



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ-UFPI
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS – CSHNB
LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JÉSSICA MARIA MONTEIRO LUZ

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM
ALTAS DOSES POR MEIO DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA
DE CAMUNDONGOS.**

PICOS-PI

2017

JÉSSICA MARIA MONTEIRO LUZ

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM
ALTAS DOSES POR MEIO DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA
DE CAMUNDONGOS.**

Trabalho de conclusão de curso para obtenção do grau de licenciado em Ciências Biológicas, apresentada à Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, na área de Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira

PICOS-PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca José Albano de Macêdo

L979a Luz, Jéssica Maria Monteiro

Avaliação citotóxica e mutagênica do ácido ascórbico em altas doses por meio do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos. / Jéssica Maria Monteiro Luz.– 2017.

CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. (32 f.)

Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2018.

Orientador(A): Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva.

Coorientador: Prof. Gilberto dos Santos Cerqueira

1. Vitamina C. 2.Câncer. 3.Ensaio Toxicológico. I. Título.

CDD 615.9

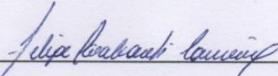
JÉSSICA MARIA MONTEIRO LUZ

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM
ALTAS DOSES POR MEIO DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA
DE CAMUNDONGOS.**

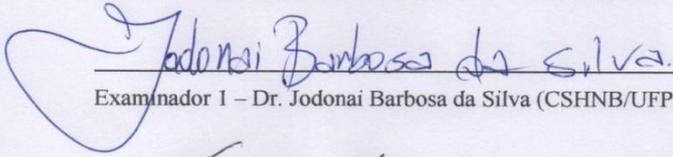
Trabalho de conclusão de curso para
obtenção do grau de licenciado em Ciências
Biológicas, apresentada à Universidade
Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio
Nunes de Barros, na área de Biológicas.

Aprovado em: 18 / 04 / 2017

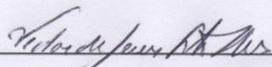
Banca Examinadora:



Presidente – Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva (CSHNB/UFPI)



Examinador 1 – Dr. Jodonai Barbosa da Silva (CSHNB/UFPI)



Examinador 2 – Dr. Victor de Jesus Meireles (CSHNB/UFPI)

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais que sempre me apoiaram
e lutaram para que eu tivesse uma boa
educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre mostrar-se presente em minha vida, pois sem seu amor nada seria. Toda fé e confiança que tive, e tenho no SENHOR, foi o que me deu forças para enfrentar as barreiras e calma nos momentos que mais precisei, pois sabia que estava sendo guiada por seu amor.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram a correr e lutar pelos meus sonhos, proporcionando os meios possíveis a nossa realidade, para que pudesse concretiza-los. E mesmo quando a realidade não favorecia, impulsionavam-se com doses de confiança, fazendo-me acreditar no aparentemente impossíveis, em possível. Obrigada pai e mãe, pelo amor, confiança e dedicação que me proporcionam sempre.

Sou grata aos meus irmãos, pela paciência e incentivo que me deram no decorrer dessa jornada acadêmica.

A todos aos meus familiares, que sempre me apoiaram e incentivaram buscar mais e mais, mesmo com toda distância.

Ao meu orientador pela paciência e auxílio no decorrer de toda a pesquisa, sendo sempre um modelo de profissional admirado e excepcional.

Agradeço a todos os meus amigos pelo apoio e atenção que me deram durante a minha vida acadêmica. Agradeço principalmente aos meus amigos de curso pelos momentos maravilhosos que passamos durante a graduação, em especial ao Augusto e Henrique por todo auxílio durante minha pesquisa, pois com a ajuda de vocês ela pôde ser concluída de modo eficiente. Também não posso esquecer da Daniela, Clarice, Michele, Janiella, Romário e Railson, pois sempre me incentivaram durante o curso.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram para da minha formação, o meu muito OBRIGADO.

“Bem sei que tudo Tu podes
e que nenhum de seus planos
podem ser frustrados” (Jó 42:2).

RESUMO

O uso intravenoso de altas doses do ácido ascórbico (vitamina C) no tratamento do câncer data de 1970, devido ao seu potencial antioxidante. Em novos estudos de farmacocinética demonstraram que a vitamina administrada via oral e intravenosa em concentrações plasmáticas de 100 μ M apresentam citotoxicidade contra tumores. Porém, alguns estudos mostraram que a vitamina C tem um potencial de reduzir a efetividade da quimioterapia em células cancerosas. Dessa forma, são necessários estudos para compreender e desvendar essa controversa sobre a atividade da vitamina C. Para isso, foi realizado uma ensaios toxicológicos para avaliar a citotóxicidade e mutagenicidade do ácido ascórbico em altas doses em conjunto, ou de modo individual com o quimioterápico 5-FU, por meio do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos. Para o teste foram utilizados 6 grupos de tratamento com (nº 5) de animais, todos provenientes do biotério da Universidade Federal do Piauí-UFPI. Os grupos de tratamentos foram CN, Vitamina C 2g e 4g, 5-FU+Vitamina C de 2g e 4g. O experimento ocorreu no laboratório de Pesquisa I do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros (CSHNB)-UFPI, em 5 dias. O primeiro dia foi administração em IP de 5-UF 450mg, só a partir do segundo dia iniciou-se as administrações dos tratamentos, que também ocorreu em IP. Foram 3 dias de tratamento. Após 24horas do ultimo dia de tratamento, os camundongos foram sacrificados e retirou-se a medula a partir do fêmur, e preparou-se lâminas. Ao analisar as lâminas a vitamina C foi citotóxica, onde na concentração de 4g associada ao 5-FU acentuou-se a citotocixidade. E não apresentou mutagênicidade. Porém, mais testes devem ser feitos, para compreender melhor a atividade da vitamina C.

Palavras-chave: Vitamina C. Câncer. Ensaio Toxicológico.

ABSTRACT

The intravenous use of high doses of ascorbic acid (vitamin C) in cancer treatment dates back to 1970 due to its antioxidant potential. In new pharmacokinetic studies demonstrated the vitamin given orally and intravenously in plasma concentrations of 100 μ M presented cytotoxicity against tumors. However, some studies reveal that vitamin C has a potential to reduce the effectiveness of chemotherapy in cancer cells. Thus, they are oriented to evaluation and evaluation of a vitamin C culture. To this end, a toxic assay was performed for an evaluation of the cytotoxicity and mutagenicity of ascorbic acid in high doses together, or in an individual way with the 5-FU chemotherapeutic, By means of the micronucleus test in bone marrow of mice. For the test of uses 6 treatment groups with (n 5) of animals, all data of the vivarium of the Federal University of Piauí-UFPI. The groups of treatments were CN, Vitamin C 2g and 4g, 5-FU + VitaminaC of 2g and 4g. The experiment available in the Research Laboratory I do Campus Senator Helvideo Nunes de Barros (CSHNB) -UFPI, in 5 days. The first day was administered in IP of 5-UF 450mg, so from the second day started as administrations of the treatments, which are also IP. There were 3 days of treatment. After 24 hours of the last day of treatment, the mice were sacrificed and the medulla was withdrawn from the femur, and slides were prepared. When analyzing as slides vitamin C was cytotoxic, where in the concentration of 4g associated with 5-FU cytotoxicity. And it did not present mutagenicity. But more tests developed, for the better of vitamin C life.

