

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

**Impacto da suplementação de Vitamina C sobre níveis de peroxidação
lipídica e glutationa reduzida em tecido hepático de camundongos com
imunossupressão induzida por ciclofosfamida**

Évelyn de Sousa Araújo

Pelotas, 2015

ÉVELYN DE SOUSA ARAÚJO

**Impacto da suplementação de Vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica
e glutationa reduzida em tecido hepático de camundongos com
imunossupressão induzida por ciclofosfamida**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Nutrição e
Alimentos da Faculdade de Nutrição
da Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Nutrição e
Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dra. Renata Torres Abib
Co-orientadores: Prof^o Dr. Augusto Schneider
Prof^a Dra. Simone Pieniz

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A663i Araújo, Evelyn de Sousa

Impacto da suplementação de vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutatona reduzida em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida / Evelyn de Sousa Araújo ; Renata Torres Abib, orientadora ; Simone Pieniz, Augusto Schneider, coorientadores. — Pelotas, 2015.

48 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Quimioterápico. 2. ácido ascórbico. 3. Estresse oxidativo. 4. Antioxidante. 5. Atividade imunossupressora. I. Abib, Renata Torres, orient. II. Pieniz, Simone, coorient. III. Schneider, Augusto, coorient. IV. Título.

CDD : 641.1

Elaborada por Aline Herbstrith Batista CRB: 10/1737

ÉVELYN DE SOUSA ARAÚJO

Impacto da suplementação de Vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutationa reduzida em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa:14 de dezembro de 2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Renata Torres Abib. (Orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS.

Prof. Dr Lúcia Rota Borges.
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas/UFPel.

Prof. Dr Carla PohlSehn.
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas/UFPel.

Prof. Dr Carlos Castilho Barros.(suplente)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil.

Agradecimentos

À minha família e amigos pelo apoio e carinho.

À minha amiga e orientadora Prof.^a Dra. Renata Torres Abib, por todos os ensinamentos, oportunidades e confiança, assim como aos meus coorientadores Augusto Schneider e Simone Pieniz pelo apoio e ensinamentos;

Às mestrandas e amigas Aline Longo, Tatiana Saccon, pela ajuda e apoio e por todos os momentos que compartilhamos juntas.

À minha querida amiga e companheira de experimento Rosane Scussel Garcia, parte essencial para realização deste trabalho;

À minha amiga e aluna Betina Dambrós meu agradecimento pela ajuda em toda a parte experimental;

Aos componentes da banca examinadora, por sua cordialidade e contribuições favorecendo o enriquecimento desta pesquisa.

Resumo

ARAÚJO, Evelyn de Sousa. **Impacto da suplementação de Vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutationa reduzida em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida.**2015. 49f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos)-Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A ciclofosfamida é muito utilizada no tratamento do câncer e como imunossupressor em transplantes. Este quimioterápico induz ao dano oxidativo pelo aumento de espécies reativas de oxigênio. A vitamina C é um nutriente de fundamental importância para o organismo, pois apresenta atividade antioxidante. O presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos da vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutationa reduzida em tecido hepático de camundongos imunossuprimidos por ciclofosfamida. O estudo foi realizado em camundongos Swiss, fêmeas, 45 dias de idade. Os animais foram divididos em quatro grupos com oito animais cada. Grupos: grupo controle, grupo vitamina C, grupo ciclofosfamida e grupo tratamento (vitamina C e ciclofosfamida). O tratamento teve duração de seis dias, sendo no sétimo a eutanásia dos animais. As análises bioquímicas de peroxidação lipídica e glutationa reduzida foram realizadas em tecido hepático. A ciclofosfamida causou aumento significativo ($p <0,0001$) nos níveis de peroxidação lipídica. Não foram observadas alterações significativas nos grupos tratados com vitamina C e não houve interação entre a vitamina C e ciclofosfamida. A ciclofosfamida não alterou níveis de glutationa reduzida. A vitamina C causou a redução do nível de glutationa reduzida em relação ao controle, tanto nos animais que receberam ciclofosfamida quanto no controle e houve interação entre Vitamina C e ciclofosfamida, ou seja, o quimioterápico intensificou a diminuição da glutationa reduzida provocada pela Vitamina C. A ciclofosfamida na dose e período utilizado foi capaz de induzir ao dano oxidativo verificado pelo aumento da peroxidação lipídica. A vitamina C na dose de 50 mg/kg de peso não apresentou potencial para proteger contra o dano oxidativo provocado pelo quimioterápico.

Palavras chaves:quimioterápico, ácido ascórbico, estresse Oxidativo, antioxidante e atividade imunossupressora.

Abstract

ARAÚJO, Evelyn de Souza. **Impact of Vitamin C supplementation on levels of lipid peroxidation and reduced glutathione in the liver tissue of mice with cyclophosphamide-induced immunosuppression.** 2015. 49f. Dissertation (Master of Nutrition and Food)-Program of Graduate for Nutrition and Food. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2015.

Cyclophosphamide is widely used in cancer treatment and as an immunosuppressant in transplant. This chemotherapy induces oxidative damage by increasing reactive oxygen species. Vitamin C is an essential nutrient important for the body because it has antioxidant activity. The present study aims to investigate the effects of vitamin C on levels of lipid peroxidation and reduced glutathione in liver tissue of mice immunosuppressed by cyclophosphamide. The study was performed in Swiss mice, female, 45 days old. The animals were divided into four groups of eight animals each. Groups: control group, vitamin C, cyclophosphamide group and treatment group (vitamin C and cyclophosphamide). The treatment lasted six days and on the seventh euthanasia of animals. The biochemical analysis of lipid peroxidation, and reduced glutathione were performed in liver tissue. The cyclophosphamide caused a significant increase ($p <0.0001$) in the levels of lipid peroxidation. No significant changes were observed in the groups treated with vitamin C and there was no interaction between vitamin C and cyclophosphamide. The cyclophosphamide did not alter levels of reduced glutathione. Vitamin C has reduced the level of reduced glutathione in the control, both in animals which received cyclophosphamide as the control and was no interaction between vitamin C and cyclophosphamide, or intensified chemotherapy the decrease of reduced glutathione caused by Vitamin C. The cyclophosphamide at a dose and time period used was able to induce oxidative damage verified by increased lipid peroxidation. The vitamin C in a dose of 50 mg / kg showed no potential to protect against oxidative damage caused by chemotherapy.

Key words: chemotherapy, ascorbic acid, oxidative stress, antioxidant and immunosuppressive activity.

Lista de Figuras

Projeto

Figura 1	Delineamento experimental	19
-----------------	---------------------------	----

Artigo

Figura 1	Lipoperoxidação hepática em camundongos Swiss	46
Figura 2	Níveis de GSH em tecido hepático de camundongos Swiss	47

Lista de Tabelas

Projeto de Pesquisa

Tabela 1 Plano de trabalho e cronograma de projeto 23

Tabela 2 Orçamento 24

Lista de abreviaturas e siglas

CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CLF	Ciclofosfamida
CT	Controle
DTNB	5,5-Ditiobis 2-Nitrobenzoato
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutatona reduzida
i.p.	Intraperitoneal
MDA	Malonaldeído
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TFK	Tampão Fosfato de Potássio
TRAT	Tratamento
UFPel	Universidade Federal de Pelotas
VIT C	Vitamina C

Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
PROJETO DE PERQUISA	11
RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO	29
ARTIGO	33
Anexos	48

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



Projeto de Dissertação de Mestrado

Avaliação do impacto da suplementação de Vitamina C sobre parâmetros de estresse oxidativo em camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida

Mestranda: Evelyn de Sousa Araújo.

Orientadora: Renata Torres Abib.

Co-orientadores: Augusto Schneider,
Simone Pieniz

Qualificado dia 11/06/ 2015.

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal processo nº 23110,002415/2015-61/CEEA 2415/2015).

Pelotas, 2015.

Sumário

1. Introdução	12
1.1 Ciclofosfamida	12
1.2 Estresses Oxidativo	12
1.3 Vitamina C	14
2. Objetivos	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. Metodologia	18
3.1 Delineamento experimental	18
3.2 Análise do estresse oxidativo em tecido hepático	18
3.2.1 Determinação de Superóxido Dismutase (SOD)	20
3.2.2 Determinação da Catalase (CAT)	21
3.2.3 Determinação da Glutationa Reduzida (GSH)	21
3.2.4 Peroxidação lipídica (TBARS)	22
4. Análise estatística	22
5. Resultados e Impactos esperados	22
6. Plano de trabalho e cronograma do Projeto	23
7. Orçamento	24
8. Aspectos Éticos	25
9. Referências	26

1. Introdução

1.1 Ciclofosfamida

Quimioterápicos provocam diminuição na celularidade de forma inespecífica, interagindo em células com alto índice mitótico, com propriedades inibitórias sobre as respostas imunes humorais e celulares (Whirl-Carrillo *et al.*, 2012). Essa interação pode promover sintomatologia variada ao paciente, desde sintomas gastrointestinais, a alterações imunológicas como a imunossupressão (KoutrasAkFau - Kalofonos e Kalofonos, 2008; Fonseca D.A.F, 2009).

A ciclofosfamida (CLF) é um exemplo de quimioterápico com atividade imunossupressora, uma vez que interfere com a proliferação e a diferenciação de células da medula óssea (Hong *et al.*, 1992; Heyland *et al.*, 2006). Estas alterações na medula estão associadas a uma acentuada leucopenia e neutropenia levando ao aumento da suscetibilidade a infecções oportunistas, reações gastrointestinais, cistite hemorrágica, esterilidade, bem como malformações congênitas e alopecia, que prejudicam o seu desfecho clínico (Abraham *et al.*, 2011).

