



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MURIEL DE ALMEIDA XAVIER

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO NA
CITOTOXICIDADE, PROLIFERAÇÃO CELULAR E
EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS MCF-7 TRATADAS
COM DIFERENTES AGENTES MUTAGÊNICOS**

Londrina
2014

MURIEL DE ALMEIDA XAVIER

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO NA
CITOTOXICIDADE, PROLIFERAÇÃO CELULAR E
EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS MCF-7 TRATADAS
COM DIFERENTES AGENTES MUTAGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

X3 e Xavier, Muriel de Almeida.
Efeitos da suplementação de ácido fólico na citotoxicidade, proliferação celular e expressão gênica de células MCF-7 tratadas com diferentes agentes mutagênicos / Muriel de Almeida Xavier. – Londrina, 2014.
70 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Células cancerosas – Teses. 2. Acido fólico – Teses. 3. Células cancerosas – Proliferação – Teses. 4. Genética – Expressão – Teses. 5. Apoptose – Teses. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 576.385.5

MURIEL DE ALMEIDA XAVIER

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO NA
CITOTOXICIDADE, PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO
GÊNICA DE CÉLULAS MCF-7 TRATADAS COM DIFERENTES
AGENTES MUTAGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Gislayne Fernandes Lemes
Trindade Vilas Boas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Verônica Elisa, Pimenta Vicentini
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 21 de fevereiro de 2014.

Dedico esse trabalho à minha família, razão pela qual busco meu melhor todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Doutor Mário Sérgio Mantovani pela orientação, confiança e pela oportunidade de fazer parte de sua equipe.

À coordenadora do Programa em Genética e Biologia Molecular, Ana Lúcia Dias, todos os docentes e demais membros do programa, por compartilharem seus conhecimentos e estarem sempre à disposição.

Aos membros da Banca Examinadora por aceitarem o convite e colaborarem para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço imensamente aos meus queridos colegas de laboratório por me acolherem e pela prontidão que sempre demonstraram em me ajudar. A contribuição de cada um de vocês foi preciosa e fundamental para a realização desse trabalho. Sempre lembrarei de nossos momentos de trabalho no laboratório, descontração, alegrias e doçuras!

Também agradeço de forma muito especial à minha família, principais responsáveis por essa conquista: meus pais, Sérgio Antônio Pastorello Xavier e Maria Madalena de Almeida Pastorello Xavier, e minha irmã Stael Maria de Almeida Xavier. Vocês são a base da minha existência e das minhas conquistas. Jamais chegaria onde cheguei sem o apoio e o esforço de vocês. Muito obrigada por serem minha família.

Aos demais amigos e familiares, sempre oferecendo apoio, caronas, almoços e conselhos sempre muito bem-vindos.

Meu sincero MUITO OBRIGADA!

XAVIER, M.A.; OLIVEIRA, M.T.; BARANOSKI, A., MANTOVANI, M.S. **Efeitos da suplementação de ácido fólico na citotoxicidade, proliferação celular e expressão gênica de células MCF-7 tratadas com diferentes agentes mutagênicos.** 2014. 70 f. Trabalho de Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

Os folatos são vitaminas encontradas em diversos alimentos e desempenham importante papel no crescimento celular, síntese de nucleotídeos e reações de metilação. Sua deficiência está implicada no desenvolvimento de diversas doenças, porém os efeitos de sua suplementação ainda não são totalmente conhecidos. Esse trabalho avaliou os efeitos da alta concentração de ácido fólico (AF) na citotoxicidade, proliferação celular e expressão gênica em células tratadas com diferentes agentes mutagênicos. Células MCF-7 foram tratadas com AF e sua associação à doxorubicina (DXR), camptotecina (CPT) e metil metanossulfonato (MMS) utilizando o Ensaio do MTT, Análise Celular em Tempo Real (RTCA) e PCR em Tempo Real (qPCR). Os resultados do Ensaio do MTT revelaram que o ácido fólico não provocou citotoxicidade e também não interferiu na citotoxicidade causada pelos agentes químicos. Pelo RTCA, o AF não interferiu na proliferação celular, tanto isoladamente, quanto em associação aos agentes químicos. A expressão de genes de apoptose, ciclo celular, sinalização de danos e receptores de folato não foi alterada no tratamento apenas com AF, contudo, associado à DXR, aumentou a expressão de *BAX*, *BCL-XL*, *CASP8* (associados a apoptose), e diminuiu *BIRC5* (associado a sinalização de danos e ciclo celular). Em associação à CPT, AF aumentou a expressão de *BAK*, *BCL-XL*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9* (associados a apoptose), *DDIT3* (sinalização de danos) e também diminuiu *BIRC5* (associado a ciclo celular). Em associação ao MMS, o AF aumentou *BIRC5* e diminuiu *TP53* (associados a ciclo celular) em relação ao tratamento apenas com o indutor, mas não interferiu nos genes associados a apoptose. Esses resultados demonstraram que o AF isoladamente não altera a proliferação e morte das células, porém, pode exercer papel adjuvante na eliminação dessas células ou impedir a apoptose quando associado à diferentes quimioterápicos modulando a ação desses agentes. Esses efeitos podem influenciar na quimioterapia e quimioprevenção e, conseqüentemente, na saúde humana.

Palavras-chave: Folato. Carcinogênese. qPCR.

XAVIER, M.A.; OLIVEIRA, M.T.; BARANOSKI, A., MANTOVANI, M.S. **Effects of folic acid supplementation in cytotoxicity, cell proliferation and genic expression of MCF-7 cells treated with different mutagenic agents.** 2014. 70 p. Dissertation of Master's Degree in Genetics and Molecular Biology – Londrina State University, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Folates are dietary vitamins, which play an essential role in cellular growth, nucleotides synthesis and methylation reactions. Folate deficiency can promote various diseases, but the supplementation effects are not known yet. This work evaluated the effects of an high concentration of folic acid (FA) on cytotoxicity, cellular proliferation and genic expression of cells treated with different mutagenic agents. MCF-7 cells were treated with FA and FA associated with doxorubicin (DXR), camptothecin (CPT) and methyl metanesulfonate (MMS) and evaluated in MTT Assay, Real Time Cell Analyzer (RTCA) and Real Time PCR (qPCR). MTT Assay results showed that FA did not induce cytotoxicity and did not influence in the cytotoxicity caused by the chemicals. In RTCA, FA did not interfere in cellular proliferation, either alone or associated with the chemical agents. Genic expression of genes related to apoptosis, cell cycle, DNA damage signaling and folate receptors did not change in cells treated only with FA; but FA associated with DXR increased *BAX*; *BCL-XL*, *CASP8* (apoptosis) and decreased *BIRC5* (DNA damage and cell cycle) expression. Associated with CPT, increased *BAK*, *BCL-XL*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9* (apoptosis), *DDIT3* (DNA damage) and also decreased *BIRC5* (cell cycle) expression. Associated with MMS, increased *BIRC5* and decreased *TP53* (cell cycle) expression, but did not change apoptosis genes compared to the treatments only with the drugs. These results showed that only FA is not able to affect the proliferation and cell death, but can exert an adjuvant role in the elimination of these cells or avoid apoptosis when associated with different chemotherapy agents affecting the action of them. These effects can influence in chemotherapy and chemoprevention and, consequently, in human healthy.

Key words: Folate. Carcinogenesis. qPCR.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Viabilidade celular obtida no Ensaio do MTT após 24h e 48h de tratamento com	27
Gráfico 2 – Proliferação celular analisada por <i>Real Time Cell Analyzer</i> em tratamento com doxorubicina.....	29
Gráfico 3 – Proliferação celular analisada por <i>Real Time Cell Analyzer</i> em tratamento com camptotecina.....	30
Gráfico 4 – Proliferação celular analisada por <i>Real Time Cell Analyzer</i> em tratamento com metil metanossulfonato	31
Gráfico 5 – Expressão gênica em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com ácido fólico comparado ao controle negativo	32
Gráfico 6 – Expressão gênica dos receptores de folato em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com ácido fólico comparado ao controle negativo.....	32
Gráfico 7 – Expressão gênica em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com doxorubicina comparado ao controle negativo.....	33
Gráfico 8 – Expressão gênica em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com doxorubicina associada ao ácido fólico.....	33
Gráfico 9 – Expressão gênica dos receptores de folato em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com doxorubicina comparado ao controle negativo.....	34
Gráfico 10 – Expressão gênica dos receptores de folato em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com doxorubicina associada ao ácido fólico	34
Gráfico 11 – Expressão gênica em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com camptotecina comparado ao controle negativo.....	35
Gráfico 12 – Expressão gênica em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com camptotecina associada ao ácido fólico	35
Gráfico 13 – Expressão gênica dos receptores de folato em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com camptotecina comparado ao controle negativo.....	36

Gráfico 14 – Expressão gênica dos receptores de folato em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com camptotecina associada ao ácido fólico	36
Gráfico 15 – Expressão gênica em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com metil metanossulfonato comparado ao controle negativo	37
Gráfico 16 – Expressão gênica em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com metil metanossulfonato associado ao ácido fólico	38
Gráfico 17 – Expressão gênica dos receptores de folato em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com metil metanossulfoanto comparado ao controle negativo.....	38
Gráfico 18 – Expressão gênica dos receptores de folato em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com metil metanossulfonato associado ao ácido fólico.....	39

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1 PROPRIEDADES GERAIS DOS FOLATOS	12
1.2 FOLATOS E CÂNCER	15
1.3 MODELO EXPERIMENTAL	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 GERAIS	19
2.2 ESPECÍFICOS	19
3 ARTIGO	20
4 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICES	61

INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a incidência de câncer e de outras doenças crônicas não transmissíveis vem aumentando no mundo todo, tanto em países desenvolvidos, como também em desenvolvimento ou subdesenvolvidos. Esforços na tentativa de esclarecer fatores que podem levar ao desenvolvimento de uma melhor prevenção e tratamento são de grande importância no combate à essa doença. Dados epidemiológicos demonstram que o estilo de vida, fatores ambientais e ocupacionais são responsáveis pela maioria dos casos de câncer (INCA, 2012).

Inúmeros agentes estão claramente associados à indução de danos no DNA e carcinogênese, como por exemplo, radiação ionizante, luz ultravioleta, agentes químicos e alguns vírus. No entanto, outras classes de compostos são consideradas importantes para a prevenção do câncer. Dentre essas classes, os componentes da dieta, como por exemplo, vitaminas antioxidantes e esfingolipídeos, podem atuar na prevenção do câncer inibindo a produção de radicais livres e interferindo nas vias de transdução de sinais nas várias etapas da carcinogênese (BOREK, 1993).

Muitos estudos têm sido realizados associando o consumo de determinados nutrientes com a redução do risco de câncer, porém a associação direta entre prevenção do câncer e ingestão de frutas e verduras deve ser cautelosa, visto que há outros fatores que interferem no processo carcinogênico, gerando ainda muita controvérsia entre os estudos já realizados nessa área (BOFFETTA *et al.*, 2010).

Nesse contexto, os folatos são vitaminas do complexo B investigadas por participarem de várias vias bioquímicas na formação de componentes celulares essenciais, como cofatores enzimáticos, biossíntese de nucleotídeos e reações de metilação (BALUZ; CARMO; ROSAS, 2002).

Quando o ácido fólico, forma sintética dos folatos, foi inicialmente implementado na prática clínica, há quase 70 anos, os pesquisadores detinham quase nenhum conhecimento acerca da biodisponibilidade, concentração nos alimentos e dos reais efeitos de altas doses e *turnover* da vitamina (BUTTERWORTH JR; TAMURA, 1989). Com os programas de fortificação dos farináceos (e seus derivados) implementados após a avaliação dos riscos da

deficiência em folatos, alguns pesquisadores tem focado seus estudos na investigação dos efeitos da suplementação do ácido fólico na saúde humana. Vários autores defendem essa linha de investigação, pois, além do consumo de alimentos fortificados, a suplementação extra com suplementos vitamínicos por grupos não inicialmente indicados para tal prática vem sendo adotada com pouco conhecimento dos efeitos e da segurança de altas doses de ácido fólico para o organismo (KIM, 2008).

Nesse contexto, devido ao número reduzido de evidências diretas dos reais efeitos da suplementação de altas doses de ácido fólico e sua controversa influência na carcinogênese, o presente trabalho investiga os efeitos de sua alta dosagem na citotoxicidade, proliferação celular e expressão gênica em células tumorais de mama tratadas com diferentes agentes mutagênicos. Os resultados poderão endossar a literatura existente e colaborar para a compreensão do papel da suplementação de altas doses de ácido fólico na saúde humana.

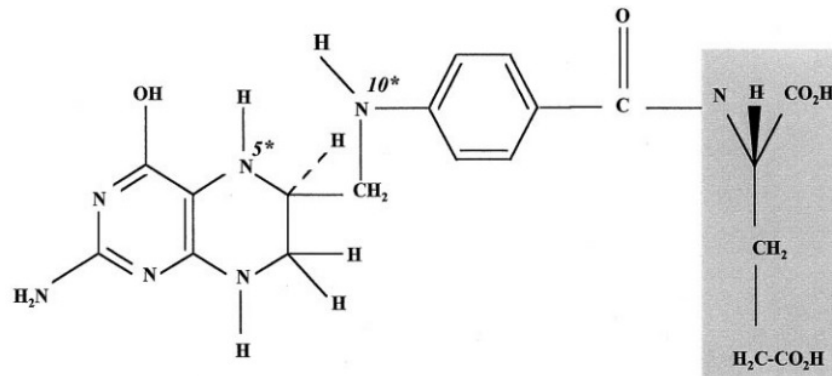
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 PROPRIEDADES GERAIS DOS FOLATOS

Folato é o termo geral utilizado para descrever compostos altamente lábeis de uma grande família contendo estruturas químicas similares (LUCOCK, 2000). Os folatos são vitaminas hidrossolúveis do complexo B que estão presentes em vários alimentos folhosos de coloração verde escura, como espinafre, couve e brócolis, bem como em frutas cítricas, tomate, amendoim, feijão branco, fígado, peixes, entre outros (USDA, 2011). Porém, na sua forma natural, os folatos apresentam muita instabilidade química e possibilitam pouca absorção, sendo sua disponibilidade dependente de diversos fatores, desde as etapas do processo de cultivo e preparação do alimento, até outros constituintes alimentares presentes que influenciam na estabilidade dos folatos durante a digestão (McNULTY; PENTIEVA, 2004).

Os folatos naturalmente presentes nos alimentos encontram-se sob a forma de poliglutamato, sendo necessária a presença das enzimas folil conjugase (pâncreas) e conjugase (intestino) para hidrolisar o poliglutamato em monoglutamato, a forma de absorção dos folatos. Essa enzima age no intestino delgado sob um pH ótimo de 6-7 e sua ação pode ser prejudicada pela ingestão de alimentos ácidos (BAILEY; GREGORY, 1999; McNULTY; PENTIEVA, 2004). A forma sintética dos folatos, o ácido fólico (AF), análogo hidrossolúvel já encontrado como monoglutamato, é a forma mais estável entre os folatos, sendo preferencialmente utilizada para o enriquecimento de alimentos e complexos vitamínicos devido a sua maior biodisponibilidade (McNULTY; PENTIEVA, 2004). Essa forma apresenta-se como cristais amarelados, com peso molecular de 441, 4 g mol⁻¹, fórmula C₁₉H₁₉N₇O₅, também é conhecida como folacina ou ácido pteroil-L-glutâmico (OFF *et al*, 2005).

Figura 1 – Estrutura geral dos folatos em sua forma monoglutâmica.

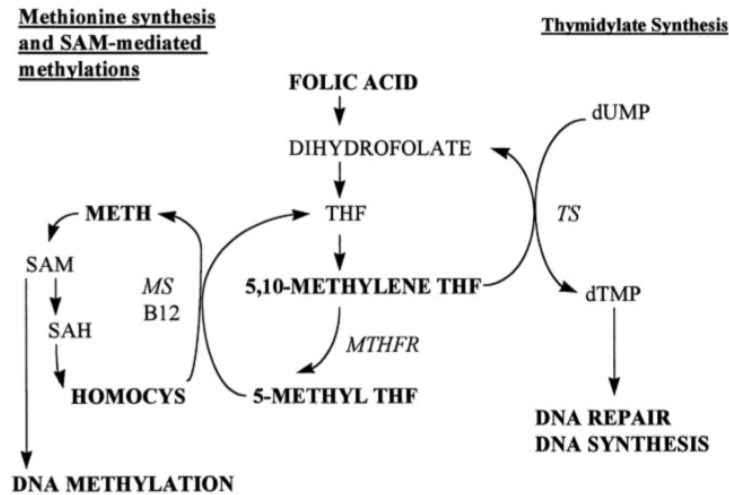


Fonte: Lucock (2000).

Ao ser ingerido pela dieta, o folato deve ser metabolizado para a formação do tetrahydrofolato (THF). O THF, por sua vez, participa de várias reações-chave no organismo, como metilação, síntese de purinas e pirimidinas e metabolismo de aminoácidos. Por exemplo, na via de metilação, o THF é metilado formando o 5, 10 metilenetetrahydrofolato. A enzima metil tetrahydrofolato redutase (MTHFR) é responsável pela doação do grupamento metil (5-metil-THF) desse composto para a homocisteína gerando metionina em uma reação mediada pela metil sintetase (MS). Essa via de metilação é dependente de vitamina B12 e é responsável pelo ciclo de regeneração homocisteína-metionina-homocisteína. A metionina é um precursor para a formação do S-adenosilmetionina (SAM), o principal doador de grupamentos metil nas reações de metilação (BALUZ; CARMO; ROSAS, 2002).

O 5,10-metilenetetrahydrofolato também é substrato para a enzima timidato sintase (TS) na reação de formação de timidilato e de metilação da desoxuridina monofosfato (dUMP) para desoxitimidina monofosfato (dTMP) gerando purinas. O timidilato e as purinas são utilizados para a síntese e reparo de DNA (BALUZ; CARMO; ROSAS, 2002; ULRICH; REED; NIJHOUT, 2008).

Figura 2 – Principais vias metabólicas dos folatos. Homocys: homocisteína; B12: vitamina B12; METH: metionina; THF: tetrahidrofolato; TS: timidilato sintase; MS: metionina sintase; MTHFR: metileno tetrahidrofolato redutase; SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteína.



Fonte: Fenech (2001).

A ingestão diária recomendada (IDR) de ácido fólico é de 400 µg para adultos. Lactantes e gestantes devem consumir quantidades maiores, 500 e 600 µg/dia, respectivamente (ANVISA, 1998). O folato é excretado pela bile e urina em forma inativa em quantidade aproximada de 100 µg por dia em humanos (BALUZ; CARMO; ROSAS, 2002).

Devido a sua importância em processos metabólicos diversos, instabilidade química e baixa concentração em produtos naturais, desde junho de 2004, as farinhas de trigo, de milho e seus derivados consumidos no Brasil devem estar fortificados com ácido fólico (e também ferro) na concentração de 150 µg/100 mg de produto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

A ingestão insuficiente de folatos tem sido associada ao desenvolvimento de várias doenças, como problemas vasculares (SELHUB; JACQUES; BOSTON, 1995), defeitos do fechamento do tubo neural (SANTOS; PEREIRA, 2007), Síndrome de Down (JAMES *et al.*, 1997), Doença de Alzheimer (CLARKE *et al.*, 1998) e certos tipos de câncer (BUTTERWORTH JUNIOR, 1993; ZHANG *et al.*, 1999; BALUZ; CARMO; ROSAS, 2002).

