

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Avaliação do efeito do uso de menadiona e ácido ascórbico associadas ao ferro  
em células tumorais de linhagem 4T1 e leucócitos *in vitro*

LUIZ RICARDO SOLDI

Uberaba  
2019

LUIZ RICARDO SOLDI

Avaliação do efeito do uso de menadiona e ácido ascórbico associadas ao ferro em células tumorais de linhagem 4T1 e leucócitos *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Básica Experimental, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari

Uberaba

2019

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

S67a Soldi, Luiz Ricardo  
Avaliação do efeito do uso de menadiona e ácido ascórbico associadas ao ferro em células tumorais de linhagem 4T1 e leucócitos *in vitro* / Luiz Ricardo Soldi. -- 2019.  
46 f. : il., fig., graf.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019  
Orientador: Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari

1. Neoplasias mamárias. 2. Ácido ascórbico. 3. Vitamina K 3.  
4. Ferro. I. Portari, Guilherme Vannucchi. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.19-006

LUIZ RICARDO SOLDI

Avaliação do efeito do uso de menadiona e ácido ascórbico associadas ao ferro em células tumorais de linhagem 4T1 e leucócitos *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Básica e Experimental, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

04 de abril de 2019.

Banca Examinadora:

---

Professor Dr. Guilherme Vannucchi Portari

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Professor Dr. Marcelo José Barbosa Silva

Universidade Federal de Uberlândia

---

Professora Dra. Fernanda Bernadelli de Vito

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

A todos que contribuíram com este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Guilherme Portari pela oportunidade, paciência, orientação e ensinamentos que levarei para a vida toda.

Gostaria de agradecer a coordenadora da Pós-graduação Prof. Dra. Márcia Michelin por permitir o uso do IPON bem como a colaboração de seus alunos durante o desenvolvimento do projeto.

Aos colegas do laboratório Alisson, Renata e Katia por todo o apoio e amizade. Aos meus familiares, nada disso seria possível sem vocês.

À CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

*Marie Curie*

## Resumo

**Introdução:** O estudo apresentado avaliou o potencial do uso de uma combinação consistindo de ácido ascórbico (AA)/menadiona (Men) associado ao ferro (Fe) como agentes indutores de estresse oxidativo em células tumorais. Células tumorais de câncer de mama de linhagem 4T1 e leucócitos humanos provenientes do sangue periférico foram utilizados como amostras e tratadas in vitro em meio RPMI incompleto por períodos de tempo de 1 hora e 4 horas. O uso de sangue periférico humano foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa sob protocolo 1525. **Métodos:** As amostras foram divididas em grupos controle, grupo ácido ascórbico/menadiona, grupo ácido ascórbico/menadiona/ferro. Após serem tratadas, foi realizada análises para atividade de catalase, quantificação de malonaldeído, concentração de tióis não proteicos e análise de morte celular por citometria de fluxo com marcação de anexina V/iodeto de propídeo. **Resultados:** Células de linhagem 4T1 apresentaram elevada atividade de catalase e concentração de tióis não proteicos ( $p < 0,05$ ) em grupos tratados com AA+Men+Fe com tratamento de duração de 1 hora. Leucócitos apresentaram uma diminuição na atividade de catalase nos grupos AA+Men e AA+Men+Fe ( $p < 0,05$ ) em ambos as durações de tratamento, enquanto tióis não proteicos apresentaram-se elevados no grupo AA+Men+Fe com tratamento de duração de 4 horas. Células em processo de morte por apoptose, necrose/autoschizis foram encontrados em maior quantidade em células dos grupos AA+Men enquanto nos grupos AA+Men+Fe houve uma melhor sobrevida celular. **Conclusão:** Tratamentos utilizando ácido ascórbico e menadiona são métodos adequados para aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e provocar morte celular em células tumorais enquanto o uso de ferro em conjunto provocou um aumento da sobrevida celular.

**Palavras-chave:** Ácido ascórbico. Menadiona. Ferro. Cancer de mama.



## Abstract

**Introduction:** The current study aimed to evaluate the use of a combination consisting of ascorbic acid/menadione associated with iron as a generator of oxidative stress in tumor cells. 4T1 breast cancer tumor cells and human peripheral blood leukocytes were utilized as samples and treated *in vitro* in RPMI incomplete medium. **Methods:** The samples were separated into control, ascorbic acid (AA)/Menadione (Men) and AA+Men+Iron groups. After treatment, the cells were tested for catalase activity, malondialdehyde (MDA) quantification, non-protein thiols concentration, and cell death analysis by flow cytometry with annexin V/propidium iodide (P.I.) staining. **Results:** 4T1 cells presented increased catalase activity and non-protein thiols concentration ( $p < 0.05$ ) in the iron associated group after a 1-hour treatment. Human leukocytes presented a decrease in catalase activity in both the AA+Men and iron associated groups ( $p < 0.05$ ) in both treatment durations, while presenting a large quantity of non-protein thiols ( $p < 0.05$ ) in the iron associated group during a 4-hour treatment. Cells suffering apoptosis, necrosis/ autophagy were encountered in larger quantities in the vitamin-only treated groups while cellular survival was noted to be improved in the iron associated groups. **Conclusion:** Treatment utilizing ascorbic acid and menadione is a suitable method to increase reactive oxygen species production and increase tumor cell death while the use of iron increased cellular survival.

**Keywords:** Ascorbic acid, Menadione, Iron, Breast cancer

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 -	Atividade de Catalase ( $\kappa$ ) por miligrama de proteína	24
Figura 2 -	$\mu$ Mols de malondialdeído (MDA) encontrados por cromatografia líquida de alta eficiência	25
Figura 3 -	Tióis não proteicos em nMols/mg de proteína	25
Figura 4 -	Citometria de fluxo realizada em células linhagem 4T1 após tratamento	26
Figura 5 -	Citometria de fluxo realizada em leucócitos provenientes do sangue periférico após tratamento	27
Figura 6 -	Apresentação da reação conhecida de um tratamento com ácido ascórbico e menadiona, resultado esperado quando se adiciona ferro, resultados obtidos.	28

## LISTA DE ABREVIações

<b>AA</b>	Ácido ascórbico
<b>MDA</b>	Menadiona
<b>Fe</b>	Ferro
<b>RPMI</b>	Meio de cultura 'Rosa Parks Medical Institute'
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>CTLs</b>	Linfócitos citotóxicos CD8+
<b>NK</b>	Células <i>Natural Killer</i>
<b>MHC</b>	Complexo de histocompatibilidade principal
<b>Inca</b>	Instituto Nacional de Câncer
<b>R.E.</b>	Receptor de estrogênio
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>HER-2</b>	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
<b>HEPES</b>	Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etano-Sulfônico
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>Cat</b>	Catalase
<b>GPx</b>	Glutathiona Peroxidase
<b>GSH</b>	Glutathiona
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína

<b>P.I.</b>	Protocolo de propócio
<b>CEP</b>	Conselho de ética em pesquisa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 CÂNCER.....	14
1.2 CÂNCER DE MAMA.....	17
1.3 LINHAGEM 4T1.....	19
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	19
1.5 ÁCIDO ASCORBICO, MENADIONA E FERRO.....	21
1.6 AUTOSCHIZIS.....	22
1.7 JUSTIFICATIVA.....	24
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	26
3.2 ANÁLISE DE CATALASE.....	26
3.3 ANÁLISE DE MALONDIALDEIDO.....	26
3.4 ANÁLISE DE TIOIS NÃO PROTEICOS.....	27
3.5 CITOMETRIA DE FLUXO.....	27
3.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	28
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>7 Referências.....</b>	<b>39</b>

## 1 Introdução

### 1.1 Câncer

A carcinogênese é um processo patológico que compreende dois acontecimentos básicos: alteração do material genético e divisão celular alterada com passagem desse material de célula mãe para célula filha <sup>1</sup>. Esse material genético alterado, denominado oncogene, contém mutações em especial nos genes que controlam o ciclo de divisão celular, nos responsáveis pela correção de erros na replicação gênica e nos que promovem e mantêm o estado de diferenciação celular. Isso faz com que células neoplásicas se diferenciem de células normais por apresentarem crescimento e proliferação descontrolada, mesmo na ausência de fatores de crescimento <sup>2</sup>. Há também outras alterações como: imortalização celular devido à ativação da enzima telomerase, remodelações cromossômicas, perda de propriedades adesivas da membrana plasmática, perda de função e da capacidade de diferenciação, potencial para invadir tecidos vizinhos e estimular a angiogênese.

O desenvolvimento de técnicas moleculares tem sido útil para a elucidação de mecanismos envolvidos na carcinogênese, em destaque, para genes da regulação e diferenciação celular. Entre as principais alterações da carcinogênese podem ser citadas: a expressão aumentada de oncogenes, inibição de supressores tumorais, instabilidades cromossômicas, alterações epigenéticas, alterações nas vias de reparo, entre outras <sup>3</sup>. Os testes moleculares para o câncer de mama foram desenvolvidos e validados baseados nestas modificações encontradas e atualmente exercem papéis na caracterização do tumor, fornecendo alternativas terapêuticas mais eficientes <sup>4</sup>.

Estima-se que cerca de 1,3 milhões de indivíduos são diagnosticados com câncer anualmente. Esse índice elevado é um dos maiores problemas encontrados na saúde pública mundial e no Brasil <sup>4; 5</sup>.