A CLF é metabolicamente ativada através de microssomas hepáticos formando dois metabolitos ativos, a fosforamida mostarda e a acroleína. O último é responsável pelos efeitos tóxicos, uma vez que induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Kern JC & Kehrer JP 2002). Esse quimioterápico tem sido usado na experimentação animal como modelo de indução de estresse oxidativo e imunossupressão (Zuluaga *et al.*, 2006). Após sua metabolização, os efeitos citotóxicos da CLF são devido a sua capacidade de ligar-se a cadeias de DNA e efetuar ligações cruzadas (Whirl-Carrillo *et al.*, 2012; Abraham *et al.*, 2011; Kern JC & Kehrer JP 2002; Emadi *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2012; Tripathi e Jena, 2009; Oboh *et al.*, 2011).

1.2 Estresse Oxidativo

A produção contínua de ERO durante os processos metabólicos leva às células a desenvolverem mecanismos de defesa antioxidantes, que controlam os níveis de espécies reativas produzidas e impedem a indução de danos oxidativos.

O organismo possui defesas antioxidantes enzimáticas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPX), além de um

importante antioxidante não enzimático, como o tripeptídio glutationa reduzida (GSH) (Suhail *et al.*, 2012). Além disso, é possível prevenir esse desequilíbrio entre as moléculas antioxidantes e pró-oxidantes através da dieta, ofertando-se nutrientes com alto poder antioxidante, como a vitamina A, C e E e polifenóis (Suhail *et al.*, 2012; Halliwell & Gutteridge 2007).

A SOD constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de ERO, catalisando a dismutação do ânion superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). Já a enzima catalase catalisa a degradação do H_2O_2 , a catálise do H_2O_2 é importante, pois, na presença do íonferro (Fe^{2+}), leva à formação de radical hidroxila (HO), altamente reativo e danoso às biomoléculas (Halliwell & Gutteridge 2007).

O organismo possui também como mecanismo de defesa a GSH, principal antioxidante endógeno não enzimático. Trata-se de um tripeptídio contendo cisteína que representa o tiol não-proteíco mais abundante nas células. Este antioxidante é primeiramente sintetizado no fígado e transportados posteriormente para os tecidos (Wu G *et al.*, 2004).

El-Sheikh e Rifaai 2014, em estudo sobre a hepatotoxicidade induzida pela CLF e seus mecanismos fisiológicos envolvidos, verificaram diminuição da atividade enzimática antioxidante da SOD, CAT, GPX, e Glutationa-S-transferase (GST), bem como a alteração dos marcadores de estresse oxidativo como aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), com diminuição da GSH e aumento do nível de citocinas pró-inflamatórias, indicando de maneira geral um estado pró-oxidante após o tratamento com CLF.

Em função de o tecido hepático ser responsável por metabolizar a CLF e também alvo da sua toxicidade, a busca por substâncias que minimizem esse efeito colateral torna-se importante (Dollery C., 1999; Capel Id Fau – Jenner *et al.*, 1979).

A imunossupressão causada pela CLF deixa o paciente exposto as mais diversas formas de contaminação. Entre elas a de origem alimentar, sendo orientado a consumir uma dieta branca, a qual é composta por alimentos abrandados pela cocção, não sendo permitido o consumo de frutas, legumes e vegetais na forma *in natura* por serem considerados veículos de patógenos (Fox e Freifeld, 2012).

Esse tipo de dieta compromete a ingestão de vitaminas hidrossolúveis como, por exemplo, a vitamina C. Essa vitamina é de fundamental importância para o

organismo, pois participa de uma variedade de reações enzimáticas, como cofator na síntese de dopamina e noradrenalina, biossíntese de colágeno, carnitina, prevenção da anemia ferropriva, metabolismo do colesterol, na atividade da hemoproteínacitocromo P450, síntese de neurotransmissores. Atua ainda como potente antioxidante no fluido extracelular, protegendo o organismo de ERO e também os lipídeos plasmáticos dos danos causados pelos radicais peróxidos na peroxidação lipídica (Douglas, 2002; Huang *et al.*, 2001; Lee, 2009; Levine, 1986; CozzolinoC., 2013).

1.3 Vitamina C

A vitamina C também recebe as denominações de L-ácido ascórbico, ascorbato e vitamina antiescorbútica. O ascorbato é a forma reduzida da vitamina C, a qual existe fisiologicamente na forma oxidada, o ácido deidroascórbico (Levine *et al.*, 1996; Lee, 2009).

Na maioria dos animais é sintetizada no fígado e no rim a partir de D-glicose ou D-galactose, sendo posteriormente transportada para os tecidos através da circulação (Levine *et al.*, 1996; Nishikimi e Yagi, 1996). Os seres humanos não são capazes de sintetizar o ascorbato, devido à inativação do gene que codifica a enzima L-gulonolactona oxidase, necessitando ingeri-la através da dieta (Lane e Richardson, 2014). Estudos mostram que a vitamina C possui dupla ação em processos oxidativos, podendo atuar como antioxidante ou pró-oxidante, neste caso, a maioria dos resultados foi observada em modelos de experimentação *in vitro* (Lee, 2009).

Estudo sobre suplementação de vitamina C e estresse oxidativo em ratos *Wistar* sob treinamento físico crônico, demonstrou que doses diárias de vitamina C (20 mg/kg) após treino não mostrou significativa mudanças nos níveis de TBARS. Em contraste, os ratos suplementados com vitamina C durante o período de treinamento mostraram significativamente elevados níveis de TBARS cerebrais (Suhail *et al.*, 2012).

A vitamina C como antioxidante não enzimático atua em três mecanismos de defesa orgânica contra ERO. Desempenha função protetora contra a formação das substâncias agressoras, função interceptadora ou primária uma vez que reage com o oxigênio antes do início do processo oxidativo e função reparadora, pois participa

do sistema de regeneração da vitamina E, sendo, portanto, de fundamental importância para manter a homeostase (Lykkesfeldt, 2014).

Estudo sobre efeito da vitamina C no estresse oxidativo sobre a nefrotoxicidade em ratos, demonstrou que a vitamina C pode controlar a regulação de ERO formado durante o processo (Moreira *et al.*, 2014).

Como descrito acima à vitamina tem uma importante participação no mecanismo de defesa, tornando-se indispensável para manter a homeostase do organismo.

Atualmente existe grande interesse na pesquisa de compostos naturais e nutrientes que possam minimizar a toxicidade de quimioterápicos auxiliando no controle dos efeitos colaterais. Desta forma a suplementação de vitamina C concomitante ao tratamento quimioterápico com CLF, pode desempenhar um papel protetor na imunossupressão induzida pelo fármaco (Barbosa e Kalaaji, 2014; Pohanka *et al.*, 2012).

Apesar da produção endógena de vitamina C por modelos animais, sua suplementação dentro do limite diário recomendado, pode propiciar um estado redox favorável, minimizando os efeitos danosos causados pelo excesso de ERO induzidos pela CLF em tecidos saudáveis (Pohanka *et al.*, 2012; Campbell e Dachs, 2014).

Tendo em vista que o fígado é o órgão responsável por metabolizar a CLF e pela produção endógena da vitamina C, torna-se órgão de eleição para investigações de estresse oxidativo.

No presente estudo, serão investigados os efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) de vitamina C sobre parâmetros de estresse oxidativo em tecido hepático de camundongos imunossuprimidos por CLF.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a suplementação de vitamina C sobre parâmetros de estresse oxidativo em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida.

2.2 Objetivos específicos

- i. Quantificar peroxidação lipídica no tecido hepático;
- ii. Avaliar conteúdo de GSH no tecido hepático;
- iii. Avaliar a atividade da CAT e da SOD no tecido hepático.

3. Metodologia

3.1 Delineamento experimental

O projeto de pesquisa será submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel)..

Serão utilizados 32 camundongos fêmeas Swiss, com 45 dias de idade, oriundos do Biotério Central da UFPel. Os animais serão alocados em grupos de 4 em caixas de polipropileno com grade, específicas para criação, medindo de 27x19x20 cm, comedouro tipo túnel e bebedouro de polipropileno com capacidade para 300 ml. As caixas serão transferidas para gabinete ventilado onde os animais permanecerão por 5 dias em aclimatação com temperatura e umidade relativa de 22-24°C e 65-75%, respectivamente e, luz artificial ciclo claro/escuro de 12 horas, antes do início do experimento.

Os animais receberão sob livre demanda água e ração padrão para roedores marca Nuvilab® diariamente. A higiene das caixas ocorrerá diariamente para minimizar qualquer tipo de contaminação.

Os animais serão divididos em quatro grupos constituídos por oitos animais cada: controle, ciclofosfamida, vitamina C e tratamento, que serão detalhados a seguir: Grupo controle (CT): ração e água *ad libitum*; injeção i.p de água destilada diariamente; Grupo ciclofosfamida (CLF): ração e água *ad libitum*; injeção i.p de ciclofosfamida (150 mg/kg no 1º dia e 100 mg/kg no 4º dia) e água destilada i.p. diariamente; Grupo vitamina C (VIT C): ração e água *ad libitum*; injeção i.p de vitamina C (50 mg/kg) e água destilada i.p. diariamente; Grupo tratamento B (TRAT B): ração e água *ad libitum*; injeção i.p de ciclofosfamida (150 mg/kg no 1º dia e 100 mg/kg no 4º dia) e injeção i.p de vitamina C (50 mg/kg) do 4º ao 7º dia.e Grupo tratamento (TRAT): ração e água *ad libitum*; injeção i.p de ciclofosfamida (150 mg/kg no 1º dia e 100 mg/kg no 4º dia) e injeção i.p de vitamina C (50 mg/kg) diariamente.