1.2 FOLATOS E CÂNCER

A quimioprevenção do câncer através de nutrientes da dieta envolve vários mecanismos de reversão de lesões pré-cancerosas, fortalecimento do sistema imune e combate às espécies reativas do oxigênio, que causam oxidação e lesão do material genético. Muitos estudos ainda são necessários para a elucidação de mecanismos de ação dos micronutrientes e estabelecimento de doses terapêuticas, visto que o consumo de suplementos de forma inadequada e fora das quantidades fisiológicas pode causar sérios danos à saúde (ANTUNES; LIMA E SILVA; CRUZ, 2010).

Os folatos são importantes doadores de grupamentos metil, desempenhando um papel relevante na manutenção da estabilidade e nos padrões de metilação do DNA (JAMES *et al.*, 1997). A ausência de folatos causa um aumento na concentração intracelular de homocisteína, cujo acúmulo está envolvido em diversas reações de oxirredução, ativação da proliferação celular ou apoptose e alterações na expressão gênica, como por exemplo, os proto-oncogenes (BRACHET *et al.*, 2004). Juntamente com a vitamina B12, o ácido fólico exerce papel fundamental na estabilidade do genoma, reduzindo de uma maneira geral o risco de câncer (FENECH, 2001).

A fortificação com ácido fólico de produtos farináceos (e seus derivados) adotada em vários países do mundo levou a um aumento do nível de folato na população e levantou questionamentos para a investigação dos efeitos da suplementação de AF na saúde humana. Em relação à carcinogênese, ainda há muitas lacunas nesse campo de estudo. Alguns autores defendem um papel ambíguo do ácido fólico, afirmando que a influência dessa vitamina no câncer depende do estágio em que a doença se encontra, bem como da existência ou não de lesões pré-neoplásicas. Evidências experimentais apontam que a deficiência de folatos é fator promotor de iniciação da carcinogênese em tecidos normais, enquanto que altas doses da vitamina respondem pelo progresso do crescimento de tumores (ULRICH; POTTER, 2007). Ao mesmo tempo, a depleção do fornecimento de folatos contribui para a eliminação de células malignas, visto que essas células encontram-se em um estágio proliferativo acelerado e necessitam de um maior aporte da vitamina para síntese de DNA e replicação (KIM, 2007). A causa do contraste entre esses resultados ainda é desconhecida, mas pode estar associada também à

diferenças na biodisponibilidade entre as formas naturais e sintética dos folatos (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

A questão da eficácia dos folatos na prevenção do câncer ainda gera muitas dúvidas, apesar de várias evidências epidemiológicas e estudos com animais demonstrarem o forte potencial quimiopreventivo dessa vitamina (ULRICH; POTTER, 2007). Em um recente trabalho, foram revisadas várias meta-análises correlacionando o consumo de ácido fólico em concentrações acima da fortificação dos alimentos e o risco de câncer. Em um total de 13 estudos, os dados de mais de 49.000 indivíduos com suplementação mínima por um ano não revelaram associação direta da suplementação de AF com o risco do desenvolvimento de nenhum tipo de câncer (VOLLSET *et al.*, 2013).

Quando associados à quimioprevenção, há diversos estudos epidemiológicos relacionando inversamente o *status* de folatos (avaliado pela quantificação de consumo ou por níveis sanguíneos) e o risco do desenvolvimento de diversos tipos de câncer, como o colorretal, pâncreas, estômago, pulmão, mama, ovário, neuroblastoma e leucemias (KIM, 2007).

O exemplo melhor estudado é a associação de folatos e câncer colorretal e, apesar da multiplicidade dos dados da literatura, há fortes evidências de uma relação inversa entre o *status* de folato e o risco de câncer colorretal ou de adenocarcinoma, seu precursor. O risco de desenvolvimento desse tipo de câncer é aproximadamente 20% a 40% menor em pessoas com alto *status* de folato quando comparadas à indivíduos com deficiência da vitamina (KIM, 2007).

Em um estudo duplo-cego, Jaszewski e colaboradores (2008) também estudaram os efeitos da suplementação de 5mg/dia de AF em um período de três anos para avaliar se essa dosagem de vitamina é capaz de reduzir a recorrência de adenoma colorretal, precursor do carcinoma colorretal. Os pesquisadores obtiveram uma resposta positiva e concluíram que a suplementação com altas doses de ácido fólico pode ser uma poderosa estratégia quimiopreventiva contra o carcinoma colorretal.

Outro exemplo é em relação ao câncer de mama, onde um estudo epidemiológico com mais de 35.000 mulheres avaliou o efeito do alto consumo de AF por um período de dez anos. Os pesquisadores não observaram relação da suplementação com o risco de câncer; ao contrário, relataram um efeito protetor (MARUTI; ULRICH; WHITE, 2009).

Em recente estudo *in vitro*, uma quantidade suprafisiológica de ácido fólico (9 μM) provocou hipometilação global do genoma e hipermetilação em ilhas CpG específicas em células humanas normais de epitélio do cólon e fibroblastos. Os autores afirmam que, como padrões aberrantes de metilação também são uma resposta à deficiência dos folatos, deve haver uma concentração ótima da vitamina para prevenir esses efeitos adversos no DNA; defendem também a necessidade de mais estudos para investigar os efeitos da suplementação de ácido fólico para esclarecer os mecanismos da associação de altas concentrações da vitamina e o desenvolvimento de doenças, como o câncer (CHARLES, JOHNSON, BELSHAW, 2012).

1.3 MODELO EXPERIMENTAL

Embora os sistemas *in vivo* reproduzam mais fielmente a ação, o metabolismo e a biodisponibilidade dos compostos em geral, os sistemas *in vitro* são muito úteis para detectar substâncias mutagênicas e/ou genotóxicas (PERES; CURI, 2005). Além disso, testes *in vivo* para avaliação da carcinogênese e toxicidade de compostos podem gerar dados insatisfatórios e não muito precisos, pois os resultados do comportamento desses compostos em seres humanos não podem ser previstos (SHANKS; GREEK; GREEK, 2009).

A cultura celular permite o estudo direcionado do comportamento das células mediante condições específicas e controladas. Fora do contexto orgânico como um todo, as células estão livres de interações com matriz extracelular e outros tipos celulares que poderiam influenciar na interação composto/célula e na análise dos resultados. Além disso, as condições de cultura (como por exemplo, temperatura, pH, nutrientes do meio, etc) podem ser facilmente padronizadas possibilitando um método de estudo com boa reprodutibilidade (PERES; CURI, 2005).

A linhagem celular MCF-7 escolhida como modelo experimental *in vitro* foi isolada na década de 70 a partir da efusão pleural do tecido de um adenocarcinoma de mama maligno em Detroit-USA, mais precisamente no Instituto *Michigan Cancer Foundation - 7*, daí o nome MCF-7. Elas são muito úteis nos estudos *in vitro* pois preservaram muitas características do epitélio mamário, como a habilidade de processar estrogênio através de seus receptores. Em cultura, formam

colônias em monocamada de aspecto abaulado e seu crescimento pode ser interrompido pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (CELL BIOLABS INC., 2012).

Essas células foram escolhidas como modelo experimental por serem de uma linhagem tumoral e então úteis para avaliar os mecanismos de interação com os agentes quimioterápicos em estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Avaliar os efeitos da suplementação de alta dosagem de ácido fólico na citotoxicidade, proliferação celular e expressão gênica da linhagem tumoral de mama MCF-7 tratada com diferentes agentes mutagênicos.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar, através do Ensaio do MTT, o potencial citotóxico e/ou protetor da suplementação de ácido fólico na concentração de 450 μ M em células MCF-7 tratadas com os agentes mutagênicos doxorrubicina, camptotecina e metil metanossulfonato nas concentrações de 2 μ M, 3 μ M e 450 μ M, respectivamente;

Realizar a Análise Celular em Tempo Real (RTCA) para monitorar a cinética de proliferação celular por até 96h em células MCF-7 tratadas somente com AF ou os agentes mutagênicos doxorrubicina, camptotecina e metil metanossulfonato nas concentrações de 2 μ M, 3 μ M e 450 μ M, respectivamente, associados ao AF;

Investigar através da Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR) a expressão de genes relacionados aos receptores de folato (*FOLR1*, *SLC19A1*, *SLC46A1*), à sinalização de danos ao DNA e ciclo celular (*BIRC5*, *CCNA2*, *DDIT3*, *GADD45A* e *TP53*) e apoptose (*BAK*, *BAX*, *BCL-2*, *BCL-XL*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9*) em células suplementadas e tratadas por 24h;

Verificar possíveis correlações entre a suplementação do AF com os diferentes mecanismos de ação dos agentes indutores de danos.

3 ARTIGO

(Artigo a ser submetido à revista *Mutation Research*)

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO NA CITOTOXICIDADE,
PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS MCF-7
TRATADAS COM DIFERENTES AGENTES MUTAGÊNICOS**

Efeitos da suplementação de ácido fólico na citotoxicidade, proliferação celular e expressão gênica de células MCF-7 tratadas com diferentes agentes mutagênicos

Xavier, M.A.¹; Oliveira, M.T.¹; Baranoski, A.¹; Mantovani, M.S.^{1,2}

RESUMO: A quimioprevenção do câncer através de componentes da dieta tem mostrado que alguns nutrientes podem reduzir o risco do desenvolvimento dessa doença. Esse estudo investiga os efeitos da suplementação do ácido fólico em relação à citotoxicidade, proliferação celular e expressão gênica. Células MCF-7 foram tratadas com AF e AF associado a diferentes agentes químicos (doxorubicina, camptotecina e metil metanossulfonato) nos Ensaio MTT, RTCA e qPCR em genes de receptores de folato, ciclo celular, sinalização de danos e apoptose. O Ensaio do MTT não indicou citotoxicidade e nem influência do AF na citotoxicidade induzida pelos agentes químicos. O AF não interferiu na cinética de ciclo celular avaliada pelos valores do Índice Celular no RTCA e também não alterou a resposta quando as células eram tratadas com os agentes químicos. A qPCR demonstrou que as células tratadas com DXR associada ao AF apresentaram um aumento na expressão de *BAX* (~ 2x), *BCL-XL*(~5x), *CASP8* (~8x), e diminuíram *BIRC5* (~5.8x). AF em associação com CPT aumentou a expressão de *BAK* (~5x), *BCL-XL* (~10x), *CASP7* (~5x), *CASP8* (~ 17,6x), *CASP9* (~7,8x), *DDIT3* (~10x) e diminuiu *BIRC5* (~9.6x). AF em associação com MMS, aumentou *BIRC5* (~11x) e diminuiu *TP53* (~2.4x). A expressão dos receptores de folato não alterou em nenhum dos tratamentos. Os resultados demonstraram que o AF isoladamente não influenciou na proliferação e morte celular, porém, pode potencializar ou impedir a apoptose quando associado à diferentes agentes químicos.

Palavras-chave: Folato. Carcinogênese. qPCR.

¹ Laboratório de Genética Toxicológica. Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina.

² Dr. M.S. Mantovani

Departamento de Biologia Geral – CCB

Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário

P.O. Box 6001, Londrina, Paraná, Brazil

CEP: 86051-990

Email: biomsm@uel.br

Phone: 55 43 3371-4977

1 INTRODUÇÃO

Os folatos são um grupo de vitaminas do complexo B essenciais para a síntese de nucleotídeos, fornecimento de grupamentos metil e replicação do DNA e então, constituem importantes componentes para o crescimento celular e reparo. (SMITH; KIM; REFSUM, 2008). Estão presentes em vários alimentos folhosos de coloração verde escura, como espinafre, couve e brócolis, bem como em frutas cítricas, tomate, amendoim, feijão branco, fígado, peixes, entre outros (USDA, 2011).

Em sua forma natural, os folatos encontram-se sob a forma de poliglutamato, sendo necessária a hidrólise em monoglutamato para sua absorção. A forma sintética dos folatos, o ácido fólico (AF), análogo hidrossolúvel, já encontrado como monoglutamato, é a forma mais estável entre os folatos, sendo preferencialmente utilizada para o enriquecimento de alimentos e complexos vitamínicos devido a sua maior biodisponibilidade (McNULTY; PENTIEVA, 2004).

A ingestão insuficiente de folatos tem sido associada ao desenvolvimento de várias doenças, como problemas vasculares (SELHUB; JACQUES; BOSTON, 1995), defeitos do fechamento do tubo neural (SANTOS; PEREIRA, 2007), Síndrome de Down (JAMES *et al.*, 1999), Doença de Alzheimer (CLARKE *et al.*, 1998) e certos tipos de câncer (BUTTERWORTH JUNIOR, 1993; ZHANG *et al.*, 1999; BALUZ; CARMO; ROSAS, 2002).

Há diversos estudos epidemiológicos relacionando inversamente o *status* de folatos e o risco do desenvolvimento de diversos tipos de câncer, como o colorretal, pâncreas, estômago, pulmão, mama, ovário, neuroblastoma e leucemias. O exemplo melhor estudado é a associação de folatos e câncer colorretal. Apesar da multiplicidade dos dados da literatura, há fortes evidências de uma relação inversa entre o *status* de folato e o risco de câncer colorretal ou de adenocarcinoma, seu precursor (KIM, 2007).

Em recente estudo *in vitro*, uma quantidade suprafisiológica de ácido fólico (9 μ M) provocou hipometilação global do genoma e hipermetilação em ilhas CPG específicas em células humanas normais do epitélio e fibroblastos. Os autores afirmam que, como padrões aberrantes de metilação também são respostas à deficiência dos folatos, deve haver uma concentração ótima da vitamina para prevenir esses efeitos adversos no DNA (CHARLES, JOHNSON, BELSHAW, 2012).

Com os programas de fortificação implementados após a avaliação dos riscos da deficiência em folatos, alguns pesquisadores tem focado seus estudos na investigado dos efeitos da suplementação do ácido fólico na saúde humana, porém ainda há poucos estudos na literatura relatando os reais efeitos da suplementação de altas doses de ácido fólico. Dessa forma, o presente artigo tem como objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de ácido fólico na citotoxicidade, proliferação celular e expressão gênica de células tumorais de mama tratadas com diferentes agentes mutagênicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AGENTES QUÍMICOS

Para a realização dos testes, as células foram tratadas com 3 indutores de dano ao DNA: doxorubicina (DXR - CAS n°23214-92-8), camptotecina (CPT - CAS n°7689-03-4) e metil metanossulfonato (MMS - CAS n°66-27-3) em concentrações finais de 2 μ M, 3 μ M e 450 μ M, respectivamente. O ácido fólico (Acros Organics®/96%-100% - CAS n° 66-27-3) foi utilizado em concentração final de 450 μ M. Essa concentração de vitamina foi escolhida para caracterizar uma alta dosagem de suplementação e corresponde à 50x mais ácido fólico que o contido originalmente no meio de cultura utilizado (4 mg/L).

2.2 LINHAGEM E CULTIVO CELULAR

Células MCF-7 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ) e mantidas em frascos de 25 cm² contendo 10 mL de meio de cultura DMEM (Cód. 12100046/Gibco®) suplementado com 10% de soro bovino fetal – SBF (Gibco®). Os frascos foram mantidos a 37° C em estufa com 5% de CO₂.

Para o preparo das células a serem utilizadas nos ensaios, o meio de cultura foi retirado do frasco, o qual foi lavado duas vezes com 5 mL de PBS. O PBS foi totalmente retirado e 500 μ L de tripsina 0,1% foram adicionados. O frasco permaneceu em estufa a 37° C por 3 minutos para total tripsinização das células. Após esse período, a tripsina foi inativada com 1,5 mL de meio de cultura com 10% de SBF. A suspensão celular obtida foi homogeneizada e 10 μ L foram misturados a

10 μL do corante Azul de Trypan 0,4% (Invitrogen®). 10 μL dessa mistura foram utilizados para contagem e viabilidade das células em contador automático (*Countess® Automated Cell Counter-Life Technologies*). Foram utilizadas suspensões com viabilidade celular maior ou igual a 80% para a montagem dos ensaios.

2.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE - MTT

O ensaio do MTT foi realizado de acordo com o proposto por Mosmann (1983). Um total de 6×10^3 células foi semeado por poço em placas de 96 poços. As placas permaneceram 24h em estufa (37°C - 5% CO_2) para estabilização. Após esse período, as células do controle-positivo foram tratadas com 100 μL dos indutores doxorubicina, camptotecina e MMS diluídos em meio de cultura com 10% de SBF e as células-teste foram tratadas com cada indutor associado ao AF. Após cada tempo de tratamento (24h e 48h), o meio de cultura foi totalmente retirado para adição de 100 μL de solução de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) 0,5 mg/mL diluído em meio de cultura sem SBF. Após 4h, a solução de MTT foi retirada e os cristais de formazan gerados foram diluídos com 100 μL de dimetilsulfóxido - DMSO. A absorbância das placas foi lida em espectrofotômetro a 550 nm e o valor médio das absorbâncias foi convertido em porcentagem de viabilidade celular através da equação: $\text{absorbância média dos tratamentos} / \text{absorbância média do controle} \times 100$. Cada tempo (24 e 48h) foi avaliado em três repetições biológicas.

2.4 ANÁLISE CELULAR EM TEMPO REAL - RTCA

Roche's xCELLigence RTCA HT System foi utilizado para investigar o efeito do AF na proliferação celular em associação com os agentes indutores nas mesmas concentrações. O teste foi realizado de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante, resumido a seguir: primeiramente, foi realizado o teste de resistência na placa específica para utilização no aparelho (placa de 96 poços contendo uma base de eletrodos em ouro necessários para medir a impedância de cada poço) com 50 μL de DMEM suplementado com 10% de SBF. Após o teste, um total de 6×10^3 células/poço foi semeado em um volume final de 100 μL por poço, onde

permaneceram para estabilização por 24h na RTCA *Station* armazenada em estufa a 37°C - 5%CO₂. Após o período de estabilização, as células foram tratadas aleatoriamente com os agentes indutores de dano associados e não associados ao AF em um volume final de 200 µL por poço. A placa permaneceu na RTCA *Station* por um período de 96h e a proliferação celular foi acompanhada em tempo real através do gráfico gerado automaticamente pelo RTCA *software*. Foram realizadas 3 avaliações.

2.5 PCR EM TEMPO REAL – QPCR

Para a extração de RNA, foram cultivados oito frascos de 25 cm² com 4x10⁴ células por frasco em um volume de 5 mL de meio de cultura. Após 24h de estabilização, cada frasco recebeu 5 mL dos seguintes tratamentos: frasco 1: controle (sem tratamento); frasco 2: AF; frasco 3: doxorrubicina; frasco 4: doxorrubicina+AF; frasco 5: camptotecina; frasco 6: camptotecina+AF; frasco 7: metil metanossulfonato; frasco 8: metil metanossulfonato+AF. Após 24h de tratamento, o meio de cultura foi descartado e o RNA total das células extraído com kit de extração RNeasy® Mini Kit Qiagen (Cat. nº 74106) de acordo com instruções do fabricante. Foram realizados três experimentos.

Brevemente, foi adicionado 1 mL de Trizol (Invitrogen®) diretamente nos frascos, o conteúdo dos frascos foi transferido para tubos que foram agitados para lise das células. Após 5 minutos, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, seguido de rigorosa agitação dos tubos para a separação do conteúdo em duas fases. Após 5 minutos, os tubos foram centrifugados por 20 minutos (12 rpm) em centrífuga refrigerada a 4° C, dos quais 400 µL da fase superior foram retirados e adicionados em novos tubos contendo 400 µL de etanol 70% previamente preparado com água DEPC. O conteúdo dos tubos foi rapidamente filtrado por um pulso de centrifugação (*spin*) nos coletores fornecidos pelo kit, o conteúdo filtrado foi descartado e então foram adicionados 700 µL do tampão RW1 do kit. O processo de filtragem foi repetido, o conteúdo filtrado foi descartado e 500 µL do tampão RE (kit) foram adicionados (etapa realizada duas vezes). Os tubos foram centrifugados por 2 minutos para secagem das colunas, as quais foram transferidas para novos tubos onde foram adicionados 50 µL de água DEPC pré-aquecida a 60° C. Os tubos foram centrifugados (1 minuto – 12 rpm) para lavagem das colunas coletoras, que

posteriormente foram retiradas, permanecendo no tubo apenas o conteúdo de RNA extraído. As amostras não utilizadas de imediato foram armazenadas a -80°C . Para a quantificação e integridade do RNA extraído, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro e sua integridade verificada em gel de agarose 0,8%.