O câncer é uma doença de difícil tratamento devido a vários motivos que incluem a capacidade de células tumorais de realizar evasão imunológica. Além disso, estas células possuem a capacidade de modificar o microambiente local

ao seu favor. Este microambiente tumoral contém distintos tipos de células como fibroblastos, células epiteliais, células do estroma, células do sistema imune (macrófagos, neutrófilos, células *natural killer*, células dendríticas e linfócitos) e matriz extracelular<sup>6;7;8</sup>. Estudos já realizados mostram que as interações célula-célula e célula-matriz extracelular podem atuar na formação e disseminação de células tumorais, causando a metástase que é a disseminação do câncer responsável pelo óbito de mais de 80% dos pacientes diagnosticados com câncer<sup>9</sup>. O microambiente, as células existentes neste espaço e as substâncias produzidas nele são considerados de grande importância como alvos de estudo para o desenvolvimento de novos tratamentos e terapias<sup>10</sup>.

As células citotóxicas CD8+ ativadas (CTLs) e células *natural killer* (NK) são linfócitos efetores que apresentam mecanismos citotóxicos necessários para a defesa contra células tumorais. Ambos destroem seus alvos celulares por dois mecanismos principais que requerem contato direto entre a célula efetora e o alvo.<sup>11</sup> Grânulos citoplasmáticos contendo proteínas citolíticas, predominantemente uma proteína disruptora de membrana denominada perforina e uma família de serino-proteases (granzimas), são secretadas por exocitose e juntas induzem a apoptose da célula-alvo<sup>12</sup>. O mecanismo principal da citólise mediada por estas células consiste na liberação de grânulos proteicos citotóxicos contra a célula-alvo que foi reconhecida<sup>13</sup>. Quando os receptores de antígenos dos CTLs e das células NK reconhecem os peptídeos associados ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) na célula-alvo, o citoesqueleto destas células é reorganizado de tal modo, que o centro de organização dos microtúbulos é deslocado para a área próxima do contato com a célula-alvo. Os grânulos do citoplasma concentram-se nessa região e a membrana do grânulo funde-se com a membrana plasmática. A fusão da membrana resulta em exocitose do conteúdo dos grânulos na superfície da célula-alvo<sup>14</sup>.

Macrófagos, linfócitos e células dendríticas são denominadas células apresentadoras de antígenos. Estas células, na presença de antígenos estranhos, estimulam respostas dos linfócitos T e células NK. As células dendríticas têm sido associadas com a redução da incidência de metástase, pois são muito eficazes em induzir e manter a resposta dos linfócitos T e células NK.

Porém, todas as células que residem no microambiente são condicionadas a funcionar de acordo com a dinâmica oferecido pelo complexo tumoral <sup>6; 8; 15</sup>.

O microambiente tumoral compõe diversas estruturas, sendo a maioria matriz extracelular. A matriz extracelular é composta por colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, proteínas matricelulares e enzimas. Essa composição molecular durante a progressão do câncer sofre mudanças que promovem a metástase.<sup>7</sup> O principal componente é o colágeno, representando cerca de 30% da massa total de proteína. Este pode servir como facilitador da invasão de células tumorais, além da maior deposição de colágeno estar associado com mudanças bioquímicas em tecidos. A fibronectina é necessária para o colágeno ser depositado dentro da matriz, sendo que sua regulação positiva ocorre por vários mecanismos. Essa glicoproteína pode ter efeitos modulatórios sobre vias de sinalização das células tumorais, promovendo o avanço da doença. Glicosaminoglicanos são cadeias de polissacarídeos encontrados ligados às proteínas do núcleo formando proteoglicanos. Estas junto às proteínas matricelulares estão associadas com o espalhamento da metástase <sup>7; 16</sup>. As enzimas presentes podem atuar de diversas formas no microambiente tumoral, alterando as vias de metabolismo para todas as células presentes neste ambiente, favorecendo ou combatendo o tumor.



## 1.2 Câncer de Mama

Existem vários tipos de câncer, sendo o câncer mais frequente entre as mulheres o de mama, que representa anualmente 25% dentre os demais tipos <sup>17; 18; 19</sup>. De acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), houve cerca de 59.700 novos casos no Brasil em 2018. Em 2015 houve 15.403 óbitos com diagnóstico de câncer de mama, sendo 98% mulheres. Dessa forma, o câncer de mama é um dos motivos de morte mais frequentes entre mulheres <sup>5</sup>.

Alguns fatores fisiológicos estão relacionados com o aumento do risco de desenvolvimento da doença, como idade, fatores comportamentais, fatores genéticos, menopausa tardia, menstruação precoce, obesidade após a menopausa, final da gravidez e história de terapia hormonal <sup>20</sup>. A idade é um dos principais fatores, pois o envelhecimento causa uma série de mudanças fisiológicas que podem aumentar o risco de desenvolvimento da doença. Mulheres são orientadas, mesmo assintomáticas, a realizar exame clínico ao menos uma vez por ano a partir dos 20 anos como, por exemplo, o exame das mamas para verificar a presença ou não de nódulos e outras irregularidades, e após 50 anos de idade, mamografia para detectar microcalcificações e outros sinais do câncer de mama. O risco para mulheres desenvolverem o câncer antes dos 35 anos é raro, sendo mais comum o desenvolvimento após 50 anos de idade <sup>21</sup>. Quanto mais cedo for feito o diagnóstico, melhor o prognóstico. Alguns sintomas que podem surgir em decorrência da doença são edema cutâneo, dor, aparecimento de nódulos, inversão do mamilo, hiperemia, descamação e secreção papilar <sup>5</sup>.

O tratamento para câncer de mama é faz uso de terapias de alto custo financeiro como quimioterapia e radioterapia. Alternativas a estes tipos de tratamento foram desenvolvidos nas últimas décadas e incluem tratamentos como terapia hormonal e terapia alvo <sup>22; 23</sup>. Devido à alta incidência de câncer de mama, os custos globais para o tratamento aumentam a cada ano. De 1995 a 2004 houve um aumento de 75% nos custos devido aos avanços nas investigações, mudanças de técnicas e inovações farmacêuticas e cirúrgicas <sup>24</sup>.

Histologicamente, a mama é considerada uma glândula sudorípara constituída por ramificações de ductos e lóbulos. A mama apresenta compostos acinares, formados por células epiteliais e mioepiteliais envoltos por um estroma de tecido adiposo e tecido fibroso. Pelas características morfológicas e unidades funcionais da mama, as lesões são originadas principalmente dos ductos e lóbulos. Uma vez desenvolvidas, as lesões mamárias são classificadas como benignas (não neoplásicas e neoplásicas) e malignas, englobando uma extensão de subtipos histológicos e são classificadas segundo o grau de diferenciação, proliferação e fenótipo celular <sup>4</sup>.

O câncer de mama possui uma grande diversidade celular e molecular, sendo a maioria dos tumores derivados das células luminais secretoras e células basais <sup>25</sup>. Com isso, essa doença possui vários subtipos patológicos e variações histológicas <sup>25; 26</sup>. A classificação histopatológica tem pouca funcionalidade, já que tumores com a mesma classificação podem ter desfechos diferentes <sup>26</sup>.

O mais comum é o carcinoma invasivo com diagnóstico de 70-80% dos casos de câncer de mama. De acordo com o grau histológico e expressão de receptores hormonais, o prognóstico do paciente varia <sup>21; 23; 26; 27</sup>. Existem outros subtipos como carcinoma lobular invasivo, carcinoma epidermóide, linfoma e sarcoma, doença de Paget do mamilo, tumor filoide e câncer de mama inflamatório <sup>26</sup>.

Existem outras técnicas além do estudo histopatológico para classificar o tipo de neoplasia. Métodos moleculares que utilizam o ácido desoxirribonucleico (DNA), o ácido ribonucleico (RNA) e o perfil de proteínas do câncer de mama têm sido muito úteis no diagnóstico <sup>28; 29</sup>.

Dentre as subdivisões moleculares existem os subtipos luminal A, luminal B, superexpressão do HER-2, basal e normal *breast-like*. Os principais subtipos são os tipos luminal A e B, com fenótipo receptor de estrogênio (RE) positivo. O luminal A é caracterizado por possuir uma expressão mais elevada de RE do que o luminal B, que possui uma moderada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminais <sup>30; 31; 32; 33</sup>. O oncogene HER-2 e a superexpressão de sua proteína são importantes biomarcadores do prognóstico de câncer de mama

<sup>33; 34</sup>. O subtipo basal é caracterizado pela expressão de vários genes expressos nas células progenitoras ou células basais. Por fim, o subtipo normal *breast-like* tem forte expressão para genes epiteliais basais e baixa expressão no epitélio luminal.

### 1.3 Linhagem 4T1

A linhagem celular tumoral transplantável de carcinoma de mama 4T1 foi originalmente isolado por Fred Miller em 1978 do tumor espontâneo 410.4+. O tumor transplantado cresce em camundongos Balb/c e em cultura. Altamente tumorigênico e invasivo, este modelo pode sofrer metástase do tumor primário para vários outros sítios distantes <sup>35; 36</sup>.

A linhagem 4T1 serve de modelo para mimetizar o câncer de mama humano devido a sua capacidade de se desenvolver espontaneamente do tumor primário e se espalhar para os linfonodos drenantes próximos semelhante ao que acontece em tumores humanos. Esta linhagem é frequentemente utilizada para desenvolver tratamentos baseados em imunoterapia <sup>37</sup>. Células 4T1 apresentam níveis adequados de MHC de classe I e níveis indetectáveis de MHC de classe II, o que faz delas alvos para linfócitos citotóxicos CD8+ <sup>38; 39; 40</sup>. O tipo de câncer de mama desenvolvido por esta linhagem é o triplo negativo. Esse tipo de câncer não possui expressão de receptores de estrógeno, receptores de progesterona e também não possui expressão de HER-2 <sup>23</sup>. Devido a impossibilidade de utilizar alternativas como tratamento hormonal, a quimioterapia resta como o único recurso disponível para estes indivíduos afligidos. Esta escassez de opções de tratamentos faz da linhagem 4T1 um modelo muito útil em estudos oncológicos <sup>41</sup>.

