

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DE COMPOSTOS
ANTIOXIDANTES SOBRE OS EFEITOS TÓXICOS CAUSADOS POR
DOCETAXEL E CARBOPLATINA NO MODELO ALTERNATIVO**

Caenorhabditis elegans

INGRID MULLICH FLESCH

PORTO ALEGRE, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DE COMPOSTOS
ANTIOXIDANTES SOBRE OS EFEITOS TÓXICOS CAUSADOS POR
DOCETAXEL E CARBOPLATINA NO MODELO ALTERNATIVO**

Caenorhabditis elegans

Dissertação apresentada por **Ingrid
Mullich Flesch** para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Prof Dra Solange Cristina Garcia

PORTO ALEGRE, 2021

Esta Dissertação de Mestrado foi desenvolvida sob a orientação da Profª Drª Solange Cristina Garcia, no Laboratório de Toxicologia (LATOX) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ingrid Mullich Flesch recebeu bolsa de mestrado CAPES.

Este trabalho foi avaliado pela Banca Examinadora composta por:

Profª. Drª. Vera Lucia Eifler-Lima

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Drª Gabriela Göethel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profª Drª. Natália Brucker (Membro Suplente)

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Flesch, Ingrid Mullich
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DE COMPOSTOS
ANTIOXIDANTES SOBRE OS EFEITOS TÓXICOS CAUSADOS POR
DOCETAXEL E CARBOPLATINA NO MODELO ALTERNATIVO
Caenorhabditis elegans / Ingrid Mullich Flesch. --
2021.
101 f.
Orientadora: Solange Cristina Garcia.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2021.

1. Toxicidade. 2. Antioxidantes. 3. Câncer de Mama.
4. Câncer de Pulmão. 5. Caenorhabditis elegans. I.
Garcia, Solange Cristina, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à professora Solange C. Garcia pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Obrigada por todos ensinamentos e por ter confiado em mim para realizar este trabalho.

Agradeço a toda minha família, principalmente meus pais, Ricardo e Miriam, por sempre me apoiarem e incentivarem o estudo, fazendo o possível e o impossível para me ver feliz. Agradeço minha irmã Ellen, por estar sempre presente! Amo muito vocês!

Agradeço imensamente a Carol, que me mostrou apoio em todos os momentos dessa jornada e nunca negou ajuda. Carol, obrigada por sempre me ajudar, me acalmar, me ensinar tanto e por tudo que fez por mim! Sou extremamente grata à nossa amizade e tenho certeza que será para sempre!

Agradeço a Gabi, por me ensinar tanto e confiar em mim no início da minha jornada acadêmica. Gabi, trabalhar contigo durante o teu doutorado despertou em mim o amor pela pesquisa! Obrigada!

Agradeço a Elisa e a Sabrina, por terem me aconselhado em todos momentos e deixarem esse caminho mais leve.

Agradeço à toda equipe do LATOX, principalmente as ICs Ingrid e Shanda. Obrigada gurias por embarcarem comigo nesse projeto, a ajuda de vocês foi fundamental para realizar com excelência este trabalho.

Agradeço a todas minhas amigas Dani, Gabi Vasconcellos, Gabi Susin e Camila. Vocês são pessoas fundamentais na minha vida. Agradeço todos os dias por meu caminho ter cruzado com o de vocês. A amizade de vocês transformou minha vida. Obrigada por sempre estarem presentes, por demonstrarem tanto amor e carinho. Amo vocês!

Agradeço às amigas Bruna e Bárbara, meus maiores presentes da faculdade. Como é incrível ver a jornada de vocês na nossa profissão! Admiro muito vocês, sem dúvidas me inspiram a ser uma profissional melhor. Obrigada por sempre escutarem meus desabafos e por todos conselhos! Vocês são perfeitas! Amo vocês!

Agradeço à todas outras amigas, pela companhia maravilhosa e por sempre acrescentarem alegria aos meus dias!

Agradeço à professora Vera Lima, ao professor Marcelo Arbo e à Dra. Gabriela Göethel por aceitarem o convite para participar da banca examinadora deste trabalho.

À UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela estrutura para realizar o Mestrado.

À CAPES pelo fomento através da concessão da bolsa.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada na seguinte maneira: Introdução, Revisão da Literatura, Objetivos, Metodologia, Resultados e Discussões, Artigo científico submetido, Conclusões, Referências Bibliográficas e Perspectivas Futuras.

Pelo fato desta dissertação ocorrer durante a pandemia mundial causada pelo Covid-19, a prática em ambiente laboratorial não pode ser continuada, pois o acesso as áreas da universidade ficaram restritos devido às sucessivas Portarias declaradas pelo Governos Estadual e pela própria UFRGS ([Portaria nº 2522/2020](#), Portaria nº 2.806/2020, [Portaria nº 3.160/2020](#), [Portaria nº 3368/2020](#), [Portaria n.º 3991/2020](#), Portaria nº 4.336/2020, [Portaria 4.881/2020](#), [Portaria nº 5.996/2020](#)). Desta forma, o artigo submetido presente nesta dissertação trata-se de uma revisão sistemática, porém também serão apresentados os resultados preliminares obtidos anteriormente à restrição das atividades presenciais e o que foi desenvolvido nos períodos de reabertura da UFRGS.

RESUMO

O câncer é o principal problema de saúde pública do mundo, visto que é a doença não-transmissível com maior taxa de mortalidade. Os tipos de cânceres com maiores números de casos esperados são o de mama e de pulmão. O tratamento utilizado para o câncer é extremamente agressivo, causando efeitos tóxicos que impactam negativamente na qualidade de vida do paciente. Sabe-se que elegera um desequilíbrio das espécies reativas causando estresse oxidativo. Sendo assim, a utilização de antioxidantes poder ser uma boa estratégia para diminuir a toxicidade e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Nesse sentido, esse trabalho tem como objetivo avaliar se a ação de uma mistura de antioxidantes e do extrato da romã podem minimizar alguns efeitos nocivos causados pelos quimioterápicos docetaxel e carboplatina, usando o modelo alternativo *Caenorhabditis elegans*. Além disso, também foi realizada uma revisão sistemática com o intuito de analisar se os antioxidantes associados ao tratamento do câncer de mama e de pulmão podem ajudar a melhorar os efeitos colaterais, o prognóstico ou a qualidade de vida dos pacientes. Os ensaios realizados em *C. elegans* mostraram que a mistura de antioxidantes foi capaz de reduzir a mortalidade causada pelos agentes quimioterápicos, porém esse resultado não foi obtido para o extrato de romã. Para a revisão, foram selecionados 515 estudos, destes, 45 deles foram incluídos no trabalho. Os antioxidantes mais utilizados nos estudos avaliados foram as vitaminas. A maioria dos estudos tiveram um resultado positivo associando o uso de antioxidantes com quimioterapia. Entretanto, alguns estudos nos quais os pacientes se autoadministravam os antioxidantes, tiveram um prognóstico negativo. Nesse sentido, foi visto que os antioxidantes são de extrema importância para melhorar a qualidade de vida do paciente com câncer e ajudar no tratamento, porém, ainda são necessários mais estudos.

Palavras-chave: Toxicidade; Antioxidantes; Docetaxel; Carboplatina; *Caenorhabditis elegans*, Câncer de Mama; Câncer de Pulmão.

ABSTRACT

Cancer is the main public health problem in the world, as it is the non-communicable disease with the highest mortality rate. The types of cancer with the highest number of expected cases are breast and lung. The treatment used for cancer is extremely aggressive, causing toxic effects that negatively impact the patient's quality of life. It is known to elect an imbalance of reactive species causing oxidative stress. Therefore, the use of antioxidants can be a good strategy to reduce toxicity and improve the quality of life of patients. In this sense, this work aims to evaluate whether the action of a mixture of antioxidants and pomegranate extract can minimize some harmful effects caused by the chemotherapeutic drugs docetaxel and carboplatin, using the alternative model *Caenorhabditis elegans*. In addition, a systematic review was also carried out in order to analyze whether antioxidants associated with the treatment of breast and lung cancer can help to improve patients' side effects, prognosis or quality of life. The tests carried out on *C. elegans* showed that the mixture of antioxidants was able to reduce the mortality caused by chemotherapeutic agents, but this result was not obtained for the pomegranate extract. For the review, 515 studies were selected, of which 45 were included in the work. The most used antioxidants in the evaluated studies were vitamins. Most studies have had a positive result associating the use of antioxidants with chemotherapy. However, some studies in which patients self-administered antioxidants had a negative prognosis. In this sense, it was seen that antioxidants are extremely important to improve the quality of life of cancer patients and help with treatment, however, further studies are needed.

Keywords:

Toxicity; Antioxidants; Docetaxel; Carboplatin; *Caenorhabditis elegans*; Breast Cancer; Lung Cancer.

Sumário

INTRODUÇÃO	13
OBJETIVOS	17
1. Objetivo Geral:.....	18
2. Objetivos Específicos	18
2.1 Objetivos Específicos da Parte Experimental	18
2.2 Objetivos Específicos da Revisão	18
REVISÃO DE LITERATURA	19
1. Câncer	20
1.1 Câncer de Mama.....	22
1.2 Câncer de Pulmão	27
2. Antioxidantes.....	30
3. <i>Caenorhabditis elegans</i>	35
MATERIAIS E MÉTODOS	39
1. Reagentes	40
2. Preparo de Soluções	40
3. Cepa N2 e sincronização dos nematoides.....	41
4. Exposição dos nematoides aos antioxidantes e aos quimioterápicos... 41	
5. Avaliação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	42
6. Ensaio de Mortalidade.....	42
7. Ensaio de Desenvolvimento	42
8. Análise Estatística	43
RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
1. Toxicidade do extrato de romã (POMx) e da mistura de antioxidantes (Mix) após 24 h de exposição.....	46
2. Avaliação do potencial efeito protetor da mistura de antioxidantes sobre a mortalidade induzida por Paraquat e MMS nos nematoides	48
3. Avaliação do potencial efeito protetor do extrato de romã e da mistura de antioxidantes sobre a mortalidade induzida por Docetaxel e Carboplatina.....	49

4. Avaliação da área corporal do <i>C. elegans</i> expostos ao extrato de romã (POMx) ou mistura de antioxidantes (Mix)	51
5. Avaliação do efeito protetor do extrato de romã (POMx) e da mistura de antioxidantes em relação ao PQ ou MMS na área corporal de <i>C. elegans</i> ..	53
6. Avaliação do efeito protetor da mistura de antioxidantes contra docetaxel e carboplatina na área corporal de <i>C. elegans</i>	54
7. Produção de EROS	56
ARTIGO SUBMETIDO.....	59
CONCLUSÕES.....	85
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	87
REFERÊNCIAS	89

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença na qual células somáticas sofrem mutações e possuem taxas de crescimento anormais e essas células são capazes de invadir qualquer tecido. A maioria dos cânceres são devido a fatores ambientais, como: obesidade, infecções, exposição à radiação ionizante, tabagismo e falta de exercício físico. Apenas 10% dos casos são devido à fatores genéticos (Klaunig, 2019). O câncer é considerado como o maior problema de saúde pública em todo o mundo, visto que, é a principal causa de morte por doenças não transmitidas. A estimativa de novos casos de câncer no Brasil, para os anos de 2020 a 2022, são de 625 mil casos (INCA, 2020).

O câncer de mama é conhecido por ser o tipo mais frequente de câncer em mulheres. Possui alta taxa de mortalidade, sendo responsável por 15.403 mortes em 2015 (INCA, 2017). Em 2020, estimou-se 66.280 novos casos entre mulheres brasileiras (INCA, 2020). A etiologia do câncer de mama é multifatorial, incluindo fatores reprodutivos e endócrinos, mutações herdadas e fatores ambientais (WHO, 2014). Em relação aos homens, o câncer de pulmão é o responsável pelo maior número de mortes, e sua incidência está diretamente relacionada com o tabagismo (Barta et al., 2019). Outros fatores de riscos estão associados a exposição a fumaça do cigarro e fatores ambientais, como exemplo a exposição a asbestos e emissões de diesel (Chivima, 2015).

O tratamento para o câncer pode ser local, sistêmico ou uma combinação dos dois. O tratamento local se refere a remoção cirúrgica do tumor e radioterapia. Já o sistêmico é aquele no qual são utilizados medicamentos, podendo ser a quimioterapia ou hormonioterapia (American Cancer Society, 2021).

Normalmente, o tratamento utilizando uma combinação de quimioterápicos é extremamente agressivo, sendo estes, causadores de danos celulares oxidativos, não apenas nas células malignas, como também nas saudáveis, o que leva a sérios efeitos adversos (Lamson e Brignall, 1999). A maioria dos agentes antitumorais utilizados promovem a produção de altos níveis de espécies reativas, o que causa uma diminuição nos níveis de antioxidantes plasmáticos nos pacientes (Gorrini et al., 2013). Nesse sentido, uma das formas de melhorar a qualidade de vida dessa população é a

suplementação com antioxidantes, visando diminuir os efeitos adversos causados pela toxicidade do tratamento (Block et al., 2007).

Esse tratamento complementar tornou-se popular e estima-se que de 13% a 87% dos pacientes estejam tomando suplementos à base de antioxidantes (Block et al., 2007). No entanto, a automedicação por pacientes com antioxidantes pode ser um problema em doenças complexas, como o câncer, porque esses compostos podem interferir na terapia, protegendo não apenas as células normais, mas também as células cancerígenas (Moss et al., 2006). Apesar disso, existem estudos mostrando que os antioxidantes ajudaram a aliviar os sintomas e parecem ser uma boa alternativa para ajudar os pacientes a permanecerem em tratamento (Figura 1) (Moss et al., 2006).

Nesse sentido, este projeto tem como objetivos investigar se os antioxidantes poderiam proteger contra os efeitos tóxicos dos quimioterápicos, utilizando modelo alternativo *in vivo* o nematoide *Caenorhabditis elegans*. Devido a pandemia do coronavírus, foi realizada também a escrita de um artigo de revisão sistemática a respeito do tema proposto.

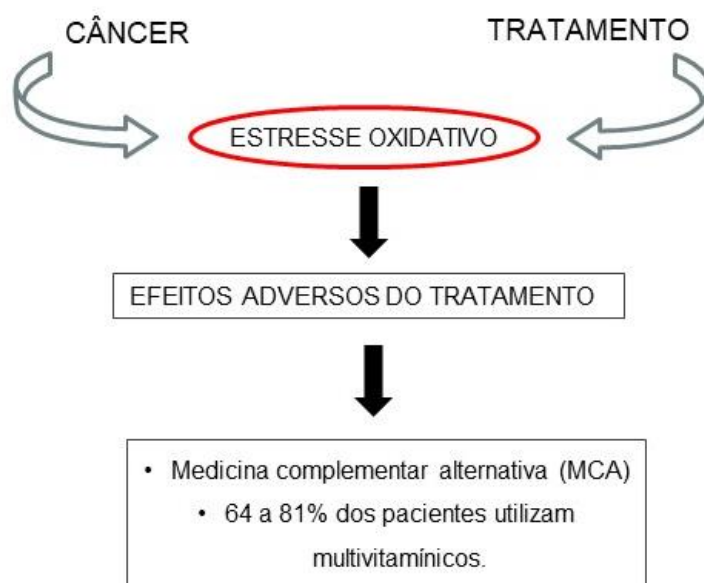


Figura 1. Estresse oxidativo como efeito adverso do tratamento e forma de manejo pelos pacientes de câncer de mama e pulmão.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral:

Este projeto teve como objetivo inicial avaliar se o extrato de romã (POMx) e uma mistura de antioxidantes (ácido α -lipóico, vitamina C, coenzima Q10, curcumina) podem minimizar os efeitos nocivos causados pelo docetaxel e carboplatina, quimioterápicos utilizadas no tratamento do câncer de mama, utilizando o modelo alternativo *C. elegans*. Devido a pandemia do coronavírus, os ensaios laboratoriais tiveram que ser interrompidos, desse modo foi realizado a escrita de um artigo de revisão sistemática relacionada ao tema proposto. Portanto este trabalho foi dividido em uma parte experimental e uma parte de revisão.