A síntese de cDNA foi realizada em termociclador T100TM Thermal Cycler BIO-RAD com 1000 ng de RNA, oligo(dT) e com enzima transcriptase reversa (M-MLV – Invitrogen®, Life Technologies).

Para as reações de qPCR, em um volume final de 10 μL , foram utilizados 8 pmol de cada par de oligonucleotídeos, 250 ng do cDNA de cada amostra, o composto fluorescente Plantion SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen®) e água. As reações foram realizadas nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos e 40 ciclos de $95^{\circ}\text{C}/20$ segundos, $60^{\circ}\text{C}/30$ segundos, $72^{\circ}\text{C}/20$ segundos no aparelho CFX96TM Real-Time System BIO-RAD®. A análise da curva de *melting* foi realizada no final de cada reação com temperatura de 50°C a 90°C a cada 0,5 graus por 20 segundos.

Os genes analisados foram *FOLR1*, *SLC19A1*, *SLC46A1* (que codificam os receptores de folato FR α , RFC e PCFT, respectivamente), *GADD45A*, *DDIT3*, *BIRC5*, *CCNA2*, *TP53* (relacionados à sinalização de danos ao DNA e ciclo celular), *BAK*, *BAX*, *BCL-2*, *BCL-XL*, *CASP7*, *CASP8* e *CASP9* (envolvidos nas vias apoptóticas).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

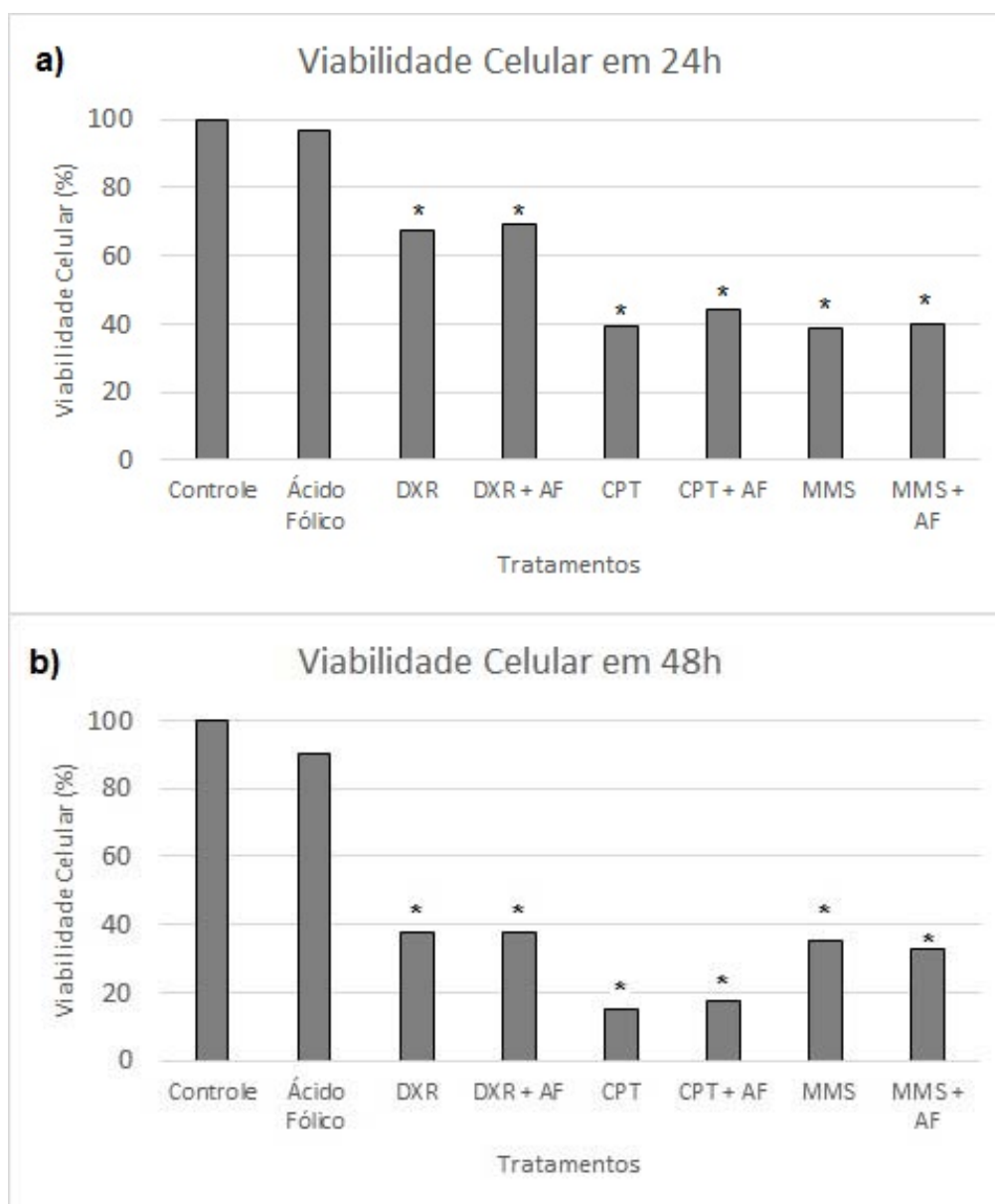
Os valores de absorbância obtidos no Ensaio do MTT e os Índices Celulares obtidos no RTCA foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguida do Teste de Tukey ($p < 0,001$) pelo programa *GraphPad Prism*® 5. Já os níveis de expressão gênica obtidos pela PCR em Tempo Real foram determinados pelo método de Pfaffl *et al.* (2002) e análise estatística realizada pelo programa REST® 2009 version 1 (*Relative Expression Software Tool*//Qiagen®), com razão maior ou igual a 2 e $p < 0,05$, comparando cada tratamento com o seu respectivo controle.

3 RESULTADOS

3.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE - MTT

Os valores médios das absorbâncias obtidas em 24h e 48h de tratamento foram convertidos em porcentagens de viabilidade celular e estão apresentados a seguir:

Gráfico 1 – Viabilidade celular obtida no Ensaio do MTT após a) 24h de tratamento e b) 48h de tratamento. AF: ácido fólico; DXR: doxorrubicina; CPT: camptotecina MMS: metil metanosulfonato. *Valores significativamente diferentes em relação ao controle negativo ($p < 0,001$).



Em 24h, os dados indicaram uma pequena diferença da viabilidade celular entre o controle negativo e o tratamento apenas com AF, de 100% para 96,77%, porém essa diminuição não foi significativa. A viabilidade das células tratadas com os indutores doxorrubicina, camptotecina e metil metanossulfonato (67,1%, 39,25% e 38,9%, respectivamente), diminuiu significativamente, bem como na associação ao ácido fólico (69,45%, 44,38% e 40,12%, respectivamente) quando comparadas ao controle negativo e ao tratamento com AF. A diferença da viabilidade celular observado nas células dos tratamentos associados não foi significativa quando comparado ao seu respectivo indutor não associado.

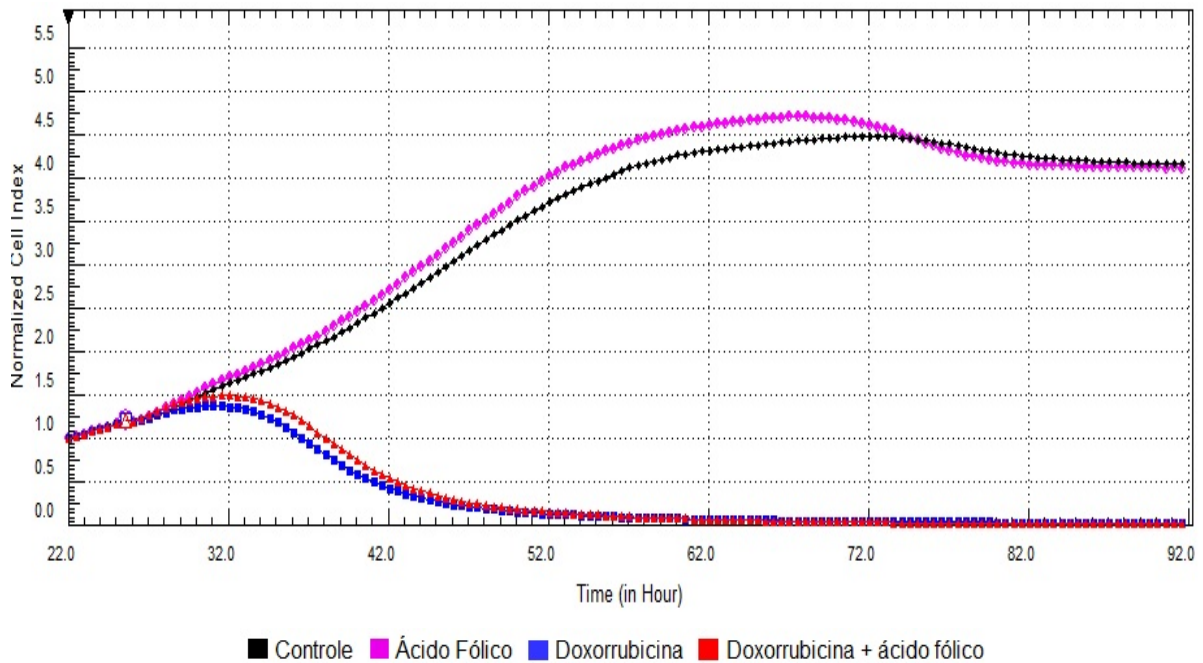
Em 48h os dados indicaram uma diferença mais acentuada, porém não significativa, da viabilidade celular entre o controle e o tratamento apenas com AF, de 100% para 90,31%. A viabilidade das células tratadas com os indutores doxorrubicina, camptotecina e metil metanossulfonato (37,52%, 14,86% e 35,37%, respectivamente) diminuiu significativamente, bem como na associação ao ácido fólico (37,45%, 16,28% e 32,75%, respectivamente) quando comparadas ao controle negativo e ao tratamento com ácido fólico. A diferença da viabilidade observada nas células dos tratamentos associados não foi significativa quando comparada ao seu respectivo indutor não associado.

3.2 ANÁLISE CELULAR EM TEMPO REAL – RTCA

Os Índices Celulares obtidos no ensaio estão apresentados nos gráficos 2, 3 e 4. As primeiras 24h do gráfico correspondem ao período de estabilização das células, no qual não há a ação de nenhum tratamento. Após esse tempo, o tratamento foi adicionado e os gráficos então normalizados para a observação do efeito dos indutores.

O gráfico 2 apresenta a cinética de proliferação obtida do tratamento com doxorrubicina e doxorrubicina + AF:

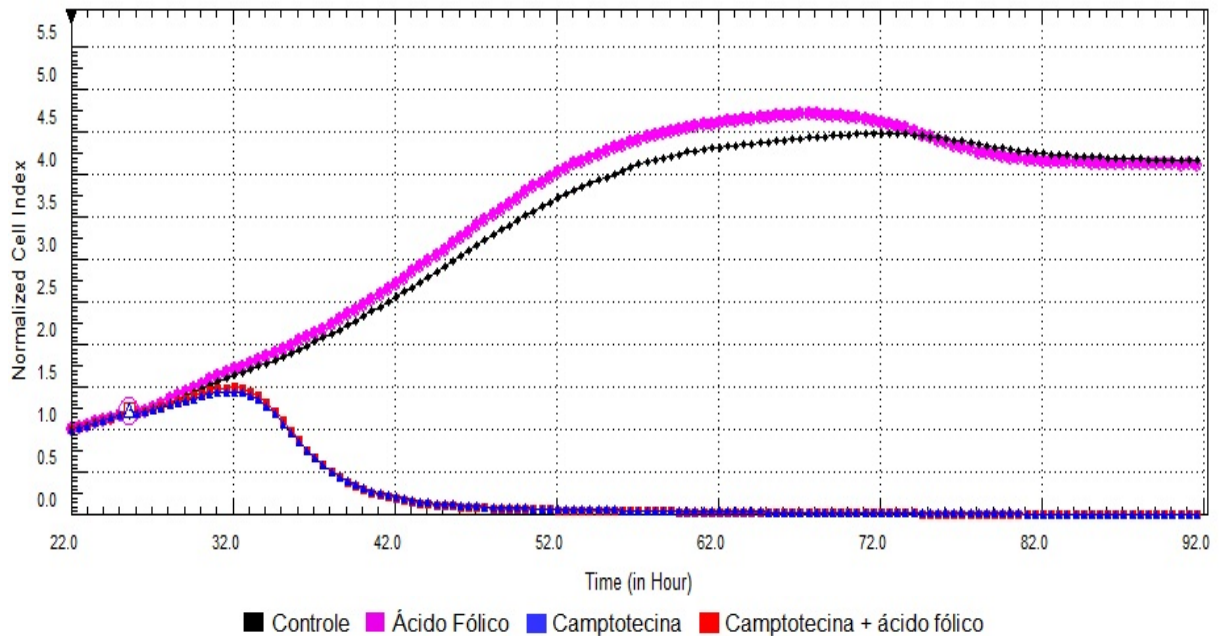
Gráfico 2 – Proliferação celular de células MCF-7 analisada por *Real Time Cell Analyzer* em tratamento com doxorrubicina (2 μ M), ácido fólico (450 μ M) e doxorrubicina associada ao ácido fólico por 96h. O ponto no gráfico refere-se à normalização dos dados em 24h e indica o início dos tratamentos.



A curva indicando o tratamento apenas com AF não apresentou diferença significativa na proliferação celular quando comparada ao controle negativo. O tratamento de AF associado à doxorrubicina demonstrou tendência de aumento da proliferação no início do tratamento, porém essa diferença não foi significativa em relação ao tratamento apenas com doxorrubicina. Em aproximadamente 24h, a curva do tratamento associado igualou-se à doxorrubicina e ambas indicam morte celular após cerca de 46h de tratamento (CI médio em 46h de tratamento = DXR: 0,111 \pm DP; DXR+AF: 0,128 \pm DP).

O gráfico 3 indica os resultados obtidos pelo tratamento campotecina e camptotecina + AF

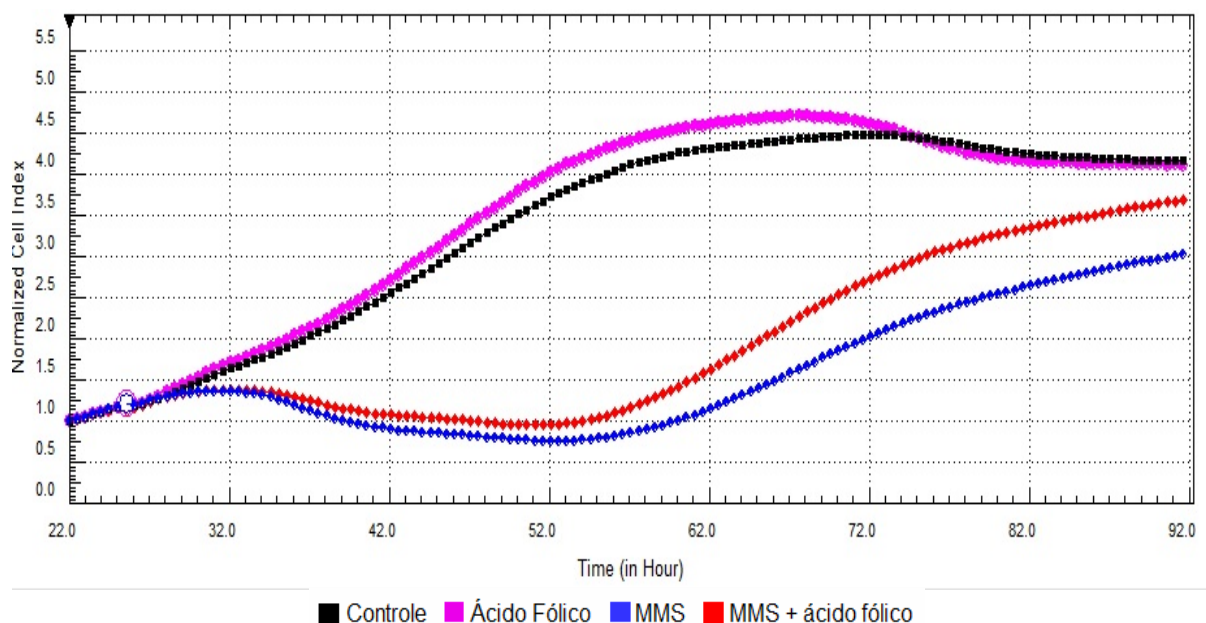
Gráfico 3 – Proliferação celular de células MCF-7 analisada por *Real Time Cell Analyzer* em tratamento com camptotecina (3 μ M), ácido fólico (450 μ M) e camptotecina associada ao ácido fólico por 96h. O ponto no gráfico refere-se à normalização dos dados em 24h e indica o início dos tratamentos.



Os resultados dos tratamentos com camptotecina foram semelhantes aos do tratamento com doxorrubicina, porém a associação com AF não demonstrou tendência no aumento da proliferação e a morte celular nos tratamentos com CPT e CPT+AF ocorreu em um período anterior ao do tratamento com doxorrubicina, aproximadamente 32h após o início dos tratamentos (CI médio em 32h de tratamento = CPT: $0.153 \pm DP$; CPT+AF: $0.126 \pm DP$).

O gráfico 4 demonstra as curvas de proliferação obtidas pelo tratamento com metil metanossulfonato isoladamente e em associação ao ácido fólico:

Gráfico 4 – Proliferação de células MCF-7 analisada por *Real Time Cell Analyzer* em tratamento com metil metanossulfonato (450 μ M), ácido fólico (450 μ M) e metil metanossulfonato associado ao ácido fólico por 96h. O ponto no gráfico refere-se à normalização dos dados em 24h e indica o início dos tratamentos.



Nesse tratamento, nota-se que houve um decréscimo menos acentuado na proliferação celular, seguido de um período de aparente interrupção da proliferação celular (em aproximadamente 18h de tratamento) e posterior retomada da proliferação em aproximadamente 32h de tratamento. A proliferação celular aumentou de forma acentuada após esse período, porém sem diferenças estatisticamente significativas entre o tratamento com MMS isoladamente e em associação ao AF.

3.3 EXPRESSÃO GÊNICA

O tratamento das células por 24h apenas com ácido fólico não alterou a expressão de nenhum dos genes de forma significativa. Os gráficos 5 e 6 demonstram os valores médios da expressão do tratamento com AF em relação ao controle negativo:

Gráfico 5 – Expressão gênica em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com ácido fólico comparada ao controle negativo. Não houve alteração significativa na expressão de nenhum dos genes ($p \leq 0,05$ e razão ≥ 2).

