

**UNIVERSIDADE BRASIL  
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOENGENHARIA  
CAMPUS ITAQUERA**

**DANIELA ALVES PIRES**

**A SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA C INIBE HIPERATIVAÇÃO  
DE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA INDUZIDAS  
POR LIPOPOLYSACCARÍDEO: ENVOLVIMENTO DA  
SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA**

**VITAMIN C SUPPLEMENTATION INHIBITS HYPERACTIVATION  
OF CHRONIC MYOGOTIC LEUKEMIA CELLS INDUCED BY  
LIPOPOLYSACCARIO: INVOLVEMENT OF PURINERGIC  
SIGNALING**

São Paulo, SP

2021

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOENGENHARIA**

**DANIELA ALVES PIRES**

**A SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA C INIBE HIPERATIVAÇÃO  
DE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA INDUZIDAS  
POR LIPOPOLYSACCARÍDEO: ENVOLVIMENTO DA  
SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para à obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira

**Orientador**

São Paulo

2021



## TERMO DE APROVAÇÃO

DANIELA ALVES PIRES

**"A SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA C INIBE HIPERATIVACÃO DE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOÍDE CRÔNICA INDUZIDAS POR LIPOPOLYSACCARÍDEO: ENVOLVIMENTO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof.(a) Dr.(a) Rodolfo de Paula Vieira (presidente-orientador)

Prof.(a) Dr.(a) Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof.(a) Dr.(a) André Luis Lacerda Bachi (UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO)

São Paulo, 22 de abril de 2021  
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a). Rodolfo de Paula Vieira

Houve alteração do Título: sim ( ) não ( X ):

---

---

---



## Termo de Autorização

### Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "A SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA C INIBE HIPERATIVAÇÃO DE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOÍDE CRÔNICA INDUZIDAS POR LIPOPOLYSACCARÍDEO: ENVOLVIMENTO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA"

Houve alteração do Título: sim ( ) não (X):

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Autor(es):

Discente: **Daniela Alves Pires**

Assinatura: \_\_\_\_\_ *Daniela*

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Rodolfo de Paula Vieira**

Assinatura: \_\_\_\_\_ *Rodolfo de Paula Vieira*

Coorientador(a):

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: 22/04/2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

P743sPIRES, Daniela Alves

A suplementação de vitamina C inibe hiperativação de células de Leucemia Mielóide Crônica induzidas por Lipopolysaccharídeo: envolvimento da sinalização purinérgica/Daniela Alves Pires.-- São Paulo: Universidade Brasil, 2021.

37 f.: il.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Bioengenharia da Universidade Brasil.

Orientação: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira.

1.Ácido Ascórbico. 2. Vitamina C. 3. Sinalização Purinérgica. 4. Leucemia. 5. Citocinas. 6 Bioengenharia. I. Vieira, Rodolfo de Paula. II.Título.

CDD 620.82

## **CONTEXTO DO ESTUDO NO PROGRAMA**

Dissertação do Programa de Mestrado em Bioengenharia relacionada à área de concentração Reabilitação, tendo como linha de pesquisa: Mecânica do Corpo Humano.

Relevância para a Bioengenharia: Pacientes que possuem Leucemia Mielóide Crônica geralmente tem infecções, sangramentos e anemia e é muito importante que se previna infecções e grandes inflamações. Portanto, no contexto da Bioengenharia, o desenvolvimento de pesquisas científicas na área de reabilitação a saúde com fatores que possam reduzir de processos inflamatórios podem resultar em melhora na qualidade de vida deste indivíduo.

## **Agradecimentos**

A Deus, que sustentou e acalentou nesses meses de viagens, incertezas, inseguranças e privações durante essa trajetória.

À minha família que sempre me apoiou em todos os momentos. Sem o apoio de vocês seria inviável a realização desse curso. Obrigada por tudo sempre.

Ao meu “Grupo do Mestrado”: Silvana, Amanda, Roseane, Marcelo, Gustavo e Matheus – companheiros de jornada e a todos meus colegas de pesquisa. Quantos momentos, lembranças, risadas, choros e perrengues enfrentamos. Obrigada por todo companheirismo, ajuda, conselhos e risadas.

Ao meu orientador, Professor Dr. Rodolfo de Paula Vieira, por sua atenção, gentileza, e dedicação no decorrer desse trabalho.

