#### UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

# Faculdade de Nutrição Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

Efeito da suplementação de vitamina C sobre a neutropenia induzida por ciclofosfamida em camundongo

**Rosane Scussel Garcia** 

#### **ROSANE SCUSSEL GARCIA**

Efeito da suplementação de vitamina C sobre a neutropenia induzida por ciclofosfamida em camundongo

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Renata Torres Abib Coorientadores: Prof<sup>a</sup> Dra. Simone Pieniz

Prof Dr. Augusto Schneider

#### ROSANE SCUSSEL GARCIA

Efeito da suplementação de vitamina C sobre a neutropenia induzida por ciclofosfamida em camundongo

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 (Orientador) Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS.
Prof. Dr. Carla Pohn Sehn Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas/UFPel.
Prof. Dr. Lúcia Rota Borges 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.

#### **Agradecimentos**

À minha família, pela paciência e incentivo;

À minha orientadora Prof.ª Dra. Renata Torres Abib, pela orientação e acolhimento;

Aos meus co-orientadores Simone Pieniz e Augusto Schneider, pela disponibilidade e apoio;

As colegas de mestrado Aline Longo e Tatiana Saccon, pelas experiências compartilhadas;

À aluna Betina Dambrós, pela ajuda em toda a parte experimental;

À amiga Évelyn de Sousa Araújo, pela convivência maravilhosa na realização deste trabalho;

Aos componentes da banca examinadora, pelas contribuições nesta pesquisa;

Obrigada.

#### Resumo

GARCIA, Rosane Scussel. **Efeito da suplementação de vitamina C sobre neutropenia induzida por ciclofosfamida em camundongos.** 2015. 56f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos). Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A neutropenia é um efeito adverso ocasionado após a administração de drogas antineoplasicas, como a ciclofosfamida, usada para tratamento de diferentes neoplasias. A vitamina C é um micronutriente antioxidante e imunomodulador, mas pouco se sabe sobre sua ação frente à neutropenia. Dessa forma o objetivo do presente trabalho foi avaliar a suplementação de Vitamina C sobre neutropenia induzida por ciclofosfamida (CLF) e perda de peso em camundongos. O estudo foi realizado com a suplementação de vitamina C 50 mg/kg intraperitoneal (i.p) por 7 dias em camundongos fêmeas, Swiss albino, adultas, imunossuprimidas com CLF, divididos em quatro grupos com 8 animais cada: Grupo controle (água destilada i.p.), CLF (150 mg/kg i.p. no dia 1 e 100 mg/kg i.p. no dia 4), vitamina C (50 mg/kg i.p., diariamente) e CLF + vit C (Ciclofosfamida 250 mg/kg i.p. e vitamina C 50 mg/kg i.p). O grupo CLF apresentou perda significativa de peso de 24% no terceiro dia em relação ao grupo controle. Quando co-administradas a vitamina C e CLF houve uma interação significativa, ou seja, a vitamina C intensificou a diminuição de neutrófilos. A vitamina C não interferiu nos valores de leucócitos. Os resultados mostraram que a suplementação de vitamina C 50 mg/kg i.p. por 7 dias intensificou a neutropenia induzida por ciclofosfamida (250 mg/kg i.p.) e não preveniu a perda peso ponderal induzida por CLF em camundongos ao final do experimento biológico.

Palavras-chave: ácido ascórbico; imunossupressão; quimioterápico

#### Abstract

GARCIA, Rosane Scussel. **Effect of vitamin C supplementation on cyclophosphamide-induced neutropenia in mice**. 2015. 56f. Dissertation (Master Nutrition and Food). Graduate Program in Nutrition and Food. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2015.

Neutropenia is caused adverse effect after administration of antineoplastic drugs, such as cyclophosphamide, used for treatment of different neoplasms. Vitamin C is an antioxidant and immunomodulatory micronutrient, but little is known about its action against the neutropenia. Thus the aim of this study was to evaluate the supplementation of Vitamin C on cyclophosphamide-induced neutropenia (CLF) and weight loss in mice. The study was conducted with vitamin supplementation C 50 mg /kg intraperitoneal (i.p.) for 7 days in female mice, Swiss albino, adult, immunosuppressed with CLF, divided into four groups of eight animals each: Control group (distilled water i.p.), CLF (150 mg / kg i.p. on day 1 and 100 mg / kg i.p. on day 4), vitamin C (50 mg / kg i.p., daily) and CLF + VITC (Cyclophosphamide 250 mg /kg i.p. and vitamin C 50 mg / kg i.p.). The CLF group showed significant weight loss of 24% on the third day compared to the control group. When co-administered vitamin C and CLF there was a significant interaction, so, vitamin C enhanced the decrease in neutrophils. Vitamin C did not interfere with leukocyte values. The results showed that supplementation of vitamin C 50 mg / kg i.p. for 7 days intensified neutropenia induced by cyclophosphamide (250 mg / kg i.p.) and the weight did not prevent weight loss in mice induced CLF the end of the biological experiment.

**Keywords:** ascorbic acid; immunosuppression; chemotherapy

## Lista de Figuras

## Projeto de Pesquisa

Figura 1	Delineamento experimental		16
Figura 2	Modelo imunossupressão		21
	Arti	igo	
Figura 1	Controle de peso ponderal		48
Figura 2	Contagem de células branças	•	49

### Lista de abreviaturas e siglas

CEEA Comitê de Ética em Experimentação Animal

CLF Ciclofosfamida

CT Controle

VIT C Vitamina C

i.p. Intraperitoneal

i.v. Intravenoso

mg Miligrama

Kg Kilograma

U Unidade

L Litro

μL Microlitro

mm<sup>3</sup> Milimitros cúbicos

< Menor

= Igual

#### Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 PROJETO DE PESQUISA	12
3 RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO	33
ARTIGO	36
APÊNCICE	52
ANEXOS	54

#### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A administração de drogas anti-neoplásicas é vista de forma benéfica no tratamento de câncer, porém as toxicidades decorrentes dos quimioterápicos, comprometem órgãos e sistemas, sendo o principal fator limitante desta terapia (Culakova, Thota et al. 2014;). A ciclofosfamida (CLF), drogas anti-neoplásica, administrada para vários tipos de tumores apresenta potencial citotóxico e imunossupressor, acarretando neutropenia (INCA, 2015).

A neutropenia, diminuição significativa de leucócitos e neutrófilos, induzida por quimioterapia é um efeito adverso importante durante o tratamento quimioterápico, sendo necessário diagnóstico e tratamento precoce, visto que pode tornar-se grave, e rapidamente pode evoluir para um quadro de neutropenia febril com suas complicações (Lima, França et al. 2013; Ford and Marshall 2014). Durante o período de neutropenia a diminuição dos neutrófilos compromete o sistema imunológico. A utilização de nutrientes imunomoduladores tem sido estudada a fim de minimizar este efeito.

A vitamina C nutriente imunomodulador, tem sido estudada por apresentar poder antioxidante, pró-oxidante e também por ser considerada como um nutriente potencializador da função imunológica, embora os mecanismos envolvidos ainda não estejam completamente elucidados (Heaney, Gardner et al. 2008; OHNO, Ohno et al. 2009; F.Ullah, H.Bhat et al. 2012; Park 2013; Putchala, Ramani et al. 2013).

Em função do seu potencial imunomodulador, Manning, Mitchell et al. (2013), estudaram o papel da vitamina C *in vivo* (em camundongos) e *in vitro* (cultura de células T) sobre a maturação e a função de linfócitos e, evidenciaram que a vitamina C pode favorecer ambos os processos, reforçando desta forma, a função imune.

Suhail et al. (2012), investigaram o efeito protetor das vitaminas C e E sobre os efeitos nocivos dos quimioterápicos, e observaram que a suplementação dessas vitaminas pode minimizar os efeitos de drogas antineoplásicas. Também Gürgen et al. (2013), referenciaram que o tecido ovariano pode ser poupado dos efeitos citotóxicos da CLF com o uso da vitamina C, E e selênio. Assim como o estudo realizado por Ajith et al. (2007), no qual demonstrou que a suplementação de vitamina C em camundongos foi capaz de atenuar a nefrotoxicidade induzida por cisplatina, outro quimioterápico bastante utilizado na prática clínica.

Estudo realizado por Vollbracht, C. et al. (2011), relata que a administração de vitamina C intravenosa foi bem tolerada por pacientes com câncer de mama, reduzindo efeitos secundários relacionados a quimioterapia.

Em vista disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto da suplementação de vitamina C durante o processo de imunossupressão em camundongos induzida por CLF.



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

Projeto de Dissertação de Mestrado

# AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA C SOBRE A NEUTROPENIA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA EM MODELO ANIMAL

Mestranda: Rosane Scussel Garcia

Orientadora: Renata Torres Abib
Co-orientadores: Simone Pieniz
Augusto Schneider

ROSANE SCUSSEL GARCIA

Avaliação da suplementação de vitamina C sobre a neutropenia induzida por

ciclofosfamida em modelo animal

Projeto Dissertação de de Mestrado

apresentado 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: Renata Torres Abib

Co-orientadores: Simone Pieniz

Augusto Schneider

#### Sumário

1. Introdução	15
1.1 Ciclofosfamida e imunossupressão	15
1.2 Vitamina C e função imunológica	18
1.3 Vitamina C e nefrotoxicidade	19
1.4 Haptoglobina e inflamação	20
2. Objetivos	21
2.10bjetivos geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Metodologia	21
3.1 Delineamento experimental	21
3.1.1 Modelo de imunossupressão induzido por ciclofosfamida	22
3.1.2 Modelo de tratamento	22
3.1.3 Eutanásia	24
3.2 Processamento de amostra	24
3.2.1 Análise dos elementos figurativos do sangue	24
3.2.2 Análise de uréia e creatinina	24
3.2.3 Análise de haptoglobia	24
3.3 Análise estatística	25
4. Resultados e impactos esperados	25
5. Cronograma	25
6. Orçamento	26
7. Aspectos éticos	27
9 Poforôncias	27

#### 1. Introdução

O avanço constante no desenvolvimento de novas tecnologias e abordagens terapêuticas anti-neoplásicas é vista de forma benéfica, porém as toxicidades decorrentes dos quimioterápicos utilizados acabam comprometendo o sistema imunológico. A toxicidade hematológica associada à mielossupressão compromete o sistema imune, com a diminuição do número de células de defesa e aumento do risco de complicações infecciosas, sendo o principal fator limitante da terapia anti-neoplásica (Maliakel, Kagiya et al. 2008; Culakova, Thota et al. 2014)

#### 1.1 Ciclofosfamida e imunossupressão

A ciclofosfamida (CLF) é uma droga anti-neoplasica, alquilante e imunossupressora, amplamente utilizada no tratamento de vários tipos de câncer, porém, como consequência acarreta toxicidade sistêmica. Esta tem por objetivo eliminar as células tumorais, mas age também sobre as células sadias. A quantidade de CLF e o tempo entre as administrações devem ser planejados de modo a garantir um efeito anti-neoplásico máximo, com toxicidade mínima, permitindo uma adequada recuperação das células normais. Assim o cálculo da dose a administrar deve ser realizado de modo criterioso. O efeito citotóxico e imunossupressor é dosedependente e um intervalo sem a droga anti-neoplasica é sempre necessário de modo a permitir a restauração da função do sistema imune (Shayne, Culakova et al. 2007; Ayhanci, Uyar et al. 2008; Ziepert, Schmits et al. 2008; Bonassa 2012; Weycker, Li et al. 2014; Ministério da Saúde 2015).