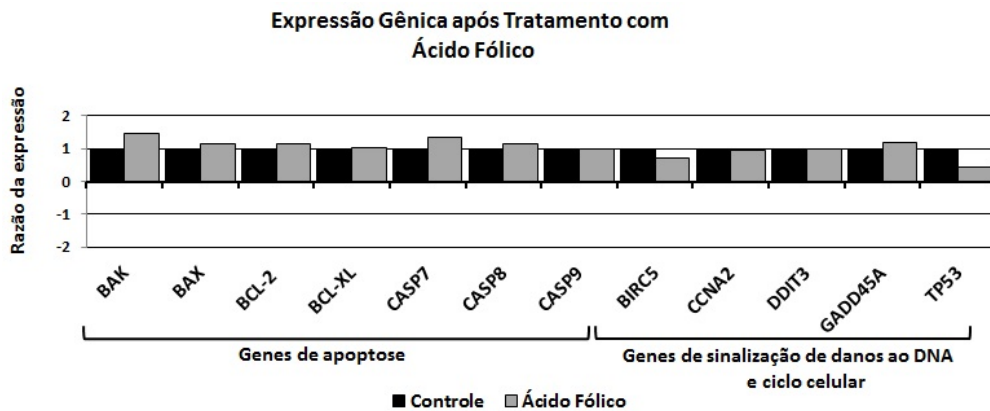
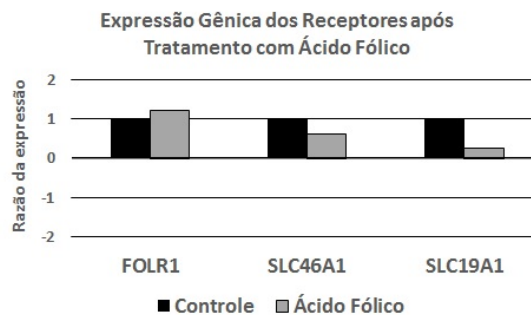


Gráfico 6 – Expressão gênica dos receptores de folato em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com ácido fólico comparada ao controle negativo. Não houve alteração significativa na expressão de nenhum dos genes ($p \leq 0,05$ e razão ≥ 2).



Em relação ao tratamento apenas com doxorrubicina, há diminuição da expressão dos genes apoptóticos *BCL-2* (~3x), *BCL-XL* (~5.8x), *CASP8* (~6x), *CASP9* (~4x) e dos genes *BIRC5* (~7.7x), e *CCNA2* (~20x), relacionados ao ciclo celular e sinalização de danos ao DNA. Não houve alteração na expressão de *BAK*, *BAX*, *CASP7*, *DDIT3*, *GADD45A*, *TP53* e nenhum dos receptores.

Quando a associação do AF com doxorrubicina é analisada utilizando o indutor como controle, obteve-se aumento da expressão dos genes apoptóticos *BAX* (~2x), *BCL-XL* (~5x), *CASP8* (~8x) e diminuição do gene de sinalização de danos e ciclo celular *BIRC5* (~5.8x). Não houve diferenças em *BAK*, *BCL2*, *CASP7*, *CASP9*, *CCNA2*, *DDIT3*, *GADD4A*, *TP53* e em nenhum dos receptores.

Gráfico 7 – Expressão gênica em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com doxorubicina comparada ao controle negativo. * = resultados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$ e razão ≥ 2).

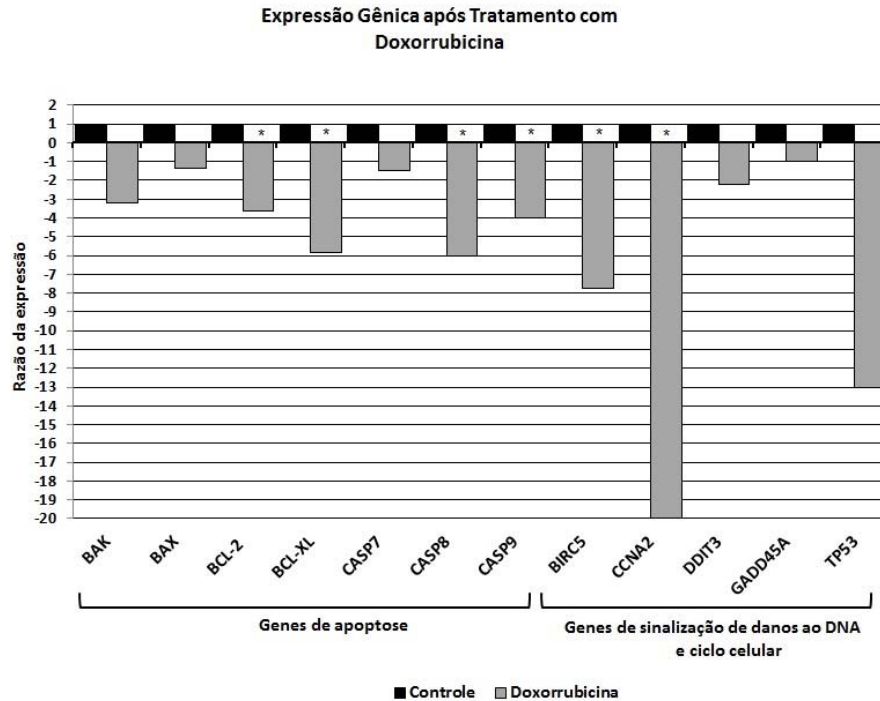


Gráfico 8 – Expressão gênica em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com doxorubicina associada ao ácido fólico comparada ao tratamento apenas com doxorubicina. * = resultados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$ e razão ≥ 2).

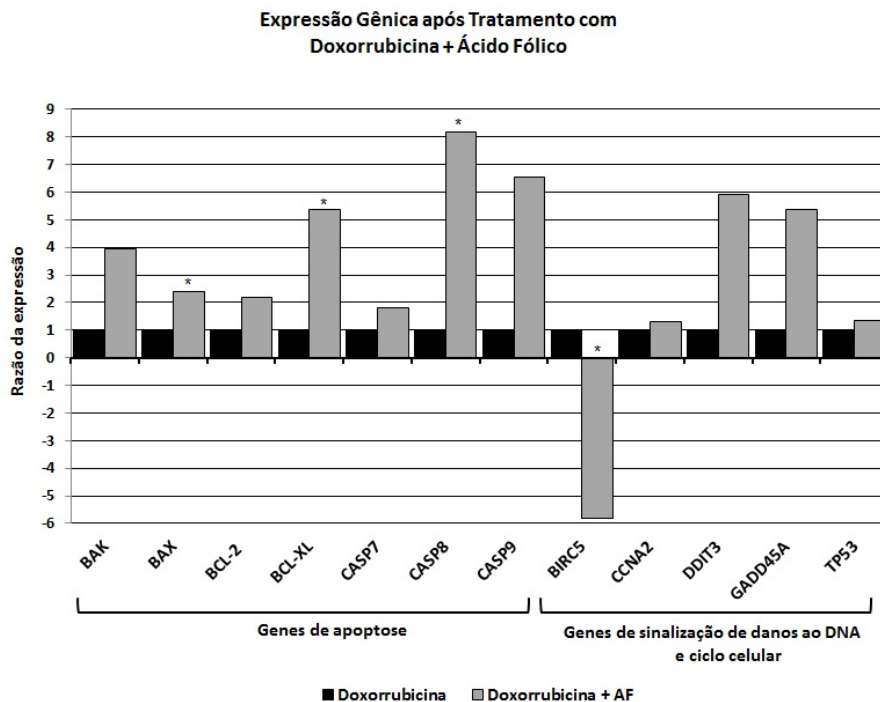


Gráfico 9 – Expressão gênica dos receptores de folato em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com doxorubicina comparada ao controle negativo. Não houve alteração significativa na expressão de nenhum dos receptores ($p \leq 0,05$ e razão ≥ 2).

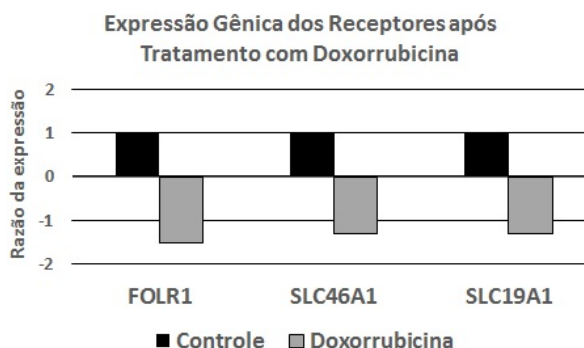
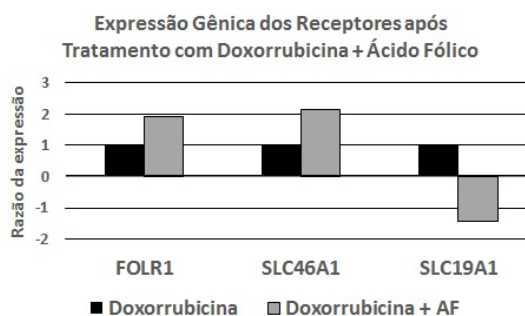


Gráfico 10 – Expressão gênica dos receptores de folato em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com doxorubicina associada ao ácido fólico comparada ao tratamento apenas com doxorubicina. Não houve alteração significativa na expressão de nenhum dos receptores ($p \leq 0,05$ e razão ≥ 2).



Os gráficos a seguir demonstram a expressão gênica das células tratadas com camptotecina isoladamente (gráficos 11 e 13) e em associação ao AF (gráficos 12 e 14). No tratamento apenas com camptotecina, há diminuição dos genes apoptóticos *BAK* (~11x), *BAX* (~2.3x), *BCL2* (~9x), *BCL-XL* (~11x), *CASP7* (~2.6x), *CASP8* (~10x), *CASP9* (~6x) e dos genes de sinalização de danos e ciclo celular *BIRC5* (~2x) e *CCNA2* (~50x). Não houve alteração na expressão de *DDIT3*, *GADD45A*, *TP53* e em nenhum dos receptores.

Quando a associação do AF com camptotecina é analisada utilizando o indutor como controle, obteve-se aumento da expressão dos genes apoptóticos *BAK* (~5x), *BCL-XL* (~10x), *CASP7* (~5x), *CASP8* (~17,6x), *CASP9* (~7,8x) e do gene de sinalização de danos e ciclo celular *DDIT3* (~10x); *BIRC5*, também relacionado ao ciclo celular, teve sua expressão diminuída (~9.6x). Não

houve alteração na expressão de *BAX*, *BCL-2*, *CCNA2*, *GADD45A*, *TP53* e em nenhum dos receptores.

Gráfico 11 – Expressão gênica em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com camptotecina comparada ao controle negativo. * = resultados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$ e razão ≥ 2).

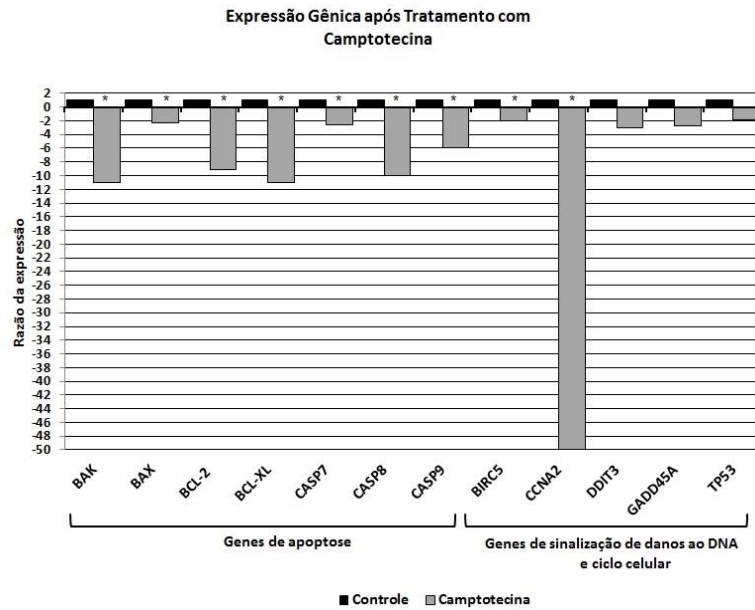


Gráfico 12 – Expressão gênica em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com camptotecina associada ao ácido fólico comparada ao tratamento apenas com camptotecina. * = resultados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$ e razão ≥ 2).

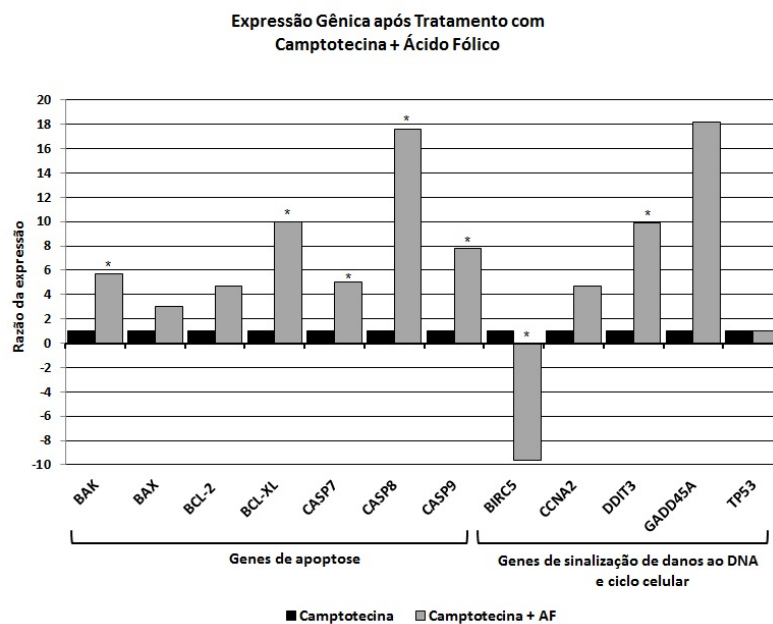


Gráfico 13 – Expressão gênica dos receptores de folato em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com camptotecina comparada ao controle negativo. Não houve alteração significativa na expressão de nenhum dos receptores ($p \leq 0,05$ e razão ≥ 2).

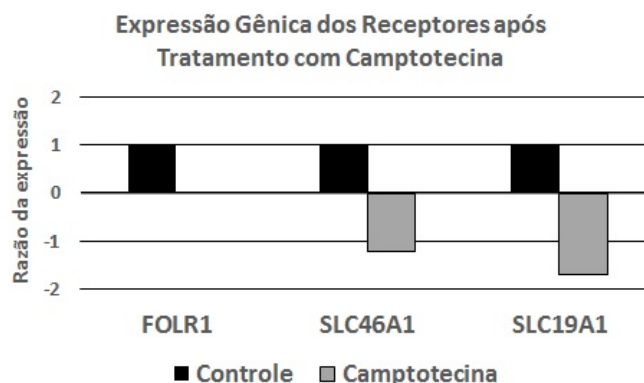
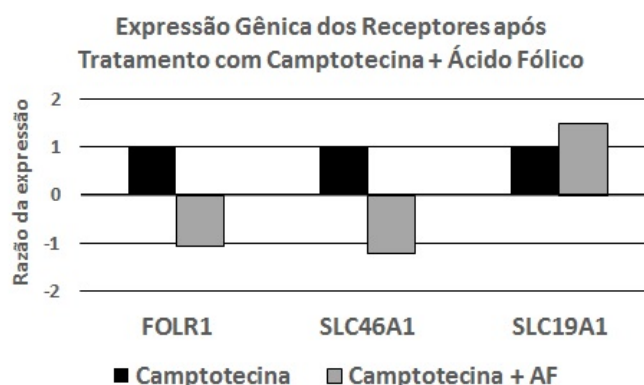


Gráfico 14 – Expressão gênica dos receptores de folato em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com camptotecina associada ao ácido fólico comparada ao tratamento apenas com camptotecina. Não houve alteração significativa na expressão de nenhum dos receptores ($p \leq 0,05$ e razão ≥ 2).



Os gráficos a seguir demonstram a expressão gênica das células tratadas com metil metanossulfonato isoladamente (gráficos 15 e 17) e em associação ao AF (gráficos 16 e 18).

No tratamento apenas com metil metanossulfonato, há aumento na expressão do gene apoptótico *BAK* (~2x) e de sinalização de danos *GADD5A* (~4x) e diminuição dos genes de ciclo celular *BIRC5* (~25x) e *CCNA2* (~23x). Não houve alteração em *BAX*, *BCL-2*, *BCL-XL*, *CASP7*, *CASP9*, *CASP9*, *DDIT3*, *TP53* e em nenhum dos receptores. Quando a associação do AF com metil metanossulfonato é analisada utilizando o indutor como controle, obteve-se aumento do gene relacionado ao ciclo celular *BIRC5* (~11x) e diminuição de *TP53* (~2.4x), gene

regulador de ciclo celular e de sinalização de danos até então não alterado no tratamento apenas com MMS. Não houve alteração em *BAK*, *BAX*, *BCL-2*, *BCL-XL*, *CASP7*, *CASP9*, *CASP9*, *CCNA2*, *DDIT3*, *GADD45A* e em nenhum dos receptores.

Gráfico 15 – Expressão gênica em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com metil metanossulfonato comparada ao controle negativo. *= resultados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$ e razão ≥ 2).

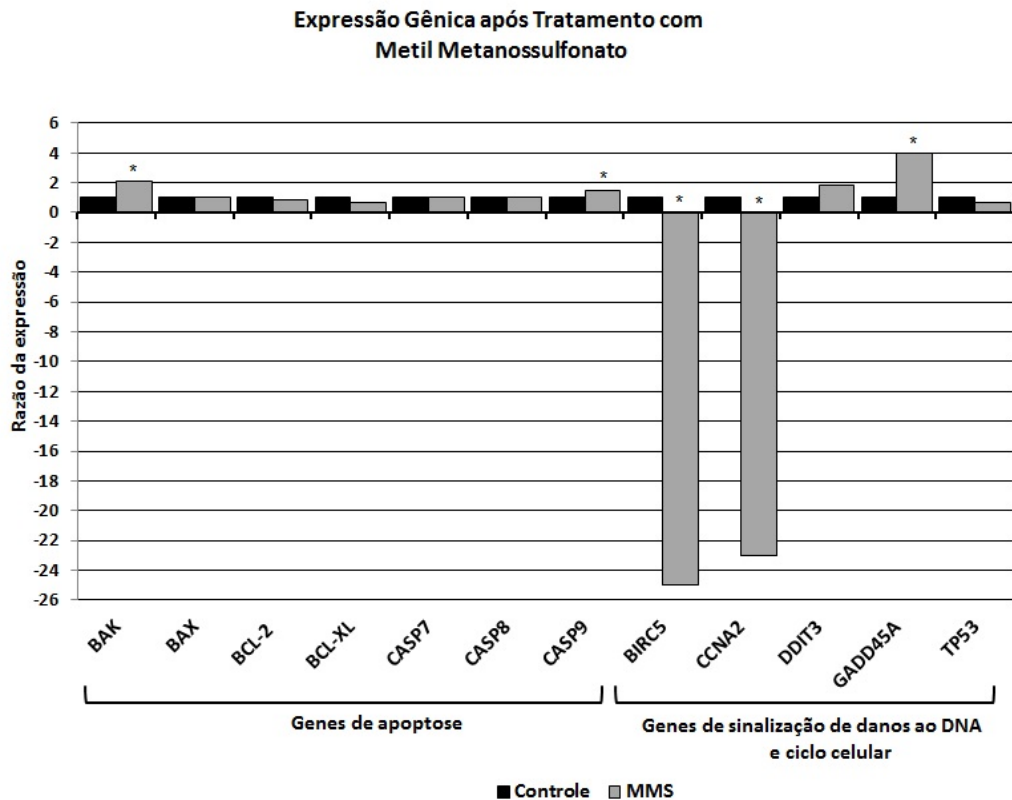


Gráfico 16 – Expressão gênica em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com metil metanossulfonato associado ao ácido fólico comparada ao tratamento apenas com metil metanossulfonato. * = resultados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$ e razão ≥ 2).