Ao Renilson e a Maysa pela ajuda nas explicações e na flexibilidade para a realização da pesquisa com a utilização do physioflow.

Aos meus amigos que direta ou indiretamente contribuíram com otimismo, com palavras de motivação na conclusão do mestrado.

A todos os professores e colegas do Programa de Mestrado Profissional em Bioengenharia.

Ao Dr. João pela parceria na execução dessa pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa.

## **Resumo**

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa, caracterizada pela superprodução de leucócitos, com os pacientes apresentando anemia, fadiga, infecções, sangramento, entre outros problemas. Assim, um objetivo importante para pacientes com LMC é prevenir infecções e inibir a exacerbação de processos inflamatórios. Nesse contexto, o presente estudo investigou se a vitamina C poderia inibir a ativação hiperinflamatória de células K-562 induzida por LPS e se a sinalização purinérgica está envolvida nessa resposta. Duas doses de vitamina C foram usadas (5 µg / mL e 10 µg / mL) por 2 horas antes de LPS (10ng / mL) por 22 horas em células K-562 (3x10<sup>5</sup> células / mL / poço). Os resultados demonstraram que ambas as doses de vitamina C reduziram significativamente a liberação de IL-6 induzida por LPS (5 µg / ml, p <0,01 e 10 µg / ml p <0,01) e TNF-alfa (5 µg / mL, p < 0,01 e 10 µg / ml p <0,01). Em contraste, ambas as doses de vitamina C induziram a liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 (5 µg / ml, p <0,01 e 10 µg / ml p <0,01). Além disso, 10 µg / ml de vitamina C induziu a liberação de klotho (10 µg / mL p <0,01), uma proteína anti-envelhecimento e antiinflamatória. É importante ressaltar que a vitamina C (5 µg / ml, p <0,01 e 10 µg / ml p <0,01) reduziu a liberação e o acúmulo de ATP no meio extracelular, bem como reduziu a expressão em níveis de mRNA do receptor P2X7, sugerindo um possível mecanismo de ação. Portanto, concluímos que a vitamina C inibe o estado hiperinflamatório induzido por LPS em células K-562 envolvendo a sinalização purinérgica.

**Palavras-chave:** Ácido ascórbico. Vitamina C. Sinalização purinérgica. Leucemia. Citocinas. Inflamação. Bioengenharia.



## **Abstract**

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasm, characterized by overproduction of white blood cells, with the patients presenting anemia, fatigue, infections, bleeding, and other problems. Thus, an important goal for CML patients is to prevent infections and inhibit the exacerbation of inflammatory processes. In this context, the present study investigated whether vitamin C could inhibit hyperinflammatory activation of K-562 cells induced by LPS and whether purinergic signaling is involved in such response. Two doses of vitamin C were used (5 µg/mL and 10 µg/mL) for 2 hours prior LPS (10ng/mL) for 22 hours in K-562 cells ( $3 \times 10^5$  cells/mL/well). The results demonstrated that both doses of vitamin C significantly reduced LPS-induced the release of IL-6 (5 µg/mL,  $p < 0.01$  and 10µg/mL  $p < 0.01$ ) and TNF-alpha (5 µg/mL,  $p < 0.01$  and 10µg/mL  $p < 0.01$ ). In contrast, both doses of vitamin C induced the release of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (5 µg/mL,  $p < 0.01$  and 10µg/mL  $p < 0.01$ ). In addition, 10µg/mL of vitamin C induced the release of klotho(10µg/mL  $p < 0.01$ ), an anti-aging and anti-inflammatory protein. Importantly, vitamin C (5 µg/mL,  $p < 0.01$  and 10µg/mL  $p < 0.01$ ) reduced ATP release and accumulation in the extracellular milieu as well as reduce the expression at mRNA levels of P2X7 receptor, suggesting a possible mechanism of action. Therefore, we conclude that vitamin C inhibits hyperinflammatory state induced by LPS in K-562 cells involving purinergic signaling.