As drogas anti-neoplásicas afetam a produção das células do sistema imune (neutrófilos), diminuindo as células brancas (leucopenia), que predispõe o organismo a invasão e proliferação de micro-organismos, aumentando o risco de contrair infecções e inibindo a resposta inflamatória (Lima, França et al. 2013).

A contagem das diferentes células sanguíneas é importante, pois permite, por meio de comparação com valores de referência, avaliar a função imunológica. O número total de leucócitos é utilizado para esta avaliação, sendo compostos por neutrófilos (50 a 70%), linfócitos (30 a 40%) e monócitos (7%). A neutropenia é

caracterizada pela redução do número total de leucócitos tanto em humanos como em animais (Zuluaga, Salazar et al. 2006; Santos, Bandeira et al. 2009).

Durante o período de mielossupressão, ocasionado pelas drogas antineoplásicas, a neutropenia é o evento adverso mais importante, sendo necessário diagnóstico e tratamento precoce de infecções, visto que se torna grave, e rapidamente pode evoluir para um quadro de neutropenia febril com suas complicações (Lima, França et al. 2013; Ford and Marshall 2014). Além disso, a neutropenia é uma importante causa de mortalidade por câncer relacionada com o tratamento anti-neoplásico (Ford and Marshall 2014; Hinojosa-Andía and Del Carpio-Jayo 2014; Vioral and Wentley 2015).

Em estudo prospectivo de coorte nos EUA entre 2002 e 2006, com 3.638 pacientes adultos com tumores sólidos (mama, pulmão, colo-retal, ovário) e linfoma em início de quimioterapia, foi observado que a maioria dos eventos neutropênicos e infecções ocorreram no primeiro ciclo e permanecem nos ciclos subsequentes. A incidência de neutropenia e a redução na dose da droga anti-neoplásica variou com o tipo e estágio do tumor (Culakova, Thota et al. 2014).

No Brasil, estudo realizado com 79 mulheres com câncer de mama em tratamento de quimioterapia adjuvante (49,4%) e neoadjuvante (50,6%), totalizando 572 ciclos de quimioterapia, pode observar que a ocorrência de neutropenia foi tanto no tratamento neoadjuvante como no adjuvante, em torno de 60%. A neutropenia foi responsável pela suspensão temporária do tratamento em 42 ciclos, não foram administrados medicação em 44 ciclos e ainda foi responsável pelo atraso em média de 6,3 dias entre os ciclos de quimioterapia (Nascimento, Andrade et al. 2014).

Pesquisas recentes indicam que a neutropenia é uma complicação prevalente em pacientes imunocomprometidos, com aparecimento nos intervalos das administrações das drogas anti-neoplásicas, representando um fator limitante do tratamento, prolongando o início do novo ciclo, podendo ter como consequência um resultado final inferior ao esperado (Khan, Dhadda et al. 2008; Lami Casaus 2009; Cortés, Cuervo et al. 2013; Gozzo 2014; Nascimento, Andrade et al. 2014).

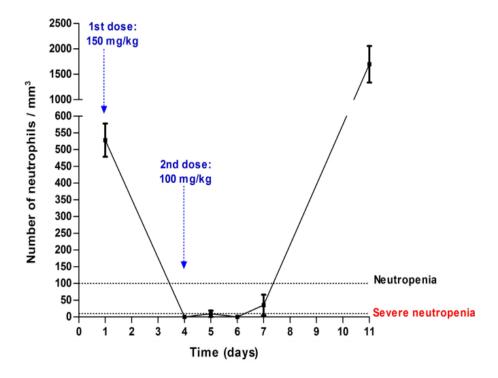
Estima-se que 60% dos adultos em quimioterapia desenvolvem neutropenia (Khan, Dhadda et al. 2008; Nascimento, Andrade et al. 2014) e entre as neoplasias hematológicas essa prevalência é em torno de 80% (Cortés, Cuervo et al. 2013; Madrid, Díaz et al. 2013; Gozzo 2014), está associada com gravidade e duração, altos custos, alta morbidade e mortalidade (Caeiro 2009; Bellesso 2013; Lima,

França et al. 2013; Weycker, Li et al. 2014; Burutaran, Guadagna et al. 2015; Vioral and Wentley 2015).

A descrição de eventos de neutropenia é importante para permitir tratamento mais rápido e eficaz, visto que não é possível prever quem irá desenvolver neutropenia (Ahn, Lee et al. 2011; Lima, França et al. 2013; Lima, França et al. 2013; Gozzo 2014). O tempo transcorrido entre a aplicação da droga e a ocorrência do menor valor de contagem hematológica é denominado de "NADIR", ocorre entre o sétimo e o décimo quarto dia de tratamento e a recuperação hematológica ocorre em torno de 30 dias após a aplicação. As consequências previsíveis da quimioterapia sugerem que há espaço para ações preventivas, com rastreamento pós-quimioterapia no aparecimento de sinais e sintomas de neutropenia, quando é recomendado um teste hematológico (Weycker, Edelsberg et al. 2012; Ford and Marshall 2014).

Em humanos, dependendo da classificação, a neutropenia pode ser considerada leve e assintomática, quando os valores de neutrófilos encontram-se entre 1000 e 1500 U/mm³. Este estágio não é considerado grave e prolongando a data da próxima sessão de quimioterapia ou reduzindo a dose do quimioterápico pode normalizar os valores dos neutrófilos. Em casos graves, quando os neutrófilos apresentam valores menores que 1000 neutrófilos/mm³, o organismo fica suscetível a infecções mais frequentes, estando associada à perda qualidade de vida, a morbidade e mortalidade (Kuderer, Dale et al. 2006; Ahn, Lee et al. 2011).

Em camundongos, estudo realizado por Zuluaga, et al. (2006) com objetivo de avaliar imunossupressão induzida por CLF em modelo animal com 250 mg/kg e caracterizando os efeitos sob as células sanguíneas brancas (neutrófilos, linfócitos e monócitos) verificou que os valores de neutropenia são diferentes dos humanos. A neutropenia, em camundongos, é caracterizada por neutrófilos abaixo de 100 U/mm³, e a neutropenia severa quando menor ou igual a 10 U/mm³. A administração de 150 mg/kg de CLF em camundongos ocasiona neutropenia entre o terceiro e o quarto dia, e a administração de uma segunda dose de 100 mg/kg de CLF, mantém a neutropenia severa até o sétimo dia após a primeira administração, quando então começa a recuperação, e atinge valores basais aproximadamente no décimo dia (Figura1) (Zuluaga, Salazar et al. 2006).



**Figura 1**. Modelo imunossupressão induzido por ciclofosfamida em camundongos (Zuluaga, Salazar et al. 2006).

Em camundongos, o estudo que avaliou o uso de uma erva medicinal chinesa (*Raiz Angélica Sinensis*) sobre a imunidade induzida por CLF, mostrou que esta erva promoveu a taxa de recuperação do sistema imune em 14 dias de tratamento. Este estudo concluiu que o número de leucócitos apresentou queda significativa no dia 4 e 11, a recuperação iniciou-se no dia 4 e voltou ao nível normal no dia 7. A administração de 5 mg/kg por dia da erva durante 14 dias mostrou-se eficaz na recuperação do sistema imune (Hui MKC 2006).

#### 1.2 Vitamina C e função imunológica

A vitamina C apresenta uma importante atividade antioxidante e também é considerada como um nutriente potencializador da função imunológica, embora os mecanismos envolvidos ainda não estejam completamente elucidados (Heaney, Gardner et al. 2008; OHNO, OHNO et al. 2009; F. Ullah, H. Bhat et al. 2012; Park 2013; Putchala, Ramani et al. 2013; Wilson, Baguley et al. 2014). A vitamina C atua

como co-fator de processos bioquímicos podendo interagir no sistema imunológico indiretamente (Mahapatra, Chakraborty et al. 2011; Mohammed, Fisher et al. 2013), não é citotóxica para as células normais, podendo ser um agente positivo para a função imunitária (Lee 2009; Hoffer, Robitaille et al. 2015).

Estudo realizado para avaliar o papel da vitamina C *in vivo* (em camundongos) e *in vitro* (cultura de células T) sobre a maturação e a função de linfócitos, evidenciaram que a vitamina C pode favorecer ambos os processos, e desta forma reforçar a função imune (Manning, Mitchell et al. 2013).

Os neutrófilos têm papel na resposta aos patógenos, regulando as defesas e modulando a inflamação (Mohammed, Fisher et al. 2013). Sendo que níveis baixo circulante de vitamina C são associados com atraso no tempo de resolução da inflamação (Mohammed, Fisher et al. 2014).

A desregulação do sistema imunológico está envolvida com o estresse oxidativo causado pelas drogas anti-neoplásicas. Um estudo recente evidenciou que a suplementação com antioxidantes pode diminuir de forma eficaz a peroxidação lipídica, causada pelo estresse oxidativo, e os níveis da proteína C-reativa, importante marcador inflamatório em ratos com diabete induzida por estreptozotocina (Park, Park et al. 2011), evidenciando o papel da vitamina C como potente antioxidante e anti-inflamatório.

Estudo realizado por Gürgen et al. (2013, com o objetivo avaliar a eficácia da vitamina C, E e selênio em tecidos ovarianos de ratas tratadas com 75 mg/kg de CLF (1vez por semana, durante 3 semanas) e 200 mg/kg de vitamina C diariamente, observou que o tecido ovariano pode ser poupado dos efeitos citotóxicos da CLF com o uso destas vitaminas. Também Suhail et al. (2012), investigando o efeito protetor das vitaminas C e E dos efeitos nocivos dos quimioterápicos e observou que pode ser útil à suplementação dessas vitaminas (Suhail, Bilal et al. 2012; Gürgen, Erdoğan et al. 2013).

#### 1.3 Vitamina C e nefrotoxicidade

A nefrotoxicidade também é uma das preocupações durante a administração das drogas anti-neoplasicas, isto porque a maioria dessas drogas são excretadas pelos rins. Como antioxidante, a vitamina C tem sido amplamente estudada por demonstrar o efeito benéfico frente à nefrotoxicidade causada pelas drogas anti-

neoplásicas (Atasayar, Gürer-Orhan et al. 2009; Chen, Yang et al. 2014; Almaghrabi 2015).