Key words: Vitamin C. Cancer. Toxicological Testing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Estrutura química do ácido ascórbico.....	16
FIGURA 2: Interação entre as hidroxilas na molécula do ácido ascórbico por ponte de hidrogênio.....	16
FIGURA 3: Reação de oxidação do ácido ascórbico a ácido deidroascórbico e de hidrólise deste último ao ácido 2,3 diceto - L – gulônico.....	17
FIGURA 4: Síntese química do ácido ascórbico a partir da glicose.	188
FIGURA 5: Fotomicrografia de eritrócito policromático micronucleado (1000x).	22

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Frequência de EPC/EPC+ENC em medula óssea de camundongos e a relação entre o número de eritrócitos policromáticos (EPC)/normocromáticos (ENC) + policromáticos (EPC).	26
TABELA 2: Frequência de micronúcleo (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea de camundongos de tratamento com vitamina C em diferentes concentrações. .	27

LISTA DE SIGLAS

AA – Ácido Ascórbico

CSHNB- Campus Senador Helvidio Nunes de Barros

CAT- Catalase

COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DRI- Dietary Reference Intake

EROs - Espécies reativas de oxigênio

EPC- Eritrócito Policromático

ENC- Eritrócito Normocromático

EPCMN- Eritrócito Policromático Micronucleado

GLUTs- Glicose Independente de Sódio

OH- Hidroxila

MN- Micronúcleo

SOD- Superóxido Dismutase

UFPI - Universidade Federal do Piauí

5-FU – Fluorouracil

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO	15
2.1. Vitaminas	15
2.2 Características do ácido ascórbico	15
2.2.1 Propriedades físico-químicas	15
2.2.2 Estrutura da molécula	16
2.2.3 Fonte e biosíntese	17
2.3 Câncer e quimioterapia	19
2.4 Utilização de AA em altas doses	19
2.5 Ensaio toxicológicos	20
2.5.1 Teste de micronúcleos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Caracterização da pesquisa	22
3.2. Local da pesquisa	23
3.3. Ensaio toxicogénico utilizados em sistema animal	23
3.3.1. Obtenção e acondicionamento dos animais	23
3.3.2. Divisão dos grupos e delineamento experimental	23
3.3.3. Retirada da medula ossea	24
3.3.4 Teste do Micronúcleo via células da medula óssea de camundongos, preparação e análise das lâminas.....	24
3.3.5. Análise estatística para os dados obtidos com animais	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5- CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico (AA) é um composto molecular orgânico vitamínico, denominado de vitamina C, responsável por hidroxilações de inúmeras reações bioquímicas nas células. As vitaminas são compostos orgânicos necessários em pequenas quantidades na alimentação, entretanto são de extrema importância para o bom funcionamento biológico de um organismo. Podemos classificar as vitaminas com base na solubilidade em hidrossolúveis, quando solúveis em água, como ácido ascórbico, ácido fólico, cobalamina, piridoxina, tiamina, niacina, riboflavina, biotina e ácido pantotênico; e lipossolúveis, quando solúveis em solventes lipídicos, que incluem as vitaminas, A, D, E e K (MACENA, 2014).

A vitamina C é facilmente encontrada na natureza, principalmente em frutas e verduras. Além disso, ela é sintetizada por vários animais, incluindo a maioria dos mamíferos. Entretanto, os seres humanos, juntamente com outros primatas são incapazes de sintetizar essa vitamina devido a uma mutação genética que altera a síntese da enzima L-gulono-1,4-Lactona oxidase, que participa da biossíntese dessa vitamina (CHATTERJEE, 1973). Portanto, os organismos que não as sintetizam devem obtê-las por meio de fontes exógenas.

Foi no século XVIII, período das grandes navegações, que ficou conhecida a importância do consumo da vitamina C, devido a sua propriedade antiescorbútica. Em 1928 Albert Szent-Gyorgy e em 1930 Glen King isolaram, independentemente, uma molécula orgânica e denominaram de vitamina C. Entretanto sua fórmula química foi determinada em 1933, em $C_6H_8O_6$ por Hirst e Haworth, que propôs juntamente com Albert Szent-Gyorgy como ácido ascórbico, por referência a suas propriedades antiescorbúticas (TEIXEIRA NETO, 2009).

A administração do ácido ascórbico por via oral é algo consagrado e bastante utilizado, já que seu efeito sistêmico é comprovado e amplamente difundido, seu combate à ação dos radicais livres responsáveis pela oxidação das células, evitam rugas, clareiam e firma a pele, previnem gripes e resfriados por agir no sistema imunológico e ajuda na absorção de ferro e cálcio pelo organismo. A vitamina C também participação da síntese das proteínas, colágeno e elastina (EDUQUIM, 2012). A deficiência desta vitamina pode levar à deformação de ossos ou outros tecidos duros do organismo (EL-SHAFEI; SALEH, 2016).

Quando o ácido ascórbico é administrado oralmente, suas concentrações plasmáticas são fortemente controladas, sendo eliminado através da urina. 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).

Os alimentos antioxidantes, ricos em ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides (vitamina A) e tocoferol (vitamina E), selênio e flavonóides, são recomendados seguindo doses preconizadas pelo Dietary Reference Intake (DRI), pois estes podem atuar na prevenção do câncer, inibindo a oxidação e a produção de radicais livres, como também favorecendo o estresse oxidativo e prevenindo até mesmo a carcinogênese (INCA, 2011).

O câncer é o nome dado a mais de 100 doenças, que tem em comum o crescimento descontrolado de células que podem invadir e se espalhar para locais distantes do corpo, gerando consequências graves para a saúde, além de ser uma das principais causas de morte a nível mundial. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2017).

Para tratamento do câncer são utilizados quimioterápicos, dos quais atuam promovendo apoptose da célula, entretanto, esses fármacos atingem todas as células gerando efeitos citotóxicos (CHEN et. al., 2016). O quimioterápico antimetabolito 5-fluorouracil (5-FU) é uma das drogas mais prescritas no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo mama, pâncreas, cabeça, pescoço e gastrointestinal (CARDANI et. al., 2014; ZHANG et. al., 2016).