**Keywords:** Ascorbic acid. Vitamin C. Purinergic signaling. Leukemia. Cytokines. Inflammation. Bioengineering.

## **DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO**

Pacientes que possuem um tipo de câncer no sangue chamado de Leucemia Mielóide Crônica geralmente tem infecções, sangramentos e cansaço e é muito importante que estes pacientes não tenham infecções e grandes inflamações. Muitas pesquisas mostram que a Vitamina C tem muitos benefícios para a saúde, então, foi realizado um estudo com células doentes por Leucemia Mielóide Crônica que receberam uma substância que provoca inflamação depois tratadas com doses diferentes de Vitamina C. O resultado da pesquisa mostrou que estas células que foram tratadas com Vitamina C tiveram uma diminuição da inflamação.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Efeitos de diferentes doses de vitamina C.....	42
Figura 2 - Citocinas.....	43
Figura 3 – ATP e P2X7.....	44

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1. VITAMINA C.....	11
1.2. BENEFÍCIOS DA VITAMINA C.....	12
1.3. VITAMINA C – RISCOS DO EXCESS.....	13
1.4. VITAMINA C E SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	14
1.5. VITAMINA C E CÂNCER.....	16
1.6. VITAMINA C E LEUCEMIAS.....	18
<b>1.6.1. Leucemia mielóide crônica.....</b>	<b>18</b>
<b>1.6.2. Leucemia mielóide aguda.....</b>	<b>19</b>
1.7. CÉLULAS K562.....	19
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>3. ARTIGO SUBMETIDO.....</b>	<b>22</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>40</b>
<b>5. FIGURAS.....</b>	<b>41</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. VITAMINA C

Segundo Manuela-Azulay (2003, p. 266) “A vitamina C, também chamada de ácido ascórbico ou ascorbato, é uma vitamina solúvel em água que está naturalmente presente em alguns alimentos, adicionada a outros e disponível como suplemento dietético”. “Os humanos, ao contrário da maioria dos animais, são incapazes de sintetizar a vitamina C endogenamente, por isso é um componente alimentar essencial (LI e SCHELLHORN, 2007, p. 2172)”.

Segundo Lopes (2019), o escorbuto é a principal doença relacionada à deficiência de vitamina C. As descrições de escorbuto são encontradas em literatura que remete ao tempo do antigo Egito e Império Romano, o que revela a antiguidade do conhecimento desta doença (SOARES et al. 2020, p. 161). “[...] O escorbuto foi identificado no século XVI como uma hipovitaminose, ganhando notoriedade quando se reconheceu que a maioria dos marinheiros da época dos descobrimentos tinha esta doença [...]” (MONYNAN et al., 2018, p.16) “[...] e que (a doença) era evitada quando se introduzia uma dieta rica em vegetais [...]” (CHALYA et al., 2011, p. 7). Os sinais de deficiência se manifestam após cerca de 4 a 6 meses de baixa ingestão, sendo considerado quadro de hipovitaminose uma concentração plasmática menor de 0,4mg/dL (LOPES, 2019).

Foram, entretanto, as pesquisas do químico americano Linus Pauling (1901-1994), também ganhadoras do Prêmio Nobel de Química, que popularizaram a vitamina C. “Pauling recomendava megadoses da vitamina para o combate de resfriados, gripes e outras viroses, bem como na

prevenção do câncer e outras doenças degenerativas” (MANUELA-AZULAY, 2003, p. 266). No entanto, Hemil e Chalker (2013, p 1), uma meta-análise em 2013 concluiu que a suplementação de ASC só reduz a incidência de resfriado comum em pessoas que desenvolvem atividade física intensa, não na população geral. “[...] As necessidades diárias recomendadas são variáveis entre países indo de 45 mg a 110 mg/d. No Brasil, adota-se a RDA (*Recommended Dietary Allowence*) de 75 mg/dia para mulheres e 90 mg/d para homens [...]” (ABRAN, 2018, P.749).

“[...] A absorção da vitamina C da dieta depende de uma multiplicidade de fatores [...]” (ROSSETTI, REAL e PALMA, 2020, P. 145). “[...] É absorvida em sua quase totalidade no intestino delgado e ocorre por um mecanismo de transporte ativo, ou seja, há gasto de energia [...]” (CAVALARI e SANCHES, 2018, P 749). De acordo com Lykkesfeldt e Tveden-Nyborg (2019, p 2412) após a ingestão oral, o ASC é absorvido principalmente por células de membrana de borda de escova do epitélio intestinal. A absorção de ASC é dependente de sódio e é mediado pelo SVCT1, um transportador ativo acoplado ao sódio e depende diretamente da dose ingerida, se a ingestão for inferior a 100 mgs por dia (2-3 frutas e/ou vegetais), entre 80 e 90% são absorvidas; enquanto se é 200 mg por dia (4-5 frutas e/ou vegetais), é totalmente absorvido, atingindo uma concentração plasmática de 80-90mg

