.; HORVÁTH, Á.; GARAJ-VRHOVAC, V. et al. Assessment of toxicity and genotoxicity of low doses of 5-fluorouracil in zebrafish (*Danio rerio*) two-generation study, **Water Research**, v. 15, n. 77, p. 201-212, 2015.

KRAYNAK, A.R.; BARNUM, J.E.; CUNNINGHAM, C.L.; NG, A.; YKORUK, B.A.; BENNET, B. et al., Alkaline comet assay in liver and stomach, and micronucleus assay in bone marrow, from rats treated with 2-acetylaminofluorene, azidothymidine, cisplatin, or isobutyraldehyde. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 786-788, p.77-86, 2015.

KRAYNAKA, A. R.; BARNUMA, J. E.; CUNNINGHAMA, C. L.; NGB, A.; YKORUKA, B. A.; BENNETA, B. Alkaline comet assay in liver and stomach, and micronucleus assay in bone marrow, from rats treated with 2-acetylaminofluorene, azidothymidine, cisplatin, or

isobutyraldehyde. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 786-788, p. 77-86, 2015.

LAMBERTI, M.; PORTO, S.; MARRA, M.; ZAPPAVIGNA, S.; GRIMALDI, A.; FEOLA, D. et al. 5-Fluorouracil induces apoptosis in rat cardiocytes through intracellular oxidative stress. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 31, n. 60, 2012.

LEE, Y. J.; LEE, G. J.; YI, S. S.; HEOD, S. H.; PARKA, C. R.; NAME, H. S et al. Cisplatin and resveratrol induce apoptosis and autophagy following oxidative stress in malignant mesothelioma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 96–107, 2016.

LEEKHA, A.; GURJAR, B.S.; TYAGI, A.; RIZVI, M.A.; VERMA, A.K. Vitamin C in synergism with cisplatin induces cell death in cervical cancer cells through altered redox cycling and p53 upregulation. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, n. 12, p. 2503-2514, 2016.

LI, N.; SUN, C.; ZHOU, B.; XING, H.; MA, D.; et al. Low Concentration of Quercetin Antagonizes the Cytotoxic Effects of Anti-Neoplastic Drugs in Ovarian Cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

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

LONGCHAR, A.; SURYA, B. P. Ascorbic acid (vitamin c) ameliorates cisplatin-induced hematotoxicity in tumor-bearing mice. **World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, v. 5, Issue 4, p. 1870-189, 2016

LU, Y.; CEDERBAUM, A.I. Cisplatin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of Cytochrome P450 2E1. **Toxicological Sciences**, v. 89, n. 2, p. 515–523, 2006.

MA, J.; YANG, J.; WANG, C.; ZHANG, N.; DONG, Y.; WANG, C. et al. Emodin augments cisplatin cytotoxicity in platinum-resistant ovarian cancer cells via ROS-dependent MRP1 downregulation. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 107671, 2014.

MIR, M.; ARAB, M.R.; SHAHRAKI, M.R.; MASHHADI, M.A.; SALAR, M.S.; AVAL, F.S. et al. Toxic effects of cisplatin on hepatocytes and liver enzymes of rats. **Research Papers**, v. 12, n. 4, 2015.

MIURA, K.; KINOUCI, M.; ISHIDA, K.; FUJIBUCHI, W.; NAITOH, T.; OGAWA, H. et al. 5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. **Cancers**, v. 2, p. 1717–1730, 2010.