Em estudo prévio realizado por Ajith (2007), foi demonstrado que a suplementação de 500 mg/kg de vitamina C em camundongos foi capaz de atenuar a nefrotoxicidade induzida por cisplatina, outro quimioterápico bastante utilizado na prática clínica, uma vez que foi capaz de reduzir significativamente os níveis de creatinina e uréia séricos, diferentemente do efeito encontrado com 500 mg/kg de vitamina E, que não se mostrou tão eficaz nestes parâmetros. Outro estudo do mesmo grupo, em 2009, verificou que o efeito da vitamina C e E em dose simples ou em multidoses pode trazer benefícios aos níveis de ureia e creatinina. Também foi observado efeito positivo em relação à co-suplementação dessas vitaminas sobre o estresse oxidativo em tecido renal induzido por cisplatina, o que ressalta as propriedades antioxidantes desta vitamina (Ajith, Usha et al. 2007; Ajith, Abhishek et al. 2009).

Ainda com o objetivo de reduzir a nefrotoxicidade da droga cisplatina, foi realizado estudo em modelo animal com administração de vitamina C (25 mg/kg) antes do tratamento com cisplatina, os resultados sugerem que a vitamina C tem um impacto benéfico sobre a função renal com os níveis de creatinina normal. (Guindon, Deng et al. 2014).

Farshid (2013), investigando o efeito da administração oral de vitamina C (200 mg/kg i.p.) e histidina (200 mg/kg), na cistite hemorrágica induzida pela CLF (200 mg/kg) em ratos *Wister*, observou que a vitamina C e histidina atenuaram a cistite hemorrágica induzida por CLF através da redução dos efeitos tóxicos de espécies reativas de oxigênio (Farshid, Tamaddonfard et al. 2013).

#### 1.4 Haptoglobina e inflamação

Em situações pró-inflamatórias, proteínas da fase aguda são ativadas nos hepatócitos e podem ser utilizadas para avaliar a resposta do sistema imune. A haptoglobina é comumente utilizada como marcadora da resposta imune (Theilgaard-Mönch, Jacobsen et al. 2006; Carter and Worwood 2007; Huntoon, Russell et al. 2013; Jelena, Mirjana et al. 2013).

Uma vez que CLF induz inflamação, através do aumento da interleucina 6 e do Fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), e a vitamina C é capaz de modular a

resposta inflamatória, sugere-se que esta vitamina possa diminuir os níveis de haptoglobina (Galicia, Maes et al. 2009; Ya-Qiang He 2015).

O desenvolvimento de novos conhecimentos para atenuar a toxicidade da quimioterapia representa uma área de grande interesse e entre eles está a terapia nutricional com base em nutrientes antioxidantes e anti-inflamatórios, embora os resultados ainda sejam controversos e escassos.

Modelos experimentais de imunossupressão apresentam-se como uma valiosa ferramenta para testar o efeito de nutrientes sobre a resposta imune.

Em vista disso, este trabalho tem como objetivo avaliar o impacto da suplementação de vitamina C durante o processo de imunossupressão em camundongos com induzida por CLF.

#### 2. Objetivos

#### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a suplementação de vitamina C sobre a neutropenia induzida por ciclofosfamida em modelo animal.

#### 2.2 Objetivos Específicos

- **2.2.1** Verificar a contagem de leucócitos totais;
- **2.2.2** Identificar a contagem de neutrófilos, linfócitos e monócitos;
- **2.2.3** Analisar os valores de uréia e creatinina sérica;
- **2.2.4** Avaliar os valores de haptoglobina sérica;

#### 3. Metodologia

#### 3.1 Delineamento experimental

O ensaio biológico será desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas (LNEFN/UFPel).

Serão utilizados 40 camundongos Swiss, com 45 dias de idade, oriundos do Biotério Central da UFPel, que permanecerão uma semana em aclimatação antes do início do experimento no LNEFN/UFPel, visando evitar o estresse dos animais.

A dieta utilizada será a ração padrão para roedores marca Nuvilab®. Os animais serão mantidos em ambiente com temperatura e umidade relativa de 22-24°C e 65-75%, respectivamente, e ciclo claro/escuro de 12 horas, em gabinetes individuais de 27x19x20 cm, produzida em arame de aço Inox Aisi 304 com polimento eletrostático, comedouro tipo túnel e bebedouro de polipropileno com capacidade para 300 ml.

A maravalha, água, luz e as gaiolas utilizadas no ensaio biológico serão fornecidas pelo LNEFN/UFPel. A maravalha será trocada diariamente e acondicionada em saco plástico para posterior descarte.

Os gabinetes serão higienizados diariamente visando evitar qualquer tipo de contaminação. O tratamento dos animais será de responsabilidade da mestranda.

#### 3.1.1 Modelo de imunossupressão induzido por ciclofosfamida

A imunossupressão induzida por CLF será realizada de acordo com modelo previamente descrito (Zuluaga, Salazar et al. 2006).

Será infundida 150 mg/kg de CLF no primeiro dia da indução do modelo e 100 mg/kg de CLF no quarto dia. A CLF será diluída em 0,5 mL de água destilada no dia da inoculação e aplicada por injeção intraperitoneal, no quadrante inferior esquerdo, sendo repetido o mesmo processo no quarto dia. (Diehl, Hull et al. 2001).

Neste modelo, a partir do primeiro dia os valores de neutrófilos vão diminuindo gradualmente, ocasionado quadro de neutropenia (< 100 neutrófilos/mm³), e no quarto dia, os animais desenvolvem neutropenia severa (< 10 neutrófilos/mm³) e permanecem neutropênicos até o sétimo dia. Após o sétimo dia os valores vão retornando gradualmente ao normal.

Os animais do grupo controle irão receber a mesmo volume de água destilada.

#### 3.1.2 Modelo de tratamento

O tratamento será realizado com vitamina C (50 mg/kg) diluída em água destilada na concentração necessária e a CLF diluída conforme recomendação do fabricante, ambas administrada i.p. de acordo com o peso de cada animal.

A vitamina C será administrada do primeiro ao sétimo dia e a CLF será administrada no dia 1 e no dia 4.

No dia 1 será diluído e administrado 150 mg/kg de CLF para induzir a neutropenia e no dia 4 será administrado 100 mg/kg de CLF para manter a neutropenia.

Serão alocados aleatoriamente 8 animais por grupo (Figura 2), conforme descrito a seguir:

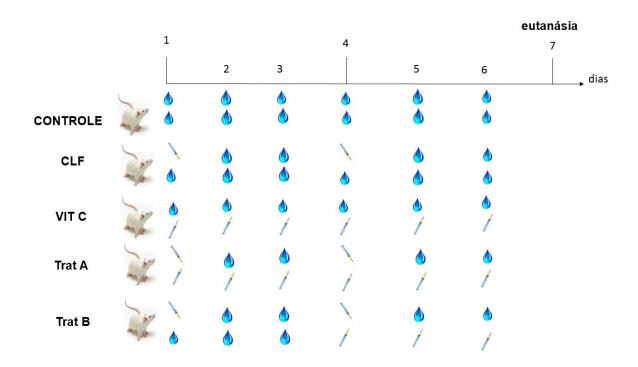
**CONTROLE:** Será administrada água destilada i.p. (2x) diariamente.

CLF: Será administrada CLF i.p. (dia 1e dia 4) e água destilada i.p. diariamente.

VIT C: Será administrada vitamina C i.p. e água destilada i.p. diariamente.

**Trat A:** Será administrada CLF i.p. (dia 1e dia 4) e vitamina C i.p. diariamente.

Trat B: Será administrada CLF i.p. (1° e 4°dia) e vitamina C i.p. do 4° ao 7° dia.



**Figura 2**. Delineamento do estudo. As gotas representam a administração de água destilada (i.p.) e a injeção, a administração de CLF e vitamina C (i.p.) ao longo dos dias do experimento.

#### 3.1.3 Eutanásia

Os animais serão eutanasiados no dia 7. Previamente à eutanásia, os camundongos serão deixados em jejum de 6 horas durante a noite.

Será realizada sedação anestésica com pentobarbital intraperitonial (45 mg/kg), 60 minutos antes da coleta do sangue. Após a anestesia, o camundongo será colocado em uma superfície plana, e em seguida, submetidos ao procedimento de exsanguinação por punção cardíaca conforme Resolução Normativa N° 12, de 20 de setembro de 2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Após o experimento a carcaças dos animais serão dispensados em saco plástico fechado e depositados em bambona com tampa para recolhimento por empresa especializada.

#### 3.2 Processamento das amostras

#### 3.2.1 Análise dos elementos figurativos do sangue

O sangue será coletado no momento da punção cardíaca, acondicionado em tubos heparinizados e acondicionados em caixa térmica para conservação e transportado ao laboratório para as análises.

O sangue será encaminhado para o laboratório da Faculdade de Veterinária da UFPel, onde serão realizadas as análises bioquímicas.

Será realizado leucograma, para a contagem de células branca sanguínea (leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos), onde será usando câmera de Neubauer e microscópio com lente objetiva de 100 X.

#### 3.2.3 Análise de uréia e creatinina

Será realizada análise de uréia e creatinina sérica para avaliação da função renal. Os valores serão quantificados por meio de kit comercial enzimático marca Bioclin (teste UV). Os resultados serão expressos em mg/dL.

#### 3.2.4 Análise de haptoglobina

A análise de haptoglobina sérica será com soro diluído 1:20 ml e incubado com hemoglobina em placa de 96 poços. Após, será adicionado  $H_2O_2$  nos poços teste e água nos poços controle. Imediatamente após, será adicionado o reagente de Guaiacol em todos os poços. A reação será incubada por 3 min, e a leitura da absorbância será feita a 450 mm.

#### 3.3 Análise estatística

Os resultados serão digitados em uma planilha do *Excel* e analisados pelo Programa *Graphpad*. O efeito vitamina C sobre a CLF e a sua interação será realizada pelo teste de *ANOVA* de duas vias. E o efeito tempo de administração da vitamina C será analisado através de *ANOVA* de uma via.

Os dados serão apresentados como médias e desvio-padrão. Para todos os testes, será considerado nível de significância de 5%.

#### 4. Resultados e impactos esperados

Os resultados deste projeto visam colaborar na compreensão de como a vitamina C pode beneficiar o organismo frente à imunossupressão induzida por um quimioterápico, e desta forma colaborar e nortear futuros estudos em seres humanos com o objetivo de minimizar os efeitos colaterais do tratamento do câncer.

Caso este benefício seja comprovado, poderá auxiliar em termos de novos enfoques quanto à prescrição dietética de vitamina C em organismos imunocomprometidos.

#### 5. Cronograma

**Quadro 1 -** Previsão cronológica de execução do projeto de pesquisa:

ANO	2015											
MESES	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
ATIVIDADES												

Revisão	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Elaboração do	Х	Х	Х	Х	Х							
Projeto	^	^	^	^	^							
Qualificação do						Х						
Projeto						^						
Comissão de												
Ética em						X						
Experimentação						^						
Animal												
Desenvolvimento							Х					
do experimento							^					
Análises								Х				
bioquímicas												
Análise dos									Х	Х		
resultados												
Redação do											Х	
Artigo												
Defesa da												
dissertação e												X
Divulgação dos												
Resultados												

#### 6. Orçamento

Será realizada parceria entre o Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição e o Laboratório da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas para a realização das análises bioquímicas.

Alguns materiais que serão utilizados são de uso rotineiro do Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas.