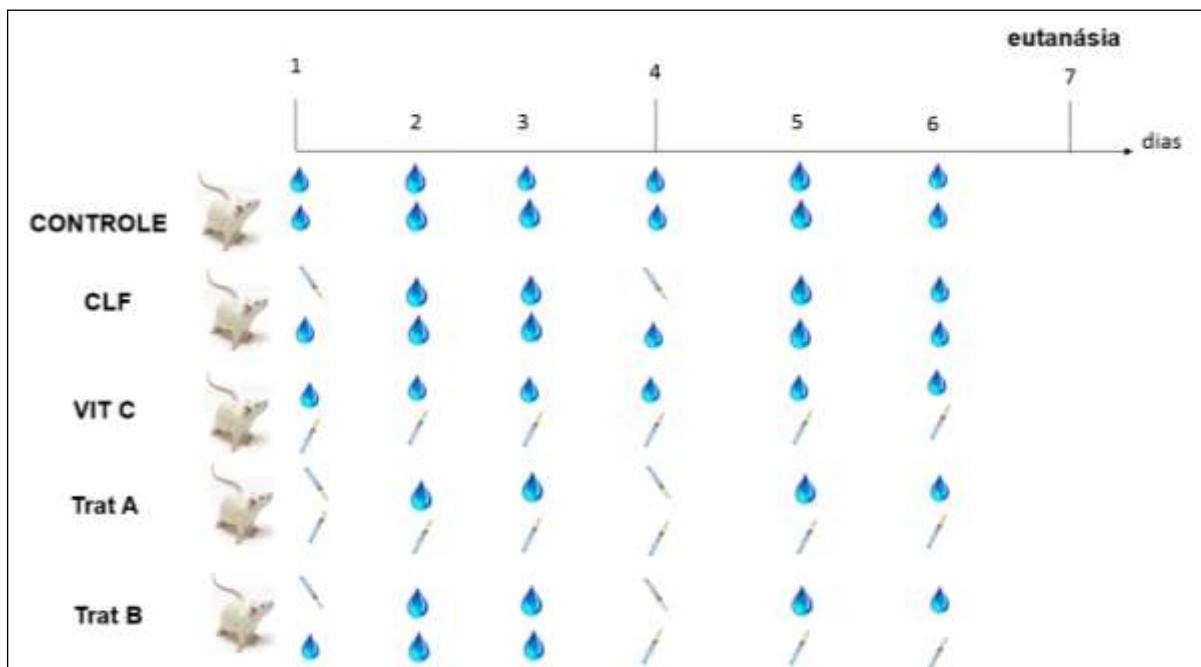


Figura 1. Delineamento do estudo

Todos os animais serão pesados diariamente, para cálculo das quantidades de CLF, vitamina C e água destilada a serem administrados.

A imunossupressão induzida por CLF será realizada de acordo com modelo previamente descrito Zuluaga *et al.*, 2006, resumidamente, será administrado 150 mg/kg de CLF no primeiro dia da indução do modelo e 100 mg/kg de CLF no quarto dia.

A CLF, da marca Sigma-Aldrich, será diluída em água destilada conforme orientação do produto (20mg/mL) em local apropriado no dia de sua administração. A aplicação da CLF será realizada por via i.p. no primeiro e quarto dia do tratamento. Cada animal receberá volume de CLF proporcional ao seu peso.

O tratamento com a vitamina C será realizado com a administração de 50 mg/kg/dia da vitamina via i.p. do primeiro ao sexto dia. O cálculo do volume a ser administrado será calculado diariamente conforme o peso do animal.

Os animais serão eutanasiados no 7º dia de tratamento, previamente os camundongos serão anestesiados e após verificação de completa sedação, submetidos ao procedimento de exsanguinação por punção cardíaca conforme a Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) nº 714 de junho de 2002, seguindo os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio

Brasileiro de Experimentação Animal. O fígado será removido, pesado, e envolvido em papel alumínio, e depois armazenado a – 80°C até o momento das análises.

3.2 Análise do estresse oxidativo em tecido hepático

3.2.1 Determinação de Superóxido Dismutase (SOD)

Realizado de acordo com Marklund, 1985. O método é baseado no acompanhamento da auto-oxidação do pirogalol a 420nm, processo altamente dependente de radicais superóxido. A SOD, se presente na amostra, consome os radicais superóxido presentes, que não estarão mais disponíveis para reagir com o pirogalol, havendo com isso uma inibição da auto-oxidação deste reagente.

Preparação da amostra: será pesado 0,06 g de tecido hepático, homogeneizado em tampão TFK 20 mM, com auxilio de um homogeneizador de tecido elétrico, na proporção (1:10), centrifugado a 3500 rpm, por 10 minutos à 4°C. Separado 15 µL do sobrenadante.

Descrição da técnica: Ao homogenato acrescentar: 215 µL de tampão com catalase. Pipetar a curva conforme a tabela abaixo (ponto zero = 100% de auto-oxidação do pirogalol, deve dar um Δabs de aproximadamente 0,02/min).

U de SOD	0	0,25	0,50	1,00
Tampão (µL)+ CAT	230	217	205	180
SOD (µL)	0	12,5	25	50

Acrescentar Pirogalol e homogeneizar no Vortex. A absorbância será monitorada em duplicata por 180 segundos de 30 em 30 minutos e determinada espectrofotometricamente a 420nm. O resultado será expresso em U SOD.mg de proteína-1 (uma unidade de atividade de superóxido dismutase é definida como a quantidade necessária para reduzir a velocidade da reação em 50%).

3.2.2 Determinação da Catalase (CAT)

A atividade da CAT será determinada conforme descrito por Aebi 1984, que se baseia no acompanhamento da decomposição de H₂O₂ determinada espectrofotometricamente a 240 nm.

Preparação da amostra: será pesado 0,06 g de tecido hepático, homogeneizado em tampão TFK 20 mM, na proporção (1:10), com auxilio de um homogeneizador de tecido elétrico, apóscentrífugado a 3500 rpm, por 10 minutos. Separado 100 µL do sobrenadante.

Descrição técnica: Ao homogenato acrescentar: 10 µL de TRITON 10% (deixar reagir 15 minutos em gelo). Após, serão incubadas em um tampão específico na presença de peróxido de hidrogênio. Absorbância será monitorada de 10 em 10 segundos durante 3 minutos, e determinada espectrofotometricamente a 240 nm. Os resultados serão expressos em unidades de atividade de catalase por mg de proteína (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 µmol de H₂O₂ por minuto por mg de proteína).

3.2.3 Determinação da Glutationa reduzida (GSH)

O conteúdo de glutationa reduzida será determinado conforme o método descrito por Ellman 1959.

Preparação da amostra: será pesado 0,06 g de tecido hepático, homogeneizado em tampão TFK 20 mM, na proporção (1:10), com auxilio de um homogeneizador de tecido elétrico, apóscentrífugado a 3500 rpm, 10 minutos à 4°C. Separado 40 µL do sobrenadante.

Descrição da técnica: Ao homogenato acrescentar: 40 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Centrifugadar a 15.000 rpm por 10 minutos á 4 °C. Os grupamento tióis não proteicos serão quantificados pela adição de 60 uL do sobrenadante ácido/desproteínizado em 125 µL de TFK 1M, ph 7,0 e 25 µL de 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoato (DTNB) 10 mM, sendo homogeneizados no Vortex. Será realizada a leitura do sobrenadante no espectrofotômetro com absorbância de 405 nm.

3.2.4 Peroxidação lipídica (TBARS)

Espécies Reativas de Oxigênio reagem com lipídios de membrana causando lipoperoxidação, com consequente formação de malondialdeído (MDA). Esta substância reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob aquecimento, formando um composto de coloração rosada, coloração esta que é proporcional à quantidade de malondialdeído formado. A formação de MDA, um índice de peroxidação lipídica, será determinada como descrito por Ohkawa H Fau - Ohishi, Ohishi N Fau - Yagi et al. 1979.

Preparação da amostra: será pesado 0,06 g de tecido hepático, homogeneizado em tampão TFK 20 mM, na proporção (1:10), centrifugado a 3500 rpm, 10 minutos. Separado 200 µL do sobrenadante.

Descrição da técnica: Ao homogenato acrescentar: 50 µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 8,1%, 375 µL de ácido acético 20%, pH 3,5, 375 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. Homogeneizada no Vortex. Incubar em banho fervente (95°C) por 60 minutos, deixando resfria por 5 minutos. Após o conteúdo será centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos. Será feito a leitura do sobrenadante no espectrofotômetro com absorbância de 535nm. As concentrações plasmáticas de MDA serão expressas como nmo/ml.

4. Análise estatística

As análises estatísticas serão realizadas de acordo com a distribuição encontrada relacionada a cada grupo tratado. Será usado ANOVA de uma (efeito do tratamento A e B) e de duas vias (efeito da vitamina C, CLF e interação vitamina C vs. CLF), usando o programa *Graphpad Prism 5.0®*. Será considerado o nível de significância de 0,05.

5. Resultados e Impactos esperados

Espera-se que este projeto contribua com o entendimento de como a vitamina C pode beneficiar o organismo frente à imunossupressão induzida por quimioterápico, através do seu potencial antioxidante. Este projeto permitirá a elucidação dos benefícios da suplementação nutricional específica, por meio da neutralização do estresse oxidativo. Esta situação tem uma implicação prática, pois a ciclofosfamida é uma droga amplamente utilizada atualmente no tratamento do câncer e que leva os pacientes a diversos efeitos colaterais indesejados.