O crescimento de células de linhagem 4T1 in vitro pode ser realizada com diversos meios inclusive o meio RPMI suplementado com 10% soro bovino fetal com antibióticos-antimicóticos em placas de cultura a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Quando utiliza o meio RPMI completo, há algumas diferenças para melhor adequar o crescimento de 4T1 como a adição de aminoácidos não essenciais e HEPES (Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etano-Sulfônico) <sup>42</sup>.

### 1.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é causado por radicais livres e espécies reativas de oxigênio. Antioxidantes combatem essas moléculas por meio do compartilhamento e captação de elétrons. Quando circulam livremente, radicais livres e espécies reativas de oxigênio podem gerar dano considerável a estruturas celulares, o que é denominado dano oxidativo <sup>43; 44</sup>.

Os principais radicais livres no sistema biológico são o ânion superóxido, radical hidroxila e óxido nítrico <sup>43; 45</sup>. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são altamente reativas e em determinadas circunstâncias, como na presença de íons metálicos, podem gerar radicais livres ou atuar como um, sendo os principais o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlet.

Antioxidantes fazem parte de um sistema de proteção utilizado por organismos para evitar dano causado por radicais livres e EROs. Essas substâncias são capazes de doar, compartilhar ou retirar elétrons de moléculas instáveis assim evitando uma cascata de reações de oxidação indesejáveis. O balanço de atividade entre essas moléculas reativas e antioxidantes é denominado equilíbrio redox <sup>46; 47</sup>.

Sistemas antioxidantes podem ser divididos em dois tipos: enzimático e não-enzimático. Os principais enzimáticos são o Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Tioredoxina, Peroxiredoxina e Glutathione Transferase. Alguns antioxidantes não enzimáticos são o Retinol (Vit A), Ácido Ascórbico (Vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E), Beta-caroteno e Glutathione (GSH).

É a partir da oxidação que ocorre na mitocôndria nas moléculas de oxigênio que vem a produção de EROs, formando o ânion superóxido. A cadeia respiratória no final do metabolismo energético, utilizado na produção de ATP, é também a etapa com o maior potencial produtor de EROs <sup>48</sup>. Os elétrons produzidos durante os passos do metabolismo energético são transportados por proteínas ligada à membrana mitocondrial até que se ligam ao O<sub>2</sub> formando H<sub>2</sub>O. Para ocorrer esse evento, as moléculas de O<sub>2</sub> precisam ser reduzidas por 4 elétrons convalendo simultaneamente. Porém quando há um número inferior

de elétrons e as moléculas de  $O_2$  são reduzidas apenas com um elétron, há formação do ânion superóxido.

Na tentativa de manter o equilíbrio redox, os ânions superóxidos produzidos são convertidos a peróxido de hidrogênio. Essa reação é catalisada pelo SOD que utiliza dois ânions superóxido e dois hidrogênios para formar o peróxido de hidrogênio. A partir disso, a glutathione peroxidase catalisa uma reação em que duas moléculas de glutathione oxidam o peróxido de hidrogênio formando duas moléculas de  $H_2O$  e uma molécula de glutathione oxidada. A catalase, outra enzima antioxidante, é capaz de converter o peróxido de hidrogênio em duas moléculas de  $H_2O$  e uma de oxigênio.

Os antioxidantes não enzimáticos como vitaminas C e vitamina E possuem um papel na manutenção do equilíbrio redox <sup>49; 50; 51</sup>.

### 1.5 Ácido Ascórbico, Menadiona e Ferro

O ácido ascórbico é um potente doador de elétrons capaz de sofrer diversas oxidações por substâncias reativas e voltar à sua forma ativa (ácido L-ascórbico) hidrossolúvel. Além de atuar diretamente como uma molécula redutora, o ácido ascórbico também auxilia na recuperação de  $\alpha$ -tocoferol após este ter sofrido alguma oxidação. Assim o  $\alpha$ -tocoferol, substância lipossolúvel, exerce sua atividade para opor a peroxidação lipídica na membrana celular <sup>46; 52; 53; 54</sup>.

Menadiona, vitamina K3, é um composto sintético na forma de quinona derivado da filoquinona (Vitamina K) com potencial pro-oxidante e antioxidante. Em células tumorais quinona é reduzida a semiquinona, a qual reduz oxigênio gerando ânion superóxido além da semiquinona sofrer um processo de reversão a quinona e o ciclo se repetir, produzindo assim uma grande quantidade de superóxido. Este pode ser catalisado por SOD formando  $H_2O_2$ , levando a danos na célula tumoral <sup>55</sup>.

A associação de ácido ascórbico e menadiona geram semiquinona e ascorbil. A semiquinona então reage com oxigênio e volta a sua forma inicial de quinona que irá reagir novamente com o ácido ascórbico disponível no mesmo

ambiente, o que cria um ciclo redox da quinona. Quando essa reação ocorre juntamente a um metal como o ferro, o ciclo ascorbil-quinona aumenta a produção de ânion superóxido aumentando consequentemente a produção de EROs, levando a estresse oxidativo. Esse dano pode ocorrer em qualquer local da célula, incluindo membrana celular, organelas, núcleo e DNA <sup>49</sup>.

Células tumorais possuem uma quantidade elevada de receptor GLUT1 levando a um acúmulo preferencial de ácido ascórbico nessas células <sup>56</sup>. O uso dessa vitamina tem sido estudado na melhora da sobrevivência de pacientes com câncer associado à quimioterapia, radioterapia e outras vitaminas. Os efeitos antitumorais que ocorrem na terapia utilizando ambos o ácido ascórbico e a menadiona induzem um tipo de morte celular programada em células tumorais denominada autoschizis <sup>57</sup>.

### 1.6 Autoschizis

As EROs possuem um papel fundamental na sinalização para proliferação, adesão e apoptose celular, além de controle nos canais iônicos e expressão de alguns genes <sup>43; 47</sup>. Durante a administração de ácido ascórbico e menadiona, os radicais livres e EROs gerados em excesso causam defeitos na membrana celular, segregação de organelas, nucléolo e excisão do citoplasma, o que resulta em uma morte celular denominada autoschizis. Durante esse tipo de morte celular, a razão núcleo/citoplasma é mantida enquanto a célula reduz de tamanho, perdendo citoplasma e tendo sua cromatina digerida levando à fragmentação do núcleo <sup>51</sup>. Diferente de apoptose, autoschizis não gera corpos apoptóticos ou causa destruição da membrana celular. Na morte celular por apoptose, o processo é iniciado e ocorre por meio de caspases enquanto na autoschizis há uma ativação de DNase sem ativação de caspases. No final da morte da célula por autoschizis há também geração de uma resposta inflamatória in vivo enquanto a apoptose trata-se de uma morte silenciosa sem resposta inflamatória concomitante <sup>14; 57</sup>.

A autoschizis é provocada pela administração de uma superdosagem de ácido ascórbico e menadiona, em uma proporção de 100:1. Como há um sequestro preferencial de ácido ascórbico por células tumorais, o uso dessas duas substâncias tem sido utilizado no tratamento para diversos tipos de

tumores como carcinomas, câncer de mama entre outros <sup>57</sup>. Os efeitos sofridos pelas células expostas a essas substâncias variam de acordo com o tempo de exposição. Durante exposição de 1hr, as células apresentam alterações no citoesqueleto se tornando mais arredondados com sinais de lesão na membrana. Em 2-4 horas há uma diminuição do tamanho celular devido a excisão do citoplasma. As mitocôndrias dessas células, também danificadas, migram para próximo ao núcleo junto a outras organelas. Dentro dessas modificações há uma redistribuição de proteínas da membrana, reorganização de filamentos do citoesqueleto e oxidação com subsequente depleção dos níveis de glutathiona e tióis <sup>51; 57</sup>.

Para realizar o estudo desse tipo de morte celular, um dos métodos mais utilizados é por citometria analisando componentes que podem ser marcados por anticorpos ligados a substâncias fluorescentes <sup>58</sup>. Um desses componentes é a fosfatidilserina, que é observada principalmente na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol. Nas células que estão no início de apoptose, onde a membrana celular ainda permanece intacto, mas sofre uma desorganização, a fosfatidilserina é translocada para a superfície exterior da bicamada. Anexina V é uma proteína que se liga à fosfolipídeos e possui alta afinidade por fosfatidilserina. Ao conjugar a anexina V ao FITC (Isotiocianato de fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas em citometria de fluxo <sup>57</sup>.

O marcador nuclear fluorescente iodeto de propídio (P.I.) é utilizado para distinguir células apoptóticas de células em processo de morte por necrose/autoschizis. O iodeto de propídio é uma molécula que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Tal propriedade deve-se ao fato de que marcadores de DNA de elevado peso molecular, como o P.I., não são passíveis de penetrar na célula intacta em decorrência do seu tamanho, bem como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais de apoptose <sup>59</sup>. Desse modo, corar células simultaneamente com anexina V-FITC (fluorescência verde) e com P.I. (fluorescência vermelha) permite a discriminação de células intactas, viáveis (FITC - PI -), no início de

apoptose (FITC + PI -) e células tardiamente apoptóticas ou em processo de autoschizis (FITC + PI +) <sup>49; 57</sup>.