Quadro 2 - Previsão Orçamentária

Material	Quantidade	Valor unitário	Valor total	
		(R\$)	(R\$)	
Luva de látex tam M cx /100	1	26,00	26,00	
Microtubos 1,5 ml pct c/1000	1	39,00	39,00	
Água destilada 1000 ml	1	6,50	6,50	
Vitamina C (100 g)	1	239,25	239,25	
Ciclofosfamida (1g)	1	218,50	218,50	
Análises bioquímicas (uréia, creatinina, leucograma, haptoglobina)	40	12,00	480,00	
TOTAL			1009,25	

#### 7. Aspectos éticos

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

#### 8. Referências

- Ahn, S., Y.-S. Lee, et al. (2011). "Predictive factors of poor prognosis in cancer patients with chemotherapy-induced febrile neutropenia." <u>Supportive Care in Cancer</u> **19**(8): 1151-1158.
- Ajith, T. A., G. Abhishek, et al. (2009). "Co-supplementation of single and multi doses of vitamins C and E ameliorates cisplatin-induced acute renal failure in mice." <u>Experimental and Toxicologic Pathology</u> **61**(6): 565-571.
- Ajith, T. A., S. Usha, et al. (2007). "Ascorbic acid and α-tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: a comparative study." <u>Clinica Chimica Acta</u> **375**(1–2): 82-86.
- Almaghrabi, O. A. (2015). "Molecular and biochemical investigations on the effect of quercetin on oxidative stress induced by cisplatin in rat kidney." <u>Saudi Journal of Biological Sciences</u> **22**(2): 227-231.

- Atasayar, S., H. Gürer-Orhan, et al. (2009). "Preventive effect of aminoguanidine compared to vitamin E and C on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats." <u>Experimental and Toxicologic Pathology</u> **61**(1): 23-32.
- Ayhanci, A., R. Uyar, et al. (2008). "Protective Effect of Zinc on Cyclophosphamide-Induced Hematoxicity and Urotoxicity." <u>Biological Trace Element Research</u> **126**(1-3): 186-193.
- Bellesso, M. (2013). "Febrile neutropenia studies in Brazil: treatment and cost management based on analyses of cases." Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia **35**: 3-4.
- Bonassa, E. M. A. e. G., Maria Inês Rodrigues (2012). Reações Adversas dos Agentes Antineoplásicos
- <u>Terapêutica Oncológica para Enfermeiros e Farmacêuticos</u>. São Paulo, Editora Atheneu. **1:** 305 460.
- Burutaran, M. B., R. Guadagna, et al. (2015). "Results of high-risk neutropenia therapy of hematology-oncology patients in a university hospital in Uruguay." Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia **37**: 28-33.
- Caeiro, F. (2009). "O papel da neutropenia no prognóstico do doente oncológico com pneumonia adquirida na comunidade." Revista Portuguesa de Pneumologia **15**: 736-739.
- Carter, K. and M. Worwood (2007). "Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases." <u>International</u> Journal of Laboratory Hematology **29**(2): 92-110.
- Chen, M.-F., C.-M. Yang, et al. (2014). "Vitamin C Protects Against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity and Damage Without Reducing Its Effectiveness in C57BL/6 Mice Xenografted With Lewis Lung Carcinoma." <u>Nutrition and Cancer</u> 66(7): 1085-1091.
- Cortés, J. A., S. Cuervo, et al. (2013). "Febrile neutropenia in the tropics: A description of clinical and microbiological findings and their impact on inappropriate therapy currently used at an oncological reference center in Colombia." <u>Biomédica</u> **33**: 70-77.
- Culakova, E., R. Thota, et al. (2014). "Patterns of chemotherapy-associated toxicity and supportive care in US oncology practice: a nationwide prospective cohort study." <u>Cancer Medicine</u> **3**(2): 434-444.
- Diehl, K.-H., R. Hull, et al. (2001). "A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes." <u>Journal of Applied Toxicology</u> **21**(1): 15-23.

- F. Ullah, M., S. H. Bhat, et al. (2012). "Ascorbic Acid in Cancer Chemoprevention: Translational Perspectives and Efficacy." <u>Current Drug Targets</u> 13(14): 1757-1771.
- Farshid, A. A., E. Tamaddonfard, et al. (2013). "Oral administration of vitamin C and histidine attenuate cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats." <a href="Indian Journal of Pharmacology">Indian Journal of Pharmacology</a> **45**(2): 126-129.
- Ford, A. and E. Marshall (2014). "Neutropenic sepsis: a potentially life-threatening complication of chemotherapy." <u>Clin Med</u> **14**(5): 538-542.
- Galicia, G., W. Maes, et al. (2009). "Haptoglobin deficiency facilitates the development of autoimmune inflammation." <u>European Journal of Immunology</u> **39**(12): 3404-3412.
- Gozzo, T. G. d. N. M. d. A. R. A. d. O. A. M. d. A. T. d. O. (2014). "Neutropenia: ocorrência e manejo em mulheres com câncer de mama em quimioterapia." Rev. Latino-Am. Enfermagem **22(2)**: 301-308
- Guindon, J., L. Deng, et al. (2014). "Optimization of a cisplatin model of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in mice: use of vitamin C and sodium bicarbonate pretreatments to reduce nephrotoxicity and improve animal health status." Molecular Pain 10: 56.
- Gürgen, S. G., D. Erdoğan, et al. (2013). "Chemoprotective effect of ascorbic acid, α-tocopherol, and selenium on cyclophosphamide-induced toxicity in the rat ovarium." Nutrition **29**(5): 777-784.
- Heaney, M. L., J. R. Gardner, et al. (2008). "Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs." <u>Cancer Research</u> **68**(19): 8031-8038.
- Hinojosa-Andía, L. J. and D. Del Carpio-Jayo (2014). "Bacteriemia asociada a neutropenia febril en pacientes hemato-oncológicos, su espectro bacteriano y patrón de susceptibilidad antibiótica." Revista Medica Herediana **25**: 22-29.
- Hoffer, L. J., L. Robitaille, et al. (2015). "High-Dose Intravenous Vitamin C Combined with Cytotoxic Chemotherapy in Patients with Advanced Cancer: A Phase I-II Clinical Trial." PLoS ONE **10**(4): e0120228.
- Hui MKC, W. W., Shin VY, So WHL, Cho CH (2006). "Polysaccharides from the root of Angelica sinensis protect bone marrow and gastrointestinal tissues against the cytotoxicity of cyclophosphamide in mice." <a href="http://www.medsci.org/v03p0001.htm">http://www.medsci.org/v03p0001.htm</a> 3(1): 1-6.
- Huntoon, K. M., L. Russell, et al. (2013). "A unique form of haptoglobin produced by murine hematopoietic cells supports B-cell survival, differentiation and immune response." <u>Molecular Immunology</u> **55**(3–4): 345-354.

- Jelena, A., M. Mirjana, et al. (2013). "Haptoglobin and the inflammatory and oxidative status in experimental diabetic rats: antioxidant role of haptoglobin." <u>Journal of Physiology and Biochemistry</u> **69**(1): 45-58.
- Khan, S., A. Dhadda, et al. (2008). "Impact of neutropenia on delivering planned chemotherapy for solid tumours." <u>European Journal of Cancer Care</u> 17(1): 19-25.
- Kuderer, N. M., D. C. Dale, et al. (2006). "Mortality, morbidity, and cost associated with febrile neutropenia in adult cancer patients." <u>Cancer</u> **106**(10): 2258-2266.
- Lami Casaus, L. A. M., Maria Antonieta; Sarmiento, Sofia Alsina; Brito Iglesia, Rosario (2009). "Aparición de episodios de neutropenia febril tras la quimioterapia citostática en el paciente oncológico." Revista Cubana de Farmacia 43 (4): 68-73.
- Lee, W.-J. (2009). "The Prospects of Vitamin C in Cancer Therapy." <u>Immune Network</u> **9**(5): 147-152.
- Lima, S. S. S., M. S. França, et al. (2013). "Neutropenic patients and their infectious complications at a University Hospital." Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia **35**(1): 18-22.
- Madrid, C., L. Díaz, et al. (2013). "Epidemiología de la neutropenia febril en pacientes adultos con neoplasia hematológica, en un período de 26 meses en el Hospital Pablo Tobón Uribe, Colombia." Revista chilena de infectología 30: 195-201.
- Mahapatra, S. K., S. P. Chakraborty, et al. (2011). "Immunomodulatory Role of Ocimum gratissimum and Ascorbic Acid against Nicotine-Induced Murine Peritoneal Macrophages In Vitro." Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2011: 1-11
- Maliakel, D. M., T. V. Kagiya, et al. (2008). "Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by glucosides of ascorbic acid and α-tocopherol." <u>Experimental and Toxicologic Pathology</u> **60**(6): 521-527.
- Manning, J., B. Mitchell, et al. (2013). "Vitamin C Promotes Maturation of T-Cells." Antioxidants & Redox Signaling **19**(17): 2054-2067.
- Ministério da Saúde, I. N. C. A. (2015). " Quimioterapia." http://www.inca.gov.br/conteudo\_view.asp?id=101.
- Mohammed, B., B. Fisher, et al. (2013). "Vitamin C: A Novel Regulator of Neutrophil Extracellular Trap Formation." <u>Nutrients</u> **5**(8): 3131-3150.
- Mohammed, B. M., B. J. Fisher, et al. (2014). "Resolution of Sterile Inflammation: Role for Vitamin C." Mediators of Inflammation **2014**: 173403.

- Mohammed, B. M., B. J. Fisher, et al. (2013). "Vitamin C: A Novel Regulator of Neutrophil Extracellular Trap Formation." <u>Nutrients</u> **5**(8): 3131-3150.
- Nascimento, T. G. d., M. d. Andrade, et al. (2014). "Neutropenia: occurrence and management in women with breast cancer receiving chemotherapy." Revista Latino-Americana de Enfermagem 22: 301-308.
- OHNO, S., Y. OHNO, et al. (2009). "High-dose Vitamin C (Ascorbic Acid) Therapy in the Treatment of Patients with Advanced Cancer." <u>Anticancer Research</u> **29**(3): 809-815.
- Park, N.-Y., S.-K. Park, et al. (2011). "Long-term dietary antioxidant cocktail supplementation effectively reduces renal inflammation in diabetic mice." <u>British Journal of Nutrition</u> **106**(10): 1514-1521.
- Park, S. (2013). "The Effects of High Concentrations of Vitamin C on Cancer Cells." Nutrients **5**(9): 3496-3505.
- Putchala, M. C., P. Ramani, et al. (2013). "Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity A systematic review." <u>Archives of Oral Biology</u> **58**(6): 563-574.
- Santos, A. P., M. B. Bandeira, et al. (2009). "Comparação entre diversos métodos de contagem diferencial de leucócitos em pacientes leucopênicos." Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia **31**: 203-205.
- Shayne, M., E. Culakova, et al. (2007). "Dose intensity and hematologic toxicity in older cancer patients receiving systemic chemotherapy." <u>Cancer</u> **110**(7): 1611-1620.
- Suhail, N., N. Bilal, et al. (2012). "Effect of vitamins C and E on antioxidant status of breast-cancer patients undergoing chemotherapy." <u>Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics</u> **37**(1): 22-26.
- Theilgaard-Mönch, K., L. C. Jacobsen, et al. (2006). <u>Haptoglobin is synthesized</u> during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by <u>neutrophils in response to activation</u>.
- Vioral, A. N. and D. Wentley (2015). "Managing Oncology Neutropenia and Sepsis in the Intensive Care Unit." Critical Care Nursing Quarterly **38**(2): 165-174.
- Weycker, D., J. Edelsberg, et al. (2012). "Risk and Healthcare Costs of Chemotherapy-Induced Neutropenic Complications in Women with Metastatic Breast Cancer." <u>Chemotherapy</u> **58**(1): 8-18.
- Weycker, D., X. Y. Li, et al. (2014). "Risk of febrile neutropenia in patients receiving emerging chemotherapy regimens." <u>Supportive Care in Cancer</u> **22**(12): 3275-3285.