2. Objetivos Específicos

2.1 Objetivos Específicos da Parte Experimental

Avaliar a exposição de antioxidantes e quimioterápicos docetaxel e carboplatina em *C. elegans*;

Realizar testes preliminares de mortalidade e desenvolvimento em *C. elegans* tratados com o extrato de romã

Realizar testes preliminares de mortalidade e desenvolvimento em *C. elegans* tratados com a mistura dos antioxidantes ácido α -lipóico, vitamina C, coenzima Q10 e curcumina

Avaliar a mortalidade e desenvolvimento de *C. elegans* expostos ao docetaxel e carboplatina previamente tratados com extrato de romã e com a mistura dos antioxidantes;

Analisar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em *C. elegans* quando exposto ao docetaxel e carboplatina previamente tratados com extrato de romã e com a mistura dos antioxidantes;

Analisar se os antioxidantes foram capazes de minimizar os efeitos tóxicos causados pelos quimioterápicos docetaxel e carboplatina.

2.2 Objetivos Específicos da Revisão

- Realizar uma revisão sistemática sobre o uso de antioxidantes concomitantes ao tratamento do câncer de mama e pulmão.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Câncer

O câncer é considerado uma doença que tem como característica o crescimento de forma agressiva, rápida e desordenada de células que sofreram uma alteração genética, transformando-se então em uma célula cancerosa, podendo acometer qualquer tecido do corpo (INCA, 2020). O câncer é a segunda maior causa de morte à nível mundial, estando este dado, porém, em transição. Um estudo realizado em 21 países mostrou que alguns já tinham o câncer como primeira causa da mortalidade da população (Hulvat, 2020).

Para o ano de 2020, foram estimados mais de 19 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes, mundialmente. Os tipos de câncer mais comumente diagnosticados são de o mama feminino, pulmão, próstata, pele não melanoma (sem considerar os casos de carcinoma basocelular) e colón. Nos homens, o tipo de câncer responsável pela maior mortalidade é o de pulmão e nas mulheres, o câncer de mama. Quando considerado ambos os gêneros juntos, o de pulmão é o responsável pelo maior número de mortes, sendo 1 em cada 5 (Sung et al., 2020). No Brasil, são esperados mais de 600 mil casos para os anos de 2020 a 2022, sendo o de pele não melanoma o mais incidente seguido pelos cânceres de mama e próstata, coloretal e pulmão (INCA, 2019).

O tratamento do câncer, normalmente, refere-se a um conjunto de ações, que consistem em remoção cirúrgica do tumor, radioterapia e tratamento com medicamentos, como a quimioterapia (INCA, 2019). A radioterapia foi utilizada na clínica pela primeira vez em 1896 e desde então esta técnica foi evoluindo. Atualmente, é utilizada como tratamento em 50% dos casos de câncer (Allen et al., 2017). A radioterapia tem como objetivo controlar localmente o tumor, ajudando a impedir o espalhamento da doença, e pode ser utilizada em todos os tipos de câncer. O princípio do tratamento é a aplicação de radiação de feixes de alta energia onde o tumor está localizado, causando danos no DNA das células cancerígenas e levando-as a morte (Jarosz-Biej et al., 2019).

Em 1960, o tratamento baseava-se em cirurgia e radioterapia, porém o aparecimento de micrometastases fez com que o uso de medicamentos fosse associado a esses tratamentos para melhorar o índice de cura (DeVita Jr e Chu, 2008). A associação de quimio e radioterapia ajuda a garantir uma eficácia melhor com menos efeitos tóxicos, visto que a radioterapia faz apenas um

controle da proliferação celular local (DeVita Jr e Chu, 2008; Allen et al., 2017). O primeiro caso de sucesso utilizando quimioterapia foi no tratamento de linfoma utilizando mostardas nitrogenadas (Amjad, et al., 2020).

A quimioterapia tem como objetivo impedir a proliferação das células malignas interferindo na síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) ou de proteínas, levando, então, à morte celular. As células cancerígenas exigem a repetição do tratamento para serem eliminadas. Infelizmente, o tratamento quimioterápico também atinge as células saudáveis, o que causa toxicidade no organismo levando a uma série de efeitos indesejados. Tendo em vista a diminuição desta toxicidade, é sugerido o uso de quimioterapia combinada, ou seja, a utilização de diferentes agentes quimioterápicos para promover a morte celular. Os quimioterápicos são divididos em diversas classes de acordo com o mecanismo de ação, sendo algumas: agentes alquilantes, como a ciclofosfamida; inibidores mitóticos, como os taxanos; antimetabólitos, como o 5-fluorouracil e gemcitabina; antraciclinas, como a doxorrubicina; os inibidores da síntese de DNA, como os derivados de platina; os anticorpos, como o trastuzumabe e hormônios ou antagonistas de hormônios, como o tamoxifeno (Amjad et al., 2020).

O câncer está fortemente relacionado com o estresse oxidativo. Espécies reativas de oxigênio (EROS) estão associadas a iniciação, progressão e promoção tumoral, além de levarem a danos ao DNA (Klaunig et al., 2019). O tratamento do câncer também está associado a uma elevação de espécies reativas. Diversos estudos mostram a associação dos efeitos adversos do tratamento com a produção de radicais livres (Weijl, 1997; Conklin et al., 2000; Liu et al., 2020). Muitos quimioterápicos acabam tendo como mecanismo de ação a produção de radicais livres e sabe-se que as antraciclinas e os compostos de platina são os que geram a maior elevação nos níveis de espécies reativas. Porém, esse mecanismo não é a principal via de ação destes quimioterápicos. A cisplatina, por exemplo, liga-se ao DNA formando adutos impedindo a replicação do DNA, o que então, leva a formação de estresse oxidativo. Outro ponto importante, é que a exposição prolongada a espécies reativas gerado pela quimioterapia gera resistência ao tratamento, diminuindo sua eficácia (Yang et al., 2018).

O maior problema enfrentado pelos pacientes com câncer durante o tratamento são os efeitos adversos da terapia, afetando a qualidade de vida do paciente, podendo levar até a uma possível diminuição da dosagem dos agentes quimioterápicos. Um estudo realizado com pacientes da Austrália utilizando quimioterapia, mostrou que os efeitos indesejados são diversos, mas os mais relatados foram fadiga, constipação e dor (Pearce et al., 2017). Sabe-se que alguns efeitos adversos são mais comuns em determinadas classes de agentes quimioterápicos, como por exemplo: antraciclinas causam cardiotoxicidade e os derivados de platina nefrotoxicidade e neurotoxicidade (Livshits et al., 2014; Amjad et al., 2020).

A medicina complementar e alternativa (MCA) é utilizada por muitos pacientes de câncer com o intuito de melhorar a qualidade de vida e amenizar os sintomas adversos causados pelo tratamento. Refere-se desde a prática de atividades religiosas até a suplementação de produtos naturais e antioxidantes (Abuelgasim et al., 2018). Um estudo realizado na Suécia mostrou que pelo menos 25% dos pacientes com câncer fazem prática de MCA e que estão muito satisfeitos com os resultados obtidos (Wode et al., 2019). Outro estudo mostra que 25 a 80% dos pacientes usam MCA para manejo do câncer (Alsharif et al., 2021). Em relação ao uso de suplementos dietéticos, estima-se que 64 a 81% dos pacientes de câncer fazem o uso de multivitamínicos após receberem o diagnóstico (Poljsak e Milisav, 2018).

Tendo em vista que o câncer de pulmão e o de mama são os mais prevalentes em nível mundial, estes serão abordados com mais detalhes a seguir, principalmente a respeito dos agentes quimioterápicos de escolha e a toxicidade causada por eles no organismo.

1.1 Câncer de Mama

Sabe-se que a etiologia do câncer de mama é multifatorial e 80% dos casos ocorrem em mulheres acima dos 50 anos. Gênero, idade e história genética, são os três maiores riscos, mas a doença também pode estar associada a outros fatores como: sobrepeso, consumo excessivo de bebidas alcoólicas, tabagismo, gravidez após os 30 anos e menarca anterior aos 12 anos. O câncer de mama pode ser classificado como invasivo e não invasivo e estes dividem-se em diversos subtipos (Akram et al., 2017).

Estudos indicam que 1 em cada 8 mulheres desenvolverá câncer de mama, sendo apenas 5 a 10% dos casos decorrentes de fatores genéticos. Como a maior parte dos casos do câncer de mama decorrem de fatores ambientais e estilo de vida, é de suma importância que a medicina siga em constante evolução para melhorar a prevenção primária. Esta, consiste em reduzir ao máximo os fatores de risco e melhorar o sistema imunológico da população (Kolak et al., 2017).

Os fatores ambientais, como os citados acima, são de grande influência no desenvolvimento ou não de doenças em geral. Já existem estudos que comprovam que uma dieta rica em gordura trans e de alto índice glicêmico está associada a um maior risco de câncer de mama. Em relação a obesidade, os casos de câncer de mama em mulheres que previamente ao diagnóstico já apresentavam sobrepeso, apresentam 33% de mais chances de mortalidade, além de piorar o prognóstico a longo prazo de mulheres que já realizaram o tratamento quimioterápico. Com relação a intensidade de exercícios físicos, estudos mostram que mulheres que realizam atividade física de intensidade moderada a alta possuem o risco reduzido em 10 a 25% de desenvolver câncer em relação a mulheres sedentárias (Kolak et al., 2017).

Os três principais subtipos de câncer de mama são classificados de acordo com a presença ou ausência de marcadores moleculares para receptores de estrogênio ou progesterona e o receptor do fator de crescimento epidermal 2 (ERBB2, antigo HER-2). Sendo que 70% possuem receptor de hormônio positivo, mas ERBB2 negativo, 15 a 20% dos casos são ERBB2 positivo e o restante é conhecido como triplo negativo, que não apresentam os marcadores moleculares previamente descritos (Waks e Winer, 2019).

O câncer de mama com receptores de hormônio positivo corresponde a maior parte dos casos, é menos agressivo e é associado a um melhor prognóstico. Nesses casos, mais de 50% dos pacientes apresentam resultados positivos com a hormonioterapia (Vingiani e Viale, 2017). A superexpressão do oncogene receptor do fator de crescimento epidermal 2 (ERBB2) causa um aumento da proliferação e crescimentos das células tumorais e, normalmente, é associado a um pior prognóstico do quadro do paciente (Liu et al., 2019; Asif et al., 2016). Quando não há a expressão dos receptores de hormônios e nem de

ERBB2, o câncer de mama é classificado como triplo negativo. Pacientes com câncer de mama triplo negativo em metástase apresentam um pior prognóstico, visto que não há um consenso de um regime de tratamento específico para esse subtipo de câncer de mama (Andre et al.,2017).

O diagnóstico de câncer de mama é feito a partir de técnicas de imagem, como a mamografia, por marcadores bioquímicos e análise dos sintomas físicos, como dor e nódulos ou massas palpáveis (Jafari et al., 2018). Se detectado na fase inicial da doença, quando ainda não há metástase, o câncer de mama é potencialmente curável. O diagnóstico para malignidade é confirmado por biópsia. Em relação à pesquisa por metástase, só é feita em pacientes sintomáticos ou com alto risco de recidiva. Para os assintomáticos, a metástase ocorre naqueles que possuem tumor com diâmetro grande ou que possuem doença nodal extensa (linfonodos positivos). Para avaliar o estadiamento, são feitos exames de rotina no paciente, como radiografia de tórax, ultrassom abdominal e cintilografia óssea (Harbeck et al., 2017).

Para o tratamento do câncer, a quimioterapia é uma grande aliada, sendo utilizada de forma concomitante ou subsequente a outras estratégias, como a radioterapia, cirurgia, hormonioterapia e imunoterapia. Os quimioterápicos possuem diferentes mecanismos para matar as células cancerígenas e são mais eficazes em células que possuem alta taxa de proliferação (Ilghami et al., 2020).

Mulheres com o diagnóstico de câncer de mama local em estado avançado ou invasivo em estágio inicial tem a recomendação de remoção cirúrgica seguida por radioterapia. Para os casos com receptores de hormônios positivos em mulheres pós menopausa, é indicada a utilização de inibidores da aromatase, com ou sem tamoxifeno. Todas as pacientes com linfonodos positivos devem receber quimioterapia (Fisusi et al., 2019).

A terapia adjuvante tem como objetivo melhorar o tratamento localizado do câncer (radioterapia e cirurgia). No câncer de mama, as terapias adjuvantes constam de quimioterapia, hormonioterapia e terapia-alvo, que ataca especificamente em receptores específicos. O regime quimioterápico mais utilizado é uma combinação de antraciclinas com taxanos. A hormonioterapia consiste em inibidores de aromatase, bloqueadores do receptor de estrogênio e

agonistas do hormônio liberador de gonadotropina. E para a terapia-alvo é utilizado anticorpo monoclonal (Maughan et al., 2010).

O câncer de mama com receptores hormonais positivos representa aproximadamente 75% dos casos e a hormonioterapia é indicada para o tratamento. Para mulheres pré-menopausa, é indicada a ablação ovariana, que é a remoção dos ovários, associada ao uso de um inibidor de aromatase ou tamoxifeno (Andre et al., 2017). Mulheres pós menopausa tem como indicação o tamoxifeno e inibidores de aromatase não esteroidais, como o anastrozol e o letrozol, e os esteroidais, exemestano, que são indicados principalmente quando há contraindicação do uso de tamoxifeno devido a trombose, embolia ou doenças oculares (Veronesi et al., 2005).

Os inibidores da aromatase agem inibindo a enzima aromatase, que é a responsável pela síntese de estrogênio (Al-Mahmood et al., 2018). O tamoxifeno age suprimindo o estrogênio, que no câncer de mama é um hormônio responsável pela proliferação das células malignas. O tamoxifeno é responsável por gerar um quadro de estresse oxidativo, causando apoptose e gerando peroxidação lipídica. Vários estudos já relataram seu potencial genotóxico e o uso a longo prazo pode levar a ocorrência de câncer endometrial, assim como, diminuição nos níveis de enzimas antioxidantes, o que gera uma resistência ao tratamento (Yang et al., 2013).

Os casos de câncer de mama triplo negativo não têm um tratamento sistêmico específico. Recomenda-se o uso de compostos da platina, como a carboplatina e a cisplatina (Andre et al., 2017). O tratamento combinando antraciclinas com taxanos possuem uma boa resposta e a associação de ciclofosfamida a essa combinação também apresentou bons resultados (Bergin e Loi, 2019).

Existem diversos regimes quimioterápicos para o tratamento do câncer de mama ERBB2 positivo, normalmente, eles consistem na combinação do trastuzumabe com outros agentes quimioterápicos. O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal humano que age no receptor ERBB2, inserido nos testes clínicos a partir de 1990, que comprovaram que a adição deste anticorpo ao tratamento aumentou a sobrevida dos pacientes (Waks e Winer, 2019). Geralmente, é bem tolerado, mas possui como seu principal efeito adverso o

aumento do risco de disfunção cardíaca (Azim et al., 2018; Barish et al., 2019). A cardiotoxicidade causada pelo trastuzumabe está relacionada à sua grande afinidade na ligação ao ERBB2, tornando o receptor incapaz de dimerizar. Os cardiomiócitos ficam sob um quadro de estresse, não podendo ativar as vias de sobrevivência celular que lidariam com a produção excessiva de EROs (Zeglinski et al., 2011).

Foram realizados estudos clínicos combinando o uso do trastuzumabe com regimes quimioterápicos compostos predominantemente de antraciclinas. A adição do anticorpo monoclonal reduziu em aproximadamente 50% a chance de recorrência e melhorou em 30% o tempo de sobrevida. Porém, esta associação causou um aumento na taxa de insuficiência cardíaca. Dentre as possíveis combinações deste anticorpo com outros quimioterápicos, um regime que mostrou bons resultados foi a associação deste ao docetaxel e a carboplatina, conhecido como TCH, devido a presença de um sinergismo entre estes fármacos. Também foi previsto que, utilizando esta associação, a toxicidade cardíaca do tratamento seria reduzida em relação aos tratamentos utilizando antraciclinas (Slamon et al., 2011).