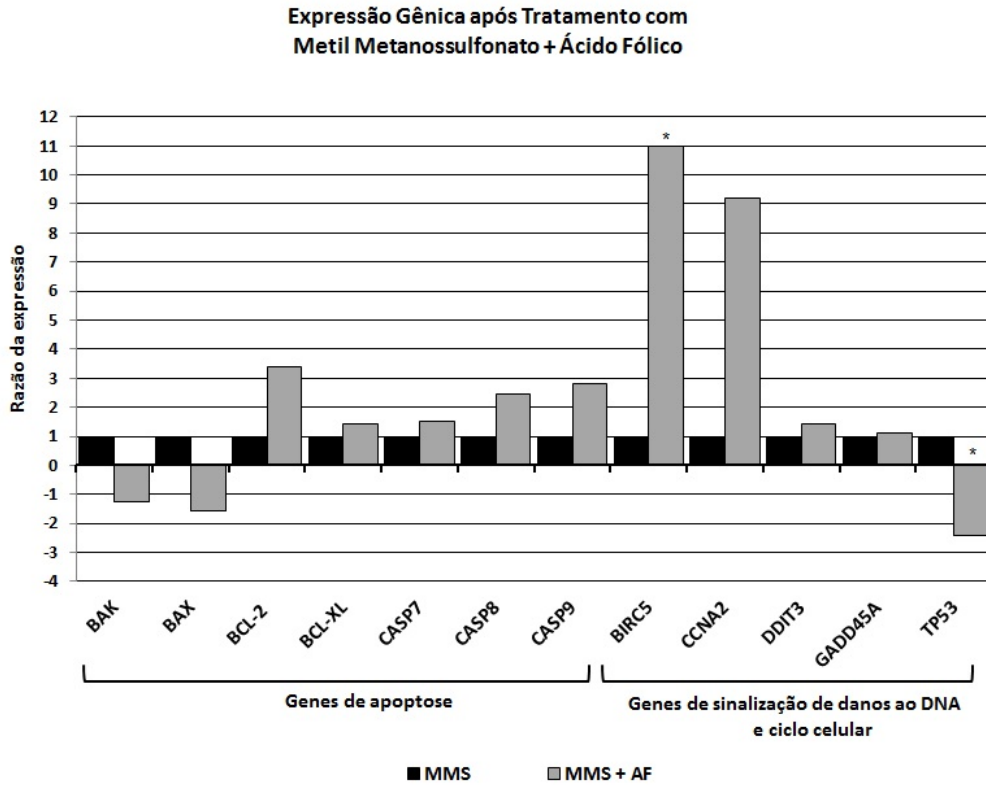


Gráfico 17 – Expressão gênica dos receptores de folato em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com metil metanossulfonato comparada ao controle negativo. Não houve alteração significativa na expressão de nenhum dos receptores ($p \leq 0,05$ e razão ≥ 2).

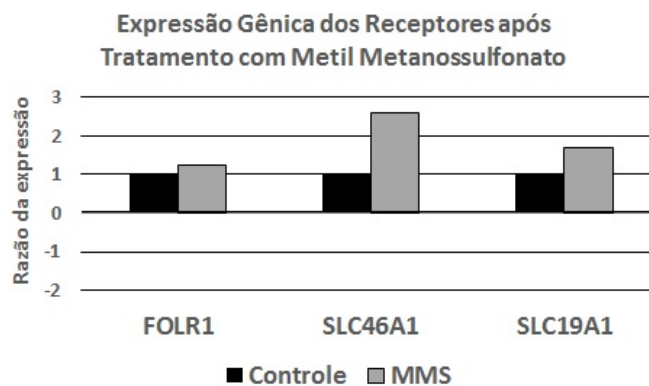
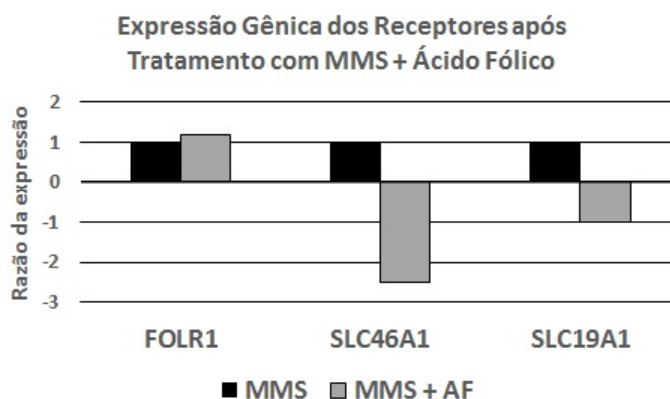


Gráfico 18 – Expressão gênica dos receptores de folato em células MCF-7 após 24 horas de tratamento com metil metanossulfonato associado ao ácido fólico comparada ao tratamento apenas com metil metanossulfonato. Não houve alteração significativa na expressão de nenhum dos receptores ($p \leq 0,05$ e razão ≥ 2).



4 DISCUSSÃO

Quando o ácido fólico foi inicialmente implementado na prática clínica, há quase 70 anos, os pesquisadores detinham quase nenhum conhecimento acerca da biodisponibilidade, concentração nos alimentos e dos reais efeitos de altas doses e *turnover* da vitamina, utilizando-a de uma forma totalmente empírica (BUTTERWORTH JR; TAMURA, 1989). Atualmente, ainda existem poucos estudos relacionados à toxicidade da suplementação com altas doses de AF. Dessa forma, o presente estudo utilizou uma concentração de AF 50x mais elevada que a contida originalmente no meio de cultura para avaliar os efeitos dessa dosagem na citotoxicidade, proliferação celular e expressão gênica de células MCF-7. As vitaminas são componentes adicionados ao meio de cultura com o intuito de aprimorar processos biossintéticos e metabólicos da célula, de forma a assimilar-se às atividades celulares que ocorrem através do fornecimento de fontes dietéticas (BETTGER; HAM, 1982).

Os resultados do Ensaio do MTT revelaram que o ácido fólico não apresentou efeito tóxico para a célula e nem influenciou na atividade dos indutores utilizados, ou seja, não evitou e nem potencializou a ação dos tratamentos, visto que não houve nenhuma diferença significativa entre o controle e os tratamentos nas condições testadas. A mesma concentração de AF foi utilizada para teste de

citotoxicidade em células embrionárias de fibroblasto de rato por Ruan e colaboradores (2000) e também não houve efeito citotóxico.

Ainda em relação ao Ensaio do MTT, na associação do AF aos agentes indutores, observou-se que a suplementação de AF não alterou o efeito citotóxico causado pelos agentes doxorubicina, camptotecina e metil metanossulfonato nas concentrações utilizadas, visto que a viabilidade celular entre os tratamentos e suas respectivas associações não revelou diferenças significativas. Esse resultado é semelhante a um relato anterior onde o potencial citotóxico da daunorubicina (droga que possui ação intercalante no material genético capaz de induzir variados danos ao DNA) e o efeito protetor do ácido fólico foram avaliados *in vitro* na linhagem tumoral MCF-7 pelo ensaio da sulforrodamina B. Três concentrações de ácido fólico foram testadas (5, 10 e 20 µg/mL), porém nenhum efeito protetor foi estatisticamente associado à essa vitamina nas condições testadas (ALY; DONYA; ABO-ZEID, 2009).

Ruan e colaboradores (2000) cultivaram células embrionárias de rato (SWV/Fnn) em meio DMEM suplementado com várias concentrações de AF (de 9 µM a 270 µM) durante tratamento com arsenito sódico e ácido dimetilarsínico, concluindo que o AF demonstrou atividade protetora de maneira dose-dependente contra os efeitos citotóxicos provocadas por esses agentes. Porém, o AF não foi capaz de evitar a redução da viabilidade celular nos tratamentos nas concentrações mais elevadas dos compostos. Em nossos experimentos, a forte ação citotóxica obtida nos tratamentos com as concentrações dos agentes químicos utilizadas pode ter determinado a ineficiência protetora do tratamento com AF, não permitindo que danos celulares severos sejam recuperados.

Em contraste, estudos *in vivo* demonstram atividades protetoras do AF contra a citotoxicidade induzida por vários agentes. Branda *et al.* (1998) demonstraram que o status de AF na dieta de ratos tratados com diferentes quimioterápicos influencia na toxicidade e eficácia da resposta ao agente químico. Quando tratados com o agente alquilante ciclofosfamida, ratos com maior concentração de folatos na dieta tiveram menor taxa de crescimento tumoral e menos toxicidade ao quimioterápico quando comparados a ratos com dieta deficiente em folato. Do mesmo modo, grupos suplementados tratados com doxorubicina e 5-fluorouracil, demonstraram menor taxa de crescimento tumoral,

porém uma redução significativa na toxicidade induzida pelo quimioterápico só foi observado nos ratos tratados com 5-fluorouracil.

Juntamente com outras vitaminas, o ácido fólico também demonstrou diminuição nos efeitos mutagênicos *in vivo* da droga anticâncer ifosfamida, um agente alquilante que destrói células tumorais pela indução de apoptose, modulação do ciclo celular e outros efeitos antiproliferativos (DONYA; ALY; ABO-ZEID, 2009).

Essas observações indicam que os efeitos citoprotetores da suplementação de ácido fólico, além de serem dose-dependentes, variam conforme o tipo celular, o indutor de dano e o modelo experimental utilizado.

A proliferação celular analisada pelo RTCA demonstrou que o ácido fólico não provoca efeito citostático (interrupção do ciclo celular) nas células tratadas com a doxorrubicina e camptotecina, sendo que a proliferação celular nesses tratamentos diminuiu. Esse resultado pode ser explicado pelo fato do AF não ser capaz de proteger os danos ao DNA provocados por esses agentes e, conseqüentemente, não impedir o processo de morte celular. O mecanismo de ação dessas drogas é semelhante e está baseado na ação das enzimas topoisomerases (I e II), que são componentes essenciais para diversas reações metabólicas, estruturação do material genético e sobrevivência das células. Essas enzimas atuam desenovelando o material genético durante a replicação através de cortes transitórios no DNA e posterior religação (BURDEN; OSHEROFF. 1998). A doxorrubicina atua sobre a topoisomerase II explorando sua função biológica de realizar quebras de fita dupla no DNA: a droga aumenta os níveis da enzima com conseqüente elevação das quebras no material genético (BURDEN; OSHEROFF. 1998). A camptotecina é uma classe de inibidores da topoisomerase I que atua impedindo a ação da enzima no relaxamento e religação do DNA durante a replicação, provocando então quebras de fita simples na molécula (POMMIER *et al.*, 1998).

Em relação à associação ao MMS no RTCA, o AF provocou parada do ciclo celular e posterior retomada de proliferação após aproximadamente 32h de tratamento. Uma hipótese para a retomada da proliferação celular observada pode ser baseada no mecanismo de ação do MMS que, ao introduzir quebras na molécula de DNA, promove parada do ciclo celular na fase S e, ao mesmo tempo, estimula o aumento da expressão de enzimas de reparo. Após reversão dos danos, há a

retomada do ciclo celular (SCHWARTZ; KMIEC, 2005). Um estudo anterior realizado em células DLD-1 (carcinoma colorretal humano) revelou que determinada concentração de MMS (nesse caso, 150 μM) é capaz de induzir danos ao DNA sem alterar a viabilidade das células, que atingem estimulação máxima de enzimas de reparo nessa concentração. Além disso, uma maior concentração de MMS (225 μM) também foi capaz de estimular essas enzimas, apesar do Ensaio do MTT ter demonstrado alta citotoxicidade nessa concentração (SCHWARTZ; KMIEC, 2005).

A concentração de 450 μM utilizada em nosso estudo pode não ter sido suficiente para alterar a viabilidade das células que, após a perda do efeito do metil metanossulfonato em solução, deram continuidade ao seu ciclo.

A literatura mostra que a ação do AF na proliferação celular, assim como no seu papel antimutagênico, pode variar dependendo da dose de vitamina e da linhagem celular utilizada. Com o intuito de avaliar o efeito de diferentes doses de suplementação de AF na proliferação e invasividade de 3 linhagens de carcinoma de próstata humano (LNCaP, PC-3 e DU145), Petersen e colaboradores (2012) cultivaram as células em meio RPMI livre de AF e posteriormente as semearam em placas de 6 poços com suplementação de AF em diferentes concentrações (4 nM, 20 nM e 100 nM). Após 3, 6 e 9 dias, as células foram coradas com azul de Trypan e contadas para obter a viabilidade celular. Os pesquisadores observaram que a proliferação da linhagem DU145 não foi afetada pela suplementação de AF, mas as outras duas linhagens tiveram aumento da proliferação de maneira dose-dependente. A proliferação de linhagens de carcinoma de células escamosas orais humanas (CAL27 e SCC25) também aumentou de maneira dose-dependente em estudo realizado por McCabe e colaboradores (2010). Esse efeito não foi observado em células controle normais HGF-1. Um aumento da proliferação celular também foi observado em culturas de células tronco neurais de roedores cultivadas em meio IMDM contendo 11x mais AF que o meio padrão (LIU *et al.*, 2010). Para avaliar o papel das vitaminas hidrossolúveis do complexo B normalmente encontradas nos meios de cultura, Ishaque e Al-Rubeai (2002) realizaram a cultura de células de hibridoma em diferentes combinações de meio de cultura deficientes em uma ou mais dessas vitaminas. Especificamente em relação ao meio livre de AF, os pesquisadores surpreenderam-se ao concluir que o crescimento celular não foi afetado e a densidade celular máxima foi atingida, sugerindo que o requerimento de

folato para o crescimento dessas células seja suprido exclusivamente por fontes endógenas.

Devido à sua natureza hidrofílica, a absorção dos folatos é realizada através de transportadores e receptores específicos. A principal via de fornecimento de folatos é através dos carreadores de folato reduzido (RFC), que os transportam de maneira bidirecional para o interior da célula. São proteínas de baixa afinidade pelos folatos, com atividade ótima em pH 7.4, presentes na membrana celular principalmente do intestino, fígado e rins. Uma outra categoria de carreadores, os transportadores de folato acoplados a próton (PCFT), foi recentemente descrita como sendo a principal responsável pela absorção e captação dos folatos no intestino. Possuem alta afinidade pelos folatos e sua atividade ótima é encontrada em pH baixo, tanto em tecidos normais (principalmente nos locais de absorção da vitamina), quanto em células malignas de mamíferos, (ZHAO; MATHERLY; GOLDMAN, 2009).

Em pH neutro ou levemente ácido, os receptores de folato (FR) incorporam a vitamina pelo processo de endocitose. Foram descritas três isoformas do receptor (α , β e γ), as quais possuem expressão tecido-específica e diferentes graus de afinidade pelos folatos. O FR α é raramente expresso em tecidos normais, porém é superexpresso em alguns tumores, principalmente de ovário. A isoforma do FR β é expressa na placenta e em células da hematopoiese normal, bem como em células leucêmicas, e a isoforma do FR γ é expressa nas mesmas células que o FR β , exceto na placenta (KELEMEN, 2006).

Em relação ao câncer, a importância de investigar a interação desses receptores com a doença reside principalmente no fato que, ao contrário dos tecidos normais (que utilizam o RFC como principal transportador das formas de folato reduzido no organismo), as células tumorais, como a de mama, por exemplo, fazem uso do FR α como principal rota de entrada de folatos para o meio intracelular. Essa descoberta fez dos receptores de folato um dos principais alvos de estudo para melhores diagnósticos e desenvolvimento de terapias direcionadas contra o câncer nos últimos anos (MEIER *et al.*, 2010). Por exemplo, analisando casos de câncer de mama invasivo em mulheres, Hartmann e colaboradores (2007) concluíram que a superexpressão de FR α está associada a um pior prognóstico da doença.

Em um recente trabalho realizado por Leung e colaboradores (2013), o soro de pacientes diagnosticadas com câncer de ovário foi analisado em relação à

presença da proteína do receptor de folato alfa. Os pesquisadores verificaram uma taxa significativamente elevada da proteína quando comparada ao soro de mulheres saudáveis ou de casos benignos da doença e sugeriram então que o FR α pode ser utilizado como um importante biomarcador para o câncer de ovário.

Alguns autores sugerem que a regulação da expressão dos genes que codificam FR, RFC e PCFT parece estar relacionada ao nível de folato do meio extracelular, de maneira geral, aumentando em situações de deficiência da vitamina como um dos recursos para otimizar sua captação (IFERGAN; ASSARAF, 2008), embora outros pesquisadores tenham demonstrado resultados inversos nessas condições (HAYASHI *et al.*, 2007; TAVARES *et al.*, 2010).

Nesse trabalho, a qPCR foi realizada com o intuito de analisar o *status* da expressão dos genes do receptor de folato alfa (*FOLR1*), carreador de folato reduzido (*SLC19A1*) e do transportador de folato acoplado a próton (*SLC46A1*) na linhagem MCF-7 em estudo. Além disso, o ensaio permitiu verificar possíveis interações da suplementação de AF nos padrões da expressão desses genes, principalmente do FR α , cuja modulação da expressão é especialmente relevante nessa linhagem celular. Os resultados indicaram que a suplementação das culturas com 450 μ M de AF por 24h não alterou a expressão desses genes e os tratamentos com os agentes químicos isoladamente, ou associados ao AF, também não revelaram alterações significativas.

Esse resultado está de acordo com o trabalho de Zhu, Alliegro e Melera (2001) que também não relacionou alterações diretas no *status* de AF no meio extracelular com os níveis de expressão de mRNA desses genes. Os pesquisadores utilizaram culturas de fibroblastos pulmonares de hamster chinês e verificaram que flutuações no *status* de AF não modificaram os níveis de mRNA do FR α , porém as proteínas foram sensíveis de maneira inversamente proporcional às diferentes concentrações de AF do meio. Os autores então sugerem que a concentração de AF em cultura atua em um nível de tradução, e não transcricional.

Em relação aos genes do RFC e PCFT, a suplementação da vitamina mostrou resultados diferentes em outras linhagens celulares. Células intestinais (CACO-2) e epiteliais do rim (HK-2) cultivadas em meio contendo 100 μ M de AF tiveram sua capacidade de absorção reduzida associada a uma diminuição dos níveis de expressão do mRNA (ASHOKKUMAR *et al.*, 2007). Resultado semelhante também foi verificado *in vivo* (DEV; WANI; KAUR, 2011).

Quando algum agente danifica o DNA da célula, essa por sua vez ativa diversos mecanismos de resposta na tentativa de proteger-se contra os efeitos danosos da lesão. Tais mecanismos envolvem principalmente a interrupção do ciclo celular, reparo do DNA e também a ativação da apoptose (BRUINS *et al.*, 2007). Para avaliar os possíveis mecanismos de ação do AF em relação às respostas celulares contra os danos causados pela doxorubicina, camptotecina e metil metanossulfonato, a expressão de genes relacionados ao ciclo celular, sinalização de danos ao DNA e apoptose também foi analisada. Os nossos resultados da expressão gênica das células MCF-7 tratadas apenas com AF não demonstraram alterações significativas em nenhum dos genes testados quando comparados ao controle.

GADD45A é um dos membros da família *GADD45* que está envolvido nas vias de parada de ciclo celular e sinalização de danos ao DNA. Sua ativação ou superexpressão pode levar à inibição de crescimento e morte celular (ROSEMARY SIAFAKAS; RICHARDSON, 2009).

DDIT3, também conhecido como *GADD153*, pertence à família de fatores de transcrição C/EBP e é ativado por altos níveis de stress do retículo endoplasmático, porém, sua participação não é essencial na morte celular induzida por essa via. *GADD153* forma dímeros com outros membros de sua família e liga-se à locais diferentes do sítio da família C/EBP ativando outros genes-alvo. Um dos genes citados como alvo desse fator de transcrição é o *BCL-2*, cuja expressão é suprimida pelo *GADD153*, promovendo apoptose (KIM *et al.*, 2013).

O gene *CCNA2* codifica a ciclina A2, que juntamente com outras ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs), são as principais classes de proteínas que regulam a progressão do ciclo celular (NURSE, 1994). Essa ciclina é necessária para a replicação do DNA na fase S do ciclo celular (YOSHIZUMI *et al.*, 1997).