- MUT-SALUD, N.; ÁLVAREZ, P. J.; GARRIDO, J.; CARRASCO, E. et al. Antioxidant Intake and Antitumor Therapy: Toward Nutritional Recommendations for Optimal Results. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016.
- NAGY, B.; MUCSI, I.; MOLNAR, J.; VARGA, A.; THURZO, L. Chemosensitizing effect of vitamin C in combination with 5-fluorouracil in vitro. **In Vivo**, v. 17, n. 3, p. 289-92, 2003.
- NASR, A.Y. Morphological, biochemical, histological, and ultrastructural protective effects of misoprostol on cisplatin induced-hepatotoxicity in adult male rats. **Saudi Medical Journal**, v. 34, n. 12, p. 1237 – 1247, 2013.
- NASRI, H. Comment on: A model for prediction of cisplatin induced nephrotoxicity by kidney weight in experimental rats. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 18, n. 12, p. 1119–1120, 2013.
- NEMATBAKHS, M.; ASHRAFI, F.; NASRI, H.; TALEBI, A.; PEZESHKI, Z.; ESHRAGHI, F. et al. A model for prediction of cisplatin induced nephrotoxicity by kidney weight in experimental rats. **Journal of research in medical sciences**, v. 18, n. 5, p. 370–373, 2013.
- PARK, H-R.; JU, E-J.; JO, S-K.; JUNG, U.; KIM, S-H.; YEE, S-T. Enhanced antitumor efficacy of cisplatin in combination with HemoHIM in tumor-bearing mice. **BMC Cancer**, v. 9, n. 85, 2009.
- PERES, L. A. B.; CUNHA JÚNIOR, A. D.; ASSUMPÇÃO, R A B. Papel da lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL) urinária na nefrotoxicidade da cisplatina em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 3, 2014.
- PERRONE, G.; HIDEHISHIMA, T.; IKEDA, H.; OKAWA, Y.; CALABRESE, E. GORGUN, G. et al. Ascorbic acid inhibits antitumor activity of bortezomib in vivo. **Leukemia**, v. 23, p. 1679–1686, 2009.
- PERRONE, R.D.; MADIAS, N.E.; LEVEY, A.S. Serum Creatinine as an Index of Renal Function: New Insights into Old Concepts. **Clinical Chemistry**, v.38, v. 10, p. 1933-1953, 1992.
- QIAN, X.P., QIAN, X.L., CHEN, X.L., GE, M., CHEN, D.J. AND MAO, W.W. The anti-proliferative effect of 5-fluorouracil on tumor is highly associated with the renewal of peripheral white blood cells. **Journal of Cancer Therapy**, v. 6, p. 594-600, 2015.
- RANGARAJAN, S.; BHUVANA, S.; CURTIS, L. M. Ascorbic Acid in Cancer: A Renewed Hope? **Cancer Science and Therapy**, v. 6, n. 9, 2014.
- RASHID, S.; ALI, N.; NAFEES, S.; HASAN, S.K.; SULTANA, S. Mitigation of 5-Fluorouracil induced renal toxicity by chrysin via targeting oxidative stress and apoptosis in *Wistar* rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.66, p. 185–193, 2014.
- RJIBA-TOUATI, K.; AYED-BOUSSEMA, I.; BELARBIA, A.; AZZEBI, A.; ACHOUR, A; BACHA, H. Protective effect of recombinant human erythropoietin against cisplatin cytotoxicity

and genotoxicity in cultured Vero cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, p. 181–187, 2013.

RUNTUWENE, J.; AMITANI, H.; AMITANI, M.; ASAKAWA, A.; CHENG, K-X.; INUI, A. Hydrogen–water enhances 5-fluorouracil-induced inhibition of colon cancer. **Peer J**, v. 3, n.859, 2015.

SAKHVIDI, M.J.Z.; HAJAGHAZADEH, M.; MOSTAGHACI, M.; MEHRPARVAR, A.H.; SAKHVIDI, F.Z.; NAGHSHINEH, E. Applicability of the comet assay in evaluation of DNA damage in healthcare providers' working with antineoplastic drugs: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 22, n. 1, p. 52-67, 2016.

SANTANDREU, F. M.; VALLE, A.; OLIVER, J.; ROCA, P. Resveratrol Potentiates the Cytotoxic Oxidative Stress Induced by Chemotherapy in Human Colon Cancer Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 219-228, 2011.