Na tentativa de melhorar os efeitos adversos induzidos durante a quimioterapia, é feita a terapia nutricional com antioxidantes, como a vitamina C (ROHENKOHL; CARNIEL; COLPO, 2011). Doses intravenosas dessa vitamina 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).

A utilização da vitamina C como agente antioxidante é válida, 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).

Deste modo, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a citotóxicidade e mutagenicidade do ácido ascórbico (vitamina C) em altas doses com concentrações diferentes

de modo individual e em conjunto ao quimioterápico 5-FU, por meio do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Vitaminas

As vitaminas são um grupo de compostos orgânicos distribuídos no reino vegetal e animal que funcionam em uma grande variedade de processos dentro do organismo. A palavra vitamina é derivada da combinação das palavras: *vital* e *amina*, e foi concebida pelo químico polonês Casimir Funk, em 1912, que isolou a vitamina B1, tiamina, do arroz. Embora necessárias em pequenas quantidades na alimentação, as vitaminas são consideradas fundamentais. Quando são sintetizadas pelo organismo, chamamos de vitaminas naturais, já quando o organismo não as sintetiza, necessariamente devem ser obtidas através da alimentação (MACENA, 2014).

As vitaminas são usadas na prevenção e tratamento de carências nutricionais e terapia de doenças não relacionadas à deficiência (RUSSO; SANTANNA, 2013). Em casos de carência, exercem prevenindo ou revertendo síndromes clínicas ocasionadas pela Hipovitaminoses, que ocorre quando o organismo não tem a quantidade necessária de vitamina absorvidas. As Hipovitaminoses decorrem mais frequentemente de carências nutricionais, porém, podem derivar de problemas de absorção intestinal, transporte plasmático, armazenamento tecidual, conversão à forma ativa e depuração (FUCHS; WANNMACHER, 2010).

2.2 Características do ácido ascórbico

2.2.1 Propriedades físico-químicas

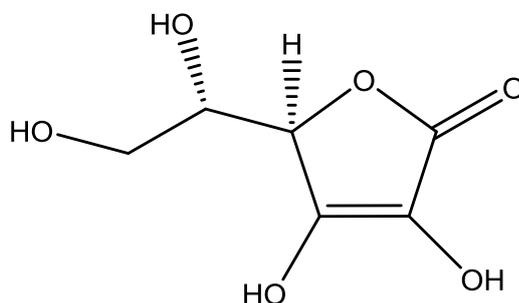
O ácido ascórbico é um sólido branco ou amarelado, cristalino com ponto de fusão de 190 a 192 °C, massa molecular 176.13 g/mol, densidade 1.65 g/cm³, bastante solúvel em água e em etanol absoluto, insolúvel nos solventes orgânicos comuns, como clorofórmio, benzeno e éter, tem sabor ácido com gosto semelhante ao suco de laranja. No estado sólido é relativamente estável. (BOBBIO, BOBBIO, 1995). A vitamina C na água é solúvel na proporção de 1 g em 3 ml. O calor, a exposição ao ar e o meio alcalino aceleram a oxidação

desta vitamina, especialmente quando o alimento está em contato com o cobre, o ferro ou enzimas oxidativas (GUILLAND; LEQUEU, 1995).

2.2.2 Estrutura da molécula

O ácido ascórbico é um composto hidrossolúvel que corresponde a uma forma oxidada da glicose que possui fórmula química $C_6H_8O_6$ (Figura 1), sendo uma alfacetolactona de seis átomos de carbono, formando um anel lactona com cinco membros e um grupo enadiol bifuncional com um grupo carbonilo adjacente (ROCHA, 2012).

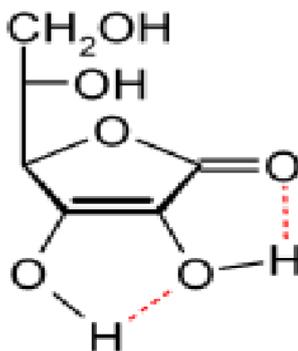
Figura 1: Estrutura química do ácido ascórbico.



Fonte: Rocha, 2012.

Sua molécula é polar com quatro hidroxilas (OH), sendo duas delas na posição C=C podem interagir entre si por pontes de hidrogênio, podendo resultar em um aumento da acidez da vitamina C, que apresenta uma boa solubilidade em água (Figura 2) (PEREIRA, 2008).

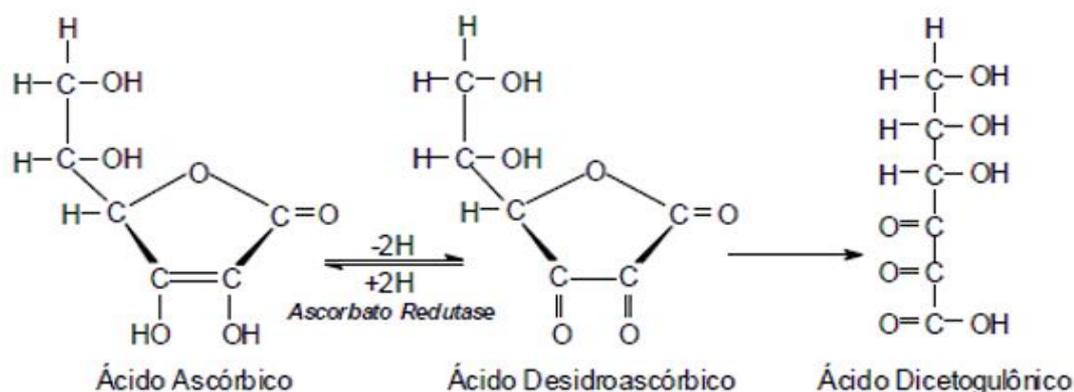
Figura 2: Interação entre as hidroxilas na molécula do ácido ascórbico por ponte de hidrogênio.



Fonte: PEREIRA, 2008.

Nas plantas são encontradas três formas do AA, uma reduzida a ácido L-ascórbico que está amplamente distribuído na natureza em altas concentrações, além de apresentar 100 % de atividade de vitamina; ácido mono-dehidroascórbico, um intermediário instável e o L-dehidroascórbico que é reversível para ácido 2,3 dicetogulônico, do qual não apresenta nenhuma atividade vitamínica (Figura 3) (TAVARES, 2003).

Figura 3: Reação de oxidação do ácido ascórbico a ácido deidroascórbico e de hidrólise deste último ao ácido 2,3 diceto - L - gulônico.



Fonte: TAVARES, 2003.