- Wilson, M. K., B. C. Baguley, et al. (2014). "Review of high-dose intravenous vitamin C as an anticancer agent." <u>Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology</u> **10**(1): 22-37.
- Ya-Qiang He, W.-T. Z., Chang-Hua Shi, Fang-Ming Wang, Xiao-Jun Tian, Lu-Lin Ma (2015). "Phloroglucinol Protects the Urinary Bladder Via Inhibition of Oxidative Stress and Inflammation in a Rat Model of Cyclophosphamide-induced Interstitial Cystitis." Chin Med J 128: 956-962.
- Ziepert, M., R. Schmits, et al. (2008). "Prognostic factors for hematotoxicity of chemotherapy in aggressive non-Hodgkin's lymphoma." <u>Annals of Oncology</u> **19**(4): 752-762.
- 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." <u>BMC</u> Infectious Diseases **6**: 55-55.

#### 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 efeito da suplementação de vitamina C sobre peso e leucograma 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). Com a aprovação do Comitê de Ética procedeu-se a reserva de animais experimentais no Biotério da UFPel.

Para desenvolvimento do experimento foi realizado curso de capacitação junto a Faculdade de Veterinária, intitulado Minicurso de Bioterismo e Experimentação Animal (Anexo).

Os camundongos fêmeas *Swiss* nasceram no dia 03/08/2015, foram desmamadas no dia 24/08/2015 e transferidos para o Laboratório Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas no dia 18/09/2015. O transporte dos animais do Biotério foi realizado em gaiolas, veículo e funcionários do Biotério de UFPel.

O experimento iniciou no dia 18 de setembro de 2015 e foi finalizado no dia 29 de setembro de 2015. No momento da chegada dos animais no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, os animais foram alocados em caixas moradia, com 4 animais cada, totalizados 8 caixas, todas etiquetadas. 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. Receberam ad libitum água e ração padrão para roedores marca Nuvilab® diariamente. O saco de ração foi aberto no primeiro dia da chegada dos animais ao laboratório e a quantidade diária foi porcionada em sacos plásticos para todos os dias do experimento. As gaiolas foram higienizadas diariamente, com troca da maravalha autoclavada e água fervida fria visando evitar qualquer tipo de contaminação durante o período de neutropenia.

No dia 23/09/2015, no turno da tarde, deu-se inicio ao modelo experimental. Os animais foram aleatoriamente alocados nos grupos controle (CT), ciclofosfamida (CLF), vitamina C (VIT C) e CLF + Vit C (Tratamento). Os animais foram identificados no rabo (I, II, III e IV) com caneta vermelha, sendo as marcar reforçadas diariamente, receberam ração e água *ad libitum*.

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

No dia 23 de setembro iniciaram-se as aplicações de ciclofosfamida, vitamina C e agua destilada conforme descrito abaixo:

Grupo CT: injeção de água destilada i.p. diariamente.

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

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

**Grupo CLF + VIT C:** injeção de ciclofosfamida i.p. (150 mg/kg no dia 1 e 100 mg/kg no dia 4) e injeção de vitamina C i.p. (50 mg/kg) diariamente.

Todos os animais foram pesados diariamente em balança digital (Marte<sup>®</sup> AD2000. Max: 2010g, Min: 0,5g), para cálculo das quantidades de CLF, Vit C e água destilada a serem administrados. O controle de peso diário também foi utilizado para verificação de alterações ponderais durante o experimento.

A CLF em pó, da marca Sigma-Aldrich, foi diluída em água destilada conforme orientação do produto (20mg/ml) em local apropriado no dia de sua administração. A aplicação 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. A vitamina C pó (Marca Synth), foi diluída em água destilada diariamente, momentos antes da administração (30 g/10 ml). O volume a ser administrado foi calculado após o peso diário de cada animal.

Ocorreu perda de 2 animais do grupo tratamento, um no dia 26 de setembro após a administração da CLF e outro no dia 28 de setembro de 2015, verificada no momento da troca da maravalha.

Os animais foram eutanasiados no dia 29/09/2015 (7º dia experimento). Previamente os camundongos foram anestesiados com xilazina 2% e cetamina 10%, após verificação de completa sedação, foram 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.

As amostras de sangue, após a punção cardíaca, foram acondicionadas em tubos com EDTA, homogeneizados e acondicionados sob refrigeração. Encaminhadas na mesma manhã ao Laboratório de Bioquímica Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, para realização das análises.

Inicialmente foi utilizado o sangue total e analisado concentração de células brancas utilizando o contador de células semi-automático Celm CC-530 (Celm), a amostra foi diluída com o diluidor automático Celm DA-500 (Celm). Para a contagem diferencial de leucócitos foram feitos esfregaços, e as lâminas coradas com Panótipo (Laborclin). A leitura foi realizada em microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon) com um aumento de 100x.

Após realização das análises procedeu-se a tabulação dos dados em planilhas do excel e em sequência, a análise estatística. Posterior a essas etapas deu-se início a escrita do artigo e estruturação da dissertação.

As análises dos parâmetros de ureia, creatinina e haptoglobina sérica prevista no projeto não foram realizadas, pois a quantidade de amostra de sangue coletada não foi suficiente para realização de as análises. Também não foi realizado o tratamento B, devido ao pequeno número de animais do experimento.

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.

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)

Efeito da suplementação de vitamina C sobre neutropenia induzida por

ciclofosfamida em camundongos.

Número de palavras: 4339

Número de figuras: 2

37

Efeito da suplementação de vitamina C sobre neutropenia induzida por ciclofosfamida em

camundongos.

Effect of Vitamin C supplementation on cyclophosphamide-induced neutropenia in mice.

Título resumido: Suplementação de vitamina C e neutropenia

Short title: Supplementation of vitamin C and neutropenia

Autores

Rosane Scussel Garcia\*1

Evelyn de Souza Araújo<sup>1</sup>

Simone Pieniz<sup>2</sup>

Augusto Schneider<sup>2</sup>

Renata Torres Abib<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas, mestranda 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.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas, professor do Programa de Pós Graduação Mestrado em

Nutrição e Alimentos. Pelotas/RS, Brasil.

Contribuição dos autores:

Todos autores contribuíram em todas etapas do trabalho e declaram não haver conflito de

interesse.

\* Autor para correspondência

Rosane Scussel Garcia, Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade

de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Campus Anglo, Rua Gomes Carneiro 1, CEP

96010-610, Pelotas, RS, Brasil, Tel.: 55 53 3921-1259;

E-mail: rosescuga@gmail.com.br

### Resumo

Efeito da suplementação de vitamina C sobre neutropenia induzida por ciclofosfamida em camundongos.

Introdução: A neutropenia é um efeito adverso ocasionado após a administração de ciclofosfamida, droga antineoplasica, usada para tratamento de diferentes neoplasias. A vitamina C é um micronutriente antioxidante e imunomodulador, mas pouco se sabe sobre sua ação frente à neutropenia. Objetivo: Avaliar a suplementação de Vitamina C sobre neutropenia induzida por ciclofosfamida (CLF) em camundongos. Material e método: O estudo foi realizado com a suplementação de vitamina C 50 mg/kg intraperitoneal (i.p) por 7 dias em camundongos fêmeas, Swiss albino, adultas, imunossuprimidas com CLF, divididos em quatro grupos com 8 animais cada: Grupo controle (água destilada i.p.), CLF (150 mg/kg i.p. no dia 1 e 100 mg/kg i.p. no dia 4), vitamina C (50 mg/kg i.p., diariamente) e CLF + vitC (Ciclofosfamida 250 mg/kg i.p. e vitamina C 50 mg/kg i.p). Resultados: O grupo CLF apresentou perda significativa de peso de 24% no dia 3 em relação ao grupo controle. Quando co-administradas a vitamina C e CLF houve uma interação significativa, ou seja, a vitamina C intensificou a diminuição de neutrófilos. A vitamina C não interferiu nos valores de leucócitos. Conclusão: Os resultados mostraram que a suplementação de vitamina C 50 mg/kg i.p. por 7 dias intensificou a neutropenia induzida por ciclofosfamida (250 mg/kg i.p.) e não preveniu a perda peso ponderal induzida por CLF em camundongos ao final do experimento biológico.

Descritores: ácido ascórbico; imunossupressão; quimioterápico;

### Abstract

Effect of Vitamin C supplementation on cyclophosphamide-induced neutropenia in mice.

Introduction: Neutropenia is a side effect caused after administration of cyclophosphamide, antineoplastic drug, used to treat different cancers. Vitamin C is an antioxidant and immunomodulatory micronutrient, but little known about its action against the neutropenia. Objectives: To evaluate the supplementation of Vitamin C on cyclophosphamide-induced neutropenia (CLF) in mice. Methods: The study was conducted with supplementation of vitamin C 50 mg/kg intraperitonial (i.p.) for seven days, female albino Swiss mice, adult, immunosuppressed with CLF, divided in four group of eight animals each: Control group (distilled water, i.p.), CLF (150 mg/kg i.p. on day 1 and 100 mg/kg i.p. on day 4), vitamin C (50 mg/kg i.p. daily) and CLF + VITC (Cyclophosphamide 250 mg/kg i.p. and vitamin C 50 mg/kg i.p.). Results: The CLF group showed significant weight loss of 24% on day 3 in the control group. When co-administered vitamin C and CLF there was a significant interaction, so, vitamin C enhanced the decrease in neutrophils. Vitamin C did not interfere with leukocyte values. Conclusion: The results showed that supplementation of vitamin C 50 mg / kg i.p. for 7 days intensified neutropenia induced by cyclophosphamide (250 mg/kg i.p.) and did not prevent the weight loss induced by CLF weight in mice at the end of the biological experiment.

**Keywords:** ascorbic acid; immunosuppression; chemotherapy;

Efeito da suplementação de vitamina C sobre a neutropenia induzida por ciclofosfamida em camundongos

### 1 Introdução

A ciclofosfamida (CLF) é uma droga antineoplasica, alquilante, atua em todas as fases do ciclo celular, usada para tratamento de vários tipos de neoplasias, entretanto é citotóxica, e um dos efeitos colaterais é a inibição aguda e transitória da medula óssea <sup>1</sup>. A mielossupressão, resultante da administração de CLF desencadeia a neutropenia, a qual é caracterizada pela diminuição do número de leucócitos totais e neutrófilos, os quais participam do sistema imune e inflamatório, responsáveis pelas defesas e frequentemente observada em humanos após a administração da CLF <sup>2, 3, 4</sup>. A neutropenia inicia principalmente no primeiro ciclo quimioterápico em função das altas doses administradas em pacientes e o risco cumulativo permanece alto ao longo do tratamento <sup>5</sup>. A utilização de nutrientes imunomoduladores tem sido estudado a fim de minimizar este efeito <sup>6</sup>.