BIRC5 codifica a survivina, proteína que faz parte de uma família de membros inibidores da apoptose. Essa proteína é altamente expressa em tecidos tumorais e atua na fase G2/M auxiliando as células tumorais a burlarem o *checkpoint* nessa fase, promovendo proliferação contínua das células. Sua expressão elevada pode inibir diretamente a ação das caspases efetoras 3 e 7 (TAMM *et al.*, 1998).

Os membros da família *BCL-2* são os controladores da via mitocondrial da apoptose e estão divididos em duas categorias: membros

antiapoptóticos, que incluem *BCL-2*, *BCL-XL*, *BCL-W* e *MCL-1*, e os membros pró-apoptóticos, como o *BAX*, *BAK*, *BAD*, *BID* e *BIM* (YU *et al.*, 2009).

O gene *TP53* codifica uma proteína essencial para a manutenção da estabilidade celular. A via p53 é ativada em condições de stress, como danos ao DNA, parada de ciclo, hipóxia ou hiperproliferação, provocando a interrupção do ciclo, morte ou senescência celular (ESPINOSA; VERDUN; EMERSON, 2003). Esse resultado depende de muitas variáveis, incluindo o status proliferativo da célula, a extensão do dano e a disponibilidade de fatores de crescimento (WAHL; CARR, 2001). Há muitas evidências sugerindo que a resposta do gene *TP53* aos danos celulares é regulada em um nível pós-transcricional, principalmente aumentando a estabilidade da proteína codificada. Dessa forma, mesmo com os níveis de mRNA diminuídos, a função da proteína pode ser mantida ou até mesmo aumentada (NOVAKOVIC *et al.*, 2006).

No tratamento com doxorrubicina, há diminuição de genes antiapoptóticos e *BIRC5* (codifica a survivina, proteína relacionada ao escape à apoptose), além da diminuição acentuada da ciclina, eventos relacionados a parada de ciclo e morte celular. Esse resultado é esperado devido ao mecanismo de ação da droga. Quando o AF foi adicionado, não houve diferença na expressão de *BCL-2* e *CCNA2*. O aumento da caspase iniciadora 8 e do gene pró-apoptótico *BAX* (não alterado no tratamento apenas com doxorrubicina), além da diminuição de *BIRC5* sugerem um potencial reforço do AF na promoção da apoptose provocada pela doxorrubicina, apesar do aumento na expressão de *BCL-XL* observada na associação.

Já o tratamento com camptotecina provocou uma diminuição geral em genes tanto pró quanto antiapoptóticos, bem como em *CCNA2* e *BIRC5*. O efeito esperado pelo tratamento com a droga é semelhante ao da doxorrubicina (apoptose), porém nessa análise não foi possível avaliar de forma objetiva tal efeito na expressão gênica devido ao fato dos genes de ambas as famílias (pró e antiapoptóticas) terem diminuído. É possível que a ação de *BAK*, *BAX* e caspases na indução da apoptose possa ser observada a nível proteico e esses genes estejam em processo de *feedback* negativo. Outros fatores que reforçam essa hipótese são a diminuição acentuada (~50x) de ciclina, indicando a parada de ciclo (evento associado ao processo de morte celular) e a diminuição de *BIRC5* que, como já mencionado, codifica proteína de escape à apoptose.

A associação da camptotecina ao AF demonstrou aumento da expressão de *BAK* e das caspases, bem como de *DDIT3* (relacionado às respostas a danos ao DNA, estresse celular e parada de ciclo), até então não alterado no tratamento apenas com camptotecina. Essas respostas, juntamente com a diminuição de *BIRC5*, revela novamente um potencial antitumoral do AF quando associado a um inibidor da topoisomerase.

Esses resultados acompanham o relato de um possível papel antitumoral da suplementação celular com AF em culturas de células de carcinoma gástrico humano (MKN-45 e MKN-28) por 72h. Os pesquisadores observaram que as culturas tratadas apresentaram índices apoptóticos maiores que as células-controle e concluíram então que o AF pode induzir apoptose nessas linhagens celulares (FANG; XIAO, 1998).

Esse mesmo efeito benéfico foi sugerido para o tratamento do glioblastoma em associação com o agente alquilante temozolamida. Células tratadas com concentrações de 4 e 40 µg/mL de folatos tiveram sua capacidade proliferativa reduzida, bem como apresentaram aumento da apoptose induzida pelo quimioterápico. Os pesquisadores defendem que, entre outros fatores, a suplementação com a vitamina aumenta o estado de metilação de genes envolvidos na proliferação e morte celular, como survivina e *BCL-W*, fazendo com que haja diminuição de sua expressão (HERVOUET *et al.*, 2009).

Esse efeito pode não estar diretamente relacionado ao AF, mas sim aos seu receptor: a alta dosagem da vitamina pode inibir a expressão do FR α alterando sinalizações intracelulares de sobrevivência, evento já citado por outros autores de forma positiva na eliminação de células malignas. Jhaveri e colaboradores (2004) observaram que a ausência do receptor alfa pode provocar parada da proliferação celular em células tumorais de mama e potencializar a ação da doxorubicina contra essas células. Em um outro estudo conduzido em pacientes com câncer de ovário, anticorpos monoclonais contra o FR α foram testados e demonstraram benefícios clínicos, como menor índice de remissão, sem toxicidade evidente (ARMSTRONG *et al.*, 2008).

No tratamento apenas com MMS, o aumento de *BAK* e *GADD45A*, bem como a diminuição de *BIRC5* e *CCNA2*, evidenciam uma sinalização de danos e a resposta celular de parada do ciclo e prevenção do escape á apoptose. Porém, a associação do AF altera negativamente essas respostas podendo mascarar a ação

do MMS, pois o tratamento associado aumentou a expressão de *BIRC5* e diminuiu TP53, importante regulador da estabilidade celular, cuja via é ativada em condições de estresse e danos ao DNA para promover parada de ciclo ou morte celular. Dessa forma, o efeito do tratamento com MMS associado ao AF pode impedir a eliminação das células com danos e promover o avanço tumoral.

É possível que, frente a outros agentes indutores, o AF exerça um papel inverso do observado em associação com a doxorrubicina e camptotecina, inibindo a apoptose. Essa possibilidade pode ser endossada pelo trabalho de Chen e colaboradores (2013) que, ao estudarem a associação do AF isoladamente ou combinado com memantina (medicamento utilizado no tratamento da Doença de Alzheimer) verificaram que o AF foi capaz de proteger em até 60% contra a apoptose causada pelo peptídeo beta-amiloide.

Em um estudo anterior realizado por Huang e colaboradores (2004), os potenciais efeitos antiapoptóticos e antioxidantes do AF foram analisados testando-se várias concentrações da vitamina (de 2 a 1500 $\mu\text{M/L}$) pré-adicionadas à cultura de células de linfoma humano U937 tratadas com o agente pró-apoptótico 7-cetocolesterol por 30h. Os pesquisadores verificaram que apenas concentrações acima de 1000 μM foram capazes de impedir a apoptose ativada pelo agente. Esses resultados indicam que a ação do AF frente à inibição da apoptose também pode ser dose-dependente.

Diante do exposto, pode-se concluir que os estudos direcionados aos efeitos da suplementação de altas doses de ácido fólico apresentados na literatura são variados. Essas divergências nos resultados apresentados podem ser devido ao modelo experimental utilizado, forma de utilização da vitamina, dose e tempo de estudo, bem como diferentes tipos celulares e métodos de análise.

O presente trabalho demonstrou que a suplementação de ácido fólico 450 μM (concentração 50x maior que a originalmente contida no meio de cultura) não apresentou efeitos tóxicos para as células MCF-7. Essa suplementação também demonstrou influência positiva na estimulação de genes pró-apoptóticos e de sinalização de danos ao DNA, sugerindo um papel antitumoral potencializando a apoptose quando associado à doxorrubicina e à camptotecina. Já associado a outros agentes, nesse caso o metil metanossulfonato, o ácido fólico tem potencial ação inibitória da apoptose provocada pelo agente, podendo contribuir então para o avanço tumoral.

Finalmente, os resultados desse trabalho devem ser somados aos demais estudos existentes na literatura para uma melhor compreensão da suplementação de ácido fólico sobre as células. Dessa forma, é importante a contínua investigação no assunto, visto que o ácido fólico é uma vitamina essencial em diversos processos metabólicos do organismo e a desregulação nas vias das quais ele participa pode provocar sérios prejuízos à saúde.

REFERÊNCIAS

ALY, F.A.; DONYA, S.M.; ABO-ZEID, M.A. The protective role of folic acid, vitamin B12 and vitamin C on the mutagenicity of the anticancer drug daunorubicin. **Researcher**, v.1, n.6, pp. 16-26, nov. 2009.

ARMSTRONG, D.K. *et al* Exploratory phase II efficacy study of MORAb-003, a monoclonal antibody against folate receptor , in platinum-sensitive ovarian cancer in first relapse. **J Clin Oncol**, v.26, n.15S, pp.5500, may 2008.

ASHOKKUMAR, B. *et al* Effect of folate oversupplementation on folate uptake by human intestinal and renal epithelial cells. **Am J Clin Nutr**, v.86. n.1, pp.159-166, 2007.

BALUZ, K.; CARMO, M.G.T. do; ROSAS, G. O papel do ácido fólico na prevenção e terapia oncológica: revisão. **Rev Bras Cancerol**, v. 48, n.4, pp.597-607, out./nov./dez. 2002.

BETTGER, W.J.; HAM, R.G. The nutrient requirements of cultured mammalian cells. **Adv Nutr Res**, v.4, pp.249-286, 1982.

BRANDA, R.F. *et al*. Nutritional Folate Status Influences the Efficacy and Toxicity of Chemotherapy in Rats. **Blood**, v.92, n. 7, pp. 2471-2476, oct. 1998

BRUINS, W. *et al* Delayed expression of apoptotic and cell-cycle control genes in carcinogen-exposed bladders of mice lacking p53.S389 phosphorylation **Carcinogenesis** vol.28 no.8 pp.1814–1823, feb 2007

BURDEN, D.A.; OSHEROFF, N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. **Biochim Biophys Acta**, v. 1400, n.1-3, pp. 139-154, oct. 1998

BUTTERWORTH JUNIOR, C.E.; TAMURA, T. Folic acid safety and toxicity: a brief review. **Am J Clin Nutr**. v. 50, n. 2, pp.353-358, aug. 1989.

BUTTERWORTH JUNIOR, C.E. Folate status women´s health pregnancy outcome and cancer. **J Am Coll Nutr**, v.12, n.4, pp.438-441, aug.1993

CHARLES, M.A.; JOHNSON, I.T.; BELSHAW, N.J. Supra-physiological folic acid concentrations induce aberrant DNA methylation in normal human cells *in vitro*. **Epigenetics**, v.7, n.7, pp. 689-694, jul 2012.

CHEN, T.F. *et al.* Dose-dependent folic acid and memantine treatments promote synergistic or additive protection against A β (25-35) peptide-induced apoptosis in SH-SY5Y cells mediated by mitochondria stress-associated death signals. **Food Chem Toxicol**, v. 62, pp. 538-547, dec 2913.

CLARKE, R. *et al.* Folate, vitamin B12 and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimers disease. **Arch Neurol** v.55, n.11, pp.1449-1455, nov 1998.

DEV, S.; WANI, N.A.; KAUR, J. Regulatory mechanisms of intestinal folate uptake in a rat model of folate oversupplementation. **Br J Nutr**, v.105,n.6, pp.827-835, mar 2011.

DONYA, S.M.; ALY, F.A., ABO-ZEID, M.A.M. The protective role of folic acid, vitamin B12 and vitamin C on the mutagenicity of the anticancer drug ifosfamide. **JEGB**, v.7, n.2, pp.41-50, jul. 2009.

ESPINOSA, J.M; VERDUM, R.E.; EMERSON, B.M. p53 functions through Stress- and Promoter-Specific Recruitment of Transcription Initiation Components before and after DNA Damage. **Mol Cell**, v.12, n.4, pp. 1015–1027, oct. 2003.

FANG, J.Y.; XIAO, S.D. Effect of trans-retinoic acid and folic acid on apoptosis in human gastric cancer cell lines MKN-45 and MKN-28. **J Gastroenterol**, v. 33, n.5, pp.656-661, oct 1998.

HARTMANN, L.C. *et al* Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast câncer. **Int J Cancer**, v. 121, n,5, pp.938-942, sep. 2007.

HAYASHI, I *et al* Folate deficiency induces cell-specific changes in the steady-state transcript levels of genes involved in folate metabolism and 1-carbon transfer reactions in human colonic epithelial cells. **J Nutr**, v. 137, n.3, pp.607-613, mar 2007.

HERVOUET, E. *et al.* Folate Supplementation Limits the Aggressiveness of Glioma via the Remethylation of DNA Repeats Element and Genes Governing Apoptosis and Proliferation. **Clin Cancer Res**, v. 15, n.10, pp.3519-3529, may 2009.

HUANG, R.F. *et al.* In vitro folate supplementation alleviates oxidative stress, mitochondria-associated death signalling and apoptosis induced by 7-ketocholesterol. **Br J Nutr**, v.92, n.6, pp.887-894, dec 2004.

IFERGAN, I.; ASSARAF, Y.G.; Molecular Mechanisms of Adaptation to Folate Deficiency. **Vitam Horm**, v.79, pp. 99-143, 2008.

ISHAQUE, A; AL-RUBEAI,M. Role of vitamins in determining apoptosis and extent of suppression by bcl-2 during hybridoma cell culture. **Apoptosis**, v.7, n.3, pp.231-239, jun. 2002.

JAMES, S.J. *et al.* Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. **Am J Clin Nutr** v.70, n.4, pp.495-501, oct. 1999.

JHAVERI, M.S. *et al.* Antisense oligonucleotides targeted to the human α folate receptor inhibit breast cancer cell growth and sensitize the cells to doxorubicin treatment. **Mol Cancer Ther**, v. 3, n.12, pp.1505-1512, dec 2004.

KELEMEN, L.E. The role of folate receptor α in cancer development, progression and treatment: Cause, consequence or innocent bystander? **Int J Cancer**, v.119, n.2, pp.243-250, jul 2006.

KIM, Y.I. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. **Mol Nutr Food Res**, v. 51, n.3, pp.267-92, mar 2007.

LEUNG, F. *et al.* Folate-receptor 1 (FOLR1) protein is elevated in the serum of ovarian cancer patients. **Clin Biochem**, v, 46, n.15, pp.1462-1468, oct 2013.

LIU, H. *et al.* Folic Acid supplementation stimulates notch signaling and cell proliferation in embryonic neural stem cells. **J Clin Biochem Nutr**, v. 47, n.2, pp.174-180, sep 2010.

MCABE, J. *et al.* Folate Supplementation Induces Differential Dose-Dependent Modulation of Proliferative Phenotypes Among Cancerous and Noncancerous Oral Cell Lines *In Vitro*. **J Diet Suppl**, v.7, n.4, pp. 325-340, dec 2010.

McNULTY, H.; PENTIEVA, K. Folate bioavailability. **Proc Nutr Soc**, v. 64, n.4, pp.529-536, nov. 2004.

MEIER, R. *et al.* Breast Cancers: MR Imaging of Folate-Receptor Expression with the Folate-Specific Nanoparticle P1133. **Radiology**, v.255, n.2, pp. 527-535, may 2010.

MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOOT, S.; PERCIVAL, S. Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells. **J Nutr**, v.133, n.8, pp.2669-2674, aug. 2003.

MOSMANN, J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation cytotoxic assays. **J Immunol Methods**, v.65, n.1-2, pp.55-63, dez. 1983.

NOVAKOVICK, P. Effects of folate deficiency on gene expression in the apoptosis and cancer pathways in colon cancer cells. **Carcinogenesis**, v..27, n.5 pp.916-924, may 2006.

NURSE, P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. **Cell**, v.79, n.4, pp.547-450, nov.1994.

PETERSEN, L.F. *et al.* Elevated physiological levels of folic acid can increase in vitro growth and invasiveness of prostate cancer cells. **BJU Int**, v. 109, n.5, pp. 788-795, mar. 2012.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR. **Nucleic Acids Res**, v.30, n.9, pp.1-19, may 2002.

POMMIER, Y. *et al.* Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme, **Biochim Biophys Acta**, v. 1400, n.1-3, pp.83-105, oct 1998.

ROSEMARY SIAFAKAS, A; RICHARSON D.R. Growth arrest and DNA damage-45 alpha (*GADD45α*). **Int J Biochem Cell Biol**, v.41, n. 5, pp 986–989, may 2009.

RUAN, Y. *et al.* Folic acid protects SWV/Fnn embryo fibroblasts against arsenic toxicity. **Toxicol Lett**, v. 117, n.3, pp.129-137, nov. 2000.

SANTOS, L.M.P.; PEREIRA, M.Z. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. **Cad Saúde Pública**, v.23, n.1, pp.17-24, jan. 2007.

SCHWARTZ, T.R.; KMIEC, E.B. Using methyl methanesulfonate (MMS) to stimulate targeted gene repair activity in mammalian cells. **Gene Ther Mol Biol** v. 9, n. pp.193-202, 2005

SELHUB, J.; JACQUES, P.F.; BOSTON, A.G. Association between plasma homocysteine concentration and extracranial carotid artery stenosis. **N Eng J Med**, v. 332, n.5, pp.286-291, feb. 1995.

SMITH, A.D.; KIM, Y.I.; REFSUM, H. Is folic acid good for everyone? **Am J Clin Nutr**, v.87, n.3, pp.517-533, mar 2008.

TAMM, I. *et al.* IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. **Cancer Res**. v.58, n.3, pp. 5315–20, dec.1998.

TAVARES, S. The effect of folate status on the uptake of physiologically relevant compounds by Caco-2 cells. **Eur J Pharm**, v. 640, n,1, pp.29-37, aug 2010.

UNITED STATES, United States Department of Agriculture (USDA). **National Nutrient Database for Standard Reference**, 2011. Disponível em:< <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>>. Acesso em 29 jun. 2012.

WAHL, G.M; CARR, A.M. The evolution of diverse biological responses to DNA damage insights from yeast and p53. **Nat. Cell Biol**, v.3, n.12, pp. E277–E286, dec. 2001.

YOSHIZUMI, M. *et al.* Down-regulation of the Cyclin A Promoter by Transforming Growth Factor-β1 Is Associated with a Reduction in Phosphorylated Activating Transcription Factor-1 and Cyclic AMP-responsive Element-binding Protein. **J Biol Chem**, v. 272, n. 35, pp. 22259–22264, aug. 1997.

YU, H.L. *et al.* Neuroprotective effects of genistein and folic acid on apoptosis of rat cultured cortical neurons induced by β-amyloid 31-35. **Br J Nutr**, v.102, n.5, pp. 655-662, sep. 2009.

ZHANG, S. *et al* A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. **JAMA**, v. 281, n.17, pp.1632-1637, may 1999.

ZHAO, R; MATHERLY, L.H.; GOLDMAN, I.D. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. **Expert Rev Mol Med**, v. 11, n.4, pp.1-28, jan. 2009

ZHU; ALLIEGRO; MELERA The rate of folate receptor alpha (FR α) synthesis in folate depleted CHL cells is regulated by a translational mechanism sensitive to media folate levels, while stable overexpression of its mRNA is mediated by gene amplification and an increase in transcript half-life. **J Cell Biochem**, v, 81, n.2, pp.205-219, may 2001.

4 CONCLUSÃO

Os folatos são importantes componentes da dieta presentes em diversos alimentos que, juntamente com outras vitaminas, exercem papel fundamental para a regulação e funcionamento do organismo, participando de diversas reações essenciais, como biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos e metilação. Devido a essa importância, a forma sintética dos folatos, o ácido fólico, é utilizada na fortificação de alimentos e na composição de suplementos vitamínicos, aumentando assim o status de folato no organismo. Desde então, muitas pesquisas vem sendo realizadas com o intuito de avaliar os efeitos de altas doses de folatos na saúde humana, principalmente em relação ao câncer

A quimioprevenção do câncer através de componentes da dieta direciona atenção aos folatos devido a sua participação em reações metabólicas-chave, cuja desregulação pela deficiência de folatos já demonstrou causar instabilidade genética e alterações nos padrões de metilação do DNA, eventos que favorecem a carcinogênese.