Os compostos de platina causam uma lesão à célula devido a interação com o DNA, inibindo a síntese tanto do DNA como do RNA e proteínas. Tanto a cisplatina quanto a carboplatina se ligam ao DNA formando adutos, causando alterações estruturais (Dilruba e Kalayda, 2016). Estudos mostraram que o dano oxidativo é um dos principais mecanismos responsáveis pela toxicidade de compostos à base de platina, estando o aumento da produção de EROS associado como um dos mecanismos de neurotoxicidade, um dos principais efeitos adversos causado por essa classe de quimioterápicos. Com a intenção de aumentar a segurança dos regimes terapêuticos utilizando estes compostos, sugere-se a suplementação com antioxidantes (Stankovic et al., 2020). O docetaxel é da classe dos taxanos e tem como principal mecanismo de ação a estabilização dos microtúbulos, seu principal efeito adverso é a neutropenia. Também possui como efeito adverso, a produção excessiva de EROS, o que muitas vezes limita o uso desse quimioterápico, visto que os danos colaterais são agressivos (Kütük et al., 2020).

As antraciclina, como a doxorubicina, ligam-se ao DNA e inibem a sua síntese causando uma inibição na ação da topoisomerase II (Rivankar, 2014). O tratamento com esses agentes, causa efeitos adversos como náusea, cardiotoxicidade e síndrome mielodisplásica (Shah et al., 2018). A cardiotoxicidade causada pela doxorubicina é dose dependente e pode causar insuficiência cardíaca. Sabe-se que essa toxicidade nas células cardíacas é causada pelo estresse oxidativo gerado pelo agente antitumoral. É sugerida a administração de antioxidantes para evitar esse efeito adverso (Songbo et al., 2019).

Um estudo realizado em mulheres com câncer de mama mostrou que 80% das pacientes utilizam medicina complementar alternativa para melhorar a qualidade de vida e diminuir os efeitos adversos (Subramami et al., 2017). O tipo de medicina complementar alternativa mais utilizado pelas pacientes com câncer de mama é o uso de plantas medicinais e suplementos de vitaminas e antioxidantes, seguido por práticas como por exemplo, a meditação. Apesar do uso dessas terapias alternativas ser alto entre as pacientes, ainda faltam estudos que comprovem a segurança destas terapias sem influenciar no tratamento tradicional do câncer (Wanchai e Stewart, 2010).

1.2 Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão é inicialmente assintomático, o que leva a ser descoberto em um estágio mais avançado e, conseqüentemente, seu prognóstico é pior. Motivo que justifica o fato deste ser o câncer com maior número de mortes no mundo. É um câncer que acomete pessoas mais velhas, normalmente a partir dos 50 anos, e os homens são mais afetados do que as mulheres. Estima-se que 80 a 90% dos casos são devido ao hábito de fumar, porém apenas 15% dos fumantes desenvolvem câncer de pulmão. Também há influência de fatores genéticos. Uma das manifestações clínicas de câncer de pulmão presente em fumantes ou ex fumantes é o aparecimento de tosse. Pneumonia recorrente e dispnéia também são sintomas que devem ser observados (Schwartz & Cole, 2015 e Nasim et al., 2019).

É importante notar que não somente o tabagismo, como também a inalação da fumaça do cigarro, tanto em fumantes quanto em não fumantes, causa uma reação inflamatória no pulmão, que gera um quadro de estresse

oxidativo no tecido e com isso, ocorrem modificações das funções das proteínas levando a alterações no DNA. Além do cigarro, a inalação de substâncias tóxicas presentes na poluição como asbestos, emissões de diesel e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, favorecem o desenvolvimento de câncer de pulmão (Filaire et al., 2013).

O câncer de pulmão é classificado em dois grupos: câncer de pulmão de pequenas células (CPC), 15% dos casos, ou câncer de pulmão de não pequenas células (CNPC), 85% dos casos. Este último, é subdividido em três subtipos: carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e câncer pulmonar de grandes células (Herbst et al., 2008). Por ser muitas vezes assintomático, o diagnóstico ocorre pela descoberta de um nódulo acidentalmente quando o paciente realiza uma radiografia do peito ou uma tomografia (Hoffman & Sacher, 2017). O diagnóstico do tecido para câncer de pulmão de células não pequenas em estágio inicial é a toracotomia. Já para pacientes em estado mais avançado ou com câncer de pulmão de células pequenas, sugere-se um método menos invasivo, como a quimioterapia. É importante fazer exames de imagem do tórax com frequência em pacientes que possuem suspeita de metástase (Collins et al., 2007).

O tratamento para pacientes com CNPC em estado inicial ocorre através da remoção cirúrgica da massa tumoral. Para pacientes que não podem realizar o procedimento cirúrgico, sugere-se radioterapia. Em casos de CNPC com características de alto risco, deve-se fazer o uso de quimioterapia. Já pacientes com CPC recomenda-se o uso de quimioterapia e radioterapia (Hoffman & Sacher, 2017).

O regime quimioterápico para CNPC avançado é uso de cisplatina ou carboplatina associado a um segundo quimioterápico. A associação mais comum é a de cisplatina com vinorelbina, porém essa associação acaba sendo muito tóxica para alguns pacientes (Harada et al., 2021). Outros agentes utilizados em conjunto com os derivados da platina são o paclitaxel, docetaxel, etoposídeo, gencitabina e irinotecan. Para CPC, a combinação de etoposídeo com cisplatina ou carboplatina é a mais utilizada, com taxa de resposta de 71 a 94% para cisplatina e de 69-87% para carboplatina. Outra associação muito utilizada é ciclofosfamida, doxorubicina e vincristina (Cersosimo, 2002).

Os efeitos adversos mais comuns da cisplatina e carboplatina incluem: náuseas e vômitos, fadiga, mielosupressão, ototoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade e hepatotoxicidade. A cisplatina é mais tóxica do que a carboplatina (Rossi & Maio, 2016). A vinorelbina é pertencente da classe dos alcaloides da vinca e age principalmente inibindo a mitose na fase de metáfase do ciclo celular, pois interage com a tubulina. Pacientes que utilizam a vinorelbina apresentam como efeitos tóxicos, toxicidade hematológica, sintomas gastrointestinais, neurotoxicidade e nefrotoxicidade (Nobili et al., 2020). A vincristina, também pertencente a classe dos alcaloides da vinca, liga-se à tubulina e impede a mitose (Mohammadgholi et al., 2013). O paclitaxel e o docetaxel também fazem com que a divisão celular pare durante a mitose, visto que, eles estabilizam os microtúbulos (Gautam & Koshkina, 2003). Estes agentes quimioterápicos causam toxicidade pulmonar, sendo o paclitaxel causador de reação de hipersensibilidade, resultando em dispneia e broncoespasmo (Long & Suresh, 2020).

A ação do etoposídeo se dá pela interferência na ação da topoisomerase II, causando danos no DNA (Van Maanen et al, 1988) e o irinotecan age inibindo a topoisomerase I (Noda et al., 2002). A gencitabina é incorporada ao DNA causando morte celular (Manegold, 2004). A ciclofosfamida é um agente alquilante, ligando-se a molécula de DNA e impedindo a formação da dupla hélice (Emadi et al., 2009).

Os agentes quimioterápicos causam um aumento dos níveis de espécies reativas no organismo, gerando efeitos adversos que acabam influenciando na resposta ao tratamento. Um estudo realizado por Gupta e colaboradores (2010), analisou o estresse oxidativo causado pelo tratamento em pacientes com câncer de pulmão e, também, a atividade de enzimas antioxidantes dos pacientes. O tratamento com cisplatina e etoposídeo causou um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e de óxido nítrico no plasma e uma diminuição na atividade de glutathione peroxidase (GSH) e superóxido dismutase (SOD) (Gupta et al., 2010). Outro estudo publicado sobre os parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com câncer de pulmão, também teve como resultado a alteração da atividade de enzimas antioxidantes e de biomarcadores de estresse oxidativo (Zanini et al., 2012).

Os efeitos adversos mais comumente relatados pelos pacientes são dor, fadiga, fraqueza e náusea, além dos efeitos que afetam a saúde emocional, como depressão e ansiedade. Para buscar uma melhora destes problemas, estudos mostram que 23 a 66% dos pacientes com câncer de pulmão optam pelo uso de medicina complementar e alternativa (Frenkel et al., 2018). Tendo em vista que os pacientes com câncer de pulmão são diagnosticados tardiamente, eles acabam sentindo mais efeitos adversos da doença em relação aos outros tipos de câncer. Sabe-se que os sintomas indesejados causados pela doença e tratamento estão relacionados com o prognóstico e por isso, é tão importante o conhecimento de alternativas para o manejo dos efeitos adversos (Wells et al., 2007).

2. Antioxidantes

Os processos fisiológicos geram radicais livres, que são moléculas que atuam transferindo elétrons necessários para as reações bioquímicas. Quando em excesso no corpo, estes radicais podem gerar danos oxidativos, que causam desde doenças autoimunes até câncer. Para evitar que haja o acúmulo destas moléculas no organismo, existem os antioxidantes, que são capazes de defender o organismo de danos oxidativos celulares. Quando há um desequilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes, gera-se um quadro chamado de estresse oxidativo (Ferreira et al., 1997; Barbosa et al., 2010). O estresse oxidativo provoca inflamação no organismo, que eventualmente, pode causar carcinogênese ou estimular a progressão do câncer e o comportamento metastático (Rijo et al., 2020).

Os antioxidantes são enzimas ou moléculas que servem como cofatores de reações que eliminam as espécies reativas, podendo ser endógenas ou exógenas. São classificados como antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos (Harris et al., 2020). Possuem três possíveis mecanismos que atuam defendendo o organismo. Os antioxidantes preventivos têm como objetivo suprimir ou prevenir a formação de radicais livres, sendo representados pelas enzimas antioxidantes, como catalase e superóxido dismutase, e proteínas presente no plasma sanguíneo. Os antioxidantes eliminadores de radicais consistem em moléculas não enzimáticas, como as vitaminas, coenzima Q10 e ácido alfa-lipóico. Em relação à última classificação de antioxidantes, os

reparadores *de novo*, são os que reparam ou eliminam os danos estruturais das biomoléculas causados pelos radicais livres, representados pelos sistemas de enzimas de reparo de DNA, lipase e enzimas proteolíticas (Stankovic et al., 2020).

Sabe-se que o câncer causa um quadro de estresse oxidativo no organismo dos pacientes. Essa produção aumentada de espécies reativas ocorre devido as células cancerígenas demandarem uma quantia elevada de adenosina trifosfato (ATP), garantindo energia suficiente para a proliferação anormal quando comparada a células saudáveis (Gorrini et al., 2013). Para garantir a sobrevivência das células cancerígenas, essas possuem mecanismos de antioxidantes de alta eficácia. Com o uso dos quimioterápicos, ocorre uma elevação de radicais livres muito maior do que a causada pela própria doença, impedindo que esse mecanismo avançado de defesa antioxidante das células cancerígenas funcione, diminuindo então, o crescimento destas (Conklin et al., 2000).

A quimioterapia e a radioterapia possuem como resultado do mecanismo de ação a formação de espécies oxidantes, causando estresse oxidativo, que acaba por prejudicar não somente as células malignas, mas também as saudáveis. O tratamento com antitumorais causa uma série de danos nocivos no organismo não somente a longo prazo, mas também causa uma toxicidade aguda durante o tratamento, o que pode causar uma dificuldade na continuidade deste (Prasad et al., 1999). A produção excessiva de espécies reativas ocorre de forma dose e tempo dependente, aumentando continuamente os radicais livres, que então acabam por sobrecarregar a capacidade antioxidante intracelular levando a efeitos adversos (Liu et al., 2020).

Como forma de melhorar o tratamento e a fim de diminuir efeitos adversos, estudos veem sugerindo o uso de antioxidantes associados a terapia para ajudar a proteger as células saudáveis (Figura 2) (Lamson e Brignall, 1999; Nechuta et al., 2010). O uso de antioxidantes auxilia na melhora dos sistemas antioxidantes nas células normais, principalmente elevando a atividade de enzimas antioxidantes, diminuindo enzimas que geram EROS ou aumentando antioxidantes não enzimáticos, o que leva a uma atenuação no estresse

oxidativo e, conseqüentemente, diminuição dos efeitos adversos (Liu et al., 2020).

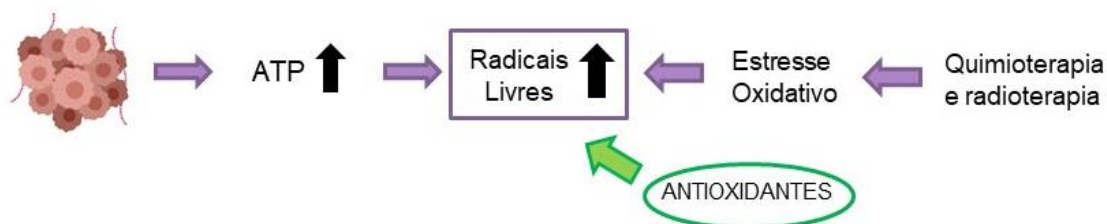


Figura 2. Células cancerígenas e o tratamento do câncer levam a um aumento nos radicais livres que podem ser diminuídos com o uso de antioxidantes.

A radioterapia tem como principal mecanismo de ação a ionização de moléculas gerando radicais livres nas células, que reagem com o DNA e causam a morte celular (Lawenda et al., 2008). Os efeitos adversos da terapia normalmente ocorrem de forma local, no órgão específico. Exemplos dos efeitos indesejados mais comuns são fibrose, atrofia e danos neuronais e eles são relacionados ao estresse oxidativo causado pela radiação (Liu et al., 2020). Como os antioxidantes não protegem de forma específica um tecido do corpo, há uma possível interferência deles na ação da radioterapia (Lawenda et al., 2008). Porém, já existem estudos demonstrando a capacidade de antioxidantes de proteger as células normais enquanto sensibilizam as células cancerígenas à radiação. Por exemplo, estudos mostraram que tanto a vitamina C quanto a E tem esta capacidade, visto que ambas foram capazes de diminuir os efeitos adversos da terapia e com isso, os pacientes toleram melhor o tratamento (Vostrikova et al., 2020).

A quimioterapia, como citado anteriormente, leva a um aumento do quadro oxidativo no organismo. Os agentes quimioterápicos agem nas células que possuem taxa de proliferação elevada causando danos no DNA, muitas vezes pelo próprio aumento das espécies reativas. Com o intuito de proteger as células saudáveis, a administração de antioxidantes associados a quimioterapia são uma alternativa. Ainda há muitas dúvidas sobre a utilização dos antioxidantes na prática clínica, pois há a possibilidade de causar uma diminuição da atividade dos antitumorais. Apesar disso, estudos vem provando os benefícios da associação destes (George e Abrahamse, 2020). O próprio quadro de estresse oxidativo causado pelo quimioterápico é desfavorável para o

seu mecanismo de ação. Devido ao aumento excessivo de espécies reativas, a taxa de proliferação celular é diminuída, alterando então o ciclo celular. Como muitos agentes antitumorais dependem da progressão do ciclo, uma interferência nesta progressão diminui a atividade dos agentes (Conklin et al., 2004).

O uso de suplementos contendo antioxidantes entre os pacientes de câncer é comum e a maioria utiliza com o intuito de aliviar os efeitos adversos e melhorar a qualidade de vida (Ladas et al., 2004). Mais de 60% dos pacientes utilizam vitaminas (Prasad, 2004). A vitamina C é um poderoso antioxidante que também age em diversos processos como cofator de enzimas envolvidas em processos do câncer, como a transcrição e regulação epigenética da expressão gênica. Também possui papel no sistema imunológico e anti-inflamatório, etapas de extrema importância no combate às células pré-cancerosas e cancerosas do hospedeiro (Pawlowska et al., 2019). Estudos mostram que a vitamina C é uma indutora de apoptose em células de câncer de mama, mas não em células normais (Lee et al., 2019).

A vitamina D também é largamente utilizada pelos pacientes com câncer e não há evidências reportadas sobre sua interação com agentes quimioterápicos (Frenkel et al., 2013). Outra vitamina que também possui atividade antioxidante e é muito estudada é a vitamina E. Um estudo clínico que analisou pacientes com câncer de próstata que estavam utilizando 50 mg por dia de vitamina E mostrou uma redução de 41% das mortes (Kline et al., 2007).