2.2.3 Fonte e biosíntese

O ácido ascórbico (AA) é um derivado de hexose sintetizado por vegetais e pela maioria dos animais, a partir da glicose e da galactose. Todas as frutas e verduras contêm alguma quantidade de ácido ascórbico. As maiores fontes de AA são as frutas como acerola, cupuaçu, goiaba, laranja, limas e limões; as hortaliças como brócolis e pimentão; e as vísceras, mas os teores reais dessa vitamina nos alimentos podem variar com as condições de crescimento e grau de maturação (ESCOTT-STUMP; KRAUSE; MAHAN, 2010).

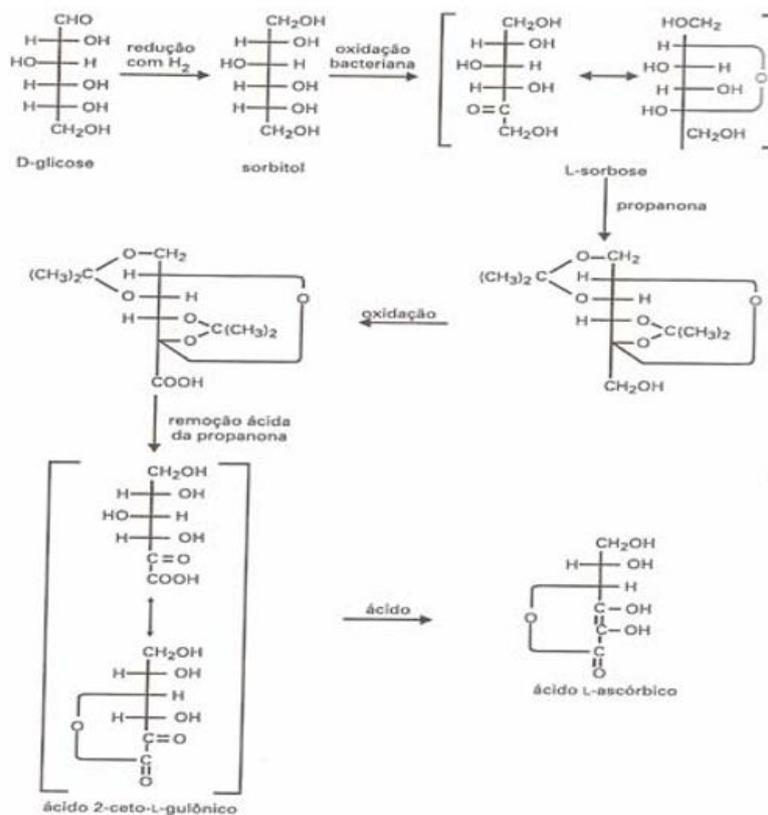
O AA (vitamina C) encontra-se na natureza sob duas formas: reduzida ou oxidada (ácido deidroascórbico); ambas são igualmente ativas, porém a forma oxidada está muito menos difundida nas substâncias naturais (WELCH, 1995). Os répteis e aves mais primitivos sintetizam o ácido ascórbico nos rins, já a maioria das aves e grande parte dos mamíferos sintetizam o ácido ascórbico no fígado, aonde a enzima L-gulonolactona oxidase converte a glicose em ácido ascórbico. O homem, outros primatas, alguns morcegos e algumas espécies de aves, entretanto, são incapazes de produzir vitamina C, devido a uma

mutação no gene que codifica a L-gulono-1,4- Lactona oxidase, a última enzima na via biossintética do ácido ascórbico (MAMEDE et. al., 2012; MAMEDE et. al., 2011).

Essa mutação genética ocorreu há aproximadamente 63 milhões de anos, da qual poderia ter proporcionado consequências letais para os primatas, caso não fossem animais vegetarianos que vivessem em um ambiente tropical, onde muitos produtos alimentícios contêm ácido ascórbico. Especula-se que estes seres vivos não possuem tal capacidade com a finalidade de aumentar as reservas de glicose, precursor do ácido ascórbico no organismo (RUSSO; SANTANNA. 2013).

Além da produção de ácido ascórbico por plantas e a maioria dos animais, ele pode ser produzido de forma sintética, idêntico ao natural. Geralmente é produzida a partir de um açúcar natural, uma dextrose (glicose, açúcar de mel, açúcar de milho). Este açúcar de fórmula química $C_6H_{12}O_6$ se converte em L-ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) por reação de oxidação onde quatro átomos de hidrogênio são removidos para formar duas moléculas de água. Existem muitas rotas diferentes para a síntese do AA, onde várias sequências de reações ocorrem durante sua síntese a partir da glicose (Figura 4) (COULTATE, 2017).

Figura 4: Síntese química do ácido ascórbico a partir da glicose.



Fonte: COULTATE, 2017.

2.3 Câncer e quimioterapia

O câncer é uma neoplasia que pode resultar da interação entre fatores genéticos e ambientais bem como por alterações químicas endógenas e infecções virais. A transformação de uma célula normal para uma célula tumoral é um processo de vários estágios que pode levar a lesões pré-cancerosas e neoplasias malignas (American Cancer Society, ACS 2017). Uma das doenças com maior mortalidade no mundo e no Brasil é o câncer. Para o biênio de 2016-2017, estão previstos mais de 600 mil novos casos de câncer no país (INCA, 2016).

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). A quimioterapia envolve o uso de substâncias citotóxicas, administrada principalmente por via sistêmica (JOHNSTON; SPENCE, 2003). O quimioterápico antimetabolito 5-fluorouracil (5-FU) é uma das drogas mais prescritas no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo mama, pâncreas, cabeça, pescoço e gastrointestinal (CARDANI et. al., 2014; ZHANG et. al., 2016).

O 5-Fluorouracil (5-FU) é um análogo da pirimidina, tendo seu uso como terapia de câncer realizado pela primeira vez em 1960. Essa droga atua inibindo de forma irreversível a enzima timidilato-sintase, que está envolvida na replicação e reparação do DNA (JONES et. al., 2015), além de incorporar os seus metabolitos tóxicos ao DNA e RNA, levando ao bloqueio do ciclo celular e apoptose (TUNG et. al., 2011).

O 5-FU tem como principais efeitos colaterais: mielossupressão, diarreia, cardiotoxicidade, dermatite, mucosites oral e intestinal, sendo esta relatada em aproximadamente 80% dos pacientes que receberam o tratamento com 5-FU, além de gerar variações na morfologia intestinal, podendo perturbar barreiras físicas e favorecer a translocação de microorganismos, aumentando a possibilidade de sepse (YASUDA et. al., 2013).

2.4 Utilização de AA em altas doses

Devido aos efeitos colaterais dos quimioterápicos, a prescrição de suplementação vitamínica com o ácido ascórbico (AA) está sendo muito usada ultimamente, principalmente por sua atividade antioxidante (SUBRAMANI et. al., 2014). O principal papel biológico do

ácido ascórbico é como agente redutor, atuando em um grande número de funções importantes. Ele serve como co-fator nas oxidações, com funções distintas, as quais promovem a incorporação de oxigênio molecular em vários substratos (KANEKO et. al., 1997). O AA tem sido relatada como sendo eficaz como um protetor contra danos oxidativos causados por vários compostos (HUY; HE; HUY, 2008)

A vitamina C pode ser absorvido por diferentes tipos de células, por meio de transportadores específicos 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).