Os resultados desse trabalho revelaram o potencial antitumoral do ácido fólico quando associado à doxorubicina e camptotecina, agentes utilizados na prática clínica no tratamento de diversos tipos de câncer. Porém, em associação ao metil metanossulfonato, o ácido fólico demonstrou um possível efeito contrário, podendo impedir a ação da droga e contribuir para o avanço tumoral. Apesar da grande importância desses resultados, vale ressaltar que a dose, o tempo de tratamento e o modelo experimental utilizado podem não trazer os mesmos benefícios. Estudos mais específicos são necessários para avaliar os mecanismos de ação do ácido fólico associado aos diferentes agentes químicos.

Finalmente, os resultados desse trabalho devem ser somados aos demais estudos existentes na literatura para uma melhor compreensão da suplementação de ácido fólico sobre as células. Dessa forma, é importante a contínua investigação no assunto, visto que o ácido fólico é uma vitamina essencial em diversos processos metabólicos do organismo e a desregulação nas vias das quais ele participa pode provocar sérios prejuízos à saúde.

REFERÊNCIAS

- ALY, F.A.; DONYA, S.M.; ABO-ZEID, M.A. The protective role of folic acid, vitamin B12 and vitamin C on the mutagenicity of the anticancer drug daunorubicin. **Researcher**, v.1, n.6, pp. 16-26, nov. 2009.
- ANTUNES, D.C.; LIMA E SIVA, I.M.; CRUZ, W.M.S.; Quimioprevenção do câncer gástrico. **Rev Bras Cancerol** v.53, n. 3, pp.367-374, abr. 2010.
- ARMSTRONG, D.K. *et al* Exploratory phase II efficacy study of MORAb-003, a monoclonal antibody against folate receptor , in platinum-sensitive ovarian cancer in first relapse. **J Clin Oncol**, v.26, n.15S, pp.5500, may 2008.
- ASHOKKUMAR, B. *et al* Effect of folate oversupplementation on folate uptake by human intestinal and renal epithelial cells. **Am J Clin Nutr**, v.86. n.1, pp.159-166, 2007.
- BAILEY, L.B.; GREGORY, J.E. Folate metabolism and requirements. **J Nutr**, v.129, n.4, pp.778-782, apr 1999.
- BALUZ, K.; CARMO, M.G.T. do; ROSAS, G. O papel do ácido fólico na prevenção e terapia oncológica: revisão. **Rev Bras Cancerol**, v. 48, n.4, pp.597-607, out./nov./dez. 2002.
- BETTGER, W.J.; HAM, R.G. The nutrient requirements of cultured mammalian cells. **Adv Nutr Res**, v.4, pp.249-286, 1982.
- BOFFETTA, P. *et al*. Fruits and vegetable intake and overall risk in the European Prospective Investigation into Cancer and nutrition (EPIC). **JNCL**, v.102, n.8, pp.529-537, apr.2010.
- BOREK, C. Molecular mechanisms in cancer induction and prevention. **Environ Health Perspect** , v.101, sup. 3, pp.237-245, oct. 1993.
- BRACHET, P. *et al* Age-associated B vitamin deficiency as a determinant of chronic diseases. **Nutr Res Rev**, v.17, n.1, pp.55-68, jun. 2004.
- BRANDA, R.F. *et al*. Nutritional Folate Status Influences the Efficacy and Toxicity of Chemotherapy in Rats. **Blood**, v.92, n. 7, pp. 2471-2476, oct. 1998
- BRASIL, Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Incidência de Câncer no Brasil: estimativa 2012**. Disponível em:<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>>; Acesso em 24 abr 2012.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA) **Portaria n º 33, de 13 de janeiro de 1998**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/33_98.htm>. Acesso em: 28 maio 2012.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Resolução - RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002**. Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/344_02rdc.htm>. Acesso em: 25 jun. 2012.

BRUINS, W. *et al* Delayed expression of apoptotic and cell-cycle control genes in carcinogen-exposed bladders of mice lacking p53.S389 phosphorylation **Carcinogenesis** vol.28 no.8 pp.1814–1823, feb 2007

BURDEN, D.A.; OSHEROFF, N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. **Biochim Biophys Acta**, v. 1400, n.1-3, pp. 139-154, oct. 1998

BUTTERWORTH JUNIOR, C.E.; TAMURA, T. Folic acid safety and toxicity: a brief review. **Am J Clin Nutr**. v. 50, n. 2, pp.353-358, aug. 1989.

BUTTERWORTH JUNIOR, C.E. Folate status women's health pregnancy outcome and cancer. **J Am Coll Nutr**, v.12, n.4, pp.438-441, aug.1993

CELL BIOLABS INC. **MCF-7GFP Cell Line**: product data sheet. Disponível em:< <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-211-gfp-mcf-7-cell-line.pdf>>. Acesso em: 10 ago 2012.

CHARLES, M.A.; JOHNSON, I.T.; BELSHAW, N.J. Supra-physiological folic acid concentrations induce aberrant DNA methylation in normal human cells *in vitro*. **Epigenetics**, v.7, n.7, pp. 689-694, jul 2012.

CHEN, T.F. *et al*. Dose-dependent folic acid and memantine treatments promote synergistic or additive protection against A β (25-35) peptide-induced apoptosis in SH-SY5Y cells mediated by mitochondria stress-associated death signals. **Food Chem Toxicol**, v. 62, pp. 538-547, dec 2913.

CLARKE, R. *et al*. Folate, vitamin B12 and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimers disease. **Arch Neurol** v.55, n.11, pp.1449-1455, nov 1998.

COLE, B.F. *et al*. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial **JAMA**, v. 296, n.21, pp.2351-2359, jun 2007.

DEV, S.; WANI, N.A.; KAUR, J. Regulatory mechanisms of intestinal folate uptake in a rat model of folate oversupplementation. **Br J Nutr**, v.105,n.6, pp.827-835, mar 2011.

DONYA, S.M.; ALY, F.A., ABO-ZEID, M.A.M. The protective role of folic acid, vitamin B12 and vitamin C on the mutagenicity of the anticancer drug ifosfamide. **JEGB**, v.7, n.2, pp.41-50, jul. 2009.

ESPINOSA, J.M; VERDUM, R.E.; EMERSON, B.M. p53 functions through Stress- and Promoter-Specific Recruitment of Transcription Initiation Components before and after DNA Damage. **Mol Cell**, v.12, n.4, pp. 1015–1027, oct. 2003.

FANG, J.Y.; XIAO, S.D. Effect of trans-retinoic acid and folic acid on apoptosis in human gastric cancer cell lines MKN-45 and MKN-28. **J Gastroenterol**, v. 33, n.5, pp.656-661, oct 1998.

FENECH, M. The role of folic acid and vitamin B12 in genomic instability of human cells. **Mutat Res** v.476, n.1-2, pp.57-67, apr. 2001.

FIGUEIREDO, J.C. *et al.* Folic Acid and Risk of Prostate Cancer: Results From a Randomized Clinical Trial. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n.6, pp.432- 435, mar 2009.

HARTMANN, L.C. *et al* Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast câncer. **Int J Cancer**, v. 121, n,5, pp.938-942, sep. 2007.

HAYASHI, I *et al* Folate deficiency induces cell-specific changes in the steady-state transcript levels of genes involved in folate metabolism and 1-carbon transfer reactions in human colonic epithelial cells. **J Nutr**, v. 137, n.3, pp.607-613, mar 2007.

HERVOUET, E. *et al.* Folate Supplementation Limits the Aggressiveness of Glioma via the Remethylation of DNA Repeats Element and Genes Governing Apoptosis and Proliferation. **Clin Cancer Res**, v. 15, n.10, pp.3519-3529, may 2009.

HUANG, R.F. *et al.* In vitro folate supplementation alleviates oxidative stress, mitochondria-associated death signalling and apoptosis induced by 7-ketocholesterol. **Br J Nutr**, v.92, n.6, pp.887-894, dec 2004.

IFERGAN, I.; ASSARAF, Y.G.; Molecular Mechanisms of Adaptation to Folate Deficiency. **Vitam Horm**, v.79, pp. 99-143, 2008.

ISHAQUE, A; AL-RUBEAI,M. Role of vitamins in determining apoptosis and extent of suppression by bcl-2 during hybridoma cell culture. **Apoptosis**, v.7, n.3, pp.231-239, jun. 2002.

JAMES, S.J.*et al.* Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolatereductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. **Am J Clin Nutr** v.70, n.4, pp.495-501, oct. 1999.

JASZEWSKI, R. *et al.* Folic acid supplementation inhibits recurrence of colorectal adenomas: a randomized chemoprevention trial. **World J Gastroenterol** , v. 14, n.28, pp. 4492-4498, jul. 2008.

JHAVERI, M.S. *et al.* Antisense oligonucleotides targeted to the human α folate receptor inhibit breast cancer cell growth and sensitize the cells to doxorubicin treatment. **Mol Cancer Ther**, v. 3, n.12, pp.1505-1512, dec 2004.

KELEMEN, L.E. The role of folate receptor α in cancer development, progression and treatment: Cause, consequence or innocent bystander? **Int J Cancer**, v.119, n.2, pp243-250, jul 2006.

KIM, Y.I. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. **Mol Nutr Food Res**, v. 51, n.3, pp.267-92, mar 2007.

KIM, S. *et al.* Cadmium induces neuronal cell death through reactive oxygen species activated by GADD153. **BMC Cell Biol**, v.14, n.4, 2013.

KOHN, K.W. DNA filter elution: a window on DNA damage in mammalian cell. **Bioessays**, v. 18, n.6, pp.505-513, jun. 1996.

LEUNG, F. *et al.* Folate-receptor 1 (FOLR1) protein is elevated in the serum of ovarian cancer patients. **Clin Biochem**, v, 46, n.15, pp.1462-1468, oct 2013.

LIU, H. *et al.* Folic Acid supplementation stimulates notch signaling and cell proliferation in embryonic neural stem cells. **J Clin Biochem Nutr**, v. 47, n.2, pp.174-180, sep 2010.

LUCOCK, M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease processes. **Mol Genet Metab**, v.71, n.1-2, pp.121-138, sep-oct. 2000.

MARUTI, S.S.; ULRICH, C.M.; WHITE, E. Folate and one-carbon metabolism nutrients from supplements and diet in relation to breast cancer risk. **Am J Clin Nutr**, v.89, n.12, pp.624-633, dec 2008.

MCABE, J. *et al.* Folate Supplementation Induces Differential Dose-Dependent Modulation of Proliferative Phenotypes Among Cancerous and Noncancerous Oral Cell Lines *In Vitro*. **J Diet Suppl**, v.7, n.4, pp. 325-340, dec 2010.

McNULTY, H.; PENTIEVA, K. Folate bioavailability. **Proc Nutr Soc**, v. 64, n.4, pp.529-536, nov. 2004.

MEIER, R. *et al.* Breast Cancers: MR Imaging of Folate-Receptor Expression with the Folate-Specific Nanoparticle P1133. **Radiology**, v.255, n.2, pp. 527-535, may 2010.

MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S.; PERCIVAL, S. Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells. **J Nutr**, v.133, n.8, pp.2669-2674, aug. 2003.

MOSMANN, J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation cytotoxic assays. **J Immunol Methods**, v.65, n.1-2, pp.55-63, dez. 1983.

NOVAKOVICK, P. Effects of folate deficiency on gene expression in the apoptosis and cancer pathways in colon cancer cells. **Carcinogenesis**, v..27, n.5 pp.916–924, may 2006.

NURSE, P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. **Cell**, v.79, n.4, pp.547-450, nov.1994.

OFF, M.K. *et al.* Ultraviolet photodegradation of folic acid. **J Photochem and Photobiol B**. v.80. n.1, pp.47-55, jul. 2005.

OLSSON, M.E. *et al.* Inhibition of Cancer Cell Proliferation in Vitro by Fruit and Berry Extracts and Correlations with Antioxidant Levels. **J Agric Food Chem**, v.52, n. 24, pp.7264-7272, dec. 2004.

PERES. C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 283 p.

PELUCCHI, C. *et al.* Dietary Folate and Risk of Prostate Cancer in Italy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.14, n.4, pp.944-948, apr. 2005.

PETERSEN, L.F. *et al.* Elevated physiological levels of folic acid can increase in vitro growth and invasiveness of prostate cancer cells. **BJU Int**, v. 109, n.5, pp. 788-795, mar. 2012.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR. **Nucleic Acids Res**, v.30, n.9, pp.1-19, may 2002.

POMMIER, Y. *et al.* Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme, **Biochim Biophys Acta**, v. 1400, n.1-3, pp.83-105, oct 1998.

ROSEMARY SIAFAKAS, A; RICHARSON D.R. Growth arrest and DNA damage-45 alpha (*GADD45α*). **Int J Biochem Cell Biol**, v.41, n. 5, pp 986–989, may 2009.

ROOS, W.P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends Mol Med**, v. 12, n.9, pp.440-450, sep 2006.

RUAN, Y. *et al.* Folic acid protects SW6101 embryo fibroblasts against arsenic toxicity. **Toxicol Lett**, v. 117, n.3, pp.129-137, nov. 2000.

SANTOS, L.M.P.; PEREIRA, M.Z. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. **Cad Saúde Pública**, v.23, n.1, pp.17-24, jan. 2007.

SCHWARTZ, T.R.; KMIEC, E.B. Using methyl methanesulfonate (MMS) to stimulate targeted gene repair activity in mammalian cells. **Gene Ther Mol Biol** v. 9, n. pp.193-202, 2005

SELHUB, J.; JACQUES, P.F.; BOSTON, A.G. Association between plasma homocysteine concentration and extracranial carotid artery stenosis. **N Eng J Med**, v. 332, n.5, pp.286-291, feb. 1995.

SHANKS, N.; GREEK, R.; GREKK, J. Are animal models predictive for humans? **Philos Ethics Humanit Med**, v.4, n.2, pp. 1-20, jan. 2009

SMITH, A.D.; KIM, Y.I.; REFSUM, H. Is folic acid good for everyone? **Am J Clin Nutr**, v.87, n.3, pp.517-533, mar 2008.

TAMM, I. *et al.* IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. **Cancer Res**. v.58, n.3, pp. 5315–20, dec.1998.

TAVARES, S. The effect of folate status on the uptake of physiologically relevant compounds by Caco-2 cells. **Eur J Pharm**, v. 640, n,1, pp.29-37, aug 2010.

ULRICH, C.M.; REED, C.M.; NIJHOUT, H.F. Modeling folate, one-carbon metabolism and DNA methylation. **Nut Rev**, v. 66, sup.1, pp.27-30, aug. 2008.

ULRICH, C.M.; POTTER, J.D. Folate and cancer—timing is everything. **JAMA**, v. 297, n.21, pp. 2408-2409, jun. 2007.

UNITED STATES, United States Department of Agriculture (USDA). **National Nutrient Database for Standard Reference**, 2011. Disponível em: < <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>>. Acesso em 29 jun. 2012.

VIJAYALAKSHMMI, B. *et al.* Effects of vitamin restriction and supplementation on rat intestinal epithelial cell apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v.38, n.12, pp.1614-1624, jun. 2005.

VOLLSET, S.E. *et al.* Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: meta-analyses of data on 50 000 individuals. **Lancet**, v.381, n.987, pp.1029-1036, mar 2013

WAHL, G.M; CARR, A.M. The evolution of diverse biological responses to DNA damage insights from yeast and p53. **Nat. Cell Biol**, v.3, n.12, pp. E277–E286, dec. 2001.

YOSHIZUMI, M. *et al.* Down-regulation of the Cyclin A Promoter by Transforming Growth Factor-b1 Is Associated with a Reduction in Phosphorylated Activating Transcription Factor-1 and Cyclic AMP-responsive Element-binding Protein. **J Biol Chem**, v. 272, n. 35, pp. 22259–22264, aug. 1997.

YU, H.L. *et al.* Neuroprotective effects of genistein and folic acid on apoptosis of rat cultured cortical neurons induced by b-amyloid 31-35. **Br J Nutr**, v.102, n.5, pp. 655-662, sep. 2009.

ZHANG, S. *et al.* A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. **JAMA**, v. 281, n.17, pp.1632-1637, may 1999.

ZHAO, R; MATHERLY, L.H.; GOLDMAN, I.D. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. **Expert Rev Mol Med**, v. 11, n.4, pp.1-28, jan. 2009

ZHU; ALLIEGRO; MELERA The rate of folate receptor alpha (FR α) synthesis in folate depleted CHL cells is regulated by a translational mechanism sensitive to media folate levels, while stable overexpression of its mRNA is mediated by gene amplification and an increase in transcript half-life. **J Cell Biochem**, v, 81, n.2, pp.205-219, may 2001.

APÊNDICES

Tabela 1 – Valores médios \pm desvio padrão da absorbância obtida no Ensaio de Citotoxicidade MTT após 24 horas de tratamento:

Absorbância	
Parâmetro	Média \pm desvio padrão
Controle	1,149 \pm 0,06
Ácido fólico	1,112 \pm 0,036
Doxorrubicina	0,771 \pm 0,043 ***
Camptotecina	0,451 \pm 0,028 ***
Metil metanossulfonato	0,447 \pm 0,038 ***
Doxorrubicina + ácido fólico	0,798 \pm 0,06 ***
Camptotecina + ácido fólico	0,510 \pm 0,04 ***
Metil metanossulfonato + ácido fólico	0,461 \pm 0,067 ***

ANOVA seguida de Teste de Tukey.

*** Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,001$)**Tabela 2** – Valores médios \pm desvio padrão da absorbância obtida no Ensaio de Citotoxicidade MTT após 48 horas de tratamento:

Absorbância	
Parâmetro	Média \pm desvio padrão
Controle	1,487 \pm 0,035
Ácido fólico	1,343 \pm 0,062
Doxorrubicina	0,558 \pm 0,037***
Camptotecina	0,221 \pm 0,031***
Metil metanossulfonato	0,526 \pm 0,047***
Doxorrubicina + ácido fólico	0,557 \pm 0,100***
Camptotecina + ácido fólico	0,257 \pm 0,073***
Metil metanossulfonato + ácido fólico	0,487 \pm 0,139***

ANOVA seguida de Teste de Tukey

*** Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,001$)

Gráfico 1 – Média das absorvâncias obtidas no Ensaio do MTT após 24h e 48h de tratamento. AF: ácido fólico; MMS: metil metanossulfonato; ***Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($p < 0,001$).