A curcumina, derivada da planta *Curcuma longa*, está entre os 10 suplementos dietéticos mais consumidos pelos pacientes de câncer. Estudos utilizando este antioxidante demonstraram sua atividade protegendo rins, fígado e coração da toxicidade induzida pelo tratamento do câncer (Frenkel et al., 2013). A curcumina, além de antioxidante, ajuda na prevenção do câncer, agindo em vias proliferativas, apoptóticas, angiogênicas e metastáticas. Já possuem estudos que afirmam ser vantajosa a associação do uso desta molécula com quimioterápicos. Um estudo realizado com células de câncer de próstata mostrou que a curcumina utilizada juntamente com o docetaxel aumentou a eficácia terapêutica do tratamento ao inibir a proliferação e aumentar a apoptose das células cancerígenas (Banerjee et al., 2017).

Seguindo na linha de antioxidantes derivados de plantas, o extrato de romã (*Punica granatum* L.) possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias devido à alta quantidade de taninos hidrolisáveis e antocianinas. Em comparação a outras moléculas antioxidantes, a romã possui antioxidantes que aparentam ser únicos devido às combinações de uma ampla gama de polifenóis, os quais possuem amplo espectro de ação contra diversos tipos de radicais livres (Sharma et al., 2017). Além destas propriedades, o extrato de romã possui propriedades que previnem o câncer, sendo os mecanismos envolvidos nessa atividade antiproliferativos, anti-invasivos, antimetastáticos, antigenotóxicos, bem como indução de apoptose (Moreira et al., 2017).

O chá verde possui grandes concentrações do polifenol epigallocatequina 3 galato (EGCG), molécula antioxidante que possui efeitos protetores contra o dano de DNA. Um estudo com pacientes de câncer de pulmão fazendo tratamento com radioterapia, cisplatina e etoposídeo em associação a ingestão de uma solução contendo EGCG mostrou que o antioxidante, além de auxiliar na esofagite causada pelo tratamento, é seguro e efetivo (Almatroodi et al., 2020). Outro polifenol encontrado na dieta que tem atividade antioxidante é a quercetina, a qual já teve seus efeitos sinérgicos com a cisplatina reportados (Rauf et al., 2018).

Compostos presentes em cogumelos, como os β -glucanos, também possuem atividade antioxidante conhecida e são muito utilizados, principalmente na Ásia. Citamos um estudo com pacientes que realizavam quimioterapia, utilizando concomitantemente um extrato de cogumelo, e obtiveram um aumento da resposta ao tratamento além dos efeitos adversos amenizados (Frenkel et al., 2013).

Um antioxidante secretado pelo próprio corpo humano é a melatonina. Estudos clínicos que usam a melatonina em associação a quimioterapia mostraram resultados como diminuição dos efeitos adversos e melhora da resposta ao tratamento. Um estudo em pacientes com câncer de mama demonstrou que a melatonina, além de melhorar o sono das pacientes, melhorou as funções cognitivas (Li et al., 2017).

A coenzima Q10 tem como atividades biológicas o reforço imunológico, eliminação de radicais livres e proteção do DNA (Tafazoli et al., 2017). É

responsável por mediar a fosforilação oxidativa na mitocôndria, por participar da cadeia de transporte de elétrons para manter ativamente a respiração celular aeróbica e, também por atuar como antioxidante intracelular. Já foram publicados artigos que relataram que os níveis da coenzima Q10 em pacientes de câncer de mama são inferiores em relação aos pacientes saudáveis (Abdi et al., 2020).

O ácido alfa-lipóico possui características antioxidantes e, também é uma molécula capaz de induzir apoptose e morte celular por ativação da caspase 3 e caspase 9. Por ser capaz de eliminar os radicais livres, acaba protegendo as células saudáveis da quimioterapia. Estudos já demonstraram que a associação deste antioxidante às terapias contendo taxanos auxilia na supressão do crescimento das células malignas de câncer de mama (Kothari et al., 2019). Outros estudos já apontaram que o ácido alfa-lipóico tem efeito citotóxico e antiproliferativo em vários tipos de câncer, dentre eles, o de mama (Tripathy et al., 2018).

Alguns estudos apresentaram dados de que antioxidantes combinados em mistura são capazes de reduzir o desenvolvimento do câncer. Um estudo que tratava células de câncer pulmonar com uma mistura de antioxidantes (vitamina C, vitamina E e betacaroteno) previamente a aplicação dos quimioterápicos paclitaxel e carboplatina, indicou um potencial efeito sinérgico desta combinação (Pathak et al., 2002).

Visto que, muito pacientes optam pelo uso de antioxidantes para melhorar a qualidade de vida durante o tratamento do câncer, é de extrema importância estudar a influência desses antioxidantes no mecanismo de ação das terapias para a doença.

3. *Caernohabditis elegans*

Análises experimentais usando modelo animal são complexas, demandando muito tempo, dinheiro e grande número de animais. Em 1959 foi proposto o princípio dos 3 Rs (do inglês *Replacement*, *Reduction* e *Refinement*) por Russel e Burch, que tem como objetivo deixar de forma mais humanitária a pesquisa com animais. A partir de 1980, esse princípio dos 3 Rs começou a vir mais à tona no mundo científico (Lee et al., 2012).

Em relação aos testes de toxicidade, já existe uma ampla utilização de testes *in vitro* e até testes utilizando bactérias (teste de Ames) para a realização de ensaios. Um dos fatos que contribui para o incentivo ao crescimento de modelos alternativos a animais na toxicologia é o fato de que, mais de 200.000 novas substâncias são identificadas por ano, o que geraria um gasto muito grande se todas estas fossem testadas em animais (Kniewald et al., 2005). Além do aumento de novas substâncias, houve o aumento da consciência em relação as questões éticas do uso de animais na pesquisa (Piersma, 2006). Um exemplo de modelo alternativo ao uso de ratos e camundongos, é o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*.

Por muito tempo, pensava-se que o *C. elegans* poderia ser encontrado somente no solo, em húmus rico. A partir dos anos 2000, começou-se a pesquisar mais a respeito da cepa selvagem desse nematoide. Esta busca foi motivada pelo fato do *C. elegans* aparentar ser um ótimo modelo para estudar biologia evolutiva e ecologia, além de que aumentaria o conhecimento a respeito dessa espécie (Frézal e Félix, 2015).

O *C. elegans*, encontrado no solo, vem ganhando destaque para pesquisas científicas que vão desde estudos de genética até ecotoxicologia. Possui uma série de características que o tornam um modelo ideal como por exemplo, seu ciclo de vida curto (2 dias), tempo de vida de 3 a 4 semanas, dimensão pequena e fácil cultivo (Weinhouse et al., 2018). Seu genoma foi completamente mapeado por Sydney Brenner em 1974, e este nematoide se mostrou muito importante, pois possui um sistema que permite o estudo de neurociência celular, desenvolvimento e comportamento (Shen, 2019).

O ciclo de vida do nematoide já é conhecido, podendo ter dois caminhos (Figura 3). O primeiro caminho é quando o *C. elegans* se encontra em condições favoráveis, o ovo recém eclodido passa pelos 4 estágios larvais e após aproximadamente 3 dias, é encontrado na forma adulta. Porém, quando o ambiente no qual ele está se desenvolvendo não é favorável, como por exemplo quando há falta de comida ou aglomeração, os vermes acabam indo para o estágio de crescimento conhecido como *dauer*. As larvas que se encontram nesse estágio são mais resistentes e quando voltam a condições favoráveis,

retornam ao desenvolvimento e evoluem para o estágio adulto (Frézal e Félix, 2015).

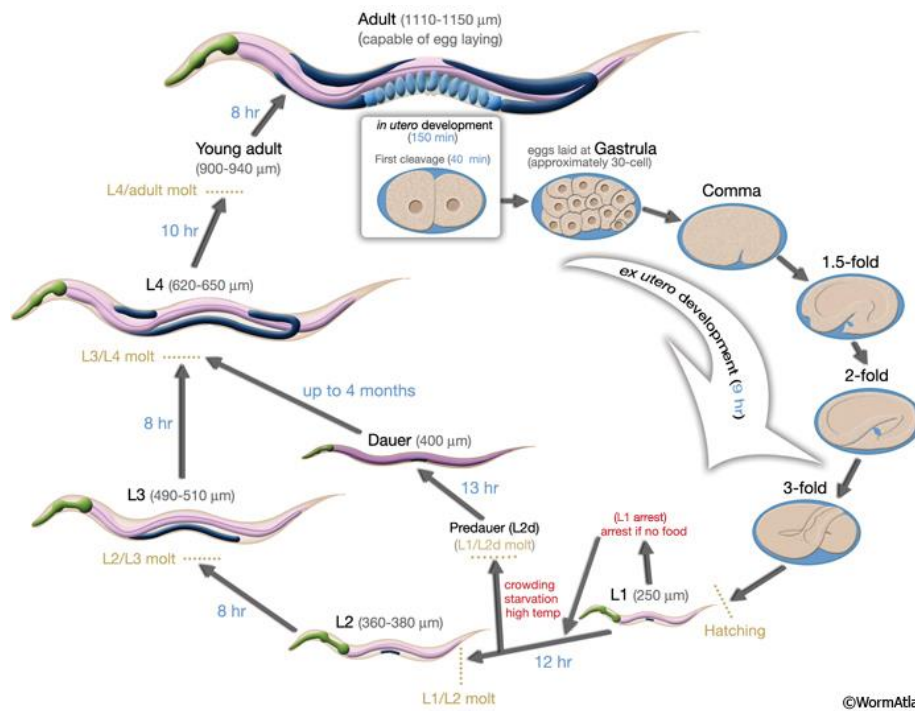


Figura 3. Ciclo de vida do *C. elegans* (Fonte: Worm Atlas, 2021).

Tendo em vista o vasto conhecimento a respeito do nematoide *C. elegans* e considerando que estudos de toxicologia em mamíferos são caros e demorados, este modelo alternativo vem se tornando um aliado às pesquisas toxicológicas (Hunt et al., 2016). Diferentemente dos modelos *in vitro*, este modelo garante a visualização de um sistema completo quando em contato com agentes tóxicos. Além disso, o genoma dos nematóides possui a maioria dos genes e caminhos de doenças semelhantes aos humanos (Kaletta et al., 2006).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Reagentes

Os antioxidantes curcumina e extrato de romã (POMx) foram obtidos da Fagron®. A vitamina C e a coenzima Q10 foram adquiridas da Purifarma® e o ácido α -lipóico foi obtido da Infinity Pharma®. Docetaxel, carboplatina, diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCF-DA), metanossulfonato de metila (MMS) e paraquat foram fornecidos pela Sigma-Aldrich Co®. (St Louis, MO, EUA). Bacto-agar e bacto-peptona foram obtidos da Becton Dickinson BD® (New Jersey, EUA) e HiMedia Laboratories® (Mumbai, Índia), respectivamente. Todos os outros produtos químicos e solventes eram de grau analítico. As cepas de nematoides utilizadas neste trabalho foram N2 Bristol, obtidas no *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC).

2. Preparo de Soluções

A solução estoque de extrato de romã (POMx) foi preparada dissolvendo o extrato em dimetilsulfóxido (DMSO), tendo concentração final de 50 mg/mL. A concentração utilizada foi de acordo com estudo *in vitro* anterior (Jeune et al., 2005), e a dose foi ajustada para *C. elegans*. A partir dessa solução estoque de POMx, obtiveram-se as outras soluções de trabalho nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 mg/mL.

A mistura de antioxidantes (Mix) foi feita com os antioxidantes ácido α -lipóico, curcumina, vitamina C e coenzima Q10. A concentração de cada antioxidante usado na mistura foi de acordo com estudos que testaram esses antioxidantes em *C. elegans* (Brown et al., 2006; Liao et al., 2011; Ishii et al., 2014; Sonane et al., 2017). Foram preparadas cinco misturas com concentrações crescentes de cada antioxidante, sendo elas: Mix A, Mix B, Mix C, Mix D e Mix E.

- Mix A: 5.1 μ g/mL de ácido α -lipóico, 18.4 μ g/mL de curcumina, 6.2 μ g/mL de vitamina C e 37.5 μ g/mL de Coenzima Q10;
- Mix B: 10.3 μ g/mL de ácido α -lipóico, 36.8 μ g/mL de curcumina, 12.4 μ g/mL de vitamina C e 75 μ g/mL de Coenzima Q10;
- Mix C: 20.6 μ g/mL de ácido α -lipóico, 73.6 μ g/mL de curcumina, 24.8 μ g/mL de vitamina C e 150 μ g/mL de Coenzima Q10;
- Mix D: 41.2 μ g/mL de ácido α -lipóico, 147.2 μ g/mL de curcumina, 49.6 μ g/mL de vitamina C e 300 μ g/mL de Coenzima Q10;

- Mix E: 61.8 µg/mL de ácido α-lipóico, 220.8 µg/mL de curcumina, 74.4 µg/mL de vitamina C e 450 µg/mL de Coenzima Q10;

A solução estoque (Mix E) foi preparada pesando os antioxidantes e dissolvendo-os em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções de trabalho foram preparadas diluindo as soluções de estoque em água.

As soluções dos quimioterápicos docetaxel e carboplatina foram preparados em água destilada e 0,05% de tween 80 no dia do experimento para evitar a degradação dos medicamentos. As concentrações de docetaxel testadas foram de 0,2 mg/mL (D1) e 0,1 mg/mL (D2), de carboplatina foram 99,4 µg/mL (C1) e 49,7 µg/mL (C2) (Rantanen et al., 1994). Os quimioterápicos foram testados separadamente.

As soluções de controle foram preparadas de acordo com os diluentes utilizados: DMSO a 5%, Tween 80 a 0,05% e DMSO a 5% com Tween 80 a 0,05%. Também foi usado um controle negativo de solução salina a 0,5%. Paraquat (PQ) e metanossulfonato de metila (MMS) foram utilizados como controles positivos visto que esses agentes nocivos são conhecidos por causarem alterações no ciclo redox e danos diretamente no DNA, respectivamente (Charão et al., 2015; Qureshi et al., 1989).

3. Cepa N2 e sincronização dos nematoides

A cepa escolhida para este estudo foi a N2 (tipo selvagem) e foi mantida em placas de meio de crescimento de nematoides (NGM) semeadas com *Escherichia coli* OP50, como fonte de alimento, a 20°C. Para a sincronização, *C. elegans* grávidos foram lavados das placas para tubos de centrifugação e depois lisados com uma mistura de *bleaching* (NaOCl 1%; NaOH 0,25 M), seguido de flotação em uma solução de sacarose a 30% (m/v) para separar os ovos de vermes e detritos de bactérias. Os ovos foram lavados com tampão M9 (KH₂PO₄ 0,02M, Na₂HPO₄ 0,04M, NaCl 0,08M e MgSO₄ 0,001M) e foram deixados em placa NGM *overnight*, para então obter os vermes em estágio larval L1.

4. Exposição dos nematoides aos antioxidantes e aos quimioterápicos

Após a sincronização, 2.500 larvas no estágio L1 foram tratadas com POMx e com a mistura de antioxidantes (Mix). Os nematoides foram incubados

por 24 horas a 20°C, com agitação constante em um rotador em meio líquido NaCl a 0,5%. Após a incubação, os vermes foram lavados três vezes com NaCl a 0,5% para remover os antioxidantes e, em seguida, transferidos para placas de petri NGM inoculadas com *Escherichia coli* OP50 para ensaios posteriores (controles) ou foram adicionados 50µL de PQ, MMS, docetaxel ou carboplatina aos vermes (Rantanen et al., 1994). Após 24h de incubação, os nematoides foram lavados três vezes com NaCl a 0,5% para remover os fármacos e os vermes foram colocados em novas placas NGM semeadas com OP50.

5. Avaliação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Para medir as EROS, 1.500 vermes N2 em estágio L1, após o tratamento com antioxidantes e quimioterápicos, foram ressuspensos em 100 µL de NaCl a 0,5% e transferidos para placas de 96 poços com 100 µL de diacetato de 2,7-diclorofluoresceína 0,05 mM (DCF-DA). A fluorescência foi medida na excitação de 485 nm e emissão de 535 nm, por 90 minutos, utilizando um leitor de microplacas (Spectramax Me2; Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, EUA) a 20°C. Os valores foram expressos como porcentagem da intensidade da fluorescência em relação ao controle. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados em duplicata.