Estudos apontam que compostos antioxidantes inibem a ação citotóxica da doxorrubicina entre 10 a 30%, devido à inibição do radical superóxido produzido pelo antineoplásico. Os antioxidantes, a exemplo das vitaminas, podem prevenir a formação ou capturar radicais livres pela ação da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase evitando reações oxidativas, e ainda podem agir sobre proteínas envolvidas no reparo de DNA ou que medeiam a ativação de vias apoptóticas (SINDHI et. al., 2013; TREMANTE et. al., 2015).

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

2.5 Ensaios toxicológicos

Os ensaios toxicológicos pré-clínicos contêm estudos para avaliação de toxicidade geral (por dose única e repetida), genotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade e toxicidade sobre a função reprodutora. O objetivo dos ensaios é avaliar a segurança através da caracterização dos efeitos tóxicos nos órgãos-alvo, da relação dose-resposta e, quando adequado, da reversibilidade de determinado efeito. A informação adquirida durante a realização destes ensaios serve para conferir a dose inicial a ser administrada, o intervalo terapêutico a utilizar durante os ensaios clínicos e os efeitos adversos que poderão surgir,

visto que cada ensaio apesar de estar confinado a determinados parâmetros encontra-se rigorosamente delineado para caracterizar os potenciais efeitos adversos que possam surgir nos ensaios clínicos (NUGENT; DUNCAN; COLAGIOVANNI, 2013).

Os testes citogenéticos capazes de detectar danos cromossômicos constituem-se em efetivas ferramentas biotecnológicas na detecção de instabilidade genética indicativa de maior probabilidade de desenvolvimento de câncer. Segundo Rabello-Gay, Rodrigues e Monteleone-Neto (1991), dentre os testes desta natureza, o Teste de Micronúcleo é um dos mais promissores. Este teste pode ser aplicado utilizando diversas linhagens celulares de diferentes organismos (HOLLAND et. al., 2008) incluindo eritrócitos de camundongos (BUTRYEE; KUPRADINUN, 2008).

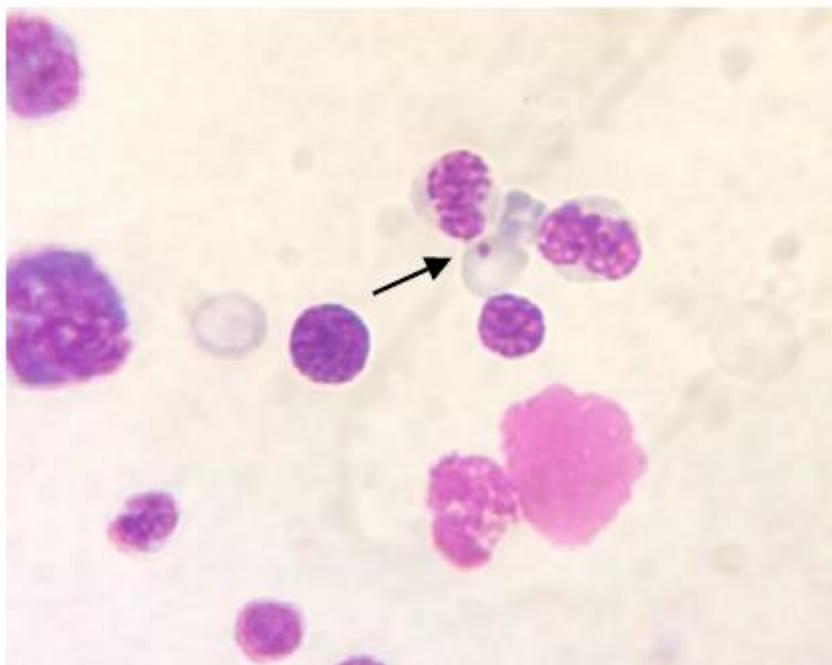
Estudos farmacocinéticos do AA em altas doses por via intravenosa em pacientes em monoterapia de tumores sólidos, com administração de 1g/L intravenosa de 4 em 4 horas durante 4 semanas, indicam ação anticâncer do AA (STEPHENSON et. al., 2013). O ácido ascórbico administrado por via intravenosa tem efeito pró-droga podendo ser oxidado e liberar o radical A^{\bullet} , catalisado por uma metaloproteína, que doa elétron para formar o radical superóxido e peróxido de hidrogênio (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012; CHEN et. al., 2010).

Entretanto, o uso clínico de antioxidantes durante a quimioterapia ainda vem sendo bastante discutido, devido às várias controvérsias sobre o seu potencial de reduzir a eficácia citotóxica de quimioterápicos tais como a ciclofosfamida e o 5-fluorouracil (TOKARSKI et. al., 2013).

2.5.1 Teste de micronúcleos

Os micronúcleos são expressos em células em divisão que contêm rupturas cromossômicas sem centrômeros (fragmentos acêntricos) e/ou cromossomos inteiros que não conseguem viajar para os polos do fuso durante a mitose (Figura 5). Deste modo, durante a telófase, um invólucro nuclear se forma ao redor dos cromossomos e fragmentos atrasados, que então se desenrolam e assumem gradualmente a morfologia de um núcleo interfásico, com a exceção de que são menores que os núcleos principais na célula, daí o termo micronúcleo. Portanto este fornece um índice conveniente e confiável de quebra de cromossomos e perda de cromossomos (SUNDARARAJAN; NATARAJAN; KANCHANA, 2017).

Figura 5: Fotomicrografia de eritrócito policromático micronucleado (1000x).



Fonte: Santos, 2015.

A marcação de MN pode ser realizada facilmente e em diferentes tipos de células relevantes para a biomonitorização humana: linfócitos, fibroblastos e células epiteliais esfoliadas, sem qualquer passo adicional de cultura *in vitro* (FENECH, 2000). Os micronúcleos (MN) são estruturas que resultam de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que se perdem na divisão celular e, assim, não são incluídos nos núcleos das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas (HEDDLE et. al., 1973). Desse modo, o MN pode ser considerado um marcador biotecnológico eficaz na avaliação de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos de agentes potencialmente genotóxicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização da pesquisa

O presente trabalho se enquadra em uma pesquisa experimental apresentando uma abordagem quantitativa. Sendo que estas são as que representam melhor uma pesquisa científica. Uma pesquisa experimental consiste em determinar um objeto de estudo, selecionar as variáveis que seriam capazes de influenciá-los, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto (GIL, 2010).