## 1.7 Justificativa

Diante de todas as informações acima expostas, houve uma necessidade de investigar a possibilidade do uso de ferro como coadjuvante em um ensaio utilizando ácido ascórbico e menadiona para induzir produção de radicais livres em células tumorais (linhagem 4T1) para verificar se há um aumento no potencial antitumoral. Visto que há grande produção de espécies reativas após tratamento com essas duas substâncias <sup>57; 60</sup>, nossa hipótese é que haverá um aumento no dano oxidativo causado após essas substâncias reagirem com o ferro levando a uma grande quantidade de morte em células tumorais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da administração de ácido ascórbico, menadiona e ferro em células tumorais e leucócitos in vitro.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

De maneira específica, este estudo buscou:

- a) Analisar marcadores de estresse oxidativo como catalase, malonaldeído (MDA), tióis não proteicos nas células após tratamento.
- b) Avaliar a quantidade de células viáveis, em processo de morte por apoptose e em processo de morte por autoschizis após tratamento.
- c) Verificar o tamanho e granulosidade das células após tratamento.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas células de câncer de mama de linhagem 4T1, linhagem celular que mimetiza o câncer de mama triplo negativo, e leucócitos, proveniente do sangue periférico de um voluntário saudável, divididos em diferentes grupos. As células 4T1 foram mantidas em garrafas de 15mL com meio RPMI completo de pH 7.4 com CO<sub>2</sub> 5% a 37°C. Os leucócitos foram extraídos do sangue periférico de um voluntário, após apresentação do trabalho e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com as normas do CEP da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Protocolo: 1525). Os três grupos foram divididos em: controle (Água destilada), ascórbico/menadiona (AA+Men), ácido ascórbico/menadiona/ferro (AA+Men+Fe). Cada grupo foi feito em quadruplicata e cada ensaio seguido em duplicata para garantir fidelidade dos resultados. Foi utilizado ácido ascórbico 0,1M, menadiona 0,01M e ferro 0,05M, concentrações definidas para manter a proporção de 100:1 (Ácido ascórbico/menadiona)<sup>49; 51; 60</sup>, diluídos em água destilada. Cada grupo foi exposto às substâncias intituladas através da administração dessa no meio de cultura, RPMI incompleto, por um período de 1h e 4h. Após esse tempo as células foram recolhidas para posterior análise.

#### 3.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE CATALASE

A atividade da catalase foi determinada seguindo o método de Aebi (1984) o qual baseia-se no acompanhamento da decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, determinada por espectrofotometria a 240nm e tendo a absorvência registrada no tempo de 30 segundos. As amostras coletadas foram lavadas com PBS e centrifugadas. O pellet foi ressuspensionado em 200uL de solução Triton X-100 0,2%, para realizar a lise das células. A reação inicia quando adiciona 200µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 22,5mM junto a 400µL de amostra previamente diluída (100uL de amostra/Triton com 700uL de tampão fosfato). Os valores foram expressos em atividade de catalase (k) /mg de proteína<sup>61</sup>.

### 3.3 ANÁLISE DE MALONDIALDEIDO (MDA)

A determinação de MDA foi realizada segundo o método de Tatum, Changchit e Chow (1990) que consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo o aduto TBA-MDA extraído com isobutanol e identificado através de detector fluorimétrico na cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A amostra utilizada foi de 500uL do meio com as células, no qual foi adicionado 500uL de TBA 0,4% em HCL 0,2N diluído na proporção de 2:1. O tubo foi então aquecido a 90°C em banho maria durante 45 minutos. Após retirar do banho, foi selada até adicionar 750uL de isobutanol e agitar por vortex. A solução foi centrifugada a 2500rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e analisado por HPLC. A fase móvel utilizada era composta por tampão fosfato 50mM, metanol e acetonitrila (72:17:11) e os parâmetros de detecção foram 515nm (excitação) e 550nm (emissão). [37] Os resultados foram analisados juntamente a uma curva padrão e os valores foram expressos em  $\mu\text{Mol/mg}$  de proteína <sup>62</sup>.

### 3.4 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS

Os tióis proteicos equivalem principalmente aos níveis de glutathiona reduzida (GSH). A análise foi realizada por método colorimétrico que consiste na reação do grupo sulfidril. Adicionamos a 150uL de amostra, 120uL de água destilada e 50uL de ácido tricloroacético 50% (TCA). Após 15 minutos de espera, a mistura foi centrifugada a 3000g por 15 minutos. Então retiramos 200uL do sobrenadante e misturamos com 400uL de tampão Tris 0,4M (pH 8,9) e 10uL de ácido 5,5'-ditiobis-2- nitro-benzoico (DTNB). Em seguida a mistura foi submetida à leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 412nm. As concentrações de tióis não proteicos foram representadas em relação à concentração de proteínas totais na amostra (nMol/mg de proteína) <sup>63</sup>.

### 3.5 CITOMETRIA

A citometria de fluxo foi realizada utilizando um kit comercial (Cayman Chemical Annexin V FITC assay kit) para determinar morte celular. Após tratadas, as células foram recolhidas, contatas e distribuídas em tubos antes de

sofrerem centrifugação a 400 x g por cinco minutos e o sobrenadante descartado. Foi realizado uma lavagem com o tampão de ligação proveniente do kit e centrifugado novamente e o sobrenadante descartado. As células foram então suspensas em 50 µL de anexina V FITC/iodeto de propídeo e incubadas no escuro por 10 minutos. 150 µL de tampão de ligação foi adicionado e as amostras analisadas pelo citometro utilizando 488nm de excitação e 525nm de emissão para FITC e 655-730 de emissão para P.I <sup>50; 58; 59</sup>.

### 3.6 ANÁLISE DE PROTEINAS TOTAIS

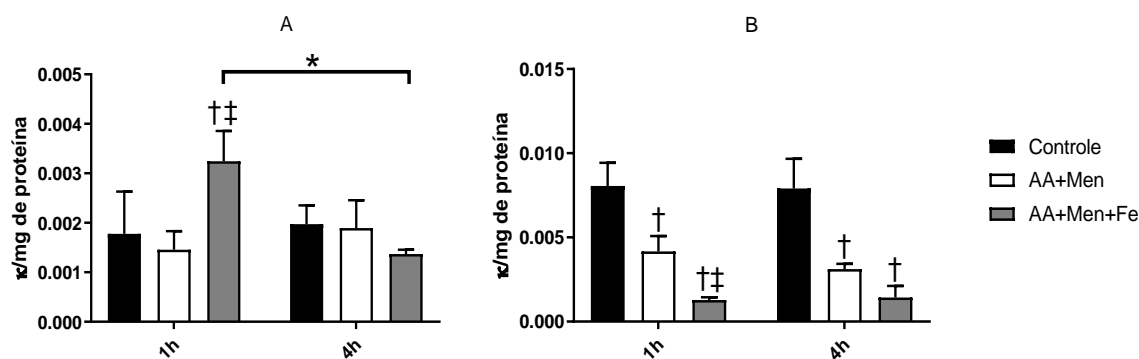
A quantificação de proteínas totais foi realizada a partir do método de Lowry. O reagente de Lowry é preparado com soluções de sulfato de cobre 1%, tartarato de sódio e potássio 2% e carbonato de sódio 2% em uma proporção de 1:1:100. Adiciona-se 1400uL desta solução a 980uL de água e 20uL de amostra. A este adiciona-se 200uL de solução de Folin diluída (5mL de Folin Ciocalteu 2N a 5mL de água destilada) e incuba a solução no escuro em temperatura ambiente. A leitura é realizada a 650nm contra o branco (Solução sem amostra). Determina-se o valor em mg de proteína utilizando uma curva padrão com albumina <sup>64</sup>.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo software GraphPad 8. Os resultados foram colhidos a partir de quadruplicatas das amostras e duplicatas dos ensaios para providenciar uma acurácia melhor aos dados. A análise estatística foi realizada por ANOVA-two way com comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Foram adotados níveis de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

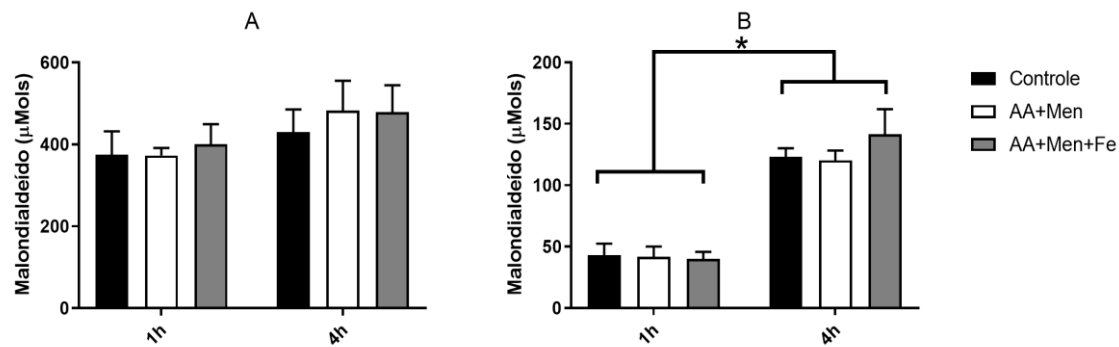
## 4 RESULTADOS

Os resultados obtidos evidenciaram valores inesperados e paradoxais. Quanto a atividade de catalase, células de linhagem 4T1 apresentaram uma elevada atividade da enzima no grupo AA+Men+Fe tratado por 1 hora, 0.0032  $\kappa$ /mg de proteína, quando comparado ao controle de 1h e o grupo AA+Men. O grupo AA+Men+Fe tratado por 4 horas demonstrou o oposto, com uma queda na atividade diferenciando significativamente de sua contraparte de 1 hora, sem diferenças quando comparado aos grupos controle e AA+Men de 4 horas (Figura 1-A). Em leucócitos do sangue periférico, a atividade de catalase apresentou atividade semelhante em ambos as durações de tratamento. Uma queda na atividade de catalase ocorreu em ambos os grupos AA+Men e AA+Men+Fe quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), com o grupo AA+Men+Fe apresentando a menor atividade de catalase (Figura 2-B).