6. Ensaio de Mortalidade

Os nematoides foram expostos ao tratamento, conforme descrito no tópico 4.4. Após 24h de incubação com o tratamento, foram realizadas 3 lavagens com NaCl a 0,5% para retirar o tratamento e os vermes foram colocados em placas NGM semeados com *E. coli* OP50. Passadas 24h dos vermes nas placas de petri, o parâmetro de mortalidade foi avaliado por contagem dos nematoides presentes nas placas com auxílio do estereomicroscópio. Todas os experimentos foram realizados em duplicata e repetidas pelo menos três vezes de forma independente.

7. Ensaio de Desenvolvimento

A área corporal foi avaliada em 20 vermes no estágio L4, em cada concentração testada, 48 horas após a remoção dos tratamentos. Os nematoides foram lavados das placas NGM com água destilada e transferidos para um tubo de centrifugação, permitindo que os vermes se assentassem e se separassem das bactérias. O processo foi repetido até que a solução estivesse

límpida. Em seguida, 15 μL da solução foram depositados em uma lâmina coberta com agarose e adicionados 25 μL de levamisol a 2,25%. Os vermes foram fotografados e a área da superfície corporal plana foi medida com o auxílio do software AxioVision LE versão 4.8.2.0 para *Windows*.

8. Análise Estatística

A análise estatística incluiu os testes de variância de uma via (ANOVA) e/ou de medidas repetidas (ANOVA), de acordo com a distribuição de cada variável, seguidos do teste de Bonferroni. Todas as análises foram realizadas prevendo um nível de significância de 0,05. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

1. Toxicidade do extrato de romã (POMx) e da mistura de antioxidantes (Mix) após 24 h de exposição

A Figura 4 mostra a mortalidade dos vermes após 24 horas de incubação com POMx e Mix. Em relação à exposição ao POMx, foi possível observar uma mortalidade significativa nas concentrações de 20, 40 e 50 mg/mL ($p < 0,001$) quando comparado ao DMSO 5% (Figura 4A). Para o Mix, todas as concentrações testadas apresentaram mortalidade significativa ($p < 0,01$) em comparação com DMSO 5% (Figura 4B).

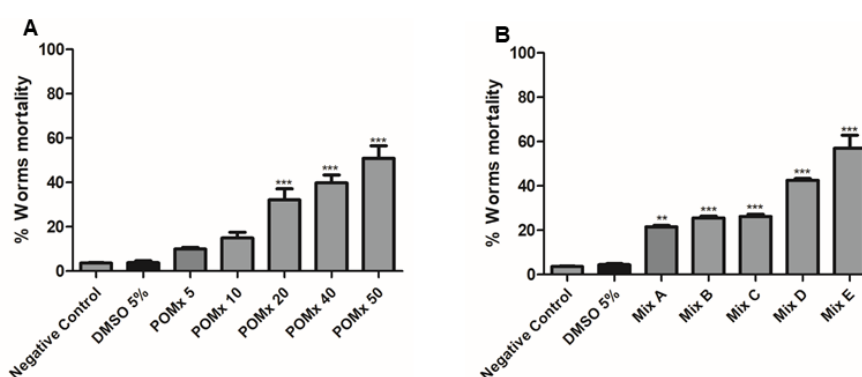


Figura 4. Mortalidade do *C. elegans* após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de extrato de romã (POMx) e misturas de antioxidantes (Mix). (A) POMx (5, 10, 20, 40 e 50 mg/mL); (B) Mistura (A, B, C, D e E). Os valores foram expressos como médias \pm DP de três experiências independentes ($n = 3$). As comparações estatísticas foram feitas usando ANOVA/Bonferroni. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. grupo controle).

Nossos resultados mostraram que as concentrações de POMx aumentaram a mortalidade de *C. elegans*. Um estudo recente mostrou que a longevidade de *C. elegans* foi prejudicada quando os vermes foram expostos a doses mais altas de POMx, mas melhorou quando doses mais baixas foram usadas, mostrando que a toxicidade e os efeitos benéficos são dependentes da dose. Essa diminuição no crescimento pode ser devido ao fato da romã começar a agir como pró-oxidante a partir de uma determinada concentração (Kılıçgün et al., 2015).

Assim como no POMx, as concentrações testadas do Mix também apresentaram diferença significativa quando comparadas aos grupos controle. A

dose letal foi encontrada aproximadamente quando os vermes foram tratados com o Mix E. A respeito dos antioxidantes utilizados no Mix, um estudo anterior no qual o *C. elegans* foi exposto a uma concentração baixa (20 μ M) e uma alta (200 μ M) de curcumina, mostrou que a longevidade dos nematoides aumentou na concentração menor, porém não foi alterada quando testada na concentração alta, indicando que a concentração elevada não foi benéfica, mas também não causou malefícios (Liao et al., 2011).

Em relação a coenzima Q10, vermes adultos que receberam uma dieta sem esse antioxidante, tiveram uma sobrevivência maior em relação aos vermes adultos que receberam coenzima Q10. Quando os vermes receberam desde a fase larval o antioxidante, eles apresentaram um desenvolvimento melhor comparado aos que não receberam (Larsen, 2002). De acordo com Ishii et al. (2004), o tratamento dos vermes desde o estágio larval com as concentrações de 50 e 150 μ g/mL de coenzima Q10 prolongaram a longevidade deles, possivelmente devido a capacidade da coenzima Q10 diminuir o estresse oxidativo quando utilizada em altas concentrações.

Já foi reportado que o ácido α -lipóico é capaz de aumentar a longevidade da *Drosophila melanogaster* (Bauer et al., 2004). Em *C. elegans*, quando utilizado na concentração de 24 μ M, além de ter aumentado a longevidade, diminuiu os níveis de radicais livres (Brown et al., 2006). A vitamina C mostrou uma influência positiva no aumento da longevidade do *C. elegans*, porém isso só ocorre até determinada concentração. Quando são utilizadas concentrações muito altas, estas podem apresentar efeitos pró-oxidantes, levando a toxicidade (Pallauf et al., 2013). Tendo em vista que o tratamento com a mistura desses antioxidantes em *C. elegans* é inédita, ainda é desconhecido se a administração deles, de forma concomitante, pode causar toxicidade ou não. Considerando o uso dos antioxidantes de forma independente, entende-se que é possível que a toxicidade seja devido a altas concentrações de vitamina C, causando um aumento na mortalidade dos nematoides, visto que os outros antioxidantes utilizados não causaram danos ao *C. elegans* nos estudos apresentados.

2. Avaliação do potencial efeito protetor da mistura de antioxidantes sobre a mortalidade induzida por Paraquat e MMS nos nematoides

Foi possível observar na Figura 5 que tanto o PQ quanto o MMS aumentaram significativamente a mortalidade dos vermes em relação ao controle negativo ($p < 0,001$). A pré-incubação de POMx não apresentou diferença significativa em relação a PQ (Figura 5A) ou MMS (Figura 5B), não sendo capaz de proteger os nematoides da toxicidade.

Na Figura 5C, os nematoides incubados com Mix não apresentaram redução significativa na mortalidade induzida por PQ. No entanto, quando a mortalidade foi induzida por MMS, Mix D e E, reduziram a mortalidade de vermes significativamente ($p < 0,05$), conforme observado na Figura 5D.

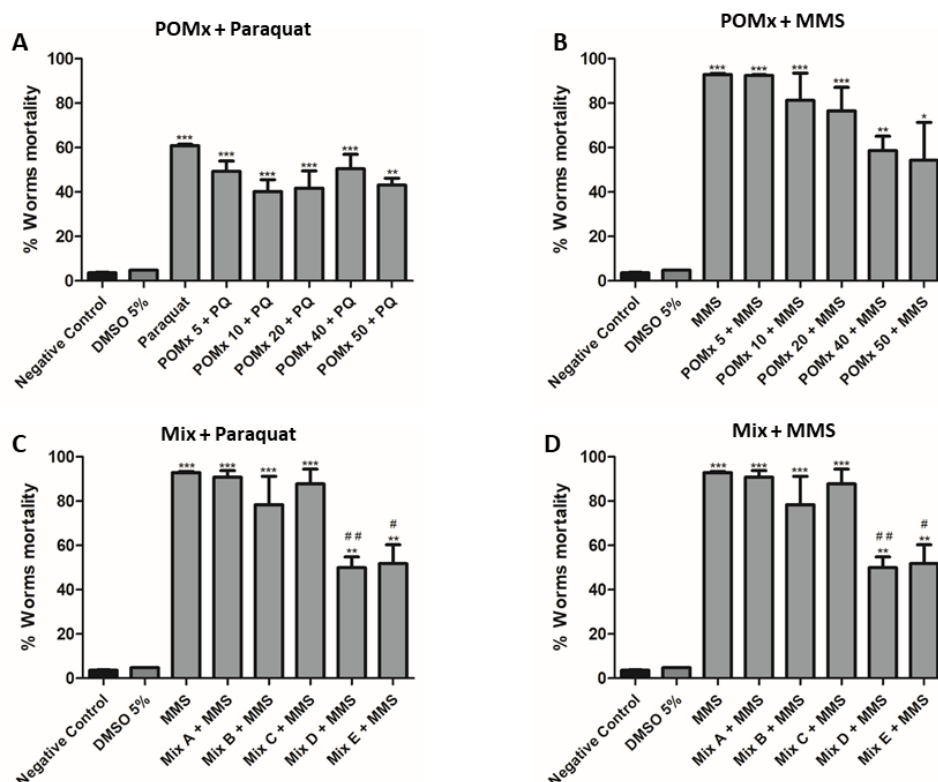


Figura 5. Mortalidade do *C. elegans* após 48 horas de exposição ao extrato de romã (POMx) e mistura de antioxidantes (Mix), seguido por paraquat (PQ) e metanossulfonato de metila (MMS). Concentrações de grupos: POMx (5, 10, 20, 40 e 50 mg/mL), Mix (A, B, C, D e E), PQ (0,5 mM) e MMS (1 μ M). **(A)** POMx + Paraquat. **(B)** POMx + MMS. **(C)** Mix + Paraquat. **(D)** Mix + MMS. Os valores foram expressos como média \pm DP (n = 3 experimentos independentes realizadas em duplicata). As comparações estatísticas foram feitas usando

ANOVA/teste post-hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. grupo de controle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. MMS).

Paraquat e MMS foram usados para testar o efeito protetor dos antioxidantes. O principal mecanismo de toxicidade do paraquat é a alteração do ciclo redox, causando uma maior produção de EROS (Charão et al., 2015). O PQ por causar um quadro de aumento das espécies reativas causa uma disfunção mitocondrial, que gera o estresse oxidativo e é considerado um agente tóxico ao *C. elegans* (Bora et al., 2020).

Charão e colaboradores (2015) realizaram um trabalho expondo os nematoides a um pré-tratamento com melatonina e após PQ (Charão et al., 2015). Nossos resultados corroboram com esse, demonstrando que nenhum antioxidante foi capaz de reverter a mortalidade causada pelo PQ. Porém, neste mesmo estudo, quando nanoencapsulada, a melatonina é capaz de reverter a mortalidade causada pelo PQ, sugerindo que o antioxidante pode ser um bom protetor.

O MMS é um agente citotóxico que atua diretamente no DNA (Qureshi et al., 1989). Um estudo em ratos, no qual foi induzida uma toxicidade reprodutiva por MMS, teve os efeitos tóxicos reduzidos quando a Vitamina E foi administrada de forma concomitante (Tang et al., 2015). No nosso trabalho, o Mix D e E foram os únicos que ajudaram a reduzir a mortalidade induzida pelo MMS.

3. Avaliação do potencial efeito protetor do extrato de romã e da mistura de antioxidantes sobre a mortalidade induzida por Docetaxel e Carboplatina

Como demonstrado na Figura 6, o Tween 80 (0,05%) e o DMSO (5%) não afetaram a mortalidade dos nematoides. O docetaxel, em ambas as concentrações, levou a um aumento significativo na mortalidade dos vermes em comparação com Tween 80 (0,05%) ($p < 0,01$; Figura 6A e 6C). O pré-tratamento com POMx 40 não foi capaz de proteger os vermes contra a mortalidade induzida por docetaxel (Figura 6A), no entanto, com o Mix D houve uma diminuição significativa na mortalidade induzida por ambas as concentrações de docetaxel ($p < 0,05$; Figura 6C).

A carboplatina, em ambas as concentrações, causou um aumento significativo na mortalidade de vermes em comparação com o Tween 80 (0,05%) ($p < 0,01$; Figura 6B e 6D). O pré-tratamento com POMx 40 não foi capaz de proteger os vermes contra a mortalidade induzida pela carboplatina (Figura 6B), no entanto, com o Mix E observamos uma diminuição significativa na mortalidade induzida pela menor dose de carboplatina testada (C2) ($p < 0,05$), mas não pela maior dose (C1) (Figura 6D). Como os quimioterápicos utilizados neste estudo atuam no nível do DNA das células cancerígenas, decidimos utilizar a concentração de Mix que teve melhor desfecho em relação ao MMS, sendo essa o Mix D. Para o POMx, utilizamos a segunda maior concentração.

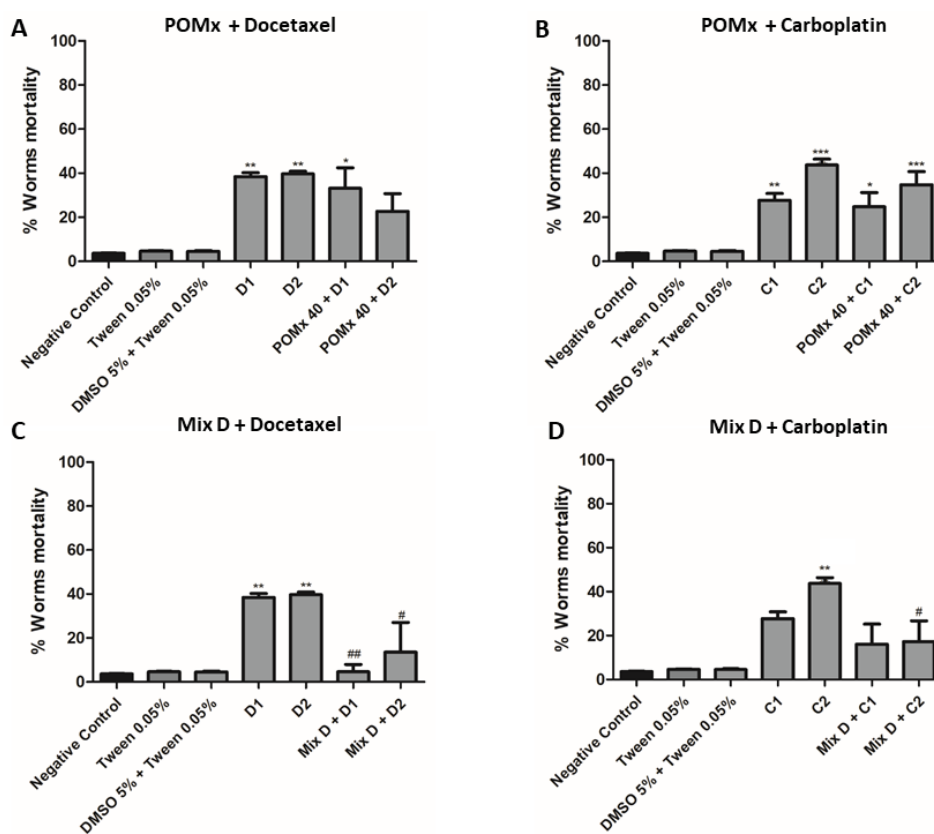


Figura 6. Mortalidade do *C. elegans* após 48 horas de exposição ao extrato de romã 40 mg/mL (POMx 40) e a mistura de antioxidantes D (Mix D) seguida de docetaxel (D1 e D2) e carboplatina (C1 e C2). **(A)** POMx 40 mg / mL + Docetaxel; **(B)** POMx 40 mg / mL + Carboplatina; **(C)** Mix D + Docetaxel; **(D)** Mix D + Carboplatina. Concentrações dos grupos: D1 (0,2 mg/mL) e D2 (0,1 mg/mL); C1 (99,4 µg/mL) e C2 (49,7 µg/mL). Os valores foram expressos como média ± DP

(n = 3 experimentos independentes realizadas em duplicata). As comparações estatísticas foram feitas usando ANOVA/teste post-hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. grupo de controle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. docetaxel ou carboplatina).