3.2 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada na estrutura física do laboratório de Nutrição experimental e de pesquisa I da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Picos-PI.

3.3 Ensaio toxicogênico utilizados em sistema animal

3.3.1 Obtenção e acondicionamento dos animais

Foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* L., linhagem Swiss, machos e fêmeas, com três meses de nascidos e com peso corpóreo entre 25-42g, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Piauí (UFPI-CSHNB). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno forradas com maravalha, em ciclo de 12/12 claro/escuro e temperatura entre 20° e 25°C, permanecendo nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. A cada dois dias as gaiolas eram lavadas e as raspas de maravalhas substituídas. A água do bebedouro era clorada, sendo administradas, junto com a ração *ad libitum*.

Os animais utilizados nesta pesquisa foram tratados conforme os princípios definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e em conformidade aos preceitos da legislação brasileira (Lei Arouca - Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí sob o número 076/15.

3.3.2 Divisão dos grupos e delineamento experimental

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 6 grupos, sendo cada grupo constituído por 5 (cinco) animais. Após a identificação dos animais por grupos foram induzidos a tratamento com o 5-FU os grupos 2, 3 e 4, no primeiro dia do experimento. Foi utilizado o modelo descrito por Carneiro-Filho et. al. (2004) e Soares et. al. (2011), de modo que os camundongos foram tratados com dose única de 5-FU (450 mg/kg i.p), capaz de produzir injúrias consistentes, como na mucosa intestinal. No segundo, terceiro e quarto dias, os animais foram tratados por grupos como descritos a seguir:

- **Grupo 1:** Controle Positivo (CP) sem indução por 5-FU, tratados com 0,2 ml de água destilada via intraperitoneal (IP).
- **Grupo 2:** Controle Negativo (CN) com indução por 5-FU, tratados com 0,2 de água destilada via intraperitoneal (IP).
- **Grupo 3:** Induzido com 5-FU, tratados com 4g/Kg de vitamina C via intraperitoneal (IP).
- **Grupo 4:** Induzido com 5-FU, tratados com 2g/Kg de vitamina C via intraperitoneal (IP).
- **Grupo 5:** Sem indução com 5-FU, tratados com 4g/Kg de vitamina C via intraperitoneal (IP).
- **Grupo 6:** Sem indução com 5-FU, tratados com 2g/Kg de vitamina C via intraperitoneal (IP).

Ao finalizar os tratamentos no quarto dia, 24 horas depois, os animais foram sacrificados para a coleta da medula óssea dos animais a partir do fêmur.

3.3.3 Retirada da medula óssea

Os animais foram eutanasiados por descolamento cervical, e com a utilização de pinças foram dissecados com objetivo de retirar o fêmur. Após retirar o fêmur, suas extremidades foram retiradas por meio de um corte, para assim facilitar a exposição da medula óssea. Através dos cortes nas extremidades do fêmur, a medula óssea foi lavada sucessivas vezes e de modo suave com meio de cultura RPMI 1640 (1:1) (Gibco ®, EUA) com uma seringa de 1ml. Após a retirada da medula óssea, foi homogeneizada com o meio, em uma centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. Foi realizado o esfregaço das células da medula óssea em lâminas de vidro e codificadas para análise cega, secas ao ar e fixadas com metanol absoluto durante 5 minutos. A coração foi com o leishman, após 24 horas do procedimento.

3.3.4 Teste do Micronúcleo via células da medula óssea de camundongos, preparação e análise das lâminas.

O teste de micronúcleos (MN) utilizando em medula óssea foi realizado de acordo com metodologia descrita previamente por Krishna e Hayashi, 2000. Para a determinação da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em medula óssea, o que caracteriza o efeito mutagênico da substância, foram observados 1000 eritrócitos

policromáticos (EPC) por animal em cada amostra de medula, totalizando 5000 células por tratamento. Para determinar a citotoxicidade da vitamina C, foi estabelecida a relação entre o número de eritrócitos policromáticos (EPC)/normocromáticos (ENC) em 500 células em amostras de medula óssea por animal, totalizando 2500 células por tratamento. Para amostras da medula óssea foi contabilizado por animal, 1500 células por tratamento. A relação de citotoxicidade para a medula óssea foi calculado por $(EPC/PCE+ENC)$. Para ambas as análises utilizou-se microscópio óptico com objetiva de aumento de 100x.

3.3.5 Análise estatística para os dados obtidos com animais

Os dados obtidos neste trabalho por meio do ensaio em camundongos *Mus musculus* foram avaliados pelo método estatístico ANOVA seguido do pós teste de Tukey, através do programa computacional Graph Prism 6.0, e o $p < 0.05$ foi utilizado como valor de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de micronúcleo *in vivo* utilizando roedores tem sido amplamente utilizado para detectar genotoxicidade. Dentre os diversos testes de genotoxicidade esse teste é recomendado por órgãos reguladores em todo o mundo como importante etapa da avaliação de segurança de produtos (GUIDELINE, 1997). A marcação de micronúcleo pode ser realizada em diferentes tipos de células para o biomonitoramento humano e em roedores, como linfócitos, fibroblastos e células epiteliais esfoliadas, sem qualquer passo adicional de cultura *in vitro* (FENECH, 2000). Avaliar o potencial genotóxico de novas drogas é de fundamental importância, visto que agentes com este potencial podem induzir danos ao material genético direta ou indiretamente por diversos mecanismos, podendo se tornar agente carcinogênico e/ou provocar mutações hereditárias (GUIDELINE, 1997).

Deste modo, com as análises, obteve-se a frequência de EPCMN e a relação $EPC/EPC+ENC$ de amostras obtidas da medula óssea dos camundongos tratados com vitamina C em concentrações diferentes, levando-se em consideração que a genotoxicidade é indicada pelo aumento significativo na frequência de micronúcleos, enquanto a citotoxicidade é indicada pela redução significativa de EPC. Em ambas as análise foram levados em consideração os resultados com valores significativos.

Tabela 1: Frequência de EPC/EPC+ENC em medula óssea de camundongos e a relação entre o número de eritrócitos policromáticos (EPC)/normocromáticos (ENC) + policromáticos (EPC).

EPC/ENC+EPC	CP	2g/Kg VitC	4g/Kg VitC	CN	5-FU + 2g/Kg VitC	5-FU + 4g/Kg VitC
Animal 1	0,94	0,55	0,78	0,56	0,69	0,34
Animal 2	0,91	0,78	0,82	0,52	0,8	0,57
Animal 3	0,88	0,73	0,74	0,7	0,65	0,6
Animal 4	0,9	0,76	0,8	0,34	0,8	0,71
Animal 5	0,86	0,69	0,77	0,52	0,8	0,33
Média	0,898	0,702	0,782*	0,528*	0,748	0,51*

CN – Controle negativo; * médias diferem do CN para $p < 0,05$ utilizando o teste de One-way ANOVA seguido de Tukey.