## 1.2. BENEFÍCIOS DA VITAMINA C

Barreta et al (2020, p 1182) explica que uma das principais funções da vitamina C é neutralizar radicais livres, reduzindo ferro, regenerando a vitamina E. A vitamina C atua como um cofator das enzimas  $\alpha$ -

cetoglutaratodioxigenases, quebrando a cadeia que saciam radicais livres através da doação de elétrons (HASSELHOLT, TVEDEN-NYBORG e LYKKESFELDT, 2015, P. 1539). “[...] Essas enzimas participam da síntese de neurotransmissores, se comportando como cofator de sistemas metabólicos que incluem a síntese de noradrenalina e dopamina [...]” (NEMET e MONNIER, 2011, P, 37128) “[...] participam na regulação da expressão do gene e na síntese de fibras de colágeno, atuando na hidroxilação de dois aminoácidos (prolina e lisina) essenciais para os processos de cicatrização[...]” (DOUGLAS, 2020, p. 120). “[...] Também está presente na biossíntese de certos aminoácidos como a tirosina e fenilalanina, participando da desaminação das mesmas [...]” (BARRETA et al, 2020, p. 1182)

### 1.3. VITAMINA C - RISCOS DO EXCESSO

De acordo com Aranha et al (2000, p. 89) o mais notável efeito da hipervitaminose C é a diarreia, provavelmente determinada pelo carreamento de grande quantidade de água para o interior do intestino. Dutra-de-Oliveira e Marchini (1998, p. 203) descrevem que podem acontecer ainda, náuseas, vômitos, um aumento da absorção do ferro e um problema potencial do rim e da bexiga, em razão do aumento de suas excreções. “[...] o ácido ascórbico é parcialmente convertido em ácido oxálico, podendo com isso induzir à litíase oxálica [...]” (NEMET e MONNIER, 2011, P. 37128). Aranha et al (2020, p.89) descreve que o excesso de ácido ascórbico excretado na urina leva a um teste falso positivo para glicosúria. “[...] evidências atuais mostram que a ingestão maciça de vitamina C (9 g/dia) produz um pequeno aumento na excreção urinária de oxalato e nenhuma alteração no urato ou fosfato inorgânico [...]” (LYKKESFELDT e TVEDEN-NYBORG, 2019, p.2412).

#### 1.4. VITAMINA C E SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico consiste em vários órgãos, tecidos, células e proteínas que combatem bactérias, vírus e células cancerosas (STADFELD et al, 2012, p.398).

Lauridsen (2019, p.4240) diz que a resposta imune é fortemente modulada pelo estresse oxidativo e processos inflamatórios. Porcelli (2017, p.247) descreve que o mecanismo de defesa natural inespecífico ou inato é derivado de células da linha mielocítica, e fornece uma resposta imediata.

Os estímulos inflamatórios podem desencadear a ativação das vias de sinalização intracelular envolvidas na expressão de mediadores inflamatórios. (KAMINSKA 2005, p. 253). Os estímulos inflamatórios primários causam a liberação de produtos microbianos e citocinas, incluindo interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (GIRARD, 2009, p.168). Como resultado, vias de sinalização intracelular são estimuladas, incluindo a proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) (KYRIAKIS e AVRUCH, 2001, p. 807).

Chen, Zhou, e Min (2018, p.1487) descrevem que a ativação da resposta inflamatória e a promoção do estresse oxidativo estão intimamente relacionadas com o sistema imunológico. Crapo (2003, p 4) fala que o sistema imunológico está inter-relacionado com múltiplos aspectos da regulação fisiológica. “[...] bem como na utilização de nutrientes [...]” (MARCOS, 2003, p. 66).