6. Plano de trabalho e cronograma do Projeto

Tabela 1. Plano de trabalho e cronograma do Projeto

Atividades	1º/2015	2º/2015	1º/2016
Revisão bibliográfica	X	X	X
Padronização de Técnicas	X		
Desenvolvimento do ensaio biológico	X		
Análises bioquímicas		X	
Análise dos resultados		X	
Redação da dissertação			X
Defesa da dissertação			X

6. Orçamento

Tabela 2. Orçamento

Material	Quant.	Valor Unit. (R\$)	Total (R\$)
Micro tubo tipo Eppendorf 1,5 mL Pacote c/500	2	63,00	126,00
Ponteira Azul de 200 a 1000 uL Pacote c/1000 un.	2	34,90	69,80
Ponteira Amarela de 0 a 200 uL Pacote c/1000 un.	2	12,90	25,80
Luva de látex tam P Caixa c/100 un.	1	26,00	26,00
Água destilada Frasco c/1000 ml	1	6,50	6,50
Vitamina C (ácido ascórbico) Frasco c/100g	1	239,25	239,25
Cyclophosphamide monohydrate Frasco c/ 250 mg	1	218,50	218,50
EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) Frasco c/1000mL	1	35,77	35,77
TCA(Ácido Tricloacético) Frasco 100 g	1	20,85	20,85
DTNB (ácido ditionitrobenzólico) Frascoc/ 500 mg	1	97,00	97,00
KCL (Cloreto de Potássio) frasco C/ 500 g Frasco	1	17,12	17,12
SDS (Dodecilsulfato de Sódio) Frasco c/ 500 g	1	47,23	47,23
Ácido Acético Frasco c/ 1000 mL	1	19,04	19,04
TBA (Ácido Tiobarbitúrico) Frasco/100 G	1	1.489,14	1.489,14
Pirogalol Frasco c/ 500 mL	1	309,12	309,12
Triton Frasco c/ 1000 mL	1	175,00	175,00
K2PO4 (Fosfato de Potássio Dibásico) Frasco c/ 250 g	1	31,33	31,33
KH2PO4 (Fosfato de Potássio Monobásico) Frasco c/ 250 g	1	26,35	26,35
Total (R\$)	-----	-----	2979,8

Os reagentes e materiais supracitados serão fornecidos pelo Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos-PPGNA.

7. Aspectos Éticos

O projeto será submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPel) anterior a execução.

8. Referências

1. Abraham, P., B. Isaac, et al. (2011). "Oral Glutamine Attenuates Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress in the Bladder but Does Not Prevent Hemorrhagic Cystitis in Rats." *Journal of Medical Toxicology* 7(2): 118-124.
2. Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." (0076-6879 (Print)).
3. Barbosa, N. S. and A. N. Kalaaji (2014). CAM use in dermatology. Is there a potential role for honey, green tea, and vitamin C? 20: 11-15.
4. Campbell, E. J. and G. U. Dachs (2014). "Current limitations of murine models in oncology for ascorbate research." (2234-943X (Electronic)).
5. Capel Id Fau - Jenner, M., H. M. Jenner M Fau - Dorrell, et al. (1979). "Hepatic function assessed (in rats) during chemotherapy with some anti-cancer drugs." (0009-9147 (Print)).
6. Cozzolino, S. M. F. and C. C. (2013). "Bases Bioquímicas e Fisiológica da Nutrição nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença." EditoraManone.
7. Dollery C. (1999). "Therapeutic Drugs, Churchill Livingstone." Edinburgh, UK.
8. Douglas, C. R. (2002). " Tratado de fisiologia aplicada à Nutrição." São Paulo: Robe Editorial.
9. Ellman, G. L. (1959). "Tissue sulfhydryl groups." (0003-9861 (Print)).
10. El-Sheikh AAK, Rifaai RA. Peroxisome Proliferator Activator Receptor (PPAR)-gamma Ligand, but Not PPAR-alpha, Ameliorates Cyclophosphamide- Induced Oxidative Stress and Inflammation in Rat Liver. *PPAR Res* [serial on the Internet]. 2014.
11. Emadi, A., R. A. Jones RjFau - Brodsky, et al. (2009). "Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary." (1759-4782 (Electronic)).
12. Fonseca D.A.F, G. R. R. M., Stracieri A.P.M. (2009). "Perfil nutricional de pacientes portadores de neoplasias segundo diferentes indicadores." *NutrirGerais* 3(5): 444-461.
13. Fox, N. and A. G. Freifeld (2012). "The neutropenic diet reviewed: moving toward a safe food handling approach." (0890-9091 (Print)).
14. Gren, A. (2013). "Effects of vitamin E, C and D supplementation on inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic mice." (0300-9831 (Print)).
15. Halliwell B. The antioxidant paradox. 2000 20000531 DCOM- 20000531(0140-6736 (Print))
16. Heyland, D. K., A. G. Dhaliwal R Fau - Day, et al. (2006). "REducing Deaths due to OXidative Stress (The REDOX Study): Rationale and study design for a randomized trial of glutamine and antioxidant supplementation in critically-ill patients." (0029-6651 (Print)).
17. Hollander, J., et al., Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age. 2000(0047-6374 (Print)).
18. Hong, R. W., W. S. Rounds JdFau - Helton, et al. (1992). "Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury." (0003-4932 (Print)).

19. Huang, J., C. J. Agus Db Fau - Winfree, et al. (2001). "Dehydroascorbic acid, a blood-brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke." (0027-8424 (Print)).
20. Kern JC, Kehrer JP. Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. 2002 20020122 DCOM- 20020418(0009-2797 (Print)).
21. KoutrasAkFau - Kalofonos, H. P. and H. P. Kalofonos (2008). "Myelotoxicity in cancer patients treated with chemotherapy: negative or positive prognostic factor?" Clin Cancer Res. 14(22)(1078-0432 (Print)): 75-79.
22. Lane, D. J. and D. R. Richardson (2014). "The active role of vitamin C in mammalian iron metabolism: much more than just enhanced iron absorption!" (1873-4596 (Electronic)).
23. Lee, W. J. (2009). "The prospects of vitamin C in cancer therapy." (2092-6685 (Electronic)).
24. Levine, M. (1986). "New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid." (0028-4793 (Print)).
25. Lykkesfeldt, J. M. A. F.-F.,Balz Frei, B. (2014). "Vitamin C." AdvNutr. 5(1)(2156-5376 (Electronic)): 16-18.
26. Marklund, S. L. (1985). "Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis." (0014-5793 (Print)).
27. Moreira, M. A., M. A. Nascimento, et al. (2014). "Ascorbic acid reduces gentamicin-induced nephrotoxicity in rats through the control of reactive oxygen species." (1532-1983 (Electronic)).
28. Nishikimi, M. and K. Yagi (1996). "Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis." (0306-0225 (Print)).
29. Oboh, G., S. A. Akomolafe TI Fau - Adefegha, et al. (2011). "Inhibition of cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat brain by polar and non-polar extracts of Annatto (*Bixaorellana*) seeds." (1618-1433 (Electronic)).
30. Ohkawa H Fau - Ohishi, N., K. Ohishi N Fau - Yagi, et al. (1979). "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction." (0003-2697 (Print)).
31. Pohanka, M., J. Pejchal, et al. (2012). "Ascorbic Acid: An Old Player with a Broad Impact on Body Physiology Including Oxidative Stress Suppression and Immunomodulation: A Review." Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 12(1): 35-43.
32. Suhail, N., N. Bilal, et al. (2012). "Effect of vitamins C and E on antioxidant status of breast-cancer patients undergoing chemotherapy." Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics 37: 22-26
33. Tripathi, D. N. and G. B. Jena (2009). "Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: a study in mice." ChemBiol Interact 180(1872-7786 (Electronic)): 398-406.
34. Wei, X., X. Su F Fau - Su, et al. (2012). "Stereospecific antioxidant effects of ginsenoside Rg3 on oxidative stress induced by cyclophosphamide in mice." (1873-6971 (Electronic)).

35. Whirl-Carrillo, M., J. M. McDonaghEmFau - Hebert, et al. (2012). "Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine." (1532-6535 (Electronic)).
36. Wu G, Fang YzFau - Yang S, Yang S Fau - Lupton JR, Lupton Jr Fau - Turner ND, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. 2004 20040227 DCOM- 20040419(0022-3166 (Print)).
37. Zuluaga, A. F., B. E. Salazar, et al. (2006). "Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases." BMC Infect. Dis. 6.

Relatório de trabalho de campo

Este relatório tem por objetivo apresentar as etapas que envolveram o trabalho de campo do presente estudo, que avaliou o impacto da suplementação de vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutatona reduzida em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida.

Após a qualificação e aprovação, o projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPel) e foi aprovado (processo nº 23110,002415/2015-61/CEEA 2415/2015). Após procedeu-se com a reserva de animais experimentais no Biotério da UFPel.

O experimento iniciou no dia 18 de setembro de 2015 e foi finalizado no dia 29 de setembro de 2015. Os animais foram alocados em caixas moradia, com 4 animais cada, totalizados 6 caixas. As mesmas foram transferidas para gabinete ventilado com controle de temperatura (22-24°C) e umidade relativa (65-75%) e luz artificial ciclo claro/escuro de 12 horas.

Os animais ficaram 5 dias em aclimatação antes do início do experimento, proporcionando uma melhor adaptação ao Laboratório de Nutrição Experimental.

No sexto dia deu-se inicio ao modelo experimental. Os animais foram aleatoriamente alocados nos grupos controle (CT), ciclofosfamida (CLF), vitamina C (VIT C) e tratamento (TRAT). Neste mesmo dia iniciaram-se as aplicações de ciclofosfamida, vitamina C e água destilada conforme descrito abaixo:

Grupo CT:ração e água *ad libitum*; injeção i.p de água destilada diariamente.

Grupo CLF: ração e água *ad libitum*; injeção i.p de ciclofosfamida (150 mg/kg no 1º dia e 100 mg/kg no 4º dia) e água destilada i.p. diariamente.