A vitamina C é um micronutriente solúvel em água e de baixo custo <sup>7</sup>, sua administração intravenosa não é tóxica para as células normais <sup>8</sup> e pode restaurar concentrações plasmáticas por meio dessa administração <sup>9</sup>. Esta vitamina tem sido estudada por apresentar poder antioxidante <sup>10, 11, 12</sup>, porém, dependendo da concentração, pode se tornar uma molécula pró-oxidante <sup>13, 14.</sup>

A suplementação de vitamina C em combinação com agentes citotóxicos, em modelos experimentais com CLF <sup>10, 12</sup>, com cisplatina <sup>15, 16</sup>, e em células cancerosas *in vitro*. <sup>17, 18</sup>, têm apresentado resultados controversos a respeito do seu benefício. Estudos realizados, avaliando a suplementação de vitamina C e E sobre a nefrotoxicidade da cisplatina intraperitoneal (i.p.) em camundongos machos *Swiss* albino, concluíram que a vitamina C apresenta ação nefroprotetora, sendo mais eficaz do que a vitamina E <sup>19, 20</sup>, o que indica que a suplementação de vitaminas antioxidantes pode trazer benefícios quando administrada sem conjunto com agentes quimioterápicos.

Em humanos, um estudo realizado por Vollbracht et al. <sup>21</sup>, testou a administração intravenosa de 7,5 g de vitamina C por semana, durante o período de quatro semanas em pacientes com câncer de mama em tratamento complementar de radioterapia, quimioterapia e hormônioterapia, e evidenciou que houve uma diminuição dos efeitos colaterais no tratamento antineoplásico, porém seu efeito sobre a neutropenia ainda não foi elucidado. Em recente revisão sobre o papel da viatmina C oral ou intravenosa em paciente com câncer, os autores concluíram que ainda não há evidências suficientes que comprovem seu benefício <sup>22</sup>.

Além do seu efeito bioativo sobre o estado redox celular, a vitamina C tem sido estudada por sua influência na função imunológica, atuando diretamente sobre as células T em modelos experimentais <sup>23, 24</sup>. Em função do seu potencial imunomodulador e antioxidante, a suplementação desta vitamina foi estudada em parâmetros hematológicos com o inseticida Chlorpyrifos (exposição que pode ocasionar toxicidade hematológica). O experimento biológico foi realizado com ratos adultos *Wistar*, Chlorpyrifos (10,6 mg/kg diariamente), e vitamina C (100 mg/kg por gavagem uma vez por dia por 17 semanas). Os resultados obtidos no estudo evidenciaram que a vitamina C foi capaz de atenuar o efeito do Chlorpyrifos em relação aos glóbulos brancos, linfócitos e neutrófilos. Este fato pode ser devido à propriedade antioxidante deste micronutriente frente à lipoperoxidação das membranas celulares. Porém os mecanismos de ação ainda não estão completamente elucidados <sup>25</sup>.

Ainda existem controvérsias em relação à vitamina C e o seu possível efeito benéfico frente à toxicidade de agentes antineoplásicos, portanto, diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação de vitamina C em modelo de imunossupressão e perda ponderal induzida por CLF em camundongos.

### 2 Materiais e métodos

### 2.1 Considerações éticas e modelo biológico

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

Foi realizado um ensaio biológico de 12 dias (5 dias de adaptação e 7 de tratamento), com 32 camundongos fêmeas, *Swiss* albino, adultos jovens (45 dias), com peso inicial variando entre 21,76 a 34,38g, e peso médio de 28,65 ± 2,99g, obtidas do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram identificados por grupos, alocados em gaiolas, medindo de 27x19x20 cm, comedouro tipo túnel e bebedouro de polipropileno com capacidade para 300 ml. As gaiolas foram transferidas para gabinete ventilado onde os animais permaneceram por cinco 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 receberam diariamente água e ração padrão *ad libitum* para roedores marca Nuvilab<sup>®</sup>. As gaiolas foram higienizadas diariamente, a troca da maravalha autoclavada e água fervida fria foram cuidados tomados visando evitar qualquer tipo de contaminação dos animais durante o período de neutropenia e proporcionar bem-estar aos modelos experimentais.

Os animais foram divididos em quatro grupos constituídos por oitos animais cada: controle (água destilada), CLF (250 mg/kg), vitamina C (50 mg/kg) e Vitamina C + CLF (CLF

250 mg/kg e vitamina C 50 mg/kg). O controle de peso foi executado diariamente em balança digital (Marte<sup>®</sup> AD2000. Max: 2010g, Min: 0,5g), para o cálculo da quantidade de água destilada, vitamina C e CLF a serem administradas. O de peso diário também foi utilizado para verificação de alterações ponderais durante o experimento.

### 2.2 Modelo experimental de imunossupressão e tratamento

A imunossupressão induzida por CLF foi realizada de acordo com modelo previamente descrito por Zuluaga et al.<sup>26</sup>, administração de 250 mg/kg de CLF i.p. (150 mg/kg no primeiro dia da indução do modelo e 100 mg/kg no quarto dia).

A CLF pó (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) foi diluída em água destilada conforme orientação do fabricante para o produto (20mg/mL), em local apropriado no dia de sua administração. A CLF foi aplicada por injeção intraperitoneal no primeiro e no quarto dia do experimento, cada animal recebeu volume de CLF proporcional ao peso.

O tratamento foi realizado com vitamina C pó (Marca Synth®), 50 mg/kg i.p.. A Vitamina C (Vit C) foi diluída em água destilada, aplicada 50mg/kg de peso do animal, a cada 24 horas, durante seis dias consecutivos. O volume de solução a ser administrada foi recalculado diariamente, após pesagem de cada animal. Os animais foram eutanasiados no sétimo dia.

## 2.3 Coleta de sangue e análise bioquímica

Ao final do ensaio biológico os animais foram submetidos a jejum por 6 horas, para posterior eutanásia. Foi realizada sedação com cetamina 10% e xilazina 2% conforme peso de cada animal, após verificação de completa sedação, conforme Resolução Normativa N° 12, de 20 de setembro de 2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca. As amostras de sangue foram acondicionadas logo após a punção em tubos contendo EDTA, homogeneizados, acondicionados sob refrigeração e transferidas ao laboratório para análises bioquímicas.

As análises bioquímicas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Bioquímica Animal da Faculdade de Veterinária da UFPel. Para análise do leucograma foi utilizado o sangue total e analisada concentração de células brancas utilizando o contador de células semi-automáticoCelmCC-530 (Celm). A amostra foi diluída em diluidor automático Celm DA-500 (Celm). Para o diferencial de leucócitos foram realizados esfregaços, e as lâminas coradas com Panótipo (Laborclin). A leitura foi realizada em microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon) com um aumento de 100x.

### 2.4 - Análise estatística

Os resultados foram expressos em média e erro padrão (EP). A normalidade foi verificada para cada variável para utilização de testes apropriados. A *ANOVA* de duas vias foi usada para verificar diferença estatística e interações entre os grupos, estabelecido nível de significância de 5%. Onde foi observada interação, foi realizado *teste t de Student* entre os grupos. Foi usado o software *GraphPad*® para as análises.

### 3 Resultados

### 3.1 Controle de peso ponderal ao longo do tratamento

Por meio dos resultados obtidos observou-se que no primeiro dia e segundo dia do ensaio biológico não houve alteração significativa no peso dos animais (p=0,20 e p=0,08 respectivamente). Porém, do terceiro dia ao sétimo dia no modelo utilizado, houve diferença significativa (p<0,05) de perda de peso entre o grupo CLF e o grupo controle (perda de 24%; 14%, 15%, 18% e 19% respectivamente). No terceiro dia o grupo CLF e grupo Vit C + CLF apresentaram perda de aproximadamente 24% (p<0,01) e 7% (p<0,05) em relação ao grupo controle, o que aponta uma interação significativa da vitamina C com a CLF (p=0,001). No sétimo dia, o peso dos animais do grupo Vit C + CLF não diferiu significativamente com o grupo CLF (p=0,97), porém ambos apresentaram valores significativamente menores em relação ao grupo controle (p=0,02; Figura 1).

### 3.2 Parâmetros hematológicos ao final do tratamento

Ao final do ensaio biológico (sétimo dia), houve diferença significativa na contagem de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos nos grupos que receberam ciclofosfamida (p<0,01; fator ciclofosfamida). A CLF acarretou neutropenia, redução de 97% no número de neutrófilos em relação ao grupo controle, e a vitamina C *per se* diminuiu os neutrófilos significativamente, porém não acarretou neutropenia. Quando co-administradas a vitamina C e CLF houve uma interação significativa, ou seja, a vitamina C intensificou a diminuição de neutrófilos. A vitamina C quando administrada com a CLF não interferiu nos valores de leucócitos, monócitos e linfócitos (Figura 2).

### 4 Discussão

No presente estudo, a administração de CLF (250 mg/kg i.p.) foi capaz de desenvolver neutropenia, observada com a diminuição severa de neutrófilos, e também promoveu perda de peso ao longo do ensaio biológico, sendo verificada maior perda de peso no terceiro dia. A vitamina C não se mostrou eficaz na prevenção da neutropenia e quanto ao peso, no terceiro dia o grupo Vit C + CLF parece ter atenuado a perda, porém ao final do tratamento não foi efetiva.

### 4.1 Ciclofosfamida e neutropenia

Segundo Zuluaga et al., (2006) a neutropenia aguda caracteriza-se pela contagem total de neutrófilos inferior a 100 U/mm³, e quando menor ou igual a 10 U/mm³ é considerada severa. Em seu modelo experimental, com camundongos fêmeas, *Swiss* albino, para indução de neutropenia, com 250 mg/kg i.p. de CLF, estes autores verificaram uma redução de 84% nos valores de leucócitos totais no quarto dia, sendo que o declínio iniciava no primeiro dia após a administração da CLF e o início da recuperação destas células no sexto dia. Estudo recente conduzido por Xu, et al. <sup>27</sup>, com camundongos machos adultos e administração de CLF 150 mg/kg i.v., observaram que o número de leucócitos começava a diminuir no primeiro dia após a indução, atingiram valores mínimos no terceiro dia e aumentava gradualmente a partir do sétimo dia. Este resultado corrobora com os encontrados no presente estudo, pois no sétimo dia após a indução do modelo, os leucócitos estavam significativamente menores (56%) que o grupo controle, indicando que o modelo de imunossupressão foi efetivo, porém a suplementação de vitamina C não influenciou na contagem total de leucócitos.