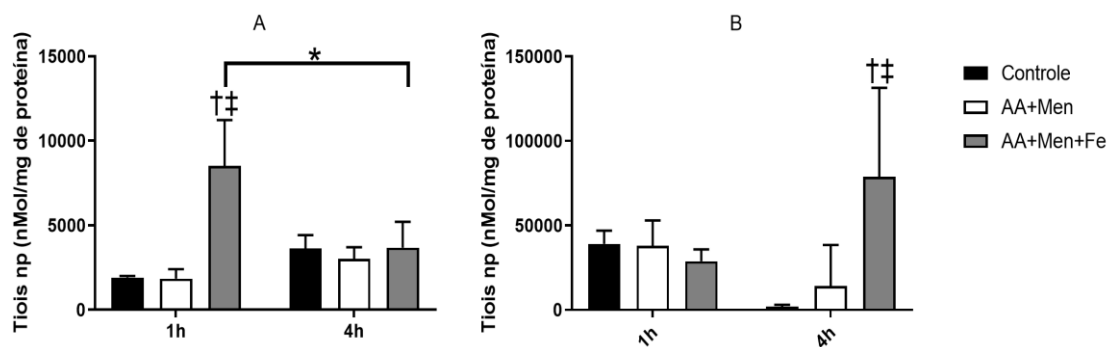
**Figura 1.** Atividade de Catalase ( $\kappa$ ) por miligrama de proteína. A: Células tumorais de linhagem 4T1. B: Leucócitos humanos do sangue periféricos. (†  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo controle; ‡  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo AA+Men; \*  $p < 0.05$  entre duração de tratamentos).

A quantidade em  $\mu$ Mols de malondialdeído nas amostras não apresentou diferenças significativas entre grupos de células de linhagem 4T1. Pode-se notar um discreto aumento de MDA nos grupos comparando por duração de tratamento, porém não houve diferença significativa (Figura 2-A). Em leucócitos do sangue periférico, houve um aumento significativo de MDA em todos os grupos tratados por 4 horas quando comparado aos grupos de 1 hora ( $p < 0,05$ ) (Figura 2-B).



**Figura 2.** Malondialdeído (MDA) em  $\mu\text{Mols}$  encontrados por cromatografia líquida de alta eficiência. A: Células tumorais de linhagem 4T1. B: Leucócitos humanos do sangue periféricos (\*  $p<0.05$  entre duração de tratamento).

Tióis não proteicos em células de linhagem 4T1 representados em nMols/mg de proteína apresentaram uma quantidade elevada no grupo AA+Men+Fe tratado por 1 hora, 9515,36 nMols/mg de proteína, diferenciando-se dos grupos restantes ( $p<0,05$ ) (Figura 3-A). Em leucócitos houve destaque nos grupos controle e AA+Men+Fe que foram tratados por 4 horas por apresentarem valores baixos e elevados, respectivamente, quando comparado aos grupos restantes (Figura 3-B).



**Figura 3.** Tióis não proteicos em nMols/mg de proteína. A: Células tumorais de linhagem 4T1. B: Leucócitos humanos do sangue periféricos (†  $p<0.05$  quando comparado ao grupo controle; ‡  $p<0.05$  quando comparado ao grupo AA+Men; \*  $p<0.05$  entre duração de tratamentos).

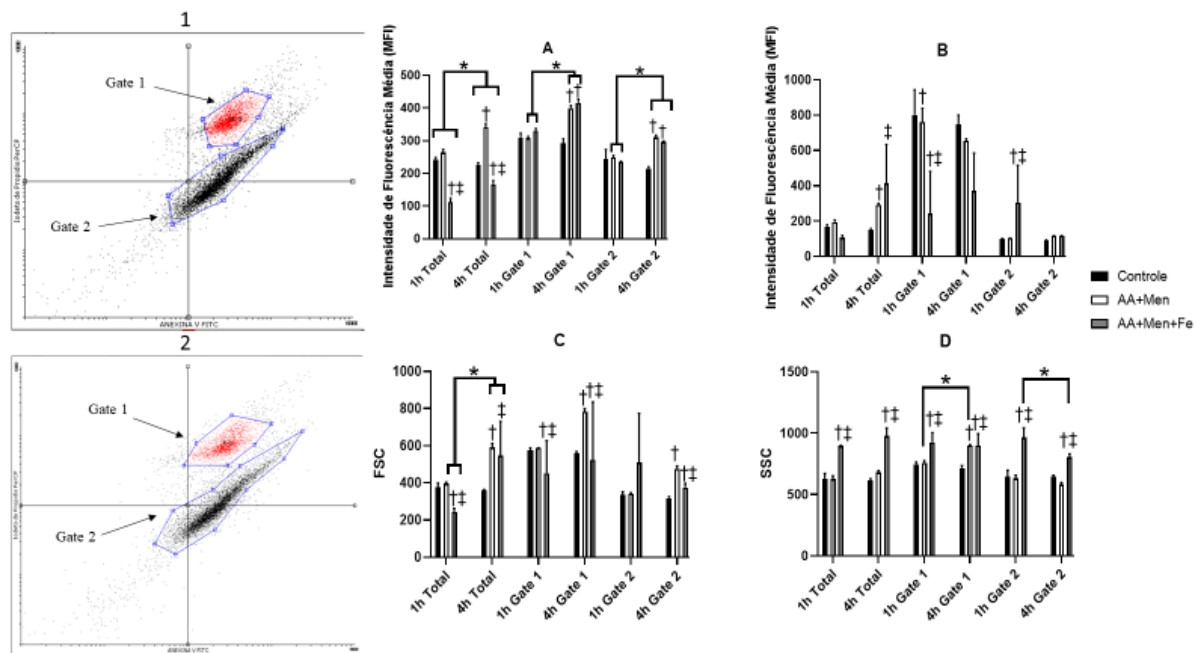
Citometria de fluxo utilizando anexina V e iodeto de propídeo (P.I.) foi realizada para determinar se ocorre apoptose ou morte celular por autschizis após tratamento. Analisamos um número total de eventos, 10.000 células, e duas populações com comportamentos de apoptose/morte distintas separadas em *gates*.

Anexina V, marcador de apoptose, apresentou diferença significativa no grupo de células de linhagem 4T1 tratadas com AA+Men por uma duração de 4 horas. Os grupos AA+Men+Fe tratados por ambos 1 hora e 4 horas apresentaram quantidades menores de anexina V (Figura 4-A).

Iodeto de propídeo, marcador de morte celular, foi encontrado em quantidades elevadas no ensaio de 4 horas nos grupos AA+Men e AA+Men+Fe. (Figura 4-B).

Tamanho celular variou de acordo com o tratamento e duração do tratamento. Grupos tratados com AA+Men por 4 horas apresentou tamanho maior quando comparado aos grupos restantes. Grupos tratados com AA+Men+Fe apresentou o oposto, com tamanho diminuído (Figura 4-C). Granulosidade celular se apresentou aumentada em todos os grupos tratados com AA+Men+Fe. Não houve diferença significativas quando comparados duração de tratamentos (Figura 4-D).