Grupo VIT C: ração e água *ad libitum*; injeção i.p de vitamina C (50 mg/kg) e água destilada i.p. diariamente.

TRAT: ração e água *ad libitum*; injeção i.p de ciclofosfamida (150 mg/kg no 1º dia e 100 mg/kg no 4º dia) e injeção i.p de vitamina C (50 mg/kg) diariamente.

Optou-se por retirar o grupo tratamento B, conforme constava no projeto, por evidenciar que a administração da vitamina C durante somente 3 dias, seria um período muito curto para se evidenciar alguma alteração nos parâmetros avaliados.

Todos os animais foram pesados diariamente em balança digital(Marte® AD2000. Max: 2010g, Min: 0,5g) para cálculo das quantidades de CLF, vitamina C e água destilada a serem administrados.

A imunossupressão induzida por CLF foi realizada de acordo com modelo previamente descrito ¹⁸, resumidamente, foi administrado 150 mg/kg de CLF no primeiro dia da indução do modelo e 100 mg/kg de CLF no quarto dia.

A CLF, da marca Sigma-Aldrich, foi diluída em água destilada conforme orientação do produto (20mg/mL) em local apropriado no dia de sua administração. A aplicada da CLF foi realizada por injeção intraperitoneal no primeiro e quarto dia do tratamento. Cada animal recebeu volume de CLF proporcional ao seu peso.

O tratamento foi realizado com a administração de 50 mg/kg/dia de vitamina C i.p. do primeiro ao sexto dia. O cálculo do volume administrado foi calculado após o peso diário de cada animal. Durante o período do experimento, ocorreram perda de 2 animais do grupo tratamento.

A eutanásia dos animais ocorreu no 7º dia de tratamento, previamente os camundongos foram anestesiados, após verificação de completa sedação, foram submetidos ao procedimento de exsanguinação por punção cardíaca conforme a Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária nº 714 de junho de 2002, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Após os animais foram laparatomizados para a retirada do fígado, sendo posteriormente congelado a -80°C até o momento das análises.

As dosagens bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição da UFPel. Concomitante as análises ocorreu à tabulação dos dados em planilhas e em sequência, a análise estatística. Posterior a essas etapas deu-se inicio a escrita do artigo e estruturação da dissertação.

A execução do presente projeto permitiu a elaboração de um artigo e a possibilidade de exploração dos resultados sob outras perspectivas, visto que o tema encontra relevância e espaço no meio científico.

O título sofreu alteração para melhor se adaptar as análises que foram realizadas. Inicialmente planejava-se fazer a avaliação de enzima antioxidantes, como SOD e CAT, porém em função do tempo (conclusão em um ano e meio) e da necessidade de parceria externa para a realização dessas dosagens, não foi

possível efetuá-las até o presente momento, porém está como perspectiva para futuro trabalho, uma vez que estão armazenadas metade dos tecidos utilizados.

Artigo

Este manuscrito será submetido após a defesa da dissertação para a Revista de Nutrição – Brazilian Journal of Nutrition (ISSN 1678-9865 *versão on-line*)

Impacto da suplementação de Vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutationa reduzida em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida

Número de palavras: 3655

Número de figuras: 2

Artigo

Impacto da suplementação de Vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutationa reduzida em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida

Impact of Vitamin C supplementation on lipid peroxidation levels and glutathione in the liver tissue of mice with cyclophosphamide-induced immunosuppression

Título resumido:

Vitamina C e dano oxidativo em camundongos

Vitamin C and oxidative damage in mice

Évelyn de Sousa Araújo¹

Rosane Scussel Garcia²

Betina Dambrós³

Simone Pieniz⁴

Augusto Schneider⁵

Renata Torres Abib⁶

¹Universidade Federal de Pelotas, mestrandona do Programa de Pós Graduação Mestrado em Nutrição e Alimentos. Pelotas/RS, Brasil. Campus Universitário Anglo/Porto. Rua Gomes Carneiro, 01 – Centro, Pelotas – RS, Brasil. CEP 96010-610, Sala 222 – Bloco A.tel 55 (53) 3921-1259, RS, Brasil. Correspondência para: ES ARAUJO. E-mail: evelyndsousa@yahoo.com.br. Participou na concepção, análise e interpretação dos dados.

²Universidade Federal de Pelotas, mestrandona do Programa de Pós Graduação Mestrado em Nutrição e Alimentos. Pelotas/RS, Brasil. Participou na concepção do artigo.

³Universidade Federal de Pelotas, acadêmica da Faculdade de Nutrição. Pelotas/RS, Brasil. Participou na análise dos dados.

⁴ Universidade Federal de Pelotas, professora do Programa de Pós Graduação Mestrado em Nutrição e Alimentos. Pelotas/RS, Brasil. Participou na concepção do artigo.

⁵ Universidade Federal de Pelotas, professor do Programa de Pós Graduação Mestrado em Nutrição e Alimentos. Pelotas/RS, Brasil. Participou na concepção do artigo.

⁶Universidade Federal de Pelotas, professora do Programa de Pós Graduação Mestrado em Nutrição e Alimentos. Pelotas/RS, Brasil. Participou na concepção, análise e interpretação dos dados.

Categoria do artigo: original

Área temática: nutrição experimental

Artigo baseado na dissertação de ES ARAUJO, intitulada “Impacto da suplementação de Vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutationa reduzida em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida”. Universidade Federal de Pelotas; 2015.

Resumo

ARAÚJO de Sousa, Évelyn. **Impacto da suplementação de Vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutationa reduzida em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida.** 2015.

Objetivos: investigar os efeitos da vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutationa reduzida em tecido hepático de camundongos imunossuprimidos por ciclofosfamida. Métodos: O estudo foi realizado em camundongos Swiss, fêmeas, 45 dias de idade. Os animais foram divididos em quatro grupos com oito animais em cada. Grupos: grupo controle, grupo vitamina C, grupo ciclofosfamida e grupo tratamento (vitamina C e ciclofosfamida). O ensaio biológico teve duração de seis dias, sendo no sétimo a eutanásia dos animais. As análises bioquímicas de peroxidação lipídica e glutationa reduzida foram realizadas em tecido hepático. Resultados: A ciclofosfamida causou aumento significativo ($p < 0,0001$) nos níveis de peroxidação lipídica. Não foram observadas alterações significativas nos grupos tratados com vitamina C e não houve interação entre a vitamina C e ciclofosfamida. A ciclofosfamida não alterou níveis de glutationa reduzida. A vitamina C causou a redução do nível de glutationa reduzida em relação ao controle, tanto nos animais que receberam ciclofosfamida quanto no controle e houve interação entre Vitamina C e ciclofosfamida, ou seja, o quimioterápico intensificou a diminuição da glutationa reduzida provocada pela Vitamina C. Conclusão: A ciclofosfamida na dose e período utilizado foi capaz de induzir ao dano oxidativo verificado pelo aumento da peroxidação lipídica. A vitamina C na dose de 50 mg/kg de peso não apresentou potencial para proteger contra o dano oxidativo provocado pelo quimioterápico.

Palavras chaves: ciclofosfamida, ácido ascórbico, estresse Oxidativo, peroxidação lipídica e glutationa reduzida e antioxidante.

Abstract

Araújo de Souza, Évelyn. **Impact of Vitamin C supplementation on lipid peroxidation levels and reduced glutathione in the liver tissue of mice with cyclophosphamide-induced immunosuppression.** 2015.

Objectives: To investigate the effects of vitamin C on levels of lipid peroxidation and reduced glutathione in liver tissue of mice immunosuppressed by cyclophosphamide. Methods: The study was carried out in Swiss mice, female, 45 days old. The animals were divided into four groups of eight animals each. Groups: control group, vitamin C, cyclophosphamide group and treatment group (vitamin C and cyclophosphamide). The biological assay lasted six days and on the seventh euthanasia of animals. The biochemical analysis of lipid peroxidation, and reduced glutathione were performed in liver tissue. Results: The cyclophosphamide caused significant ($p <0.0001$) in the levels of lipid peroxidation. No significant changes were observed in the groups treated with vitamin C and there was no interaction between vitamin C and cyclophosphamide. The cyclophosphamide did not alter levels of reduced glutathione. Vitamin C has reduced the level of reduced glutathione in the control, both in animals which received cyclophosphamide as the control and was no interaction between vitamin C and cyclophosphamide, or intensified chemotherapy the decrease of reduced glutathione caused by Vitamin C. Conclusion: cyclophosphamide at a dose and time period used was able to induce oxidative damage verified by increased lipid peroxidation. Vitamin C at a dosage of 50 mg / kg showed no potential to protect against oxidative damage caused by chemotherapy.

Key words: cyclophosphamide, ascorbic acid, oxidative stress, lipid peroxidation and reduced glutathione and antioxidant.

Introdução

A ciclofosfamida (CLF) é um quimioterápico utilizado no tratamento do câncer e como agente imunossupressor em transplantes¹. Possui amplo espectro de efeitos adversos, incluindo hepatotoxicidade em seres humanos e animais experimentais^{2, 3}. O mecanismo pela qual a CLF causa lesão hepática não está totalmente elucidado. Sabe-se que sua ativação e metabolização ocorrem através de microssomas hepáticos formando dois metabolitos ativos, a fosforamida mostarda e a acroleína. O primeiro estaria envolvido na sua atividade antineoplásica, enquanto a acroleína, um metabólito altamente reativo, seria o responsável pela indução de lesão hepática, uma vez que induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Sendo assim, o fígado por estar diretamente envolvido na metabolização da CLF, tornando-se particularmente suscetível ao estresse oxidativo⁴. Estudos sugerem que durante a metabolização da CLF no fígado, além de gerar ERO ocorreria também diminuição das defesas antioxidantes^{6, 7}.