Este ensaio biológico, com a administração de CLF 250 mg/kg i.p., apresentaram redução de 56% nos leucócitos totais e 38% nos linfócitos, após 7 dias de tratamento. Fang, et al. <sup>29</sup>, em estudo com camundongos *Balb/c*, adultos, indução tóxica por acrilamida intragástrica, CLF uma dose de 200 mg/Kg i.p e tratamento de 30 dias, verificaram redução de 53% nos leucócitos e 94% nos linfócitos do grupo controle em relação ao grupo CLF, resultados de linfócitos diferentes deste estudo. Também, Liu et al. <sup>30</sup> evidenciaram resultados diferentes, uma diminuição significativa no número total de glóbulos brancos (76%) após 10 dias da infusão de CLF 40 mg/kg/dia por três dias e radioterapia 2.0 Grey. Estas diferenças podem ser explicadas pela dose diferente de quimioterápico administrado, combinação com outras terapias e tempo exposição.

### 4.2 Ciclofosfamida, Vitamina C e neutropenia

Os resultados do presente estudo demonstraram redução no número de neutrófilos (97%) no grupo CLF em relação ao controle. Com relação à vitamina C per se na quantidade de 50 mg/kg houve diminuição significativa em relação ao controle, porém esta diminuição foi menor do que a encontrada no grupo CLF. Quando co-adminstrada a vitamina e a CLF, houve intensificação da neutropenia. Esta diminuição de leucócitos talvez pudesse ser diferente, se a vitamina C fosse administrada por um período anterior e/ou posterior ao tratamento da neutropenia ocasionada pela CLF.

Estudo conduzido por Miranda-Vilela et al. <sup>28</sup>, testou doses via oral no limite recomendado de β-caroteno (25 mg), vitamina C (1000 mg) e vitamina E (1.200 UI) por 10

dias consecutivos em camundongos fêmeas, *Swiss*, albino, adultos expostos a doses semanais de 20 mg/m² do quimioterápico doxorubicina, em modelo com indução de tumor. Este estudo corrobora com o resultado encontrado no presente estudo, no qual os leucócitos totais, os linfócitos e os neutrófilos não sofreram influência da vitamina C comparados ao controle nos animais com e sem tumor.

Vetvicka et al. <sup>31</sup>, em um experimento com camundongos fêmeas BALB/c adultas infectados com células de carcinoma de pulmão e tratados com CLF i.p. (30 mg/kg) aplicada no oitavo dia após indução do tumor, testaram diferentes doses de imunomoduladores antioxidante naturais incluindo glucano, resveratrol e vitamina C, não encontraram efeito isolado, porém a combinação dos três mostrou-se efetivo contra as células tumorais. Também estudo publicado recentemente, com coquetel vitamínico constituído por vitamina E, C e K3 em linhagem celular de melanoma, sugere que doses supra fisiológicas podem ser eficazes na quimioprevenção *in vitro*<sup>32</sup>. Isto indica que, possivelmente, o efeito que encontrado com a suplementação de vitamina C isolada pode ser diferente de quando co-administrada a outras vitaminas.

## 4.3 Ciclofosfamida, vitamina C e peso ponderal

Além da neutropenia, outra consequência da utilização de CLF em camundongos está relacionada à perda de peso ponderal <sup>29</sup>. A suplementação de vitamina C (50mg/kg) em camundongos no presente estudo não atenuou a neutropenia e/ou a perda de peso induzida por ciclofosfamida (250 mg/kg) após o sétimo dia de tratamento. Entretanto, essa perda ponderal foi mais gradativa do que o efeito agudo observado no grupo que não recebeu a vitamina. Esta perda significativa de peso observada pode ter ocorrido devido aos efeitos colaterais da droga, como náuseas e/ou vômitos resultando em anorexia, porém estes sintomas não foram avaliados.

Um estudo recente que avaliou camundongos BALB/c fêmeas, adultas, expostas a acrilamida, utilizando como controle positivo a CLF 200 mg/kg i.p., mostrou que os animais tratados com o quimioterápico apresentaram uma redução significativa de peso de aproximadamente 7% quando comparado o grupo controle negativo (sem a CLF) após 30 dias <sup>29</sup>. No presente estudo, usando 250 mg/kg de CLF houve redução de aproximadamente 19% do peso no sétimo dia. Esta diferença pode ser explicada uma vez que o tempo analisado foi diferente, sendo assim, o peso pode ter sido recuperado após o período NADIR (menor valor de contagem hematológica), em que os animais encontram-se mais debilitados.

Perda de peso significativa também foi encontrada por Liu et al. <sup>30</sup>, em estudo conduzido em camundongos Balb/c machos e fêmeas adultos, os quais foram submetidos a CLF i.p. (40 mg/kg) e radioterapia para induzir a mielossupressão. Observou-se que após 10

dias, houve uma redução de aproximadamente 30% no peso dos animais comparados ao grupo controle. Esta perda aumentada em relação aos resultados do presente estudo pode ser devido à soma dos efeitos da radio e quimioterapia. Perda de peso ponderal também foi encontrada no estudo de Merwid-Ląd et. al. <sup>33</sup>, realizado com ratos fêmeas/machos adultos da linhagem *Wistar*, onde foi testada a CLF na dose de 15 mg/kg por 10 dias consecutivos. No estudo foi observado uma perda de peso de aproximadamente 68% comparado ao grupo controle, sendo que esta perda pode estar relacionada aos efeitos colaterais como mucosite e desidratação, ou ainda, pode ter sido causada em função de a droga ter sido aplicada diariamente, diferente do modelo utilizado no presente estudo.

### 5 Conclusão

A suplementação de vitamina C 50 mg/kg por 7 dias intensificou a neutropenia induzida por ciclofosfamida (250 mg/kg i.p.) e não preveniu a perda ponderal induzida por CLF em camundongos fêmeas de 45 dias. Entretanto, mais estudos são necessários com a suplementação desta vitamina por um período superior, em outras concentrações e coadministradas com outros antioxidantes.

O desenvolvimento de novos conhecimentos para atenuar a toxicidade das drogas antineoplasicas representa uma área de grande interesse e entre eles está à terapia nutricional com base em nutrientes imunomoduladores e antioxidantes.

### Limitações do estudo

Este trabalho apresentou como limitações a duração e o período do tratamento com a vitamina C; o controle de ingestão ao longo do tratamento, que justificaria as alterações de peso encontradas, bem como o controle dos efeitos colaterais. Além disso, o monitoramento de marcadores anti-inflamatórios, como interleucinas e TNF alfa, e antioxidantes endógenos durante a imunossupressão poderiam auxiliar no entendimento dos mecanismos fisiológicos relacionados a perda de peso e imunidade neste modelo.

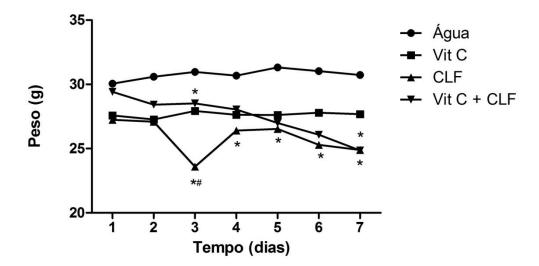
### 6 Referências

- 1. Ministério da Saúde INCA. Quimioterapia. www.inca.gov.br/conteudo\_view.asp?ID=101. 2015.
- 2. Hurvitz S, Guerin A, Brammer M, Guardino E, Zhou ZY, Viau DL, et al. Investigation of Adverse-Event-Related Costs for Patients With Metastatic Breast Cancer in a Real-World Setting. Oncologist. 2014; 19(9): 901-8.

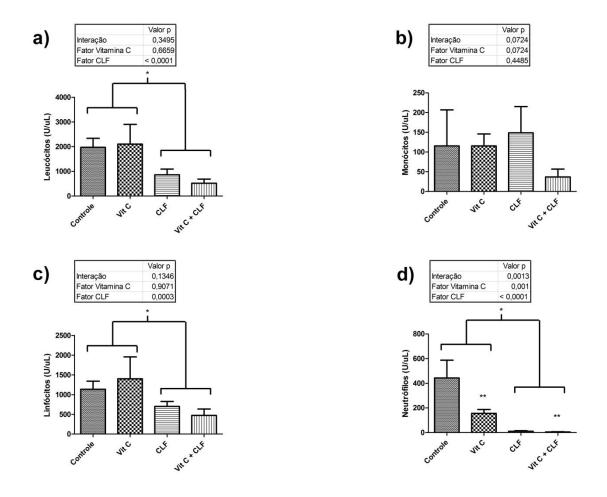
- 3. Madrid C, Díaz L, Combariza J, Gálvez K, Olaya V, Ramírez I, et al. Epidemiología de laneutropenia febril en pacientes adultos con neoplasia hematológica, enun período de 26 meses enel Hospital Pablo Tobón Uribe, Colombia. Revista chilena de infectología. 2013; 30: 195-201.
- 4. Weycker D, Edelsberg J, Kartashov A, Barron R, Lyman G. Risk and Healthcare Costs of Chemotherapy-Induced Neutropenic Complications in Women with Metastatic Breast Cancer. Chemotherapy. 2012; 58(1): 8-18.
- 5. Culakova E, Poniewierski MS, Wolff DA, Dale DC, Crawford J, Lyman GH. The impact of chemotherapy dose intensity and supportive care on the risk of febrile neutropenia in patients with early stage breast cancer: a prospective cohort study. Springer Plus. 2015; 4: 396. PubMed PMID: PMC4524886.
- 6. Li X, Sun W-J. The clinical activity of arsenic trioxide, ascorbic acid, ifosfamide and prednisone combination therapy in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. Onco Targets and therapy. 2015; 8: 775-81. PubMed PMID: PMC4399549.
- 7. Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. Biochim Biophys Acta. 2012; 1826 (2): 443-57.
- 8. Lee W-J. The Prospects of Vitamin C in Cancer Therapy. Immune Network. 2009; 9(5): 147-52. PubMed PMID: PMC2816948.
- 9. Wilson MK, Baguley BC, Wall C, Jameson MB, Findlay MP. Review of high-dose intravenous vitamin C as an anticancer agent. Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology. 2014; 10(1): 22-37.
- 10. Farshid AA, Tamaddonfard E, Ranjbar S. Oral administration of vitamin C and histidine attenuate cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. Indian Journal of Pharmacology. 2013 Mar-Apr; 45(2): 126-9. PubMed PMID: PMC3660922.
- 11. 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 ovarium. Nutrition. 2013; 29(5): 777-84.
- 12. Song J, Liu L, Li L, Liu J, Song E, Song Y. Protective effects of lipoic acid and mesna on cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. Cell Biochemistry and Function. 2014; 32(2): 125-32.
- 13. Putchala MC, Ramani P, Sherlin HJ, Premkumar P, Natesan A. Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity A systematic review. Archives of Oral Biology. 2013; 58(6): 563-74.
- 14. F. Ullah M, H. Bhat S, Hussain E, Abu-Duhier F, Ahmad A, M. Hadi S. Ascorbic Acid in Cancer Chemoprevention: Translational Perspectives and Efficacy. Current Drug Targets. 2012; 13(14): 1757-71.