Observou-se que quem obteve valores significativos para citotoxicidade foram os grupos dos tratamentos 4g/kg VitC, CN e 5-FU+ 4g/Kg VitC. No grupo tratado com 2g/Kg de Vitamina C, não apresentou valores significativos para toxicidade, enquanto que na concentração de 4g/Kg foi tão toxica quanto no grupo tratado apenas com 5-FU (CN). O grupo CN apresentou toxicidade, confirmando os estudos de Matsumoto et al. (2015) que demonstrou o efeito citotóxico *in vitro* de 5-FU em diferentes linhagens de células cancerosas.

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 (ZAHNG et. al., 2008). Além disso, foi observado que altas doses de vitamina C nas concentrações de 2g/Kg e 4g/Kg, quando associadas ao 5-FU, acentuaram mais ainda citotoxicidade. Portanto, percebe-se que as altas doses de vitamina C foram pró-oxidativas, ao invés de atuarem como um agente antioxidante, interferindo na ação do quimioterápico.

Tabela 2: Frequência de micronúcleo (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea de camundongos de tratamento com vitamina C em diferentes concentrações.

MN	CP	2g/Kg VitC	4g/Kg VitC	CN	5-FU + 2g/Kg VitC	5-FU + 4g/Kg VitC
Animal 1	0,029	0,044	0,02	0,005	0,03	0,01
Animal 2	0,014	0,03	0,032	0,017	0,023	0,008
Animal 3	0,017	0,023	0,03	0,01	0,021	0,016
Animal 4	0,007	0,025	0,018	0,014	0,023	0,018
Animal 5	0,01	0,021	0,014	0,02	0,023	0,016
Média	0,0154	0,0266 ^{NS}	0,0228 ^{NS}	0,0132 ^{NS}	0,024 ^{NS}	0,0136 ^{NS}

CN – Controle negativo; * médias diferem do CN para $p < 0,05$ utilizando o teste de RM-MANOVA seguido de Tukey.

Na análise de genotoxicidade, a vitamina C, nas duas concentrações estudadas não apresentaram formação de micronúcleo de modo significativo. Esses resultados apontam que a vitamina C nas concentrações estudadas, aparentemente não foram mutagênicas, podendo ser verificado pela baixa formação de micronúcleos nos eritrócitos de medula óssea de camundongos. Deste modo, visto que a formação de MN pode estar associada ao surgimento de neoplasias, dados preliminares mostraram que o tratamento com doses terapêuticas estudadas de vitamina C podem ser seguras em relação à formação de tumores derivados do tratamento.

5 CONCLUSÃO

Deste modo, a partir do bioensio de medula óssea em camundongos, determinou-se que a vitamina C, principalmente na concentração de 4g/Kg, apresentou citotoxicidade, porém não foi mutagênica, o que garante a segurança do seu uso associado aos quimioterápicos. Entretanto, estudos de interação desse composto devem ser avaliados em outros testes e em outras concentrações, para uma melhor compreensão dos riscos e benefícios de doses farmacológicas do ácido ascórbico, visando à eficácia e qualidade de vida de pacientes em terapias oncológicas.

Além disso, estão em andamento, estudos de análise da mucosite induzida pelo 5-Fluorouracil e do papel da vitamina C na redução desse processo que é um dos principais efeitos colaterais do tratamento quimioterápico com o 5-FU.

REFERÊNCIAS

- AZZOLINI M; JACOMINO AP; BRON IU. **Índices para avaliar a qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estádios de maturação.** Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília. V.39, n.2, p 139-145, 2013.
- BOBBIO, F. O. BOBBIO, P. A. **Introdução a química de alimentos.** 2.ed. São Paulo: Varela, 1995. 223p.
- BUTRYEE C., KUPRADINUN P. **Antioxidant capacity of Citrus hystrix leaf using in vitro methods and their anticlastogenic potential using the erythrocyte micronucleus assay in the mouse.** Toxicology Letters, 180: S79, 2008.
- BLOCK, KI; KOCH, A.C.; MEAD, M.N.; TOTHY, P.K.; NEWMAN, R.A.; GYLLENHAAL, C. **Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials.** Cancer Treatment Review, v. 33, n. 1, p. 407-418, 2007.
- CAMERON, E.; PAULING, L.; LEIBOVITZ, B. **Ascorbic acid and cancer: a review.** Cancer Research, v. 39, p. 663-669, 1976.
- CARNEIRO-FILHO, B. A.; LIMA, L. P. F.; ARAÚJO, D. H.; CAVALCANTE, M. C.; CARVALHO, G. H. P.; BRITO, G. A. C.; LIMA, V.; MONTEIRO, S. M. N.; SANTOS, F. N.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. **Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis.** Digest. Dis. Sci., v. 49(1), p. 65-72, 2004.
- CARDANI, D., SARDI, C., LA FERLA, B., D'ORAZIO, G., SOMMARIVA, M., MARCUCCI, F., OLIVERO, D., TAGLIABUE, E., KOEPEL, H., NICOTRA, F., BALSARI, A., RUMIO, C. **Sodium glucose cotransporter 1 ligand BLF501 as a novel tool for management of gastrointestinal mucositis.** Molecular cancer, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.
- CHATTERJEE, I. B. **Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid.** Science, v. 182, n. 4118, p. 1271-1272, 1973.
- COULTATE, T.P. **Alimentos: A química de seus componentes.** 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 368p. ÁCIDO ASCÓRBICO Disponível em <<http://www.acidoascorbico.com/>> Acesso em 13.05.2017.
- 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.
- CHEN, Q.; ESPEY, M.G.; SUN, A.Y.; POOPUT, C.; Kirk, K.L.; KRISHNA, M.C. **Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice.** Proceedings of the National Academy of Science USA, v. 105, n. 32, p. 11105-11109, 2010.

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.

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

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

EDUQUIM: **Núcleo de Educação em Química.** 2012. Disponível em: <http://www.eduquim.ufpr.br/>. Acesso em: 14 maio de 2017.

ESCOTT_STUMP, S.; KRAUSE.; MAHAN, L.K.; **Alimentos, nutrição e dietoterapia** [tradução Natalia Rodrigues Pereira...et al.]. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010; p. 95-96 e 100.

EL-SHAFEI RM; SALEH RM. **Pharmacological effects of Vitamin C & E on Diclofenac Sodium intoxicated Rats.** Biomedicine & Pharmacotherapy 84 (2016) 314–322
FENECH, M. **The in vitro micronucleus technique.** Mutation Research, v. 455, p. 81–95, 2000.

FUCHS F. D.; WANNMACHER; L. **Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional.** 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa.** 4 ed. São Paulo: Atlas, 2010. 176p.