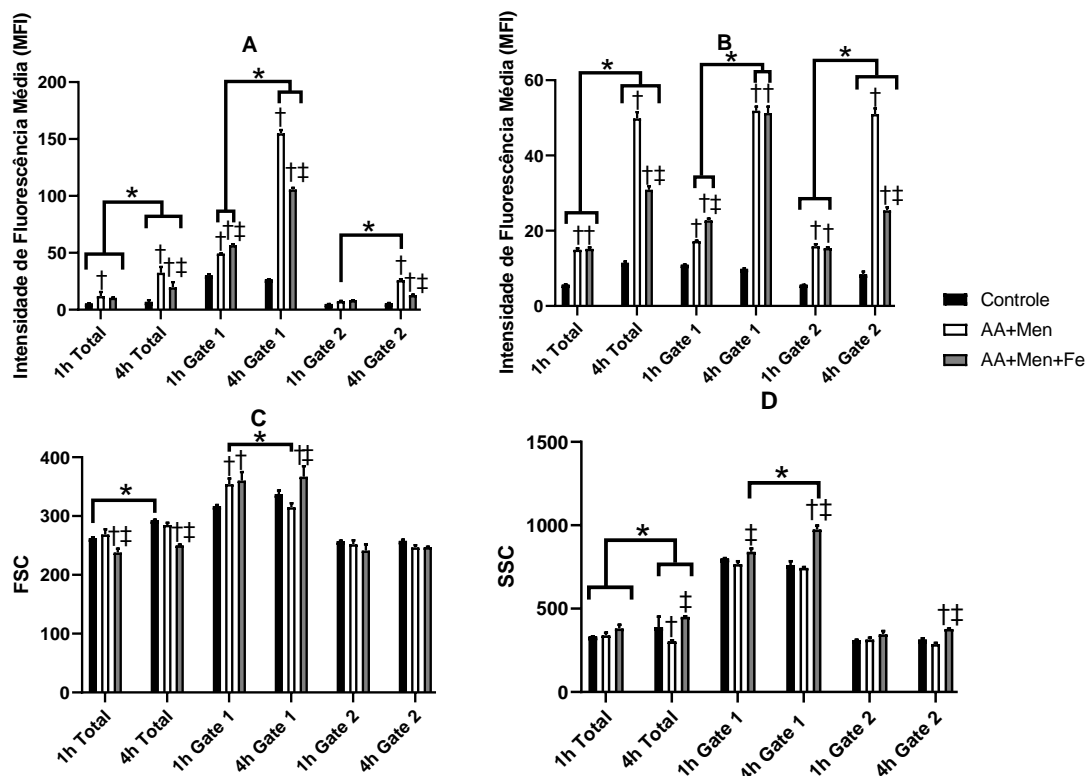


**Figura 4.** Citometria de fluxo realizada em células linhagem 4T1 após tratamento. 1: Resultado da citometria do grupo controle de 1 hora de tratamento. 2: Resultado da citometria do grupo controle de 4 horas de tratamento. A: intensidade de fluorescência média de anexina V. B: Intensidade de fluorescência média de iodeto de propídeo. C: *Forward-Scatter* demonstrando tamanho celular. D: *Side-Scatter* demonstrando granulosidade celular (†  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo controle; ‡  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo AA+Men; \* $p < 0.05$  entre duração de tratamentos).

As quantidades de anexina V e P.I. em leucócitos demonstrou uma intensidade de fluorescência cerca de 5 a 10x menores do que em células tumorais. Quanto a anexina V, houve diferenças significativas encontradas entre duração de tratamento em que os grupos tratados por 4 horas demonstraram intensidade de fluorescência elevada de anexina V, com o grupo AA+Men apresentando a maior leitura. Diferentemente das células de linhagem 4T1, os grupos AA+Men+Fe apresentaram quantidades maiores do que no grupo controle (Figura 5-A).

Iodeto de propídeo demonstrou intensidade de fluorescência maior nos grupos tratados por 4 horas, sendo que o grupo AA+Men teve a maior leitura. Em ambos 1 hora e 4 horas de tratamento, os grupos AA+Men e AA+Men+Fe apresentou valores maiores do que o controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 5-B).

O tamanho celular demonstrou um valor menor nos grupos tratados com AA+Men+Fe enquanto granuloseidade celular apresentou valores elevados nesses mesmos grupos (Figura 5-C, Figura 5-D).



**Figura 5.** Citometria de fluxo realizada em leucócitos humanos provenientes do sangue periférico após tratamento. A: Intensidade de fluorescência média de anexina V. B: Intensidade de fluorescência média de iodeto de propídeo. C: *Forward-Scatter* demonstrando tamanho celular. D: *Side-Scatter* demonstrando granuloseidade celular (†  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo controle; ‡  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo AA+Men; \*  $p < 0.05$  entre duração de tratamentos).

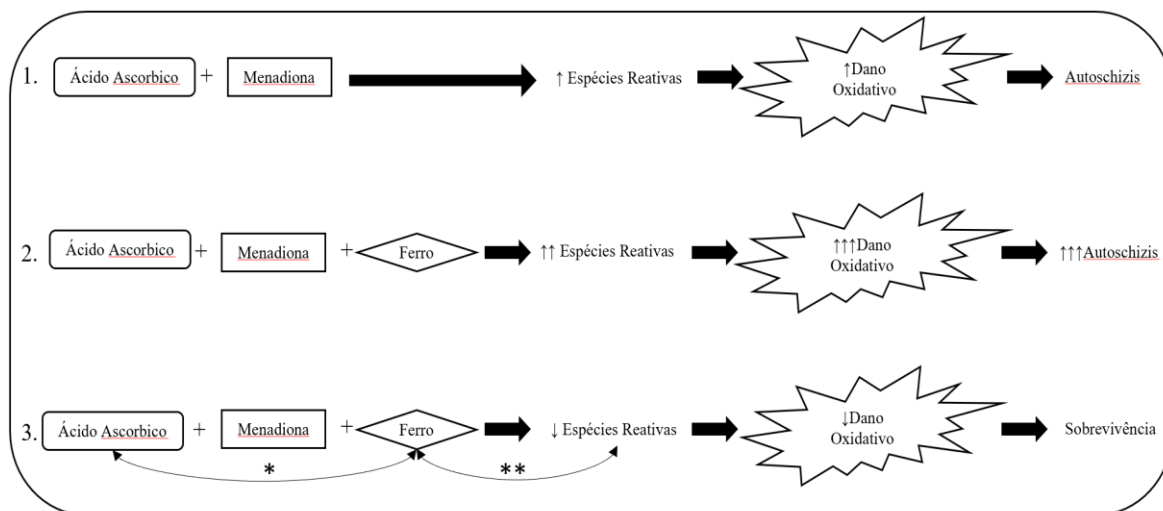
O uso de ácido ascórbico com menadiona associado ao ferro apresentou variações no equilíbrio redox das células analisadas, elevando a quantidade de espécies reativas, enquanto ofereceu uma sobrevivência celular melhor a ambos tumores e leucócitos. Analisando os valores brutos, nota-se que leucócitos apresentam quantidade elevada de catalase (cerca de 5x maior), tióis proteicos (cerca de 10x maior) e valores diminuídos para marcadores de morte após tratamento.

## 5. DISCUSSÃO

O câncer de mama continua sendo um dos tipos mais nocivos de câncer para as mulheres. As células tumorais que se originam em ou ao redor do tecido mamário tendem a ser extremamente difíceis de tratar, devido à sua diversidade de receptores diferentes, ou ausência desses, capaz de aumentar seu crescimento e proliferação, potencializando a angiogênese ou evitando o sistema imunológico. No presente estudo, houve uma tentativa de induzir o aumento de estresse oxidativo em células tumorais para causar autoschizis e levar essas células a morte. O método utilizado foi uma avaliação *in vitro* do uso de uma dose específica de ácido ascórbico e menadiona com ou sem ferro para causar uma produção em larga escala de peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. O uso da combinação de ácido ascórbico e menadiona obteve resultados positivos em alguns estudos<sup>60; 65</sup> e até ganhou sua própria indicação como um novo tipo de morte celular, autoschizis. O mesmo pode ser dito do ferro em um sistema de aplicação individual singular<sup>66</sup>. O uso do ferro ao lado dessas duas substâncias é uma nova tentativa de melhorar o dano oxidativo devido ao radical hidroxila, convertido do peróxido de hidrogênio na presença de ferro, sendo um radical mais reativo e, portanto, teoricamente aumentando o dano celular causado. O presente estudo demonstra uma resposta paradoxal a essa hipótese, já que o ferro parece ter causado pouco impacto quanto ao estresse oxidativo em conjunto a um efeito protetor celular, mantendo as células tumorais viáveis e menos propensas à morte. Como o mecanismo dessas reações ainda estão em pesquisa, existem algumas explicações possíveis para esses resultados.

A reação e o efeito previamente conhecidos na literatura da utilização de ácido ascórbico e menadiona em meios com células tumorais estão exemplificados na figura 6. O resultado previsto da associação do ferro a esta reação já prejudicial foi um aumento do estresse oxidativo devido a quantidades maiores de espécies reativas. No entanto, o uso de ferro em combinação a ácido ascórbico e menadiona causou uma diminuição no estresse oxidativo (menor atividade de catalase, sem diferença significativa no MDA, elevada quantidade de glutathiona reduzida) o que levou à sobrevivência celular. A intensidade de fluorescência dos marcadores de morte no grupo controle foi maior do que nos

grupos com ferro. Este aspecto de proteção atribuída pelo do ferro foi inesperado pois de acordo com a reação de Fenton a presença de ferro com peróxido de hidrogênio causaria uma reação que leva à produção de radical hidroxila, reativo nocivo a células. O ácido ascórbico como um potente doador de elétrons possivelmente reagiu com o ferro, como ambos estavam no mesmo meio simultaneamente, e levou a uma estabilização dos íons. Isso retirou a capacidade do ferro de reagir com o peróxido de hidrogênio e interrompeu completamente sua atividade. Brandt et al. (2018) utilizaram sacarose de ferro na tentativa de influenciar o crescimento de células tumorais e tratar o câncer de cólon <sup>67</sup>. Semelhante aos nossos resultados, uma inibição da morte celular ocorreu e uma possível diferença entre o ferro intracelular e extracelular veio à luz. Como a maioria dos danos celulares que levam à morte celular causada por espécies reativas vêm de uma região intracelular onde as organelas e o núcleo podem ser lesados, há uma necessidade de converter o peróxido de hidrogênio dentro da célula em radical hidroxila para provocar uma maior quantidade de dano oxidativo. Devido ao peróxido de hidrogênio ser capaz de atravessar a membrana celular com facilidade, pode pular de um ambiente intracelular para um extracelular. Nesse caso, o ferro extracelular pode ter transformado o peróxido de hidrogênio em radical hidroxila fora da célula. Como o radical hidroxila não é capaz de atravessar a membrana celular com a mesma facilidade, o único alvo possível de dano celular seria a membrana celular externa, limitando seu potencial de dano.