Uma das consequências do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, que constitui uma reação em cadeia nos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, alterando sua permeabilidade, fluidez e integridade. Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, como o malonaldeído (MDA), culminando com a morte celular⁸. O organismo possui defesas para combater as ERO, como a glutationa (GSH), principal antioxidante endógeno não enzimático. Trata-se de um tripeptídio contendo cisteína que representa o tiol não-proteíco mais abundante nas células. Este antioxidante é sintetizado no fígado e transportado posteriormente para os tecidos⁹.

El-Sheikh e Rifaai¹⁰, em estudo sobre a hepatotoxicidade induzida pela CLF e seus mecanismos fisiológicos, verificaram aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com diminuição da GSH e aumento do nível de citocinas pró-inflamatórias, indicando de maneira geral um estado pró-oxidante após o tratamento com CLF. Em função do tecido hepático ser responsável por metabolizar a CLF e também alvo da sua toxicidade, a busca por substâncias que minimizem esse efeito colateral torna-se importante².

O tratamento quimioterápico com CLF induz a imunossupressão deixando o paciente exposto às mais diversas formas de contaminação. Entre elas a de origem alimentar, sendo orientado a consumir dieta branca, no qual os alimentos sofrem processo de cocção, não sendo permitido o consumo de frutas, legumes e vegetais na forma *in natura* por serem considerados veículos de patógenos¹¹. Este tipo de dieta compromete a ingestão de vitaminas hidrossolúveis como, por exemplo, a vitamina C. Esta vitamina é de fundamental

importância para o organismo, pois participa de uma variedade de reações enzimáticas, atuando como potente antioxidante no fluido extracelular, protegendo o organismo de ERO e também os lipídeos plasmáticos dos danos causados pelos radicais peróxidos na peroxidação lipídica^{12, 13}. A maioria dos animais é capaz de sintetizar a vitamina C, no entanto, os seres humanos não possuem essa capacidade, necessitando ingeri-la através da dieta¹⁴.

A suplementação de vitamina C pode propiciar um estado redox favorável, minimizando os efeitos danosos causados pelo excesso de ERO induzido pela CLF em tecidos saudáveis¹⁵. Estudos em animais têm demonstrado que o tratamento com vitamina C na dose de 50 mg/kg de peso tem sido capaz de suprimir o estresse oxidativo^{16, 17}.

No presente estudo, foram investigados os efeitos da administração intraperitoneal de vitamina C sobre a peroxidação lipídica e nível de glutatona reduzida em tecido hepático de camundongos imunossuprimidos por CLF.

Metodologia

Animais e protocolo experimental

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (nº 2415/2015).

Foi realizado estudo experimental com 32 camundongos fêmeas Swissalbino, com 45 dias de idade, peso médio inicial de 28,65g ± 2,99, obtidas do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram alocados em caixas de polipropileno com grades específicas para criação, medindo de 27x19x20 cm, comedouro tipo túnel e bebedouro de polipropileno com capacidade para 300 ml. As caixas foram transferidas para gabinete ventilado com controle de temperatura e umidade relativa de 22-24°C e 65-75%, respectivamente, e luz artificial ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais permaneceram cinco dias em aclimatação, mais sete dias de ensaio biológico, totalizando um período experimental de 12 dias. Foi fornecido ração específica para roedores da marca Nuvilab® e água *ad libitum*. As caixas foram higienizadas diariamente com troca da cama, para evitar uma possível contaminação tendo em vista que alguns animais encontravam-se imunossuprimidos pelo tratamento quimioterápico.

Os animais foram divididos em quatro grupos constituídos por oitos animais cada: controle, ciclofosfamida, vitamina C e tratamento, que serão detalhados a seguir: Grupo controle (CT): injeção intraperitoneal (i.p.) de água destilada como veículo, diariamente; Grupo ciclofosfamida (CLF): injeção i.p de ciclofosfamida (150 mg/kg no 1º dia e 100 mg/kg no 4º dia) e água destilada i.p. diariamente; Grupo vitamina C (VIT C): injeção i.p de vitamina C (50 mg/kg) e água destilada i.p. diariamente; e Grupo tratamento (TRAT): injeção i.p de

ciclofosfamida (150 mg/kg no 1º dia e 100 mg/kg no 4º dia) e injeção i.p de vitamina C (50 mg/kg) diariamente.

A imunossupressão induzida por CLF foi realizada de acordo com modelo previamente descrito¹⁸. No qual, foi administrado 150 mg/kg de CLF no 1º dia da indução do modelo e 100 mg/kg de CLF no 4º dia.

A CLF (Sigma-Aldrich®) foi diluída em água destilada conforme orientação do produto (20mg/mL) em local apropriado no dia de sua administração. A CLF foi aplicada por injeção i.p.no 1º e 4º dia do tratamento. Cada animal recebeu volume de CLF proporcional ao seu peso.

O tratamento foi realizado com a administração de 50 mg/kg/dia de vitamina C i.p. do 1º ao 6º dia. O cálculo do volume a ser administrado foi calculado após o peso diário obtido de cada animal.

Os animais foram eutanasiados no 7º dia do ensaio biológico. Previamente os camundongos foram anestesiados e após verificação de completa sedação, submetidos ao procedimento de exsanguinação por punção cardíaca conforme a Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) nº 714 de junho de 2002, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Após os animais foram laparatomizados para a retirada do fígado, sendo posteriormente congelado a -80°C.

Análises Bioquímicas

A formação de MDA, um índice de peroxidação lipídica foi medido no tecido hepático por meio da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS),conforme Ohkawa et al ¹⁹.

As amostras foram incubadas a 95° C durante 60 minutos em meio ácidocontendo Dodecilsulfato de Sódio (SDS) a 8,1%, ácido acético 20%, pH 3,5 e ácidotiobarbitúrico (TBA) 0,67%. Após as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos. O produto da reação foi determinado a 535nm por espectrofotometria.Os resultados foram expressos em nmols de TBARS/mg de proteína.

O conteúdo de glutationa reduzida foi determinado indiretamente através da estimativa de tióis não proteicos conforme o método descrito por Ellman²⁰. Foi adicionado às amostras ácido tricloroacético (TCA)10%, sendo centrifugado a 15.000 rpm por 10 minutos a 4 ° C. Os grupamento tióis não proteicos foram quantificados pela adição de tampão fosfato de potássio (TFK) 1M, ph 7,0 e 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoato (DTNB) 10mM. A leitura do espectro do produto da reação foi realizada a405nm. Os resultados foram expressos

emnmol/mg de proteína. A dosagem de proteína nos tecidos foi realizada pelo método de Lowry²¹.

Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP). Foi testada a normalidade de todas variáveis para selecionar o teste estatístico mais apropriado. A ANOVA de duas vias foi usada para verificar diferença estatística e interações entre os grupos, estabelecido nível de significância de 5%. O teste *t* pareado foi utilizado para comparação de peso inicial e final dos tratamentos e o teste *t* de amostras independentes foi utilizado quando a interação foi encontrada entre os grupos. Foi usado software *GraphPad Prism 5[®]* para as análises.

Resultados

Ciclofosfamida como indutor de imunossupressão

Ao final do período experimental os animais tratados com CLF apresentaram imunossupressão, verificado pela diminuição de 60% nos níveis de leucócitos e 97% de neutrófilos quando comparados ao grupo controle.

Efeito da ciclofosfamida e da vitamina C sobre peroxidação lipídica em tecido hepático

A Figura 1 apresenta os efeitos da vitamina C e CLF nos níveis de peroxidação lipídica no tecido hepático. A CLF causou aumento significativo ($p < 0,0001$; Fator CLF) nos níveis de TBARS, sendo que no grupo controle a média de lipoperoxidação foi $0,047 \pm 0,007$ nmol/mg de proteína e no grupo CLF, a média foi de $0,065 \pm 0,009$ nmol/mg de proteína. Não foram observadas alterações significativas nos grupos tratados com vitamina C em relação ao controle e não houve interação entre a vitamina C e ciclofosfamida.

Efeito da ciclofosfamida e da vitamina C sobre níveis de GSH em tecido hepático

Como podemos verificar na figura 2, a CLF não alterou os níveis de GSH, e a vitamina C causou redução significativa nos níveis de GSH em relação ao grupo controle, de $0,130 \pm 0,005$ umol/mg de proteína para $0,110 \pm 0,010$ μ mol/mg de proteína ($p=0,003$). Observou-se ainda interação entre a vitamina C e CLF ($p=0,03$), ou seja, a CLF intensificou a diminuição da GSH provocada pela vitamina C.

Discussão

Os resultados do presente estudo, corroboram com os resultados descritos por Zuluaga et al¹⁸, no qual utilizaram camundongos Swiss fêmeas com 180 dias de idade, e o tratamento com CLF (na dose de 150 mg/kg no 1º dia e outra de 100 mg/kg de peso no 4º dia de tratamento)foi capaz de induzir a imunossupressão. No presente estudo este modelo de imunossupressão também induziu ao dano oxidativo verificado pelo aumento dos níveis de TBARS em aproximadamente 40%. El-Sheikhe Rifaai¹⁰ em estudo realizado com ratos albinos machos adultos utilizaram a CLF em dose única de 150 mg/Kg de peso cinco dias antes do termo do experimento. O grupo que recebeu somente CLF apresentou níveis significativamente superiores (aproximadamente 230%)de lipoperoxidação em tecido hepático. Wei et al²² em estudo com camundongos fêmeas com 35 dias de idade utilizaram a CLF como indutor de imunossupressão, na dose única de 100 mg/kg de peso i.p. Após análises em tecidos de timo e baço, verificaram aumento significativo dos níveis de TBARS.