O ácido ascórbico está envolvido em vários processos biológicos, nomeadamente na síntese de carnitina para transporte de ácidos de cadeia



longa pela membrana mitocondrial levando á síntese de ATP (BURSAC´-MITROVIC´ et al, 2016, p. 29)

O ASC também está presente na síntese de neurotransmissor norepinefrina e de óxido nítrico, metabolismo de prostaglandinas, fator importante na atenuação da resposta inflamatória (BORETTI e BANIK, 2020, P. 100). Monacelli et al (2017, p. 670) falam que a vitamina C tem sido relatada como possui uma ação antiinflamatória, associada à redução da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral, proteína interleucina-23 e C-reativa. Tröhle e Hahn (2009, p.49) descrevem a vitamina C como um antioxidante inibe a oxidação de proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucléicos. Kogut, Lee e Santin (2020, p.1906) apontam que o ácido ascórbico exerce múltiplos efeitos sobre a viabilidade e metabolismo das células imunes humanas e é armazenado em leucócitos. Mitmesser et al (2016, p 1161) discorrem que o armazenamento em leucócitos é em concentrações 50 a 100 vezes maiores do que no plasma e essas concentrações conferem efeitos protetores nas células imunes.

Carr et al. (2007, p.300) descobriram em um estudo observacional que 75% dos pacientes gravemente enfermos tinham níveis plasmáticos de vitamina C abaixo do normal, devido ao aumento do metabolismo ocasionado por uma resposta inflamatória hiperativa.

A ASC parece exercer um papel protetor em doenças infecciosas virais agudas e crônicas, que são caracterizadas pelo excesso de produção de radicais livres e danos ao DNA (KAUR, ROWE e STOVOLD, 2009). Doenças infecciosas crônicas são caracterizadas pela desregulação imunológica e pelo

metabolismo celular prejudicado, que induzem um agravamento progressivo do estresse oxidativo (CAR, 2020, p133).

A ASC modulava o microambiente tecidual em pacientes com câncer, reduzindo níveis de citocinas pró inflamatórias, curiosamente, interleucina (IL)-1 e IL-6 nesses pacientes exerceram benefícios contra a recidiva do câncer (BORETTI e BANIK, 2020, p.100). Gorkom e col (2018, P.41) descrevem que o ASC parece ter um papel importante na indução da diferenciação e maturação das células T, ou seja, estimulação de células imunes.

ASC também modula as citocinas envolvidas na inflamação e na resposta imune (KAUR, ROWE e STOVOLD, 2009, p. 200). Segundo Berretta (2020, p. 1182) a incubação de linfócitos sanguíneos com ASC induzida por lipopolisacarídeo (LPS) reduziu o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e interferon (IFN)- $\gamma$ , citocinas pró inflamatórias, e aumentou a expressão do IL-10 antiinflamatório.

Tan et al (2020, p.7560) informa que o impacto de uma suplementação de vitamina C na duração de um resfriado e na prevenção ou tratamento de pneumonia ainda é questionado.

## 1.5. VITAMINA C E CÂNCER

De acordo com o INCA (Instituto nacional do Câncer) (2020), câncer é um termo utilizado para representar mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações, é definido como uma enfermidade multicausal crônica, em que as células possuem crescimento descontrolado. O desenvolvimento de suas variadas formas resulta de uma interação entre

fatores endógenos e ambientais (INCA, 2010). A incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando no mundo (BRAY, 2014). Segundo Castillo-Velarde (2019, p.95) a relação entre vitamina C e câncer é bem complexa.

Mikiriva et al (2017, p.670) relatam que o consumo de vitamina C tem efeitos benéficos na prevenção do desenvolvimento de mutações, uma vez que o estresse oxidativo tem papel importante na origem e disseminação do câncer. Por outro lado, indivíduos com câncer tendem a ter baixos níveis plasmáticos de vitamina C e menos resposta à suplementação, que pode ocorrer devido ao aumento da absorção de vitamina C pelas células tumorais (DA MATA et al, 2016, p.680)

Rohenkohl, Carniel e Colpo (2011, p. 107) descrevem que os antioxidantes por si só conseguem controlar o crescimento tumoral sem produção de toxicidade, com menor eficiência do que as drogas antitumorais, mas quando administrados juntos consegue-se o efeito desejado. Estudos a respeito dessa associação mostram a grande importância da manutenção dos níveis desses nutrientes para o paciente oncológico visando proporcionar maior sobrevida e melhoria da qualidade de vida (BURSAC´-MITROVIC´, 2016, p. 29).

Rohenkohl, Carniel e Colpo (2011, p. 107) realizaram uma pesquisa em 2011 e analisaram o consumo de antioxidantes, dentre eles a vitamina C, em pacientes nos diferentes ciclos de tratamento quimioterápico e observaram que o consumo desta vitamina foi adequado em todos os ciclos em 71 % dos dias.