**Figura 6.** Apresentação da reação conhecida de um tratamento com ácido ascórbico e menadiona (1), resultado esperado quando se adiciona ferro (2), resultados obtidos (3). (\*possível reação de ácido ascórbico doando elétrons ao ferro. \*\*possível reação de espécies reativas reagindo com ferro.)

O marcador utilizado para dano celular, o malondialdeído, não demonstrou aumento nas células tumorais mesmo após um tratamento de 4 horas com ácido ascórbico/menadiona com ou sem ferro. Para avaliar este marcador, utilizamos cromatografia líquida de alta eficiência através do método de Tatum et al. Para preparar nossa amostra, analisamos o meio celular com células imersas diretamente sem lavagem para manter todo o malondialdeído acumulado presente. Através deste método, nenhum MDA seria perdido e um aumento seria esperado ao longo do tempo, uma vez que o MDA permaneceria no meio. Os resultados demonstram um aumento apenas nos leucócitos, com uma quantidade máxima de MDA encontrada menor do que quando comparadas até com o menor valor encontrado nas células tumorais 4T1. Uma revisão de Victor et al. reuniu diferentes trabalhos mostrando que certos leucócitos têm uma quantidade maior de antioxidantes quando comparados com células normais, que já possuem cerca de 10 vezes a quantidade existente de antioxidantes nas células cancerígenas, e são capazes de resistir a mudanças na concentração de espécies reativas<sup>68</sup>. Isso se deve ao fato de que células como células T CD8+, células *natural killer* e macrófagos utilizam espécies reativas como óxido nítrico em suas atividades e possuem sistemas específicos para proteger sua integridade celular de seu potencial autodestrutivo. O estoque de antioxidantes

disponíveis nessas células pode fornecer uma grande proteção contra a peroxidação lipídica e, assim, evitar a produção de grandes quantidades de MDA.

Os tióis não proteicos demonstraram comportamento experimental peculiar nos resultados. Um aumento após 1 hora de tratamento em células tumorais, células que possuem menores concentrações de antioxidantes, e um aumento após 4 horas em leucócitos, células que comumente contêm grandes quantidades de antioxidantes, expressam uma possível resposta aguda e exaustão de tióis não proteicos presentes. Os tióis não proteicos são principalmente equivalentes aos níveis reduzidos de glutathione. Perry et al. (1993) analisaram tecidos tumorais de mama e encontraram valores variando de níveis teciduais abaixo do normal de até 11 vezes <sup>69</sup>. No presente estudo, a quantidade de tióis não proteicos presentes nas células tumorais 4T1 foi menor do que nos leucócitos humanos. Barranco et al. (2000) também analisaram o tecido tumoral de câncer de mama e descobriram que esses tecidos têm uma proporção de tumor/tecido normal de glutathione particularmente alta em comparação com outros tipos de tumor <sup>70</sup>. É possível que em nosso estudo atual tenhamos subestimado a quantidade de tióis não proteicos em células tumorais 4T1, já que suas quantidades nesta linhagem celular específica ainda não foram determinadas adequadamente. Yeh et al. (2006), e Perquin et al. (2001) encontraram níveis oxidados de glutathione em cerca de 20% dos níveis reduzidos de glutathione em células de câncer de mama humano <sup>71; 72</sup>. Como os tióis não-proteicos são basicamente o equivalente de níveis reduzidos de glutathione, o estudo atual talvez determinou apenas uma pequena porção de um sistema subjacente maior e estudos mais específicos precisam ser realizados para determinar a quantidade do antioxidante glutathione em sua forma oxidada além da reduzida.

As duas durações de tratamento escolhidas para o experimento foram baseadas na pesquisa de Beck et al. (2009) <sup>60</sup>, onde doses farmacológicas de ácido ascórbico e menadiona foram usadas para tratar células tumorais por diferentes períodos de tempo. Este estudo apresentou respostas iniciais que foram encontradas com 1 hora de tratamento com uma resposta elevada após 4 horas e continuaram a aumentar de acordo com o tempo. Nossa hipótese era de que a reação de Fenton provocada pelo ferro, produzindo grandes quantidades

de radical hidroxila, aumentaria o estresse oxidativo e, assim, tratamentos de 4 horas seriam suficientes para perceber quantidades significativas de morte de células tumorais. Devido aos nossos resultados paradoxais, suspeitamos que um tratamento prolongado de 24-96 horas poderia possivelmente superar os antioxidantes nativos presentes nas células e levar à autschizis. Jamison et al. realizaram um experimento semelhante com ácido ascórbico e menadiona em células de carcinoma prostático e observaram que em menos de 24 horas a maioria das células morriam por necrose e após esse período uma morte celular diferente, possivelmente autschizis, ocorreu <sup>51</sup>. Considerando isso, é possível que até mesmo um tratamento de 4 horas tenha sido insuficiente para causar reações oxidativas adequadas para levar à autschizis. O impacto da exposição prolongada às substâncias utilizadas em células de tumor de câncer de mama e leucócitos requer mais pesquisas para determinar adequadamente o período mais eficiente de tratamento.

## 6 CONCLUSÃO

A utilização de ácido ascórbico e menadiona é uma forma adequada para induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e provocar dano celular em células tumorais. O uso de ferro como coadjuvante requer estudos mais completos para determinar seu mecanismo por inteiro e beneficiar de seu potencial com outras moléculas oxidativas.



## REFERÊNCIAS

- 1 HAHN, W.; WEINBERG, R. **Rules for making human tumor cells**. New england journal of medicine. 347: 1593-1603 p. 2002.
  
- 2 TORRY, D. S.; COOPER, G. M. **Proto-oncogenes in development and cancer.**: Am J Reprod Immunol. 25: 129-132 p. 1991
  
- 3 TAKESHIMA, H.; USHJIMA, T. **Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk**. Precision oncology. 3: 1-10 p. 2019.
  
- 4 DELMONICO, L.; ALVES, G.; AMARAL, L. F. P. A biologia do câncer de mama e testes moleculares de prognóstico. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 14, n. supl. 1, p. 59-65, 2015.
  
- 5 **INCA. Tipos de câncer. Mama: INCA - Ministério da Saúde 2016.**
  
- 6 DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 1, p. 24-37, Jan 2006. ISSN 1474-175X (Print)  
 1474-175X (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16397525](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16397525) >.
  
- 7 INSUA-RODRIGUEZ, J.; OSKARSSON, T. The extracellular matrix in breast cancer. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 97, p. 41-55, Feb 1 2016. ISSN 1872-8294 (Electronic)  
 0169-409X (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=26743193](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26743193) >.
  
- 8 PEIN, M.; OSKARSSON, T. Microenvironment in metastasis: roadblocks and supportive niches. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 309, n. 10, p. C627-38, Nov 15 2015. ISSN 1522-1563 (Electronic)  
 0363-6143 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=26377313](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26377313) >.
  
- 9 BARNEY, L. E. et al. **The predictive link between matrix and metastasis**. Curr Opin Chem Eng. 11: 85-93 p. 2017.

- <sup>10</sup> TORRY, D. S.; COOPER, G. M. Proto-oncogenes in development and cancer. **Am J Reprod Immunol**, v. 25, n. 3, p. 129-32, Apr 1991. ISSN 1046-7408 (Print)
- 1046-7408 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1930640](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1930640)>.
- <sup>11</sup> BEVAN, M. **Helping the CD+ t-cell response**. Nature reviews immunology. 4: 595-602 p. 2004.
- <sup>12</sup> SMYTH, M. J.; TRAPANI, J. A. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. **Immunol Today**, v. 16, n. 4, p. 202-6, Apr 1995. ISSN 0167-5699 (Print)
- 0167-5699 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7734049](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7734049)>.
- <sup>13</sup> HENKART, P. A. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Annu Rev Immunol**, v. 3, p. 31-58, 1985. ISSN 0732-0582 (Print)
- 0732-0582 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3904772](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3904772)>.
- <sup>14</sup> TRAPANI, J. A. et al. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. **Curr Opin Immunol**, v. 12, n. 3, p. 323-9, Jun 2000. ISSN 0952-7915 (Print)
- 0952-7915 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10781403](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10781403)>.
- <sup>15</sup> MUNN, D. H. et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, v. 281, n. 5380, p. 1191-3, Aug 21 1998. ISSN 0036-8075 (Print)
- 0036-8075 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9712583](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9712583)>.
- <sup>16</sup> ZHOU, L. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human inflammatory bowel disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 24, n. 6, p. 695-701, Jun 2012. ISSN 1473-5687 (Electronic)
- 0954-691X (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22387885](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22387885)>.

- <sup>17</sup> DESANTIS, C. E. et al. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 24, n. 10, p. 1495-506, Oct 2015. ISSN 1538-7755 (Electronic)
- 1055-9965 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=26359465](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26359465)>.
- <sup>18</sup> BALDASSARRE, G.; BELLETTI, B. Molecular biology of breast tumors and prognosis. **F1000Res**, v. 5, 2016. ISSN 2046-1402 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=27134741](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=27134741)>.
- <sup>19</sup> GHONCHEH, M.; SOLTANI, S.; SALEHINIYA, H. Disparities in Incidence and Mortality of Breast Cancer. **Iran J Public Health**, v. 45, n. 2, p. 270-1, Feb 2016. ISSN 2251-6085 (Print)
- 2251-6085 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=27114997](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=27114997)>.
- <sup>20</sup> MCGUIRE, S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. **Adv Nutr**, v. 7, n. 2, p. 418-9, Mar 2016. ISSN 2156-5376 (Electronic)
- 2161-8313 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=26980827](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26980827)>.
- <sup>21</sup> SMITH, R. A. et al. American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: update 2003. **CA Cancer J Clin**, v. 53, n. 3, p. 141-69, May-Jun 2003. ISSN 0007-9235 (Print)
- 0007-9235 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12809408](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12809408)>.
- <sup>22</sup> WANG, T. et al. **A cancer vaccine-mediated postoperative immunotherapy for recurrent and metastatic tumors**. Nature communications. 9: 1532 p. 2018.
- <sup>23</sup> SOKOLENKO, A.; IMYANITOV, E. **Molecular diagnostics in clinical oncology**. Frontiers in molecular biosciences. 5: 76 p. 2018.
- <sup>24</sup> WARREN, J. L. et al. Evaluation of trends in the cost of initial cancer treatment. **J Natl Cancer Inst**, v. 100, n. 12, p. 888-97, Jun 18 2008. ISSN 1460-2105 (Electronic)
- 0027-8874 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18544740](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18544740)>.