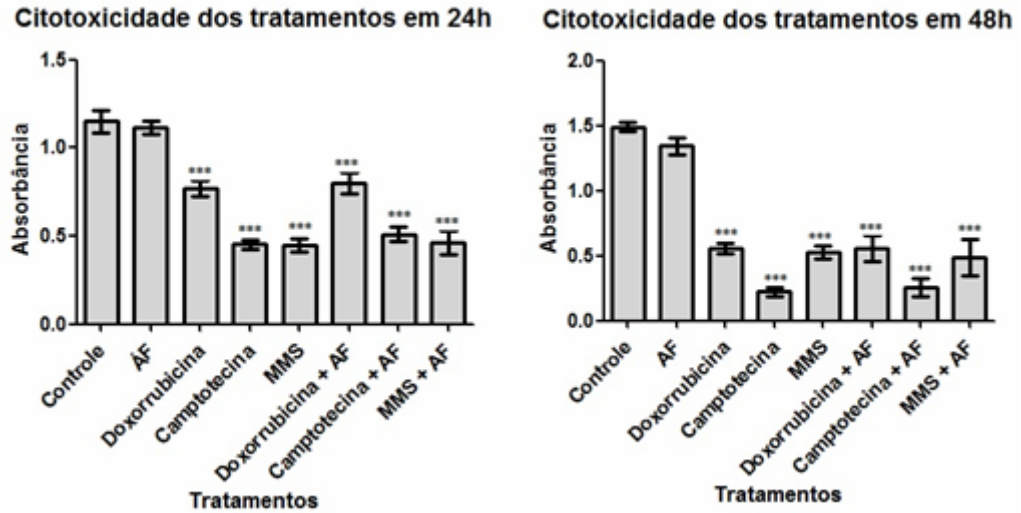


Figura 1 – Layout do tratamento realizado na Análise Celular em Tempo Real (RTCA):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CPT AF	DOX	DOX AF	CAMP	AF	DOX AF	CPT AF	x	MMS AF	CPT AF	Br	Br
B	DOX	DOX AF	x	Controle	MMS	MMS AF	Controle	Controle	CPT	x	MMS	Br
C	DOX AF	Controle	MMS	MMS	x	Controle	MMS AF	CPT	DOX	DOX	CPT	Br
D	MMS	MMS AF	CPT	DOX	AF	MMS	x	AF	DOX AF	CPT	MMS AF	Br
E	x	AF	MMS AF	CAMP AF	MMS AF	CAMP AF	AF	CPT	MMS	DOX	Br	Br
F	AF	x	Controle	CAMP	DOX	DOX	Controle	CPT AF	Controle	x	AF	Br
G	x	MMS AF	DOX AF	Controle	AF	x	x	DOX	MMS AF	x	Br	Br
H	DOX AF	AF	CAMP	MMS	CAMP AF	DOX AF	DOX AF	x	MMS	CPT AF	CPT AF	Br

DOX: doxorubicina; CPT: camptotecina; MMS: metil metanossulfonato; AF: ácido fólico; Br: branco; x: poços restantes contendo apenas células.

Tabela 3 – Índices Celulares obtidos na Análise Celular em Tempo Real (RTCA) no tempo de 24h:

Cell Index at: 24:05:23												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,6567	2,536	2,8749	3,0305	2,6052	2,8512	3,1882	2,9138	2,9479	2,8993	0,0108	-0,0457
B	2,6836	2,9751	2,7297	2,6073	2,8242	2,6158	2,5337	2,4599	3,6498	2,606	2,9603	0,0285
C	2,4845	2,6952	3,1172	2,7114	2,7291	2,7115	2,6488	2,6694	2,8734	2,4919	2,987	0,0231
D	2,2397	2,5884	2,8562	2,7177	2,4188	2,6727	2,8688	2,7671	2,8335	2,8148	3,7695	0,0579
E	2,6872	2,9156	2,7336	2,9488	3,0174	3,1204	3,0292	3,0323	3,2048	2,6757	0,0582	0,0391
F	2,3695	2,5704	2,546	2,6281	2,5773	2,4842	2,9939	2,5745	3,0637	2,739	2,81	0,0347
G	2,6296	2,9457	3,0469	2,7383	2,2032	3,248	2,7847	3,4468	3,3175	2,507	-0,0069	0,0142
H	2,9018	2,8702	2,9184	2,807	2,4411	3,044	2,8085	3,4008	2,6478	2,9182	2,3021	-0,0275

Tabela 4 – Índices Celulares obtidos na Análise Celular em Tempo Real (RTCA) no tempo de 48h:

Cell Index at: 48:11:24												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,2025	0,5784	0,6658	0,2578	7,6052	0,5808	0,1442	7,8016	2,6812	0,2484	0,016	-0,0545
B	0,5015	0,5427	7,9654	7,1568	1,6786	1,7413	7,9015	7,408	0,3197	8,1613	1,9397	0,01
C	0,5736	7,1758	2,3155	1,1472	8,1128	7,7076	1,6646	0,226	0,6132	0,4597	0,2904	-0,0052
D	1,3177	1,9808	0,252	0,4144	7,5068	3,1189	8,2315	9,374	0,6371	0,2512	3,5725	0,034
E	6,7763	8,2157	2,7799	0,2082	2,1087	0,2258	10,2334	0,2769	2,9491	0,3897	0,0418	0,0187
F	7,1098	7,5485	7,6838	0,2339	0,4647	0,5061	8,7645	0,1778	9,6882	9,2622	9,5947	0,0149
G	6,8463	3,097	0,5646	8,2519	6,7771	10,2681	7,8072	0,3512	4,4579	2,2473	-0,0286	-0,0055
H	0,5806	9,6169	0,2335	1,6672	0,2031	0,6621	0,6064	11,2909	1,8667	0,1979	0,2054	-0,0418

Tabela 5 – Índices Celulares obtidos na Análise Celular em Tempo Real (RTCA) no tempo de 55h:

Cell Index at: 55:11:28												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1218	0,345	0,362	0,172	9,6586	0,3206	0,0813	9,6485	2,8417	0,1689	0,0165	-0,0578
B	0,2784	0,2631	9,9068	8,5309	1,517	1,6475	10,0721	9,1675	0,2163	10,8832	1,816	0,0075
C	0,3071	8,6676	2,1921	0,9733	9,5514	9,1545	1,59	0,1355	0,3573	0,2823	0,1983	-0,0168
D	1,1855	1,9178	0,1558	0,2424	8,5556	3,4164	10,1932	11,4996	0,3478	0,1572	3,9548	0,0263
E	7,4992	9,3195	3,0299	0,1518	2,0599	0,1533	11,7908	0,1956	2,9609	0,2225	0,0374	0,0106
F	8,724	9,0486	9,3181	0,153	0,265	0,2841	10,258	0,1054	11,2205	12,1685	11,9364	0,0116
G	8,291	3,3555	0,27	9,9277	8,271	12,6833	9,1826	0,1805	5,3998	2,2888	-0,0356	-0,0076
H	0,2932	12,4658	0,1399	1,6239	0,1254	0,3292	0,3037	14,3314	1,8286	0,1234	0,132	-0,0422

Tabela 6 – Índices Celulares obtidos na Análise Celular em Tempo Real (RTCA) no tempo de 70h:

Cell Index at: 70:11:43												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0494	0,1583	0,1351	0,0866	12,4441	0,1403	0,0213	11,0911	5,8262	0,0964	0,0135	-0,065
B	0,1113	0,076	11,4695	9,9982	3,7989	4,5026	12,0533	10,5844	0,1259	12,7049	4,7073	-0,0029
C	0,1069	10,044	5,3121	2,1165	11,047	10,8018	4,1059	0,0578	0,169	0,1547	0,1171	-0,0244
D	2,156	5,1169	0,0791	0,1137	9,5173	7,0099	11,4621	11,966	0,1663	0,0863	9,7432	0,0175
E	8,0336	9,5265	6,7069	0,0817	4,4383	0,1018	11,5341	0,1296	8,0506	0,1145	0,0303	-0,0025
F	10,0543	9,9615	10,3089	0,0817	0,1349	0,1353	10,8549	0,0484	11,6333	12,489	12,6464	0,0042
G	9,6887	8,4563	0,0859	10,5889	9,6046	12,698	9,7094	0,0668	13,2895	5,7697	-0,0458	-0,0265
H	0,1035	13,1793	0,0448	3,3947	0,0523	0,111	0,1006	14,3721	4,0891	0,0595	0,0606	-0,0548

Tabela 7 – Índices Celulares obtidos na Análise Celular em Tempo Real (RTCA) no tempo de 96h:

Cell Index at: 96:42:13												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0003	0,0913	0,0522	0,0262	9,9785	0,0801	-0,0132	10,9949	10,48	0,0512	0,0142	-0,074
B	0,0497	0,0122	10,4608	10,2907	6,9702	7,8361	10,3318	10,1056	0,0597	10,3922	8,8642	-0,0173
C	0,0356	9,7303	8,8472	4,5566	10,3901	10,0309	7,7344	-0,0095	0,1041	0,0979	0,0447	-0,0355
D	3,5179	8,6665	0,0097	0,0622	9,2704	10,2071	10,2061	10,6743	0,1056	0,0302	13,061	-0,001
E	7,5305	9,326	8,9704	0,0418	7,8467	0,0487	10,479	0,0624	13,3554	0,065	0,0199	-0,0135
F	8,7212	9,5094	9,2879	0,0265	0,082	0,0789	10,0133	-0,0052	10,1162	10,3933	10,5813	-0,0144
G	8,6918	11,4867	0,0125	9,8137	9,2081	10,2161	9,3711	0,0234	15,9439	8,3782	-0,063	-0,035
H	0,0355	10,1494	-0,0201	5,8668	0,0017	0,0394	0,0295	9,7347	7,0841	0,0129	0,0223	-0,0612

Tabela 8 – Quantificação de RNA por espectrofotômetro:

Tratamento	R1		R2		R3	
	ug/mL	Razão	ug/mL	Razão	ug/mL	Razão
Controle	52.8	2.22	149.7	1.96	108.8	1.91
AF	53.2	1.82	135.3	1.96	113.8	2.02
Doxorrubicina	40.7	1.74	45.9	1.84	59.3	1.94
Camptotecina	35.4	1.66	42.8	1.86	20.8	1.89
MMS	42.4	1.8	125.2	1.97	78.7	1.86
Doxorrubicina + AF	38.4	1.87	87.7	2.03	66.9	1.92
Camptotecina + AF	21	1.54	76.6	1.96	57.9	1.93
MMS + AF	30.2	1.97	37.5	1.79	63.8	1.89

R: repetição; AF: ácido fólico; MMS: metil metanossulfonato

Quadro 1 – Expressão gênica média das repetições analisadas pelo *Rest 2009*:

Gene	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
GADD45A AF	1,184	0,868 - 1,689	0,755 - 2,042	0,533	
GADD45A Dox	0,984	0,265 - 7,337	0,211 - 11,739	0,967	
GADD45A Dox+AF	5,29	2,708 - 10,968	2,166 - 17,548	0,077	
GADD45A Camp	0,363	0,057 - 5,408	0,041 - 8,653	0,393	
GADD45A Camp+AF	6,619	4,817 - 9,396	4,049 - 11,888	0,012	UP
GADD45A MMS	4,17	2,081 - 9,096	1,664 - 14,553	0,024	UP
GADD45A MMS+AF	4,584	3,055 - 5,905	2,821 - 8,746	0,052	
DDIT3 AF	0,989	0,625 - 1,767	0,558 - 2,191	0,931	
DDIT3 DOX	0,456	0,181 - 2,191	0,150 - 2,716	0,307	
DDIT3 Dox AF	2,713	1,597 - 4,253	1,222 - 4,701	0,084	
DDIT3 Camp	0,245	0,058 - 1,483	0,048 - 2,091	0,307	
DDIT3 Camp+AF	3,379	2,684 - 4,542	2,084 - 4,982	0,035	UP
DDIT3 MMS	1,853	1,393 - 2,564	1,101 - 3,077	0,031	UP
DDIT3 MMS+AF	2,688	1,288 - 4,999	0,986 - 6,197	0,116	
CCNA2 AF	0,933	0,651 - 1,266	0,587 - 1,743	0,824	
CCNA2 Dox	0,049	0,024 - 0,105	0,019 - 0,173	0	DOWN
CCNA2 Dox AF	0,064	0,018 - 0,166	0,013 - 0,187	0	DOWN
CCNA2 Camp	0,02	0,006 - 0,052	0,005 - 0,086	0,034	DOWN
CCNA2 Camp+AF	0,096	0,048 - 0,166	0,035 - 0,241	0	DOWN

CCNA2 MMS	0,043	0,012 - 0,152	0,009 - 0,249	0 DOWN
CCNA2 MMS+AF	0,104	0,035 - 0,226	0,025 - 0,313	0,027 DOWN
TP53 AF	1,151	1,050 - 1,267	1,028 - 1,329	0,053
TP53 Dox	0,714	0,549 - 0,877	0,511 - 0,920	0 DOWN
TP53 Dox AF	0,973	0,845 - 1,198	0,812 - 1,257	0,818
TP53 Camp	0,527	0,383 - 0,733	0,357 - 0,769	0 DOWN
TP53 Camp+AF	0,542	0,430 - 0,642	0,401 - 0,669	0,024 DOWN
TP53 MMS	0,678	0,598 - 0,802	0,583 - 0,841	0 DOWN
TP53 MMS+AF	0,334	0,223 - 0,457	0,208 - 0,480	0,02 DOWN
BIRC5 AF	0,719	0,523 - 0,944	0,478 - 1,180	0,192
BIRC5 Dox	0,457	0,305 - 0,603	0,272 - 0,844	0,012 DOWN
BIRC5 Dox+AF	0,079	0,024 - 0,165	0,021 - 0,207	0 DOWN
BIRC5 Camp	0,467	0,366 - 0,584	0,362 - 0,724	0 DOWN
BIRC5 Camp+AF	0,214	0,156 - 0,300	0,135 - 0,345	0 DOWN
BIRC5 MMS	0,04	0,018 - 0,077	0,015 - 0,113	0 DOWN
BIRC5 MMS+AF	0,173	0,135 - 0,241	0,124 - 0,257	0 DOWN
BAX AF	1,143	0,878 - 1,727	0,704 - 1,887	0,615
BAX Dox	0,727	0,585 - 0,896	0,535 - 0,957	0,043 DOWN
BAX Dox+AF	1,729	1,438 - 2,108	1,262 - 2,198	0,086
BAX Camp	0,436	0,361 - 0,505	0,334 - 0,513	0,066
BAX Camp+AF	1,385	0,804 - 2,168	0,626 - 2,228	0,303
BAX MMS	1,498	1,260 - 1,768	1,119 - 1,798	0 UP
BAX MMS+AF	1,023	0,622 - 1,930	0,484 - 2,108	0,916
BAK AF	1,461	0,980 - 2,095	0,899 - 2,883	0,221
BAK Dox	0,316	0,126 - 0,777	0,098 - 1,070	0,107
BAK Dox AF	1,251	0,499 - 5,122	0,452 - 7,049	0,988
BAK Camp	0,22	0,110 - 0,408	0,085 - 0,562	0 DOWN
BAK Camp+AF	1,272	0,837 - 1,851	0,661 - 2,492	0,332
BAK MMS	2,099	1,391 - 3,067	1,285 - 4,221	0,03 UP
BAK MMS+AF	1,395	1,079 - 1,760	0,944 - 2,186	0,118
BCL-XL AF	1,023	0,643 - 1,669	0,532 - 2,093	0,672
BCL-XL Dox	0,171	0,120 - 0,256	0,090 - 0,298	0 DOWN
BCL-XL Dox+AF	0,918	0,658 - 1,443	0,450 - 1,665	0,721
BCL-XL Camp	0,088	0,047 - 0,179	0,030 - 0,217	0 DOWN
BCL-XL Camp+AF	0,887	0,599 - 1,458	0,425 - 1,748	0,601

BCL-XL MMS	0,693	0,511 - 1,110	0,322 - 1,178	0,39
BCL-XL MMS+AF	0,555	0,321 - 0,999	0,202 - 1,072	0,219
BCL-2 AF	0,814	0,675 - 1,086	0,659 - 1,100	0,331
BCL-2 Dox	0,274	0,211 - 0,371	0,206 - 0,376	0 DOWN
BCL-2 Dox+AF	0,597	0,484 - 0,763	0,472 - 0,773	0,023 DOWN
BCL-2 Camp	0,109	0,059 - 0,295	0,058 - 0,299	0 DOWN
BCL-2 Camp+AF	0,509	0,254 - 0,784	0,248 - 0,794	0,064
BCL-2 MMS	0,814	0,477 - 1,248	0,466 - 1,264	0,647
BCL-2 MMS+AF	0,235	0,131 - 0,429	0,128 - 0,435	0,079
CASP7 AF	1,344	1,136 - 1,746	0,931 - 1,851	0,125
CASP7 Dox	0,657	0,457 - 0,988	0,396 - 1,251	0,198
CASP7 Dox+AF	1,178	0,926 - 1,423	0,831 - 1,709	0,379
CASP7 Camp	0,384	0,267 - 0,580	0,232 - 0,734	0 DOWN
CASP7 Camp+AF	1,919	1,293 - 2,772	1,005 - 3,371	0,198
CASP7 MMS	0,995	0,799 - 1,232	0,760 - 1,291	0,904
CASP7 MMS+AF	1,338	0,551 - 2,557	0,428 - 2,709	0,569
CASP8 AF	1,154	0,918 - 1,350	0,888 - 1,707	0,513
CASP8 Dox	0,167	0,092 - 0,324	0,080 - 0,409	0,014 DOWN
CASP8 Dox+AF	1,369	1,099 - 1,618	1,014 - 1,961	0,11
CASP8 Camp	0,093	0,061 - 0,146	0,053 - 0,184	0,036 DOWN
CASP8 Camp+AF	1,643	1,152 - 2,226	1,007 - 2,453	0,082
CASP8 MMS	1,012	0,878 - 1,234	0,818 - 1,303	0,806
CASP8 MMS+AF	1,104	0,588 - 1,707	0,514 - 1,904	0,834
CASP9 AF	0,989	0,801 - 1,307	0,638 - 1,379	0,937
CASP9 Dox	0,24	0,068 - 0,775	0,049 - 0,867	0 DOWN
CASP9 Dox+AF	1,566	1,334 - 2,084	0,982 - 2,135	0,201
CASP9 Camp	0,164	0,062 - 0,358	0,045 - 0,393	0 DOWN
CASP9 Camp+AF	1,28	0,971 - 1,823	0,707 - 1,871	0,361
CASP9 MMS	1,474	1,118 - 1,865	1,021 - 1,992	0,033 UP
CASP9 MMS+AF	0,935	0,687 - 1,426	0,547 - 1,596	0,735

FOLR1 AF	1,214	0,818 - 1,701	0,708 - 2,202	0,48
FOLR1 Dox	0.664	0.491 - 0.458	0,354 – 11.65	0.169
FOLR1 Dox+AF	1,909	1.329 – 2.952	1;004 – 3.441	0.201
FOLR1 Camp	0	0.000 – 0.000	0.000 – 0.001	0.36
FOLR1 Camp+AF	0.945	0.662 – 1.492	0.467 – 1.753	0.934 DOWN
FOLR1 MMS	1,23	0.557 – 2.422	0.375 – 2.724	0.772
FOLR1 MMS+AF	0.838	0.500 – 1.204	0.439 – 1.514	0.628
SLC46A1 AF	0.632	0.176 – 2.465	0.072 – 3.482	0.634
SLC46A1 Dox	0.771	0.246 – 2.573	0,102 – 4.376	0.721
SLC46A1 Dox+AF	2.14	0.699 – 6.695	0.536 – 15.55	0.434
SLC46A1 Camp	1.123	0.161 – 9,463	0.066 – 23,42	0.957
SLC46A1 Camp+AF	0.819	0.236 – 3.463	0.096 – 7.827	0.607
SLC46A1 MMS	2.639	1.019 – 6.269	0.639 – 14.27	0.247
SLC46A1 MMS+AF	0.388	0.046 – 1.878	0.038 – 2.373	0.64
SLC19A1 AF	0.274	0.073 – 0.698	0.047 – 1.494	0.101
SLC19A1 Dox	0.771	0.246 – 2.573	0.102 – 4.378	0.712
SLC19A1 Dox+AF	0.702	0.359 – 1.787	0.229 – 2.387	0.524
SLC19A1 Camp	0.565	0.095 – 1.895	0.061 – 4.086	0.718
SLC19A1 Camp+AF	1.491	0.573 – 4.521	0.314 – 7.572	0.437
SLC19A1 MMS	1.729	0.542 – 6.245	0.419 – 13.46	0.751
SLC19A1 MMS+AF	0.997	0.431 – 3.117	0.23 – 4.525	0.932