## 1.6. VITAMINA C E LEUCEMIAS

A leucemia é um câncer que tem início nas células-tronco da medula óssea no qual a formação de células sanguíneas doentes (câncer) atrapalha a produção das células sanguíneas saudáveis da medula óssea, fazendo com que seu número fique anormal (ABRALE, 2019). Pode ser classificada como “aguda” ou “crônica” de acordo com a velocidade de crescimento das células doentes e como “mieloide” ou “linfoide” a partir do tipo de glóbulos brancos produzidos na medula óssea (ABRALE, 2020).

### 1.6.1. LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC)

Para Bollmann e Giglio (2011, p.236) a leucemia mieloide crônica (LMC) constitui uma desordem mieloproliferativa, que se caracteriza pela presença de uma mutação adquirida, a qual afeta a célula tronco hematopoiética. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica como uma “neoplasia mieloproliferativa” (quando a medula óssea produz células sanguíneas em excesso) (ABRALE, 2019, p 10).

Um cromossomo é um grupo organizado de DNA, substância encontrada no núcleo de cada célula e que contém as instruções genéticas que coordenam o seu desenvolvimento e funcionamento (SOUZA et al, 2013, p.220). Montenegro, Valporto e Veith (2008, p.5) explicam que os 46 cromossomos das células somáticas humanas são compostos de 23 pares.

No caso da LMC ocorre quebra errada nos cromossomos 9 e 22 (SOUZA, 2013, p.220). Quando os pedaços quebrados que tem o gene BCR e o gene ABL desses cromossomos se juntam, formam o gene BCR-ABL no

chamado cromossomo Philadelphia e “Ph” é a sua abreviação (BOLLMANN e GIGLIO, 2011, p 236).

Pacientes com LMC têm uma superprodução de glóbulos brancos e uma evolução lenta no crescimento das células doentes (HAMERSCHLAK, 2008, p 84). “[...] Isso pode causar anemia, fadiga, infecções e outros problemas, mas alguns pacientes são assintomáticos e a doença é descoberta em um exame comum [...]” (ABRALE, 2019, p. 12).

### 1.6.2 LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA (LMA)

Na leucemia mieloide aguda (LMA), uma série de mutações genéticas nas células-tronco resulta na formação de blastos, células que ficam “presas” nos estágios anteriores ao amadurecimento e se multiplicam de forma descontrolada. (ABRALE, 2020, p 8). Os blastos também se desenvolvem rapidamente na medula óssea, se acumulam e passam a atrapalhar o desenvolvimento de células saudáveis (HAMERSCHLAK, 2008, p 84). No diagnóstico da LMA, o número de células saudáveis (células vermelhas, brancas e plaquetas) pode cair e, neste momento o indivíduo começa apresentar anemia, infecções e sangramentos (MARTINS e FALCÃO, 2000, p.57).

### 1.7. CÉLULAS K562

As células K562 foram estabelecidas a partir de derrame pleural de mulher de 53 anos com leucemia mieloide crônica em crise de explosão terminal (YANG, CAI e MENG, 2016, p. 17). As células são não-aderentes e arredondadas, são positivas para o gene BCR:ABL, podendo ser usadas como um alvo altamente sensível para ensaios *in vitro* (MARK et al, 2016, p. (40). Estudos recentes mostraram que as explosões de K562 são células

malignas hematopoiéticas que se diferenciam espontaneamente em progenitores reconhecíveis das séries eritrócito, granulócito e monocítica (KARIMIANI et al, 2014, p.183).

Yang, Cai e Meng (2016, p.18) expõem que as células K562 fazem parte do painel de linha de células cancerígenas NCI-60 usado pelo Instituto Nacional de Câncer.

Recente relatórios do nosso grupo e de outros mostraram que pacientes com neoplasias hematológicas são frequentemente deficientes em vitamina C plasmática, por motivo desconhecido (HUIJSKENS et al, 2016, p.8). Estudos em cultura de tecidos têm mostrado que a restauração da vitamina C em concentrações normais podem potencializar os efeitos do DNA metil-inibidores da transferase (DNMTis) (LIU et al, 2016, p.10238).