SHARMA, R.; ADAM, E.; SCHUMACHER, U. The action of 5-fluorouracil on human HT29 colon cancer cells grown in SCID mice: mitosis, apoptosis and cell differentiation. **British Journal of Cancer**, v. 76, n. 8, p. 1011-1016, 1997.

SIRIWARDENA, A.K.; MASON, J.M.; SHEEN, A.J.; MAKIN, A.J.; SHAH, N.S. Antioxidant therapy does not reduce pain in patients with chronic pancreatitis: the anticipate study. **Gastroenterology**, v. 143, n. 3, p. 655-663, 2012.

SOSA V.; MOLINÉ T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, .M.E. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 2, n. 1, p. 376-390, 2012.

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

THIVAT, E.; THÉRONDE, S.; LAPIROT, O.; ABRIAL, C.; GIMBERGUES, P. GADÉA, E. et al. Weight change during chemotherapy changes the prognosis in non metastatic breast cancer for the worse. **BMC Cancer**, v. 10, n. 648, 2010.

TROMBINI, C.; FONCECA, T. G.; MORAIS, M., ROCHA, T. L.; BLASCO, J.; BEBIANNO, M. J. B. Toxic effects of cisplatin cytostatic drug in mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Environmental Research**, v 119, p. 12-21, 2016.

TROMBINI, C.; FONSECA, T.G.; MORAIS, M.; ROCHA, T.L.; BLASCO, J.; BEBIANNO, M.J. Toxic effects of cisplatin cytostatic drug in mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Environmental Research**, V. 119, p. 12-21, 2016.

UETAKI, M.; TABATA, S.; NAKASUKA, F.; SOGA, T.; TOMITA, M. Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin C-induced oxidative stress. **Nature: Cientific Reports**, v. 5, 2015.

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

YOSHIKAWA, Y.; HIZUME, K.; ODA, Y.; TAKEYASU, K.; ARAKI, Y.; YOSHIKAWA, K. Protective Effect of Vitamin C against Double-Strand Breaks in Reconstituted Chromatin Visualized by Single-Molecule Observation. **Biophysical Journal**, v. 90, p. 993–999, 2006.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio do teste *Allium cepa*, os resultados do presente estudo indicam que a vitamina C na dose de 2 μ M reduz a citotoxicidade induzida por cisplatina ou 5-FU.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* constituiu em um modelo biológico conveniente para estudo de estresse oxidativo, permitindo observar que a terapia com cisplatina ou 5-FU causa danos oxidativos em células eucarióticas, os quais podem ser modulados pela vitamina C, quando administrada concomitantemente ou após a meia-vida das drogas, porém essa modulação causa um efeitos controversos desempenhado pelo AA, que pode antagonizar a ação antitumoral de agentes quimioterápicos, comprometendo a eficácia da terapia.

A quimioterapia com cisplatina e 5-fluorouracil reduziu o tamanho dos tumores em modelos in vivo de Sarcoma 180, promovendo perda de peso, leucopenia, danos hepáticos e renais. Por meio da aplicação do teste cometa, observou-se que a administração de cisplatina ou 5-fluorouracil induziu danos genotóxicos em células da medula. Quando associadas à vitamina C, os efeitos antitumorais e genotóxicos induzidos pelas drogas foram significativamente modulados pelo antioxidante.

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

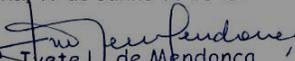


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “**Análises pré-clínicas morfofisiológicas de animais em quimioterapia e a influência da vitamina C sobre o crescimento tumoral**”, protocolo nº **076/15**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. PAULO MICHEL PINHEIRO FERREIRA–Núcleo de Tecnologia Farmacêutica/ CCS/ UFPI** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **17/06/2016**.

Vigência do Projeto	Julho/ 2016 à Dezembro/ 2018
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico/ <i>swiss</i>
Nº de Animais	192
Peso/ Idade	20 a 30g/ 2 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFPI.

Teresina, 17 de Junho de 2016.


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