Sabe-se que o docetaxel causa toxicidade *in vivo* (Kim et al., 2017). A cisplatina, um quimioterápico pertencente a mesma classe da carboplatina, apresenta toxicidade já relatada no *C. elegans* (García-Rodríguez et al., 2018). Tendo em vista que os dois quimioterápicos possuem o mesmo mecanismo de ação, se ligam ao DNA formando adutos, causando alterações estruturais, sugere-se que a carboplatina também causa efeitos tóxicos no nematoide.

Wang e colaboradores (2013) demonstraram que o POMx quando combinado com docetaxel pode ajudar a aumentar a apoptose de linhagens celulares de câncer de próstata, C4-2, PC3 e ARCaPM, sugerindo que a utilização da romã é interessante para melhorar o tratamento com este quimioterápico. Porém, o resultado encontrado *in vitro* não é sempre reproduzível da mesma forma que o *in vivo*. No nosso trabalho, o POMx não se mostrou eficaz em relação a proteção do *C. elegans*, tanto quando tratado com o docetaxel como com a carboplatina.

No entanto, o Mix D mostrou uma diferença significativa em todas as concentrações de docetaxel (D1 e D2) e na menor concentração de carboplatina (C2). Presume-se que a mistura dos antioxidantes é melhor do que o POMx, devido ao fato de que misturas quando combinadas a agentes antitumorais aumentam a apoptose em células cancerígenas, sem causar a morte de células normais (Pathak et al., 2013). Algumas vitaminas antioxidantes, quando utilizadas em conjunto, apresentam um resultado melhor do que quando utilizadas isoladamente, podendo utilizar uma dose menor dessas para afetar o crescimento da célula cancerígena (Cole et al., 1997).

4. Avaliação da área corporal do *C. elegans* expostos ao extrato de romã (POMx) ou mistura de antioxidantes (Mix)

Em relação à área corporal, o DMSO 5% causou uma diminuição significativa quando comparado ao controle negativo ($p < 0,01$), conforme a Figura 7. Não foram observadas diferenças significativas para as concentrações

testadas de POMx (Figura 7A) e Mix (Figura 7B) quando comparadas com DMSO 5%.

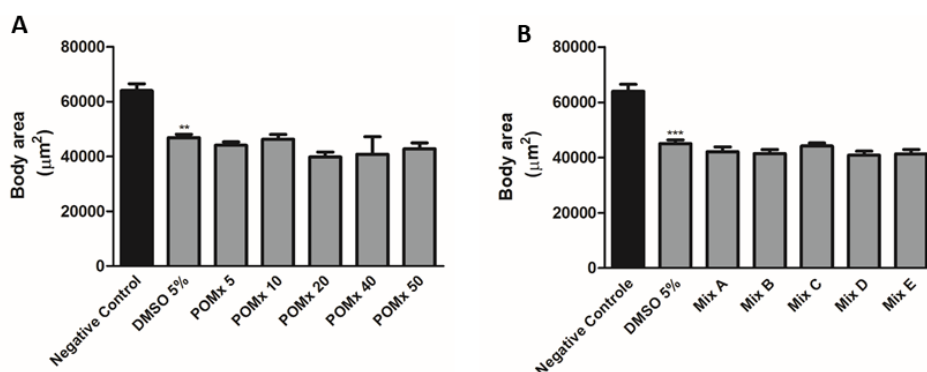


Figura 7. Área corporal de *C. elegans* após 24 horas de exposição com extrato de romã (POMx) **(A)** e misturas de antioxidantes (Mix) **(B)** em diferentes concentrações. Os valores são expressos como médias \pm DP de três experimentos independentes ($n = 3$). As comparações estatísticas foram feitas usando ANOVA/teste post-hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. grupo de controle).

O DMSO é um solvente amplamente utilizado nos experimentos com *C. elegans* devido sua capacidade de solubilizar moléculas hidrofóbicas. Já foi visto que, quando os vermes são tratados com DMSO 1%, o comportamento alimentar é alterado, diminuindo significativamente o consumo de alimento e a estrutura morfológica do verme (Calahorro et al., 2021). Como podemos observar na figura 7, o DMSO causou uma diferença significativa no desenvolvimento do *C. elegans*, o que pode estar relacionado ao fato destas alterações serem causadas pelo solvente.

Além do DMSO, o POMx pode estar relacionado com alterações do desenvolvimento corporal. Um estudo publicado por Kılıçgün e colaboradores (2015), no qual foi analisada a taxa de crescimento dos nematoides, mostrou que houve uma diminuição no crescimento quando tratados com concentrações de 10 a 20 mg/mL de extrato de romã (Kılıçgün et al., 2015), resultados que reforçam nossos achados.

Em relação aos antioxidantes presentes no Mix, a curcumina também já foi relacionada com a diminuição do tamanho dos nematoides, fato que pode

estar associada a diminuição de taxa de bombeamento faríngeo, interferindo no comportamento alimentar do *C. elegans* (Liao et al., 2011). Em relação aos outros antioxidantes presentes na mistura, não foram encontrados estudos que comparem o desenvolvimento de *C. elegans* com eles.

5. Avaliação do efeito protetor do extrato de romã (POMx) e da mistura de antioxidantes em relação ao PQ ou MMS na área corporal de *C. elegans*

Na Figura 8, é possível observar que o DMSO (5%) apresentou diferença significativa quando comparado ao controle negativo ($p < 0,01$). O PQ (Figura 8A e 8C) e o MMS (Figura 8B e 8D) reduziram a área corporal dos vermes em comparação com DMSO 5% ($p < 0,001$). As pré-incubações, tanto com POMx e Mix, não foram capazes de reverter a diminuição da área corporal causada por PQ ou MMS.

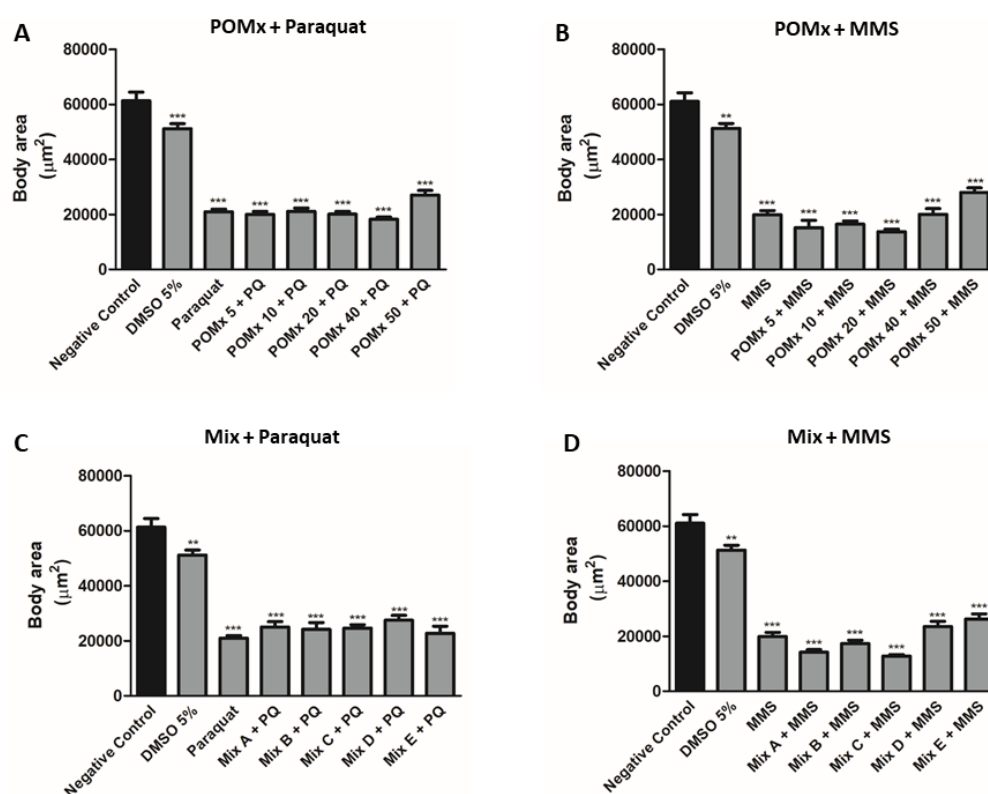


Figura 8. Áreas corporais dos *C. elegans* após 48 horas de exposição ao extrato de romã (POMx) e mistura de antioxidantes (Mix) seguido por paraquat (PQ) e metanossulfonato de metila (MMS). Concentrações de grupos: POMx (5, 10, 20, 40 e 50 mg/mL), Mix (A, B, C, D e E), PQ (0,5 mM) e MMS (1 µM). **(A)** POMx + Paraquat. **(B)** POMx + MMS. **(C)** Mix + Paraquat. **(D)** Mix + MMS. Os valores são

expressos como média \pm SEM (n = 3 experimentos independentes realizados em duplicata). As comparações estatísticas foram feitas usando ANOVA / teste post-hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. grupo de controle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. MMS).

O paraquat é responsável por gerar um quadro de estresse oxidativo no *C. elegans*. Um estudo publicado por Charão e colaboradores (2015) demonstrou que o PQ causou uma diminuição significativa na área corporal e mesmo quando os vermes receberam um pré-tratamento com a melatonina, não houve uma reversão deste quadro, mas quando nanoencapsulada, a melatonina é capaz de proteger o nematoide (Charão et al, 2015). Resultados que corroboram com nossos achados, tendo em vista que os antioxidantes testados neste projeto não foram capazes de reverter a diminuição da área corporal causada pelo PQ.

Em relação ao MMS, sabe-se que esse agente citotóxico causa danos no DNA e é responsável por causar um atraso no desenvolvimento do *C. elegans* (Miyaji et al., 2018). Nossos resultados demonstraram que o MMS causou uma diminuição significativa no desenvolvimento corporal dos nematoides.

6. Avaliação do efeito protetor da mistura de antioxidantes contra docetaxel e carboplatina na área corporal de *C. elegans*

A Figura 9 mostra que a área corporal do *C. elegans* foi significativamente reduzida quando incubado com DMSO (5%) + Tween 80 (0,05%) em comparação com o controle negativo ($p < 0,05$). Ambas as concentrações de docetaxel (Figura 9A e 9C) e carboplatina (Figura 9B e 9D) reduziram significativamente a área corporal dos vermes quando comparadas ao grupo Tween 80 (0,05%) ($p < 0,001$). Nem o POMx 40 nem o Mix D foram capazes de reverter a toxicidade do desenvolvimento induzida pelos quimioterápicos.

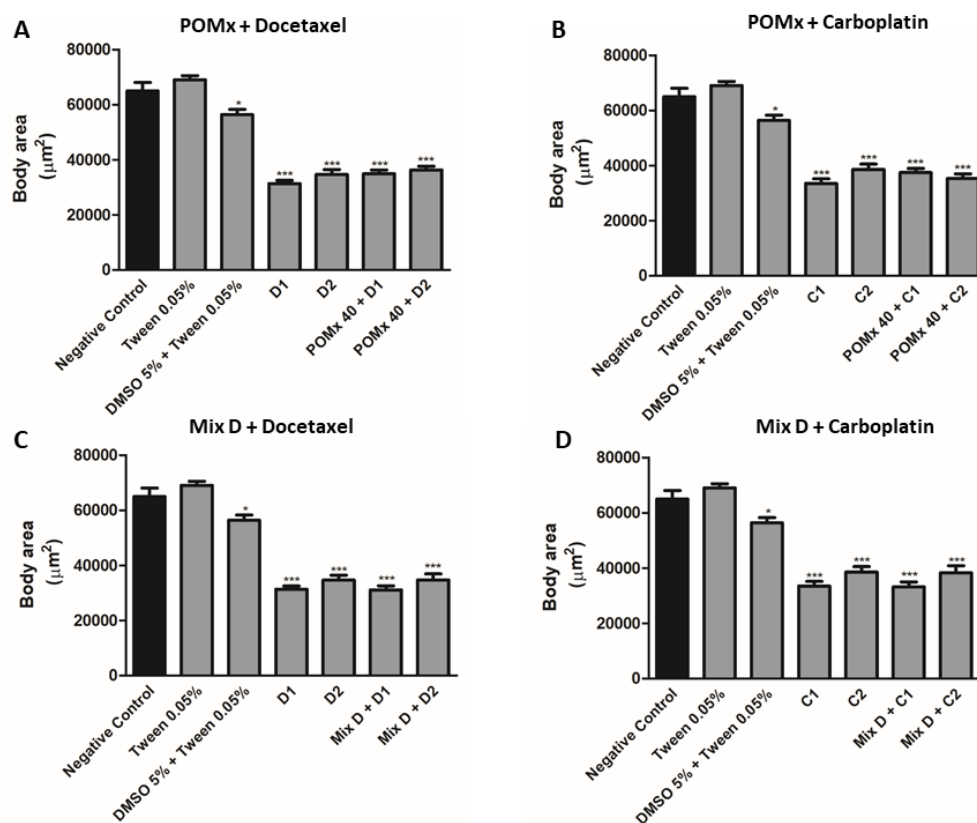


Figura 9. Áreas corporais de *C. elegans* após 48 horas de exposição ao extrato de romã 40 mg / mL (POMx 40) e mistura de antioxidantes D (Mix D) seguida de docetaxel (D1 e D2) e carboplatina (C1 e C2). **(A)** POMx 40 mg / mL + Docetaxel; **(B)** POMx 40 mg/mL + Carboplatina; **(C)** Mix D + Docetaxel; **(D)** Mix D + carboplatina. Concentrações: D1 (0,2 mg/mL) e D2 (0,1 mg/mL); C1 (99,4 µg/mL) e C2 (49,7 µg/mL). Os valores são expressos como média ± SEM (n = 3 experimentos independentes realizados em duplicata). As comparações estatísticas foram feitas usando ANOVA/teste post-hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. grupo controle).

Em relação ao docetaxel, não foram encontrados estudos que associem o uso desse quimioterápico em *C. elegans*. Já em relação a carboplatina, um estudo que avaliou a taxa de bombeamento faringeal, que é um ensaio onde são contados os movimentos da faringe dos nematoides por 30 segundos, mostrou que *C. elegans* expostos a 1500 µM de carboplatina após 168 h, obtiveram uma diminuição significativa do bombeamento faringeal (Wellenberg et al, 2021). Este resultado sugere que o comportamento alimentar dos nematoides foi

alterado, corroborando com o nosso estudo, que indica que a carboplatina causa uma diminuição significativa no desenvolvimento dos vermes.

7. Produção de EROS

Em relação à avaliação da produção de EROS, a solução utilizada para solubilizar os quimioterápicos e antioxidantes (DMSO 5% + Tween 80 0,05%) causou um aumento significativo nos níveis de EROS quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$; Figura 10).

Na figura 10A, é possível observar que as concentrações de docetaxel testadas (D1 e D2) causaram um aumento na produção de EROS em relação ao Tween 0.05%, solução na qual o quimioterápico foi solubilizado. Porém só a concentração mais alta apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$). A Figura 10B mostra que apenas a concentração mais alta de carboplatina (C1) apresentou diferença significativa quando comparado a Tween 80 0,05% ($p < 0,05$). O POMx não foi capaz de diminuir significativamente a produção de EROS causada tanto pelo docetaxel como pela carboplatina (Figura 10A e 10B)

Na figura 10C, é possível observar que apenas a maior concentração de docetaxel (D1) apresentou diferença significativa em relação ao Tween 0.05% ($p < 0,05$). Na figura 10D observa-se que apenas a maior concentração de carboplatina apresentou diferença significativa quando comparado ao tween 80 (0,05%) ($p < 0,05$). Em relação a mistura de antioxidantes testada (Mix D), foi observada uma diminuição significativa da produção de EROS quando utilizada em associação com a maior dose de carboplatina (C1) ($p < 0,01$).