- 15. Atasayar S, Gürer-Orhan H, Orhan H, Gürel B, Girgin G, Özgüneş H. Preventive effect of aminoguanidine compared to vitamin E and C on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Experimental and Toxicologic Pathology. 2009; 61(1): 23-32.
- 16. Chen M-F, Yang C-M, Su C-M, Hu M-L. Vitamin C Protects Against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity and Damage Without Reducing Its Effectiveness in C57BL/6 Mice Xenografted With Lewis Lung Carcinoma. Nutrition and Cancer. 2014; 66(7): 1085-91.
- 17. Park S. The Effects of High Concentrations of Vitamin C on Cancer Cells. Nutrients. 2013; 5(9): 3496-505. PubMed PMID: doi:10.3390/nu5093496.
- 18. Uetaki M, Tabata S, Nakasuka F, Soga T, Tomita M. Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin C-induced oxidative stress. Scientific Reports. 2015; 5:13896. PubMed PMID: PMC4563566.
- 19. Ajith TA, Usha S, Nivitha V. Ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: a comparative study. Clinica Chimica Acta. 2007; 375(1–2): 82-6.
- 20. Maliakel DM, Kagiya TV, Nair CKK. Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by glucosides of ascorbic acid and α-tocopherol. Experimental and Toxicologic Pathology. 2008; 60(6): 521-7.
- 21. Vollbracth C, Schneider B, Leendert V, Weiss G, Auerbach L, Beuth J. Intravenous Vitamin C Administration Improves Quality of Life in Breast Cancer Patients during Chemo-/Radiotherapy and Aftercare: Results of a Retrospective, Multicentre, Epidemiological Cohort Study in Germany. In Vivo. 2011 November 1, 2011; 25(6): 983-90.
- 22. Jacobs C, Hutton B, Ng T, Shorr R, Clemons M. Is There a Role for Oral or Intravenous Ascorbate (Vitamin C) in Treating Patients With Cancer? A Systematic Review. The Oncologist. 2015; 20(2): 210-23. PubMed PMID: PMC4319640.
- 23. Noh K, Lim H, Moon S-k, Kang JS, Lee WJ, Lee D, et al. Mega-dose Vitamin C modulates T cell functions in Balb/c mice only when administered during T cell activation. Immunology Letters. 2005; 98(1): 63-72.
- 24. Badr G, Bashandy S, Ebaid H, Mohany M, Sayed D. Vitamin C supplementation reconstitutes polyfunctional T cells in streptozotocin-induced diabetic rats. European Journal of Nutrition. 2012; 51(5): 623-33. English.
- 25. Ambali SF, Ayo JO, Esievo KAN, Ojo SA. Hemotoxicity Induced by Chronic Chlorpyrifos Exposure in Wistar Rats: Mitigating Effect of Vitamin C. Veterinary Medicine International. 2011; Article ID 945439, 7 pages.doi:10.4061/2011/945439.
- 26. 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 Infectious Diseases. 2006; 6:55-. PubMed PMID: PMC1434751.

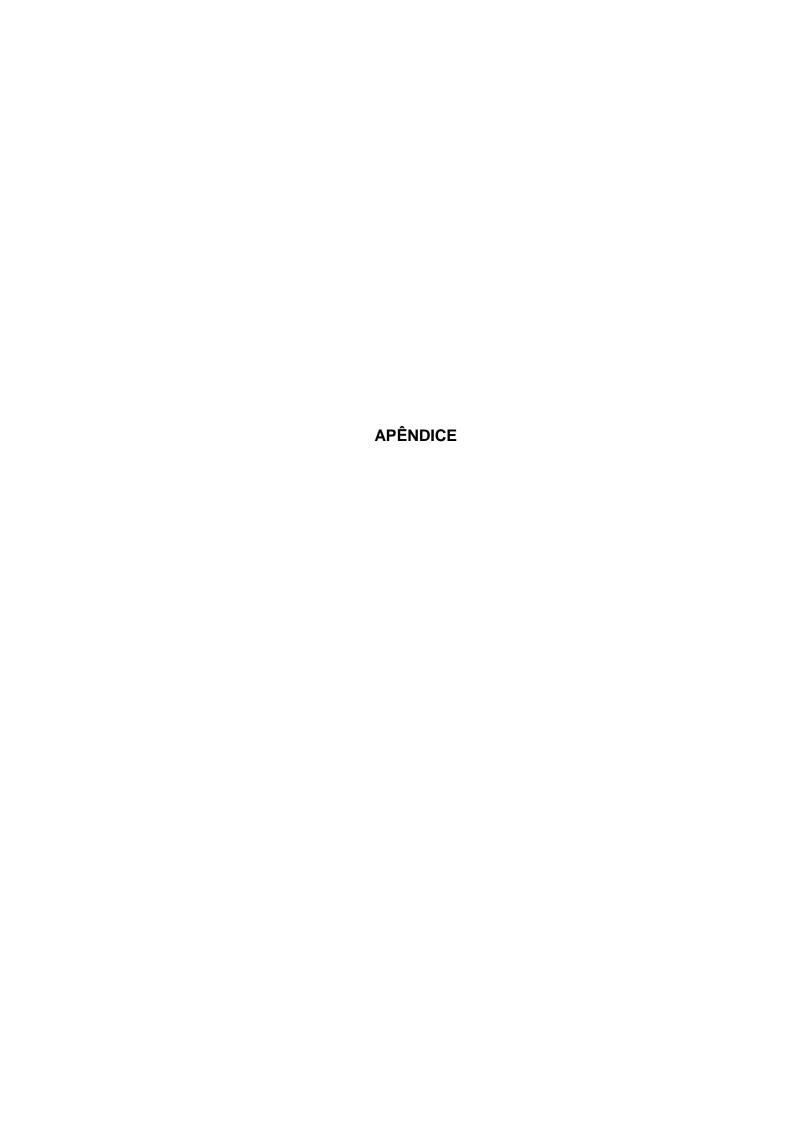
- 27. Xu M, He R-R, Zhai Y-J, Abe K, Kurihara H. Effects of Carnosine on Cyclophosphamide-Induced Hematopoietic Suppression in Mice. The American Journal of Chinese Medicine. 2014; 42(01): 131-42.
- 28. Miranda-Vilela AL, Grisolia CK, Longo JPF, Peixoto RCA, de Almeida MC, Barbosa LCP, et al. Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations. Journal of Nutritional Biochemistry. 2014; 25(11): 1161-76.
- 29. Fang J, Liang CL, Jia XD, Li N. Immunotoxicity of Acrylamide in Female BALB/c Mice. Biomedical and Environmental Sciences. 2014; 27(6): 401-9.
- 30. Liu M, Tan H, Zhang X, Liu Z, Cheng Y, Wang D, et al. Hematopoietic effects and mechanisms of Fufang E'jiao Jiang on radiotherapy and chemotherapy-induced myelosuppressed mice. Journal of Ethnopharmacology. 2014; 152(3): 575-84.
- 31. Vetvicka V, Vetvickova J. Combination of Glucan, Resveratrol and Vitamin C Demonstrates Strong Anti-tumor Potential. Anticancer Research. 2012 January 1, 2012; 32(1): 81-7.
- 32. Tremante E, Santarelli L, LoMonaco E, Sampaoli C, Ingegnere T, Guerrieri R, et al. Sub-apoptotic dosages of pro-oxidant vitamin cocktails sensitize human melanoma cells to NK cell lysis. Oncotarget. 2015; 6(31).
- 33. Merwid-Ląd A, Ksiądzyna D, Hałoń A, Chlebda-Sieragowska E, Trocha M, Szandruk M, et al. Impact of morin-5'-sulfonic acid sodium salt on cyclophosphamide-induced gastrointestinal toxicity in rats. Pharmacological Reports. 2015; 67(6): 1259-



**Figura 1** – Evolução ponderal de peso ao longo dos 7 dias de ensaio biológico em camundongos fêmeas *Swiss* adultas (n=8 por grupo). \*p<0,05 com relação ao controle (teste t). #p=0,001 (fator interação, ANOVA 2 vias). Pelotas, 2015.



**Figura 2** – Leucograma após 7 dias de ensaio biológico, leucócitos (a), monócitos (b), linfócitos (c), neutrófilos (d) em camundongos fêmeas *Swiss* adultas (n=8 por grupo). Resultados expressos em média ± EP. ANOVA de 2 vias. \*diferença significativa no Fator Ciclofosfamida, \*\* diferença significativa Fator Vitamina C. Pelotas, 2015.



Apêndice A - Termo de Autorização para inserir Trabalho Acadêmico na Base de Dados da UFPel



Data: ...../...../...../



# Universidade Federal de Pelotas – UFPel Sistema de Bibliotecas - SISBI **Biblioteca Digital**

AUTORIZAÇAO			
Nome do autor: Rosane Scussel Garcia			
CPF: 44345305004  Currículo Lattes: Sim (x) Não ()  E-mail: rosescuga@gmail.com  Título: Efeito da suplementação de vitamina C sobre neutropenia induzida por ciclofosfamida em			
camundongos.			
Orientador: Renata Torres Abib CPF: 00863219004 Currículo Lattes: Sim (x) Não () E-mail: renata.abib@ymail.com			
Co-orientador: Simone Pieniz			
CPF: 95715649072			
Currículo Lattes: Sim (x) Não ( ) E-mail: nutrisimone@yahoo.com.br			
Co-orientador: Augusto Schneider			
CPF: 01083267051 Currículo Lattes: Sim (x) Não ( ) E-mail: augustoschneider@gmail.com			
Agência de fomento: ( ) CNPq – ( ) Capes - ( ) Fapergs - ( ) Outra:			
Autorizo a Universidade Federal de Pelotas, através da <b>Biblioteca Digital</b> , a disponibilizar gratuitamente em seu web site, sem ressarcimento dos direitos autorais, o texto integral (ou parte) da dissertação/tese de minha autoria em formato PDF1, para fins de leitura e/ou impressão pela internet, a título de divulgação da produção científica gerada pela UFPel, a partir desta data. Caso parte do trabalho seja de conteúdo restrito, favor comunicar quais partes não terão acesso público.			
Assinatura do autor Assinatura do coordenador			





Pelotas, 13 de julho de 2015

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

Presidente da Comissão 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 ciclofosfamida", processo imunossupressão induzida por com 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 muscullus/Swiss

Nº de animais: 40 Idade: 45 dias Sexo: Fêmeas

Origem: Biotério Central/UFPel

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Lachur

Presidente da CEEA

	Ciente em:	/_	/201
Assinatura do Professor Responsável:			



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS FACULDADE DE VETERINÁRIA



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que Rosane Scussel Garcia participou como ouvinte do evento intitulado "Minicurso de Bioterismo e Experimentação Animal", totalizando 8 horas.

Pelotas/UFPel, 26 de setembro de 2015.

Prof., Dra. Marcia de Oliveira Nobre Departamento de Clínicas Veterinárias

Faculdade de Veterinária - UFPEL

Coordenadora CLINPET

M.V..Dra. Anelize de Oliveira Campello F Chefe do Biotério Central - UFPel Coordenadora Adjunta CLINPET Faculdade de Veterinária - UFPEL