Contudo, o tratamento com vitamina C na quantidade de 50 mg/kg durante seis dias não foi capaz de atenuar a peroxidação lipídica induzida pelo tratamento com o quimioterápico. Ergul et al²³ em estudo sobre o efeito de diferentes doses de vitamina C frente ao estresse oxidativo provocado pelo antimicrobiano Isoniazida (50 mg/kg), em ratos, verificaram que a vitamina C na dose de 100 mg/kg reduziu o estresse oxidativo provocado pela droga enquanto que na dose de 1000 mg/kg este efeito não foi evidenciado, já o efeito da vitamina C *per se* não foi apresentado. Outro dado importante deste estudo foi que o tratamento teve duração de 21 dias, sendo assim, além da dose ter sido menor de vitamina C do que a utilizada no presente estudo, o período de duração do tratamento (sete dias) pode ser uma justificativa para incapacidade da vitamina C em reduzir o dano oxidativo.

A glutationa reduzida é o mais abundante tiol intracelular, existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular²⁴. Os níveis intracelulares de tiol são importantes na determinação da extensão da lesão celular induzida por agentes quimioterapêuticos, possui ainda, papel central na defesa das células contra o estresse oxidativo²⁵.

Em particular, problemas na síntese e metabolismo da glutationa reduzida estão associados a algumas doenças, nas quais os níveis de glutationa reduzida e das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo⁹. Alterações na concentração deste tripeptídio podem ser um indicador útil em certas desordens fisiológicas, como anemias causadas por infecções ou seguidas pela administração de algumas drogas oxidantes^{9,25}.

No presente estudo a GSH teve sua atividade diminuída pela vitamina C em ambos os grupos. Possivelmente a interação da droga com a vitamina impediu que os estoques do antioxidante fossem repostos. Esta situação pode ter efeito positivo, no caso de células tumorais. Como podemos verificar no estudo realizado por Prasad *et al*²⁶, no qual foi induzido tumor em camundongos machos Swissalbinos, observou-se que após o tratamento com CLF e vitamina C, a interação destas, promoveu diminuição nos níveis de GSH em células tumorais, aumentando assim a suscetibilidade a apoptose. Verificaram ainda que a diminuição da defesa antioxidante GSH da célula tumoral foi benéfica para o hospedeiro.

A GSH tem sido foco de interesse no tratamento quimioterápico do câncer. Uma elevação intracelular nos níveis de GSH tem sido atribuída à resistência das células cancerosas ao estresse oxidativo, radioterapia e quimioterapia, enquanto que uma depleção de seus níveis poderia aumentar a citotoxicidade de uma variedade de agentes antitumorais^{27, 28}.

No estudo de Gurgen *et al*²⁹ sobre o efeito protetor de diferentes antioxidantes, entre eles o ácido ascórbico, em ratos fêmeas da linhagem *Wistar* tratados com CLF (75 mg/kg de peso- uma vez por semana, durante três semanas), verificaram que após tratamento com vitamina C (200 mg/kg de peso-doses diárias por gavagem durante três semanas), o valor de GSH no plasma, no grupo contendo a CLF evitava C foi maior do que no grupo tratado apenas com CLF, sendo o resultado semelhante ao do grupo controle, sugerindo que a interação entre os dois foi capaz de reestabelecer ou manter os níveis de GSH. Foi observado ainda que tanto a dose de vitamina C quanto a droga CLF aliada ao maior tempo de tratamento possibilitaram um aumento de GSH mediado pela vitamina C, diferentemente do encontrado no presente estudo.

Outra hipótese para o fato da vitamina C *per se* ter diminuído a GSH, seria que, como os camundongos, diferentemente dos humanos, são capazes de sintetizar esta vitamina e que seu metabolismo está ligado diretamente com a produção de GSH, em que ambas atuam como defesa antioxidante, pode ter ocorrido uma feedback negativo, ou seja, com o maior aporte de vitamina C, a produção endógena de GSH foi parcialmente suprimida, como sugerido em uma revisão sobre metabolismo da vitamina C em animais anteriormente. O fato da CLF não ter alterado o nível de GSH pode ser explicado por sua última dose ter sido administrada três dias antes da análise, este tempo pode ter sido suficiente para o reestabelecimento dos níveis de GSH³⁰.

Como se pode verificar dependendo do tipo celular, a diminuição da defesa antioxidante GSH pode ser benéfica ou não. No caso do presente estudo a interação entre a vitamina e o quimioterápico promoveu a depleção desse sistema de defesa, expondo o hospedeiro exposto ao dano oxidativo. Já se este efeito fosse encontrado em células

tumorais, esta susceptibilidade poderia auxiliar na apoptose e com isso intensificar o efeito do quimioterápico. Antioxidantes podem se tornar mais efetivos e menos prejudiciais quando administrados em concentrações e por períodos apropriados^{31, 32}. O mecanismo pelo qual a interação das duas substâncias promove diminuição da GSH não foi elucidado até o momento.

Algumas limitações do estudo pode ter sido a dose de 50 mg/kg de vitamina C ser considerada pequena para ser observado um possível efeito protetor contra o dano oxidativo. Além disso, o tempo de tratamento de sete dias associado ao fato da suplementação ter iniciado junto com o tratamento quimioterápico, e não anterior, pode ter sido outro fator limitante para a incapacidade da vitamina C exercer efeito sobre o dano oxidativo.

Conclusão

A CLF na dose e período utilizado foi capaz de induzir ao dano oxidativo verificado pelo aumento da peroxidação lipídica. A vitamina C na dose de 50 mg/kg de peso não apresentou potencial proteção contra o dano oxidativo provocado peloquimioterápico nessas condições, evidenciado pela supressão dos níveis de GSH e efeito nulo sobre a lipoperoxidação. Entretanto, mais estudos com diferentes concentrações e tempos de administração desta vitamina são necessários.

Referências

1. Shanafelt TD, Lin T Fau - Geyer SM, Geyer Sm Fau - Zent CS, Zent Cs Fau - Leung N, Leung N Fau - Kabat B, Kabat B Fau - Bowen D, et al. Pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab regimen in older patients with chronic lymphocytic leukemia. 2007 20070524 DCOM- 20070703(0008-543X (Print)). eng.
2. Capel Id Fau - Jenner M, Jenner M Fau - Dorrell HM, Dorrell Hm Fau - Williams DC, Williams DC. Hepatic function assessed (in rats) during chemotherapy with some anti-cancer drugs. 1979 19790927 DCOM- 19790927(0009-9147 (Print)). eng.
3. Fraiser LH, Kanekal S Fau - Kehrer JP, Kehrer JP. Cyclophosphamide toxicity. Characterising and avoiding the problem. 1991 19920309 DCOM- 19920309(0012-6667 (Print)). eng.
4. Kern JC, Kehrer JP. Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. 2002 20020122 DCOM- 20020418(0009-2797 (Print)). eng.
5. Honjo I, Suou T Fau - Hirayama C, Hirayama C. Hepatotoxicity of cyclophosphamide in man: pharmacokinetic analysis. 1988 19881220 DCOM- 19881220(0034-5164 (Print)). eng.
6. Bhattacharya A, Lawrence Ra Fau - Krishnan A, Krishnan A Fau - Zaman K, Zaman K Fau - Sun D, Sun D Fau - Fernandes G, Fernandes G. Effect of dietary n-3 and n-6 oils with and without food restriction on activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in livers of cyclophosphamide treated autoimmune-prone NZB/W female mice. 2003 20031015 DCOM- 20040414(0731-5724 (Print)). eng.
7. Stankiewicz A, Skrzyllewska E Fau - Makiela M, Makiela M. Effects of amifostine on liver oxidative stress caused by cyclophosphamide administration to rats. 2002 20030519 DCOM- 20030602(0792-5077 (Print)). eng.
8. Herskho C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. 1989 19891221 DCOM- 19891221(0037-1963 (Print)). eng.
9. Wu G, Fang Yz Fau - Yang S, Yang S Fau - Lupton JR, Lupton Jr Fau - Turner ND, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. 2004 20040227 DCOM- 20040419(0022-3166 (Print)). eng.
10. El-Sheikh AAK, Rifai RA. Peroxisome Proliferator Activator Receptor (PPAR)-gamma Ligand, but Not PPAR-alpha, Ameliorates Cyclophosphamide- Induced Oxidative Stress and Inflammation in Rat Liver. PPAR Res [Internet]. 2014.
11. Fox N, Freifeld AG. The neutropenic diet reviewed: moving toward a safe food handling approach. 2012 20120808 DCOM- 20121002(0890-9091 (Print)). eng.
12. Lee WJ. The prospects of vitamin C in cancer therapy. 2009 20100216 DCOM- 20110714(2092-6685 (Electronic)). eng.
13. Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. 1986 19860422 DCOM- 19860422(0028-4793 (Print)). eng.
14. Lane DJ, Richardson DR. The active role of vitamin C in mammalian iron metabolism: much more than just enhanced iron absorption! 2014 20140922 DCOM- 20150609(1873-4596 (Electronic)). eng.
15. Campbell EJ, Dachs GU. Current limitations of murine models in oncology for ascorbate research. 2014 20141029 DCOM- 20141029(2234-943X (Electronic)). eng.
16. Gren A, Barbasz A Fau - Kreczmer B, Kreczmer B Fau - Sieprawska A, Sieprawska A Fau - Rudolphi-Skorska E, Rudolphi-Skorska E Fau - Filek M, Filek M. Protective effect of ascorbic acid after single and repetitive administration of cadmium in Swiss mice. 2012 20120918 DCOM- 20130129(1537-6524 (Electronic)). eng.
17. Guo X, Li Wenjie FAUXQ, Xin Qiliang FAUDH, Ding Hui FAUZC, Zhang Caiyun FAUCY, Chang Yanzhong FAUDX, et al. Vitamin C protective role for alcoholic liver disease in mice through regulating iron metabolism. 2011 20110429 DCOM- 20110816(1477-0393 (Electronic)). eng.
18. Zuluaga AF, Salazar BE, Rodriguez CA, Zapata AX, Agudelo M, Vesga O. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. BMC Infect Dis. 2006;6.
19. Ohkawa H Fau - Ohishi N, Ohishi N Fau - Yagi K, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. 1979 19790829 DCOM- 19790829(0003-2697 (Print)). eng.
20. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. 1959 19591201 DCOM- 20000701(0003-9861 (Print)). eng.
21. Lowry OH Fau - Rosebrough NJ, Rosebrough Nj Fau - Farr AL, Farr Al Fau - Randall RJ, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. 1951 19521201 DCOM- 20040215(0021-9258 (Print)). eng.
22. Wei X, Su F Fau - Su X, Su X Fau - Hu T, Hu T Fau - Hu S, Hu S. Stereospecific antioxidant effects of ginsenoside Rg3 on oxidative stress induced by cyclophosphamide in mice. 2012 20120604 DCOM- 20120927(1873-6971 (Electronic)). eng.
23. Ergul Y, Erkan T, Uzun H, Genc H, Altug T, Erginoz E. Effect of vitamin C on oxidative liver injury due to isoniazid in rats. Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society. 2010;52(1):69.

24. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. 2000 20000825 DCOM- 20000825(0070-2137 (Print)). eng.
25. Lei XG. In vivo antioxidant role of glutathione peroxidase: evidence from knockout mice. 2002 20020318 DCOM- 20020809(0076-6879 (Print)). eng.
26. Prasad SB, Rosangkima G Fau - Nicol BM, Nicol BM. Cyclophosphamide and ascorbic acid-mediated ultrastructural and biochemical changes in Dalton's lymphoma cells in vivo. 2010 20100830 DCOM- 20110119(1879-0712 (Electronic)). eng.
27. Khynriam D, Prasad SB. Changes in endogenous tissue glutathione level in relation to murine ascites tumor growth and the anticancer activity of cisplatin. 2003 20030117 DCOM- 20030515(0100-879X (Print)). eng.
28. Navarro J, Obrador E Fau - Carretero J, Carretero J Fau - Petschen I, Petschen I Fau - Avino J, Avino J Fau - Perez P, Perez P Fau - Estrela JM, et al. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. 1999 19990331 DCOM- 19990331(0891-5849 (Print)). eng.
29. Gürgen SG, Erdoğan D, Elmas Ç, Kaplanoğlu GT, Özer Ç. Chemoprotective effect of ascorbic acid, α -tocopherol, and selenium on cyclophosphamide-induced toxicity in the rat ovary. Nutrition. 2013;29(5):777-84.
30. Banhegyi G, Braun L Fau - Csala M, Csala M Fau - Puskas F, Puskas F Fau - Mandl J, Mandl J. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. 1997 19971020 DCOM- 19971020(0891-5849 (Print)). eng.
31. Veskoukis AS, Tsatsakis Am Fau - Kouretas D, Kouretas D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. 2012 20111201 DCOM- 20120328(1466-1268 (Electronic)). eng.
32. Halliwell B. The antioxidant paradox. 2000 20000531 DCOM- 20000531(0140-6736 (Print)). eng.

	valor p
Interação	0,3909
Fator Vitamina C	0,5548
Fator CLF	< 0,0001

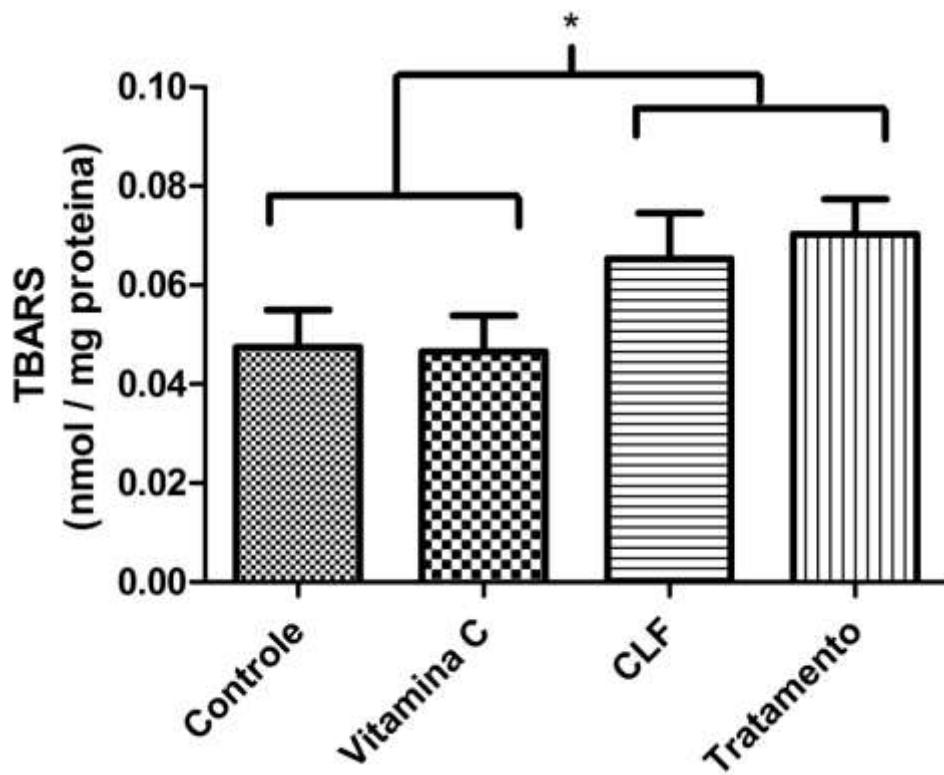


Figura 1: Lipoperoxidação hepática em camundongos Swiss. Resultados expressos em média ± DP, (n=8). Teste ANOVA de 2 vias. Pelotas, 2015.

	Valor p
Interação	0,0366
Fator Vitamina C	< 0,0001
Fator CLF	0,2276

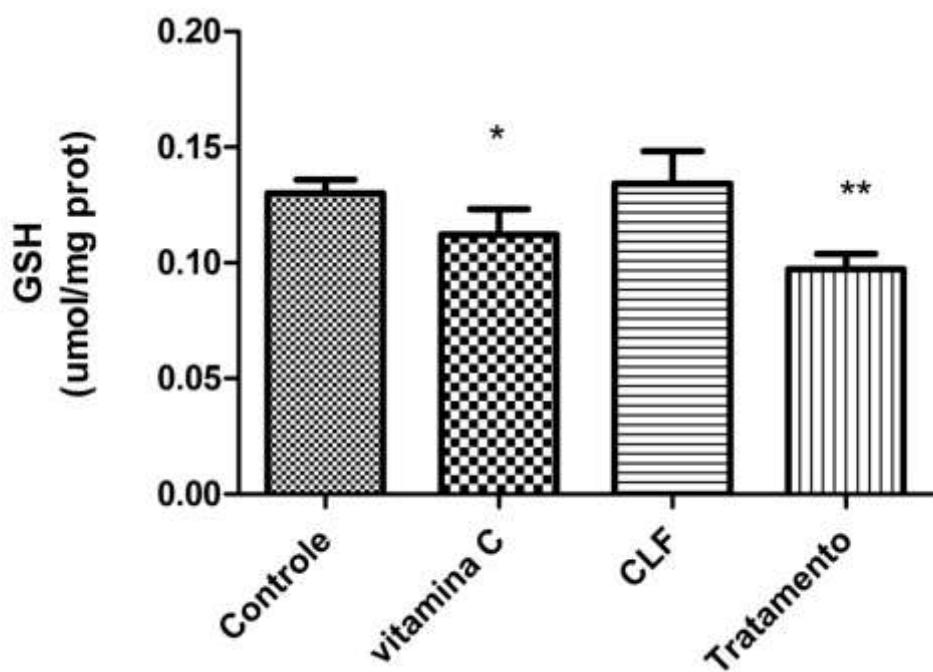


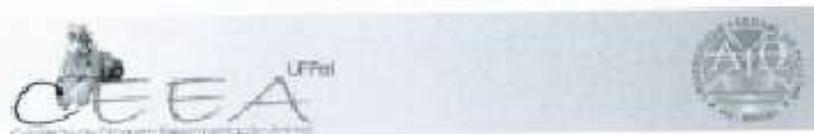
Figura 2: Níveis de GSH em tecido hepático de camundongos Swiss. Resultados expressos em média \pm DP, (n=8). TESTE ANOVA de 2 vias. Pelotas, 2015.

*diferença em relação ao controle (teste t);

** diferença em relação a CLF e vitamina C (teste t).

Anexo

Cópia do parecer de ética



Pelotas, 13 de julho de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Félix

Presidente do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Prof. Renata Torres Abib

Departamento de Nutrição – Faculdade de Nutrição

Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: "Impacto da suplementação de Vitamina C sobre parâmetros de estresse oxidativo e imunidade em camundongos com imunossupressão induzida por ciclodifosfamida", processo nº23110.002415/2015-61, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer FAVORÁVEL a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 2415-2015).

Vigência do Projeto: 15/07/2015 a 01/04/2016

Espécie/ Linhagem: *Mus musculus/Swiss*

Nº de animais: 40

Idade: 45 dias

Sexo: Fêmeas

Origem: Biônico Central/UFPel

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Félix

Presidente da CEEA

Ciente em: ____ / ____ / 2015

Assinatura do Professor Responsável: _____