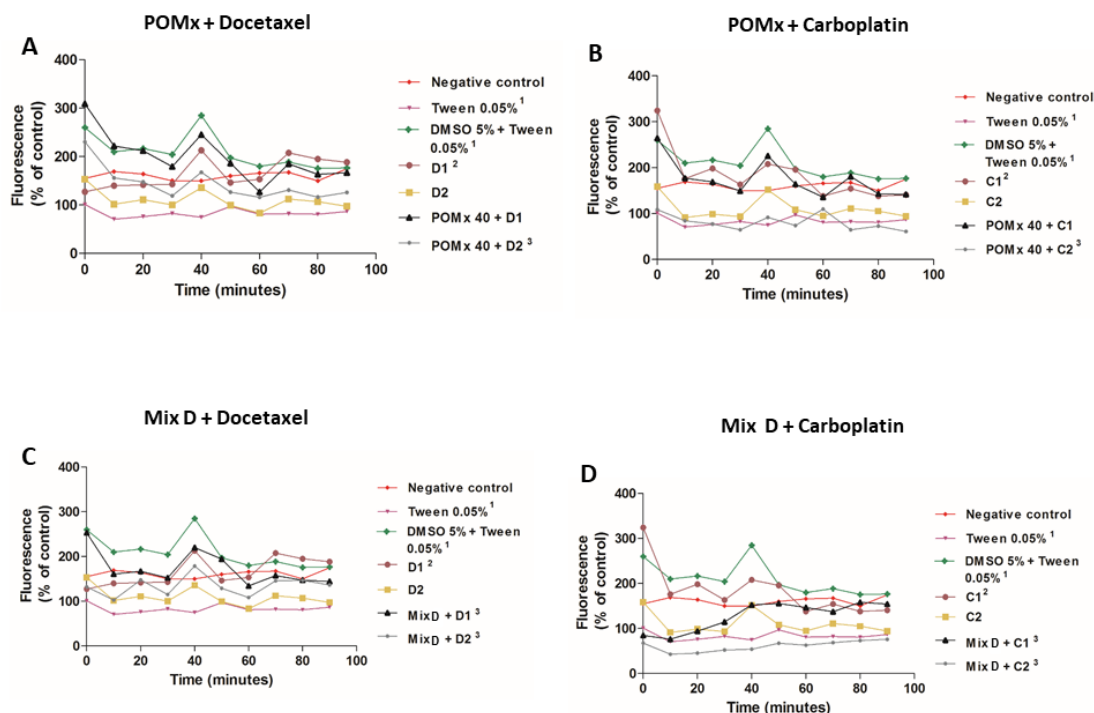


Figura 10. Níveis de EROS medidos por DCF-DA: **(A)** POMx 40 mg/mL + Docetaxel; **(B)** POMx 40 mg/mL + Carboplatina; **(C)** Mix D + Docetaxel; **(D)** Mix D + Carboplatina. D1 (0,2 mg/mL) e D2 (0,1 mg/mL); C1 (99,4 µg/mL) e C2 (49,7 µg/mL). Os dados são expressos como média ± DP (n = 3 experimentos independentes realizados em duplicata). As comparações estatísticas foram feitas usando ANOVA / teste post-hoc de Bonferroni de medidas repetidas (¹ $p < 0,05$ vs. controle negativo; ² $p < 0,05$ vs. Tween 0,05%; ³ $p < 0,05$ vs. DMSO 5% + Tween 0,05%).

No ensaio de produção de EROS, carboplatina e docetaxel se mostraram oxidantes, resultado que era esperado, uma vez que tais agentes quimioterápicos são conhecidos por aumentarem a produção de EROS (Conklin, 2004). Analisando os resultados, o Mix apresentou um resultado melhor do que o POMx. Por ser uma mistura, provavelmente atuem em mais de um mecanismo nos vermes, ajudando a minimizar a toxicidade.

ARTIGO SUBMETIDO

CONCLUSÕES

O câncer é uma doença de alta incidência e possui um tratamento extremamente agressivo que gera muito desconforto aos pacientes, piorando a qualidade de vida. Devido a toxicidade dos possíveis tratamentos, há uma necessidade em encontrar alternativas aos pacientes para amenizar os efeitos adversos, facilitando a continuidade do tratamento. O uso de antioxidantes como auxiliares para reduzir a toxicidade causada pela quimioterapia ou radioterapia tem sido uma estratégia adotada por pacientes com todos os tipos de câncer.

Considerando que o câncer de mama e o de pulmão são os que possuem maior número de novos casos registrados, é de extrema importância avaliar a ação de antioxidantes concomitante ao tratamento. A parte experimental deste estudo mostrou que a mistura antioxidante (Mix) teve melhores resultados do que o extrato de romã (POMx), pois diminuiu a mortalidade de *C. elegans* causada pelo docetaxel e pela menor dose de carboplatina, sugerindo que o uso de uma mistura de antioxidantes pode ser interessante para reduzir a toxicidade dos quimioterápicos testados. Em relação a revisão apresentada nessa dissertação, os estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que os antioxidantes são capazes de reduzir a toxicidade do tratamento sem interferir no mecanismo de ação dos quimioterápicos. Em relação aos ensaios clínicos ou estudos observacionais com pacientes com câncer, nem todos tiveram resultados positivos. Isso pode ser devido ao fato de alguns dos estudos terem sido feitos entrevistando pacientes que já faziam o uso de antioxidantes, não tendo assim um controle na administração desses, e todos apresentarem a limitação de uma amostra pequena, diminuindo o poder estatístico. Conforme visto nesta revisão sistemática, este tópico, apesar de popular, ainda é novo e necessita de mais estudos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar a atividade dos antioxidantes testados no Mix na parte experimental de forma individual;
- Avaliar o potencial efeito protetor da mistura quando testado em concentrações menores;
- Avaliar o efeito protetor dos antioxidantes quando tratados após com a associação do docetaxel e carboplatina;
- Realizar ensaios de lifespan e avaliação comportamental do *C. elegans* quando exposto aos antioxidantes e quimioterápicos;
- Realizar ensaios *in vitro* utilizando linhagem celular de câncer de mama, para avaliar se os antioxidantes interferem no mecanismo de ação dos agentes quimioterápicos.

REFERÊNCIAS

ABDI, S.; MONTAZERI, V.; GARJANI, A.; SHAYANFAR, A.; PIROUZPANAH, S. Coenzyme Q10 in association with metabolism-related AMPK/PFKFB3 and angiogenic VEGF/VEGFR2 genes in breast cancer patients. **Molecular Biology Reports**, v. 47, p. 2459-2473, 2020.

ABUELGASIM, K.; ALSHARHAN, Y.; ALENZI, T.; ALHAZZANI, A.; ALI, Y.; JAZIEH, A. The use of complementary and alternative medicine by patients with cancer: a cross-sectional survey in Saudi Arabia. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 18, p.1-8, 2018.

AKRAM, M.; IQBAL, M.; DANİYAL, M.; KHAN, A. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological Research**, v. 50, p. 1-23, 2017.

ALLEN, C.; HER, S.; JAFFRAY, D. Radiotherapy for Cancer: Present and Future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 109, p. 1–2, 2017.

AL-MAHMOOD, S.; SAPIEZYNSKI, J.; GARBUZENKO, O.; MINKO, T. Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 8, p.1483-1507, 2018.

ALMATROODI, S.; ALMATROUDI, A.; KHAN, A.; ALHUMAYDHI, F.; ALSAHLI, M.; RAHMANI, A. Potential Therapeutic Targets of Epigallocatechin Gallate (EGCG), the Most Abundant Catechin in Green Tea, and Its Role in the Therapy of Various Types of Cancer. **Molecules**, v. 25, p.1-39, 2020.

ALSHARIF, F. Discovering the Use of Complementary and Alternative Medicine in Oncology Patients: A Systematic Literature Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2021, p 1-9, 2021.

American Cancer Society. **Treatment Types**, 2021. Disponível em: <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types.html>>. Acesso em: 29 de Jul de 2021.

AMJAD, M.; KASI, A. Cancer Chemotherapy. **StatPearls**, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/>>

ANDRE, R.; VOLOVAT, S.; CARDOSO, F. Treatment of Advanced Disease: Guidelines. **Breast Cancer**, p. 549–556, 2017.

ASIF, H.; SULTANA, S.; AHMED, S.; AKHTAR, N.; TARIQ, M. (2016). HER-2 Positive Breast Cancer - a Mini-Review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, p. 1609-1615, 2016.

AZIM, H.; LASHEEN, S.; KASSEM, L. Treatment of HER2-positive early breast cancer: How to best balance efficacy and toxicity? **The Breast Journal**, v. 24, p. 459–461, 2018.

BANERJEE, S.; SINGH, S.; CHOWDHURY, I.; LILLARD, J.; SINGH, R. Combinatorial effect of curcumin with docetaxel modulates apoptotic and cell survival molecules in prostate cancer. **Frontiers in Bioscience-Elite**, v. 1, p. 235-245, 2017.

BARBOSA, K.; COSTA, N.; ALFENAS, R.; DE PAULA, S.; MINIM, V.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629–643, 2010.

BARISH, R.; GATES, E.; BARAC, A. Trastuzumab-Induced Cardiomyopathy. **Cardiology Clinics**, v. 37, p. 407-418, 2019.

BARTA, J.; POWELL, C.; WISNIVESKY, J. Global Epidemiology of Lung Cancer. **Annals of Global Health**, v. 85, p. 8, 2019.

BAUER, J.; GOUPIL, S.; GARBER, G.; HELFAND, S. Anaccelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 12980-12985, 2004.

BERGIN, A.; LOI, S. Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. **Faculty Reviews**, v. 8, p. 1-11, 2019.

BLOCK, K.; KOCH, A.; MEAD, M.; TOTHY, P.; NEWMAN, R.; GYLLENHAAL, C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials. **International Journal of Cancer**, v. 123, p. 1227-1239, 2007.

BORA, S.; VARDHAN, G.; DEKA, N.; KHATANIAR, L.; GOGOI, D.; BARUAH, A. Paraquat exposure over generation affects lifespan and reproduction through mitochondrial disruption in *C. elegans*. **Toxicology**, v. 447, 2020.

CALAHORRO, F.; HOLDEN-DYE, L.; O'CONNOR, V. Impact of drug solvents on *C. elegans* pharyngeal pumping. **Toxicology Reports**, v. 8, p. 1240-1247, 2021.

CERSOSIMO, R. Lung cancer: A review. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 59, p. 611–642, 2002.

CHARÃO, M.; SOUTO, C.; BRUCKER, N.; BARTH, A.; JORNADA, D.; FAGUNDEZ, D.; ÁVILA, D.; EIFLER-LIMA, V.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A.; GARCIA, S. *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5093-106, 2015.

CHIVIMA, B. Lung cancer. **Nursing Standard**, v. 29, p. 61–61, 2015.

COLE, W.; PRASAD, N. Contrasting effects of vitamins as modulators of apoptosis in cancer cells and normal cells: A review. **Nutrition and Cancer**, v. 29, p. 97-103, 1997.

COLLINS, L.; HAINES, C.; PERKEL, R.; ENCK, R. Lung cancer: diagnosis and management. **American Family Physician**, v. 75, p. 56-63, 2007.

CONKLIN, K. Dietary Antioxidants During Cancer Chemotherapy: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness and Development of Side Effects. **Nutrition and Cancer**, v. 37, p. 1–18, 2000.

CONKLIN, K. Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**, v. 3, p. 294-300, 2004.

DEVITA JR, V.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, p. 8643-53, 2008

DILRUBA, S.; KALAYDA, G. Platinum-based drugs: past, present and future. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 77, p. 1103–1124, 2016.

EMADI, A.; JONES, R.; BRODSKY, R. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 6, p. 638–647, 2009.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FILAIRE, E.; DUPUIS, C.; GALVAING, G.; AUBRETON, S.; LAURENT, H.; RICHARD, R.; FILAIRE, M. Lung cancer: What are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition. **Lung Cancer**, v. 82, p. 383–389, 2013.

FISUSI, F.; AKALA, E. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 7, p. 3-23, 2019.

FRENKEL, M.; ABRAMS, D.; LADAS, E.; DENG, G.; HARDY, M.; CAPODICE, J.; WINEGARDNER, M.; GUBILI, J.; YEUNG, K.; KUSSMANN, H.; BLOCK, K. Integrating dietary supplements into cancer care. **Integrative Cancer Therapies**, v. 12, p. 369-84, 2013

FRENKEL, M.; SLATER, R.; SAPIRE, K.; SIERPINA, V. Complementary and Integrative Medicine in Lung Cancer: Questions and Challenges. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 24, p. 862–871, 2018.

FRÉZAL, L.; FÉLIX, M. *C. elegans* outside the Petri dish. **Elife**, v. 4, p. 1-14, 2015.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, F.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, C.; BRENA, D.; KUKHTAR, D.; SERRAT, X.; NADAL, E.; BOXEM, M.; HONNEN, S.; MIRANDA-VIZUETE, A.; VILLANUEVA, A.; CERÓN, J. Genetic and cellular sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to the chemotherapeutic agent cisplatin. **Disease Models & Mechanisms**, v. 11, 2018.

GAUTAM, A.; KOSHKINA, N. Paclitaxel (Taxol) and Taxoid Derivates for Lung Cancer Treatment: Potential for Aerosol Delivery. **Current Cancer Drug Targets**, v. 3, p. 287–296, 2003.

GEORGE, S.; ABRAHAMSE, H. Redox Potential of Antioxidants in Cancer Progression and Prevention. **Antioxidants (Basel)**, v. 9, p. 1156, 2020.

GORRINI, C.; HARRIS, I.; MAK, T. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, p. 931–947, 2013.

GUPTA, A.; SRIVASTAVA, S.; PRASAD, R.; NATU, S.; MITTAL, B.; NEGI, M.; SRIVASTAVA, A. Oxidative stress in non-small cell lung cancer patients after chemotherapy: Association with treatment response. **Respirology**, v. 15, p. 349–356, 2020.

HARADA, G. Effectiveness and toxicity of adjuvant chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. **Jornal Brasileiro de Pneumologia** [online] v. 47, 2021.

HARBECK, N.; GNANT, M. Breast cancer. **The Lancet**, v. 389, p. 1134–1150, 2017.

HARRIS, I.; DENICOLA, G. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. **Trends in Cell Biology**, v. 30, p. 440-451, 2020.

HERBST, R.; HEYMACH, J.; LIPPMAN, S. Lung Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 359, p. 1367–1380, 2008.

HOFFMAN, R.; SANCHEZ, R. Lung Cancer Screening. *Med Clin North Am.* 2017 Jul; v. 101, p. 769-785, 2017

HULVAT, M. Cancer Incidence and Trends. **Surgical Clinics of North America**, v. 100, p. 469-481, 2020.

HUNT, P. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, p. 50-59, 2016.

ILGHAMI, R.; BARZEGARI, A.; MASHAYEKHI, M.; LETOURNEUR, D.; CREPIN, M.; PAVON-DJAVID, G. The conundrum of dietary antioxidants in cancer chemotherapy. **Nutrition Reviews**, v. 78, p. 65-76, 2020.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Monograph. Estimate/2018 – **Cancer Incidence in Brazil**. Rio de Janeiro, Brazil, 2017.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Tratamento do Câncer**, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tratamento>>. Acesso em 22 de Jul de 2021.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Monograph. Estimate/2020 – **Cancer Incidence in Brazil**. Rio de Janeiro, Brazil, 2019.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **O que é Câncer?** 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em 21 de Jul de 2021.

ISHII, N.; SENOO-MATSUDA, N.; MIYAKE, K.; YASUDA, K.; ISHII, T.; HARTMAN, P.; FURUKAWA, S. Coenzyme Q₁₀ can prolong *C. elegans* lifespan by lowering oxidative stress. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 41-46, 2004

JAFARI, S.; SAADATPOUR, Z.; SALMANINEJAD, A.; MOMENI, F.; MOKHTARI, M.; NAHAND, J.; RAHMATI M.; MIRZAEI, H.; KIANMEHR, M. Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, p. 5200–5213, 2018.