GUIDELINE, ICH. **ICH2B: Genotoxicity: A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals,** 1997.

GUILLAND JC, LEQUEU B. **As vitaminas do nutriente ao medicamento.** São Paulo: Santos, 1995; 375.

HEDDLE, J.A. (1973). **A rapid in vivo test for chromosomal damage.** Mutation. Res. 18: 187-190.

HOLLAND, N., BOLOGNESI, C., KIRSCH-VOLDERS, M., BAONASSI, S, ZEIGER, E., KNASMUELLER, S. and FENECH, M. (2008) **The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project prospective on current status and knowledge gaps.** *Mutat. Res.*, **659**, 93-108.

HUY LA; HE H; HUY CP. **Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health.** Biomed Sci, vol. 4, no. 2, 2008.

INCA. **Câncer: O que é Câncer?** Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acesso em: 10 maio 2017.

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

INCA. Instituto Nacional de Câncer. José Carlos Gomes da Silva. **Estimativa 2016, incidência de câncer no Brasil, dia nacional de combate ao câncer**. [acesso em 2017]. Disponível: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>.

JOHNSTON PG, SPENCE RAJ. **Oncologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

JONES, C. D., GUIOT, L., MIKE, S., GORMAN, M., TEHRANI, H. **The use of chemotherapeutics for the treatment of keloid scars**. *Dermatology reports*, v. 7, n. 2, 2015.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 907 p. Cap. 24: The vitamins.

KRISHNA G, HAYASHI M. “In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation,” *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 455, no. 1, pp. 155-166, 2000.

MACENA, P. T. Vitaminas. Dossiê Vitaminas. **Food ingredientes Brasil**. Nº 29, 2014.

MATSUMOTO Y; RODRIGUEZ V; WHITFORD TA; BEEHARRY N; HIROSHI I and TOMKINSON AE. **Synergistic enhancement of 5-fluorouracil cytotoxicity by deoxyuridine analogs in cancer cells**. *Oncoscience*, Vol.2, No.3, 2015.

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

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

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

NUGENT, P., DUNCAN, J.N., COLAGIOVANNI, D. B. **The Preparation of a Preclinical Dossier to Support an Investigational New Drug (IND) Application and First-in-Human**, 2013.

PEREIRA, Vinicius Rodrigues. **Ácido Ascórbico**-características, mecanismos de ação e aplicações na indústria de alimentos. Pelotas, 2008.

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

PRASAD, K.N.; KUMAR A. **High doses of multiple antioxidant vitamins: essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy.** Journal of American College of Nutrition, v. 18, n. 4, p.13-25, 1999.

RABELLO-GAY, M. N; RODRIGUES, M. A. L. R.; MAONTELEONE, N. R. (1991), **Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação.** Sociedade Brasileira de Genética, São Paulo.

ROCHA, Marcele de Moraes. **Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes: Ácido ascórbico (Vitamina C).** Ilsi Brasil International Life Sciences Institute Do Brasil, São Paulo. 2012.

ROHENKOHL CC; CARNIEL AP; COLPO E. **Consumo de antioxidantes durante tratamento quimioterápico.** ABCD, arquivos brasileiros de cirurgia digestiva. vol.24, no.2. São Paulo, 2011.

RUSSO, A.; SANT'ANNA, M. **Uso racional da Vitamina C (Ácido Ascórbico).** Cebrim Informa, 2013.

SANTOS, Valdir T. de F. **Frequencia de micronúcleos em tambaquins de pisciculturas no município Médici-RO: Influencia de agrotóxicos.** 51f. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Pesca)- Fundação Universidade Federal de Rondônia, Presidente médici, 2015.

SINDHI V; GUPTA V; SHARMA K; BHATNAGAR S; KUMARI R; DHAKA N. **Potencial applications of antioxidants- A review.** Journal of Pharmacy Research. V.7, n.9, p. 828-835, 2013.

SOARES AF, Aquino AR, CARVALHO CH, Nonaka CF, ALMEIDA D, PINTO, LP. **Frequency of oral mucositis and microbiological analysis in children with acute lymphoblastic leukemia treated with 0.12% chlorhexidine gluconate.** Braz Dent J. 2011;22(4):312-6.

SNYDER, C.H. **The extraordinary chemistry of ordinary things.** 2ª ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1995. p. 492-493; 503-506 e 507-509.

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

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

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

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.

TAVARES, J. et al. **Estabilidade do ácido ascórbico em polpa de acerola submetida a diferentes tratamentos**. Magistra on line da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, v.15, n.2, jul./dez. 2003.

TEIXEIRA NETO, F.; **Nutrição clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009; p. 76, 128-129 e 288.

TOKARSKI, S.; RUTKOWSKI, M.; GODALA, M.; MEJER, A.; KOWALSKI, J. [**The impact of ascorbic acid on the concentrations of antioxidative vitamins in the plasma of patients with non-small cell lung cancer undergoing first-line chemotherapy**]. *Polski merkuriusz lekarski*, v. 35, n. 207, p. 136-140, 2013.

TUNG, D., CHEUNG, P. H., TUDOR, G., BOOTH, C., SAHA, S. **In vivo effects of immunomodulators in a murine model of fluorouracil-induced mucositis**. *Current Therapeutic Research*, v. 72, n. 6, p. 262-272, 2011.

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

WELCH RW, WANG YA, CROSSMAN JB Jr, PARK KL, Kirk and M, Levine. **Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms**. *J Biol Chem*, 1995;

YASUDA, M., KATO, S., YAMANAKA, N., IIMORI, M., MATSUMOTO, K., UTSUMI, D., TAKEUCHI, K., KYTAHARA, Y., AMAGASE, K., HORIE, S., TAKEUSHI, K. **5-HT3 receptor antagonists ameliorate 5- fluorouracil- induced intestinal mucositis by suppression of apoptosis in murine intestinal crypt cells**. *British journal of pharmacology*, v. 168, n. 6, p. 1388-1400, 2013.

ZHANG, Y. P.; CHU, R. X.; LIU, H. **Vitamin a intake and risk of melanoma: A meta-analysis**. *PloS one*, v. 9, n. 7, p. e102527, 2008.



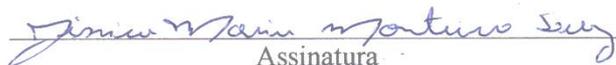
**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA
“JOSÉ ALBANO DE MACEDO”**

Identificação do Tipo de Documento

- () Tese
() Dissertação
(X) Monografia
() Artigo

Eu, **JÉSSICA MARIA MONTEIRO LUZ**, autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de 02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar, gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação **AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM ALTAS DOSES POR MEIO DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**, de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI 26 de Janeiro de 2018.


Assinatura