De acordo com Gilbert et al (2019, p.143), pacientes com malignidades hematológicas são frequentemente deficientes em vitamina C, que é essencial para a conversão induzida por TET de 5-metilcitosina (5mC) em 5-hidroximetilcitosina (5hmC), um processo chave na progressão e agressividade das malignidades hematológicas [52]. Diante de todo exposto, o presente estudo hipotetizou que a suplementação com vitamina C pode inibir a hiperativação inflamatória induzida por infecções bacterianas.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar se a suplementação com vitamina C é capaz de inibir a hiperativação das células de leucemia mieloide crônica (K-562) e se há envolvimento da sinalização purinérgica.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar resposta inflamatória das células K562 suplementadas com vitamina C através:

- Resposta das citocinas pró inflamatórias (interleucina 6 e fator tumoral TNF-  $\alpha$ );
- Resposta inflamatória das células K562 através da resposta das citocinas anti inflamatórias (interleucina1 e interleucina 10);
- Resposta da proteína klotho.

### **3. ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO**

#### **Vitamin C Supplementation Inhibits Hyperactivation of Chronic Myeloid Leukemia Cells Induced by Lipopolysaccharide Involving Purinergic Signaling**

Daniela A Pires<sup>1</sup>, Maysa AR Brandão-Rangel<sup>2</sup>, Anamei Silva-Reis<sup>2</sup>,  
Fabiana R S Olímpio<sup>3</sup>, Flavio Aimbire<sup>3</sup>, Carlos R Oliveira<sup>4</sup>, José R Mateus<sup>4</sup>,  
Lucas S Zamarioli<sup>5</sup>, Juliana M B Santos<sup>2</sup>, Rodolfo P Vieira<sup>1</sup>

1- Universidade Brasil, Post-graduation Program in Bioengineering, Rua Carolina Fonseca 235, São Paulo – SP, Brazil, 08230-030.

2- Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Post-graduation Program in Science of Human Movement and Rehabilitation, Avenida Ana Costa 95, Santos – SP, Brazil, 11060-001.

3- Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Department of Science and Technology, Rua Talim 330, São José dos Campos – SP, Brazil, 12231-280.

4- Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Post-graduation Program in Biomedical Engineering, Rua Talim 330, São José dos Campos – SP, Brazil, 12231-280.

5- Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Department of Pharmacology, Rua Três de Maio 100, São Paulo – SP, Brazil, 04044-020.

#### **Corresponding author**

Rodolfo P Vieira, Prof Dr

Universidade Brasil, Post-graduation Program in Bioengineering, Rua Carolina Fonseca 235, São Paulo – SP, Brazil, 08230-030

rodrelena@yahoo.com.br

+55 12 99141-0615



## **Abstract**

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasm, characterized by overproduction of white blood cells, with the patients presenting anemia, fatigue, infections, bleeding, and other problems. Thus, an important goal for CML patients is to prevent infections and inhibit the exacerbation of inflammatory processes. In this context, the present study investigated whether vitamin C could inhibit hyperinflammatory activation of K-562 cells induced by LPS and whether purinergic signaling is involved in such response. Two doses of vitamin C were used (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 2 hours prior LPS (10ng/mL) for 22 hours in K-562 cells ( $3 \times 10^5$  cells/mL/well). The results demonstrated that both doses of vitamin C significantly reduced LPS-induced the release of IL-6 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p < 0.01$  and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$   $p < 0.01$ ) and TNF-alpha (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p < 0.01$  and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$   $p < 0.01$ ). In contrast, both doses of vitamin C induced the release of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p < 0.01$  and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$   $p < 0.01$ ). In addition, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  of vitamin C induced the release of klotho(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$   $p < 0.01$ ), an anti-aging and anti-inflammatory protein. Importantly, vitamin C (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p < 0.01$  and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$   $p < 0.01$ ) reduced ATP release and accumulation in the extracellular milieu as well as reduce the expression at mRNA levels of P2X7 receptor, suggesting a possible mechanism of action. Therefore, we conclude that vitamin C inhibits hyperinflammatory state induced by LPS in K-562 cells involving purinergic signaling.

**Keywords:** ascorbic acid, vitamin C, purinergic signaling, leukemia, cytokines, inflammation.

## **1. Introduction**

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasm, associated with a cytogenetic abnormality on the Philadelphia (Ph) chromosome, resulting in a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22. The CML affects mainly adults and presents an incidence of 1–2 cases per 100 000 adults[1-3].