- <sup>25</sup> BOCKER, W. et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. **Lab Invest**, v. 82, n. 6, p. 737-46, Jun 2002. ISSN 0023-6837 (Print)
- 0023-6837 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12065684](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12065684)>.
- <sup>26</sup> CALLAGY, G. et al. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. **Diagn Mol Pathol**, v. 12, n. 1, p. 27-34, Mar 2003. ISSN 1052-9551 (Print)
- 1052-9551 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12605033](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12605033)>.
- <sup>27</sup> SOKOLENKO, A.; IMYANITOV, E. **Molecular tests for the choice of cancer therapy**. Current pharmaceutical design. 23: 4794-4806 p. 2017.
- <sup>28</sup> PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, Aug 17 2000. ISSN 0028-0836 (Print)
- 0028-0836 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10963602](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10963602)>.
- <sup>29</sup> SORLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **Eur J Cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667-75, Dec 2004. ISSN 0959-8049 (Print)
- 0959-8049 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15571950](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15571950)>.
- <sup>30</sup> CAREY, L. A. et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA**, v. 295, n. 21, p. 2492-502, Jun 7 2006. ISSN 1538-3598 (Electronic)
- 0098-7484 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16757721](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16757721)>.
- <sup>31</sup> HE, Z. Y. et al. Breast Cancer Subtype is Associated With Axillary Lymph Node Metastasis: A Retrospective Cohort Study. **Medicine (Baltimore)**, v. 94, n. 48, p. e2213, Dec 2015. ISSN 1536-5964 (Electronic)
- 0025-7974 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=26632910](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26632910)>.

- 32 ROUZIER, R. et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 16, p. 5678-85, Aug 15 2005. ISSN 1078-0432 (Print)
- 1078-0432 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16115903](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16115903)>.
- 33 WIECHMANN, L. et al. Presenting features of breast cancer differ by molecular subtype. **Ann Surg Oncol**, v. 16, n. 10, p. 2705-10, Oct 2009. ISSN 1534-4681 (Electronic)
- 1068-9265 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19593632](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19593632)>.
- 34 TANNER, M. et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. **Am J Pathol**, v. 157, n. 5, p. 1467-72, Nov 2000. ISSN 0002-9440 (Print)
- 0002-9440 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11073807](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11073807)>.
- 35 DEXTER, D. L. et al. **Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor.** Cancer Res. 38: 3174-3181 p. 1978.
- 36 PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. **Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7 cell-based tumor vaccines.** Cancer Res. 58: 1486-1493 p. 1998.
- 37 YAN, H. et al. **Active immunotherapy for mouse breast cancer with irradiated whole-cell vaccine expressing VEGFR2.** Oncology reports. 29: 1510-1516 p. 2013.
- 38 PULASKI, B. A. et al. **Immunotherapy combining MHC class II and CD80 cell-based vaccines with IL-12 reduces established metastatic disease and stimulates immune effectors and monokine induced by IFN.** Cancer Immunol. Immunotherapy. 49: 34-45 p. 2000.
- 39 ASLAKSON, C. J.; MILLER, F. R. **Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor.** Cancer Res. 52: 1399-1405 p. 1992.
- 40 LELEKASIS, M. et al. **A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone.** Clinical Exp Metastasis. 17: 163-170 p. 1999.

- 41 KAUR, P. et al. **A mouse model for triple negative breast cancer tumor-initiating cells(TBNC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease.** BMC Cancer. 12: 1-12. p. 2012.
- 42 PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. **Mouse 4T1 Breast Tumor Model.** Current Protocols in Immunology: 1-16 p. 2000.
- 43 BANDYOPADHYAY, U.; DAS, D.; BANERJEE, R. K. **Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis.** Current Science-Bangalore. 77: 658-666 p. 1999.
- 44 BIRBEN, E. S., U. M. SACKENSEN C. ERZURUM, S. KALAYCI, O. **Oxidative stress and antioxidante defense:** World Allergy Organization Journal. 5: 9-19. p. 2012.
- 45 MARKLUND, S. M., G. **Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase.** European Journal of Biochemistry. 47: 469-474 p. 1974.
- 46 ASLANI, B. A.; GHOBADI, S. **Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system.** Life Sciences. 146: 163-173 p. 2016.
- 47 CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. **A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives.** Food and Chemical Toxicology. 51: 15-25 p. 2013.
- 48 PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. **Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases.** Indian Journal of Clinical Biochemistry. 30: 11-26 p. 2015.
- 49 GILLOTEAUX, J. et al. **Microscopic aspects of autoschizic cell death in human ovarian carcinoma cells following vitamin C, vitamin K3 or vitamin C:K3 treatment.** Microsc Microanal. 9: 311-329 p. 2003.
- 50 JAMISON, J. M. et al. **Flow cytometric and ultrastructural aspects of the synergistic antitumor activity of vitamin C-Vitamin K3 combinations against human prostatic carcinoma cells.** Tissue & Cell. 28: 687-701 p. 1996.
- 51 \_\_\_\_\_. **Cell cycle arrest and autoschizis in human bladder carcinoma cell line following vitamin C and vitamin K3 treatment.** Biochem Pharmacol. 67: 337-351 p. 2004.
- 52 BIRBEN, E. **Oxidative stress and antioxidante defense:** World Allergy Organization Journal. 5 2012.

- 53 ANDERSON, R. et al. **The effects of increasing weekly doses of ascorbate on certain cellular and humoral immune functions in normal volunteers.** American Journal of Clinical Nutr. 33: 71-76 p. 1980.
- 54 BLOCK, G. **Epidemiologic evidence regarding vitamin C and cancer.** American Journal of Clinical Nutrition. 54: 1310S-1314S p. 1991.
- 55 TAPER, H. S. et al. **Non-toxic potentiation of cancer chemotherapy by combined C and K3 vitamin pre-treatment.** International Journal of Cancer. 40: 575-579 p. 1987.
- 56 BROWN, R. S.; WAHL, R. L. **Overexpression of glut-1 glucose transporter in human breast cancer an immunohistochemical study**  
Cancer. 72: 2979-2985 p. 1993.
- 57 JAMISON, J. M. et al. **Autoschizis: a novel cell death.** Biological Pharmacology. 63: 1773-1783 p. 2002.
- 58 SCHUTTE, B. et al. **Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells.** Journal of Neuroscience Methods. 86: 63-69 p. 1998.
- 59 CROWLEY, L. C. et al. **Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry.** Cold Spring Harb Protoc: 647-651 p. 2016.
- 60 BECK, R. et al. **Menadione reduction by pharmacological doses of ascorbate induces an oxidative stress that kills breast cancer cells.** International Journal of Toxicology. 28: 33-42 p. 2009.
- 61 AEBI, H. **Catalase in vitro.** Methods in enzymology. 105: 236 p. 1947.
- 62 TATUM, V.; CHANGCHIT, C.; CHOW, C. **Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection.** Lipids. 25: 226-229 p. 1990.
- 63 SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. **Estimation of total, protein bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent.** Analytical Biochemistry. 25: 192-205 p. 1968.
- 64 LOWRY, O. H. et al. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** Journal of Biol. Chem. 193: 265-275 p. 1951.

- 65 VERRAX, J. et al. **Redox-active quinones and ascorbate: an innovative cancer therapy that exploits the vulnerability of cancer cells to oxidative stress.** *Anti-Cancer agents in medical chemistry.* 11: 213-221. p. 2011.
- 66 THOIDINGJAM, S.; TIKU, A. B. **New developments in breast cancer therapy: role of iron oxide nanoparticles.** *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* 8: 1-9. p. 2017.
- 67 BRANDT, K. et al. **Augmentation of intracellular iron using iron sucrose enhances the toxicity of pharmacological ascorbate in colon cancer cells.** *Redox Biology.* 14: 82-87 p. 2018.
- 68 VICTOR, V.; ROCHA, M.; FUENTE, M. **Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis.** *International immunopharmacology.* 4: 327-347 p. 2004.
- 69 PERRY, R. et al. **Glutathione levels and variability in breast tumors and normal tissue.** *Cancer.* 72: 783-787 p. 1993.
- 70 BARRANCO, S. et al. **Relationship between colorectal cancer glutathione levels and patient survival.** *Dis Colon Rectum:* 1133-1140 p. 2000.
- 71 YEH, C.-C. et al. **A study of glutathione status in blood and tissues of patients with breast cancer.** *Cell biochemistry and function.* 24: 555-559 p. 2006.
- 72 PERQUIN, M. et al. **The glutathione-related detoxification system is increased in human breast cancer in correlation with clinical and histopathological features.** *J Cancer Re Oncol.* 127: 368-374 p. 2001.