JAROSZ-BIEJ, M.; SMOLARCZYK, R.; CICHÓN, T.; KUŁACH, N. Tumor Microenvironment as A "Game Changer" in Cancer Radiotherapy. **International Journal of Molecular Science**, v. 20, p. 1-19, 2019.

JEUNE, M.; KUMI-DIAKA, J.; BROWN, J. Anticancer Activities of Pomegranate Extracts and Genistein in Human Breast Cancer Cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, p. 469-475, 2005.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 387-399, 2006.

KILIÇGÜN, H; ARDA, N.; UÇAR, E. Identification of longevity, fertility and growth-promoting properties of pomegranate in *Caenorhabditis elegans*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, p. 356-9, 2015.

KIM, J.; LEE, Y.; KIM, Y.; CHO, E.; HUH, E.; BANG, O.; KIM, N. Aqueous extract of Phragmites rhizoma ameliorates myelotoxicity of docetaxel *in vitro* and *in vivo*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, p. 1-13 ,2017.

KLAUNIG, J. Oxidative Stress and Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, p. 4771-4778, 2019.

KLIN, K.; LAWSON, K.; YU, W.; SANDERS, B. Vitamin E and cancer. **Vitamins & Hormones**, v. 76, p. 435-61, 2007.

KNIEWALD, J.; KMETIC, I.; GAURINA-SRCEK, V.; KNIEWALD, Z. Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 56, p. 195-204, 2005.

KOLAK, A.; KAMIŃSKA, M.; SYGIT, K.; BUDNY, A.; SURDYKA, D.; KUKIEŁKA-BUDNY, B.; BURDAN, F. Primary and secondary prevention of breast cancer. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 24, p. 549-553, 2017.

KOTHARI, I.; MAZUMDAR, S.; SHARMA, S.; ITALIYA, K.; MITTAL, A.; CHITKARA, D. Docetaxel and alpha-lipoic acid co-loaded nanoparticles for cancer therapy. **Therapeutic Delivery**, v. 10, p. 227–240, 2019.

KÜTÜK, S.; NAZIROĞLU, M. Selenium Diminishes Docetaxel-Induced Cell Death, Oxidative Stress, and Inflammation in the Laryngotracheal Epithelium of the Mouse. **Biological Trace Element Research**, v. 196, p. 184-194, 2020.

LADAS, E.; JACOBSON, J.; KENNEDY, D.; TEEL, K.; FLEISCHAUER, A.; KELLY, K. Antioxidants and cancer therapy: a systematic review. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, p. 517-28, 2004.

LAMSON, D.; BRIGNALL, M. Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. **Alternative Medicine Review**, v. 4, p. 304-29, 1999.

LARSEN, P. Extension of Life-Span in *Caenorhabditis elegans* by a Diet Lacking Coenzyme Q. **Science**, v. 295, p. 120–123, 2002.

LAWENDA, B.; KELLY, K.; LADAS, E.; SAGAR, S.; VICKERS, A.; BLUMBERG, J. Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, p. 773-83, 2008.

LEE, H.; INSELMAN, A.; KANUNGO, J.; HANSEN, D. Alternative models in developmental toxicology. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 58, p. 10-22, 2012.

LEE, S.; JEONG, J.; LEE, I.; LEE, J.; JUNG, J.; PARK, H.; LEE, D.; CHAE, Y. Effect of High-dose Vitamin C Combined With Anti-cancer Treatment on Breast Cancer Cells. **Anticancer Research**, v. 39, p. 751-758, 2019

LI, Y.; LI, S.; ZHOU, Y.; MENG, X.; ZHANG, J.; XU, D.; LI, H. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. **Oncotarget**, v. 8, p. 39896-39921, 2017.

LIAO, V.; YU, C.; CHU, Y.; LI, W.; HSIEH, Y.; WANG, T. Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, p. 480-487, 2011.

Liu, Y., Ma, Y., An, N., Sun, P., Wang, Y., & Sun, C. Clinical efficacy of combination of pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for treatment of patients with HER2-positive breast cancer. **Medicine**, v. 98, p 1-3, 2019.

LIU, Y.; WANG, X.; HE, D.; CHENG, Y. Protection against chemotherapy- and radiotherapy-induced side effects: A review based on the mechanisms and therapeutic opportunities of phytochemicals. **Phytomedicine**, v. 80, 2020.

LIVSHITS, Z., RAO, R. B., & SMITH, S. An Approach to Chemotherapy-Associated Toxicity. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 32, p.167–203, 2014.

LONG, K.; SURESH, K. Pulmonary toxicity of systemic lung cancer therapy. **Respirology**, v. 25, p. 72-79, 2020.

MANEGOLD, C. Gemcitabine (Gemzar®) in non-small cell lung cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 4, p. 345–360, 2004.

MAUGHAN, K.; LUTTERBIE, M.; HAM, P. Treatment of breast cancer. **American Family Physician**, v. 81, p. 1339-46, 2010.

MIYAJI, M.; HAYASHI, Y.; FUNAKOSHI, M.; TANAKA, A.; ZHANG-AKIYAMA, Q. AP endonuclease EXO-3 deficiency causes developmental delay and abnormal vulval organogenesis, Pvl, through DNA glycosylase-initiated checkpoint activation in *Caenorhabditis elegans*. **Scientific Reports**, v. 8, 2018.

MOHAMMADGHOLI, A.; RABBANI-CHADEGANI, A.; FALLAH, S. Mechanism of the interaction of plant alkaloid vincristine with DNA and chromatin: spectroscopic study. **DNA and Cell Biology**, v. 32, p. 228-35, 2013.

MOREIRA, H.; SLEZAK, A.; SZYJKA, A.; OSZMIANSKI, J.; GASIOROWSKI, K. Antioxidant and cancer chemopreventive activities of cistus and pomegranate polyphenols. **Acta Poloniae Pharmaceutical**, v. 74, p. 688-698, 2017.

MOSS, R. Should Patients Undergoing Chemotherapy and Radiotherapy Be Prescribed Antioxidants? **Integrative Cancer Therapies**, v. 5, p. 63-82, 2006.

NASIM, F.; SABATH, B.; EAPEN, G. Lung Cancer. **Medicinal Clinics of North America**, v. 103, p. 463-473, 2019.

NECHUTA, S.; LU, W.; CHEN, Z.; ZHENG, Y.; GU, K.; CAI, H.; ZHENG, W.; SHU, X. Vitamin Supplement Use During Breast Cancer Treatment and Survival:

A Prospective Cohort Study. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 20, p 262–271, 2010.

NOBILI, S.; LAVACCHI, D.; PERRONE, G.; VICINI, G.; TASSI, R.; LANDINI, I.; GROSSO, A.; ROVIELLO, G.; MAZZANTI, R.; SANTOMAGGIO, C.; MINI, E. Vinorelbine in Non-Small Cell Lung Cancer: Real-World Data From a Single-Institution Experience. **Oncology Research**, v. 28, p. 237-248, 2020.

NODA, K.; NISHIWAKI, Y.; KAWAHARA, M.; NEGORO, S.; SUGIURA, T.; YOKOYAMA, A.; FUKUOKA, M.; MORI, K.; WATANABE, K.; TAMURA, T.; YAMAMOTO, S.; SAIJO, N. Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer. **New England Journal Medicine**, v. 346, p.85-91, 2002.

PALLAUF, K.; BENDALL, J.; SCHEIERMANN, C.; WATSCHINGER, K.; HOFFMANN, J.; ROEDER, T.; RIMBACH, G. **Vitamin C and lifespan in model organisms. Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 255–263, 2013.

PATHAK, A.; SINGH, N.; KHANNA, N.; REDDY, V.; PRASAD, K.; KOCHUPILLAI, V. Potentiation of the Effect of Paclitaxel and Carboplatin by Antioxidant Mixture on Human Lung Cancer H520 Cells. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, p. 416-421, 2002.

PAWLOWSKA, E.; SZCZEPANSKA, J.; BLASIAK, J. Pro- and Antioxidant Effects of Vitamin C in Cancer in correspondence to Its Dietary and Pharmacological Concentrations. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2019.

PEARCE, A.; HAAS, M.; VINEY, R.; PEARSON, S.; HAYWOOD, P.; BROWN, C.; WARD, R. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. **PLoS One**, v. 12, 2017.

PIERSMA, A. Alternative methods for developmental toxicity testing. **Basic Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 427-31, 2006.

POLJSAK, B.; MILISAV, I. The Role of Antioxidants in Cancer, Friends or Foes? **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, p. 5234-5244, 2018.

PRASAD, K. Multiple dietary antioxidants enhance the efficacy of standard and experimental cancer therapies and decrease their toxicity. **Integrative Cancer Therapies**, v. 3, p. 310-22, 2004.

PRASAD, K.; KUMAR, A.; KOCHUPILLAI, V.; COLE, W. High Doses of Multiple Antioxidant Vitamins: Essential Ingredients in Improving the Efficacy of Standard Cancer Therapy. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 18, p. 13–25, 1999.

QURESHI, A.; BLOOM, S.; HAMILTON, J.; DIETERT, R. Toxic Effects of Methyl Methanesulfonate (MMS) on Activated Macrophages From Chickens. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 13, p. 253-262, 1989.

RANTANEN, V.; GRÉNMAN, S.; KULMALA, J.; GRÉNMAN, R. Comparative evaluation of cisplatin and carboplatin sensitivity in endometrial adenocarcinoma cell lines. **British Journal of Cancer**, v. 69, p. 482-486, 1994.

RAUF, A.; IMRAN, M.; KHAN, I.; UR-REHMAN, M.; GILANI, S.; MEHMOOD, Z.; MUBARAK, M. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, p. 2109-2130, 2018.

RIJO, P.; PEŠIĆ, M.; FERNANDES, A.; SANTOS, C. Natural Products: Optimizing Cancer Treatment through Modulation of Redox Balance. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–3, 2020.

RIVANKAR, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 10, p. 853, 2014.

ROSSI, A.; DI MAIO, M. Platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: optimal number of treatment cycles. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 16, p. 653-60, 2016.

SCHWARTZ, A.; COTE, M. Epidemiology of Lung Cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 21–41, 2015.

SHAH, A.; GRADISHAR, W. Adjuvant Anthracyclines in Breast Cancer: What Is Their Role? **Oncologist**, v. 23, p.1153-1161, 2018.

SHARMA, P.; MCCLEES, S.; AFAQ, F. Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. **Molecules**, v. 22, p. 177, 2017.

SHEN, K. The Power of *C. elegans*: A Tribute to Sydney Brenner. **Developmental Cell**, v. 49, p. 496–498, 2019.

SLAMON, D.; EIERMANN, W.; ROBERT, N.; PIENKOWSKI, T; MARTIN, M.; PRESS, M.; MACKEY, J.; GLASPY, J.; CHAN, A.; PAWLICKI, M.; INTER, T.; VALERO, V.; LIU, M.; SAUTER, G.; VON, MINCKWITZ, G.; VISCO, F.; BEE, V.; BUYSE, M.; BENDAHMANE, B.; TABAH-FISCH, I.; LINDSAY, M.; RIVA, A.; CROWN, J. Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 365, p. 1273–1283, 2011.

SONANE, M.; MOIN, N.; SATISH, A. The role of antioxidants in attenuation of *Caenorhabditis elegans* lethality on exposure to TiO₂ and ZnO nanoparticles. **Chemosphere**, v. 187, p. 240-247, 2017.

SONGBO, M.; LANG, H.; XINYONG, C.; BIN, X.; PING, Z.; LIANG, S. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 30, p. 41-48, 2019.

STANKOVIC, J.; SELAKOVIC, D.; MIHAILOVIC, V.; ROSIC, G. Antioxidant Supplementation in the Treatment of Neurotoxicity Induced by Platinum-Based Chemotherapeutics-A Review. **Internatioal Journal of Molecular Science**, v. 21, p. 7753, 2020.

SUBRAMANI, R.; LAKSHMANASWAMY, R. Complementary and Alternative Medicine and Breast Cancer. **Approaches to Understanding Breast Cancer**, p.231–274, 2017.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, p. 209-249, 2021.

TAFAZOLI, A. Coenzyme Q10 in breast cancer care. **Future Oncology**, v. 13, p. 1035–1041, 2017.

TANG, Z.; DING, W.; WANG, L.; JIANG, W.; ZHANG, Q.; CHEN, H.; ZOU, H.; DONG, Y.; SHAO, J.; MA, T. Protective effect of vitamin E on methyl methanesulfonate-induced teratozoospermia in adult Sprague-Dawley rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, p. 4422-4426, 2015.

TRIPATHY, J.; TRIPATHY, A.; THANGARAJU, M.; SUAR, M.; & ELANGO VAN, S. α -Lipoic acid inhibits the migration and invasion of breast cancer cells through inhibition of TGF β signaling. **Life Sciences**, v. 207, p. 15–22, 2018.

VAN MAANEN, J.; RETÈL, J.; DE VRIES, J.; PINEDO, H. Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 80, p. 1526-33, 1988.

VERONESI, U.; BOYLE, P.; GOLDBIRTSCH, A.; ORECCHIA, R.; VIALE, G. Breast cancer. **The Lancet**, v. 365, p. 1727–1741, 2005.

VINGIANI, A.; VIALE, G. The Pathology Report. **Breast Cancer**, p. 157–168, 2017.

VOSTRIKOVA, S.; GRINEV, A.; GOGVADZE, V. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Carcinogenesis and Tumor Therapy. **Biochemistry (Mosc)**, v. 85, p. 1254-1266, 2020.

WAKS, A.; WINER, E. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA**, v. 321, p. 288-300, 2019.

WANCHAI, A.; ARMER, J.; STEWART, B. Complementary and alternative medicine use among women with breast cancer: a systematic review. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 14, p. 45-55, 2010.

WANG, Y.; ZHANG, S.; IQBAL, S.; CHEN, Z.; WANG, X.; WANG, Y.; WU, D. Pomegranate Extract Inhibits the Bone Metastatic Growth of Human Prostate Cancer Cells and Enhances the InVivo Efficacy of Docetaxel Chemotherapy. **The Prostate**, v. 74, p. 497-508, 2014.

WEIJL, N.; CLETON, F.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, v. 23, p. 209–240, 1997.

WEINHOUSE, C.; TRUONG, L.; MEYER, J.; ALLARD, P. *Caenorhabditis elegans* as an emerging model system in environmental epigenetics. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 59, p. 560-575, 2018.

WELLENBERG, A.; WEIDES, L.; KURZKE, J.; HENNECKE, T.; BORNHORST, J.; CRONE, B.; KARST, U.; BRINKMANN, V.; FRITZ, G.; HONNEN, S. Use of *C. elegans* as a 3R-compliant in vivo model for the chemoprevention of cisplatin-induced NEUROTOXICITY. **EXPERIMENTAL NEUROLOGY**, V. 341, 2021.

WELLS, M.; SARNA, L.; COOLEY, M.; BROWN, J.; CHERNECKY, C.; WILLIAMS, R. D.; DANAOL, L. Use of Complementary and Alternative Medicine Therapies to Control Symptoms in Women Living With Lung Cancer. **Cancer Nursing**, v. 30, p. 45–55, 2007.

WHO - World Health Organization. Monograph. **World Cancer Report**. Lyon, France, 2014.

WODE, K.; HENRIKSSON, R.; SHARP, L.; STOLTENBERG, A.; HÖK NORDBERG, J. Cancer patients' use of complementary and alternative medicine in Sweden: a cross-sectional study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, p.1-11, 2019.

YANG, H.; VILLANI, R.; WANG, H.; SIMPSON, M.; ROBERTS, M.; TANG, M.; LIANG, X. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v 37, p. 266, 2019.

YANG, G.; NOWSHEEN, S.; AZIZ, K.; GEORGAKILAS, A. Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, p. 392–404, 2013.

ZANINI, D.; SCHMATZ, R.; PELINSON, L.; PIMENTEL, V.; DA COSTA, P.; CARDOSO, A.; SCHETINGER, M. Ectoenzymes and cholinesterase activity and

biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 374, p. 137–148, 2012.

ZEGLINSKI, M.; LUDKE, A.; JASSAL, D.; SINGAL, P. Trastuzumab-induced cardiac dysfunction: A 'dual hit'. **Experimental & Clinical Cardiology**, v. 16, p. 70-74, 2011.