CML patients have an overproduction of white blood cells and usually have a slow evolution in the growth of diseased cells over time. This can cause anemia, fatigue, infections, bleeding, and other problems. But some patients are completely asymptomatic, and the disease is frequently discovered after routine hematological examinations. The disorder starts with a non-lethal overproduction of leukocytes, which soon evolves into leukemia, due to accentuated leukocytosis with a predominance of immature myeloid precursors and sometimes platelets. The CML disease develops slowly and progressively, but the signs and symptoms begin to appear after the number of leukocytes reach 30 to 90 thousand[4].

Owing to the presence of elevated neutrophil counts with normal humoral and cellular immune function, in the chronic phase of CML there are few occurrences of infections [5]. However, in the first months of treatment, there is an increase of infections in CML patients as a result of neutropenia observed in this period. Currently, the therapy for CML is based on the molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs) that potently interfered with the interaction between the BCR-ABL1 oncoprotein and adenosine triphosphate (ATP), blocking cellular proliferation of the malignant clone[4]. In addition, the

selective inhibitory of TKIs, such as, imatinib mesylate, on BCR-ABL1 oncoprotein, has been demonstrated by competing ATP-binding site [6].

In this context, although vitamin C deficiency is infrequent in the general population, patients with cancer often present reduced levels of vitamin C [7]. In fact, reduced cellular levels of vitamin C may facilitate the cells to turn into leukemia cells [8]. On the other side, high doses of vitamin C may lead leukemic cells to die [9]. Furthermore, vitamin C supplementation is thought to improve health related quality of life in leukemia patient [10]. Of note, vitamin C is also capable to restores the cellular sensitivity to imatinib, a BCR/ABL tyrosine kinase inhibitor, which is the most promising drug in use actually for CML treatment [11]. In this view, considering the TKIs, such as imatinib present a crosstalk with purinergic signaling and that vitamin C also can act via purinergic signaling [12], the present study investigates whether vitamin C may inhibit chronic myeloid cells hyperactivation by modulating purinergic signaling, notably ATP-induced P2X7 receptor activation.

## **2. Experimental section**

### **2.1. Human Cell Culture Study**

K-562 cell line, a human blood (chronic myelogenous leukemia) cell, was obtained from Rio de Janeiro Cell Bank and cultured in RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal calf serum and with 100 µg/ml of streptomycin and 100 UI/ml of penicillin, at concentration of  $3 \times 10^5$ /mL/well in 48 wells plate, at a humidified atmosphere into a CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) [13].

The cells were pre-treated with vitamin C (5ug/mL and 10ug/mL; Sigma Chemical Co., USA) for 2 hours and then stimulated with lipopolysaccharide from gram negative bacteria (LPS; 10ng/mL; Escherichia coli 026:B6; L3755, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 22 hours. The cells and supernatant were recovered, centrifuged at 900g, for 5 minutes at 4°C and then supernatant immediately used for ATP measurement and latter for cytokines measurement. The cells were washed using phosphate buffered saline (PBS) and then subjected to RT-PCR protocol.

## **2.2. Cytotoxicity assay by MTT assay**

The cell viability of control, LPS, and vitamin C at the following concentrations (0.1; 1; 10; 100; and 1000µg/mL)-treated cells were measured using a standard MTT assay. Briefly,  $5 \times 10^4$  viable cells were seeded into clear 96-well flat-bottom plates (Corning USA) in DMEM high glucose medium supplemented with 10% fetal bovine serum and pre-treated with 5ug/mL and 10ug/mL for 2 hours and then stimulated with LPS (10ng/mL) for 22h. Then, 10µL/well of MTT (5mg/mL) were added and the cells were incubated for 4h. Following incubation, 100µL of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution in deionized water were added to each well and left overnight [13]. The absorbance was measured at 595nm in a benchtop multimode reader SpectraMax i3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

## **2.3. Adenosine Triphosphate (ATP) Measurement**

The ATP concentration was determined in the cell culture supernatant immediately after cell collection by using the ATPlite Luminescence Assay System (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's

instructions. The readings were done using the SpectraMax i3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The results were expressed in mmol/mL [14].

#### **2.4. Cytokines Measurement**

The levels of IL-1RA (DY280), IL-6 (DY206), IL-10 (DY217), TNF-alpha (DY210) and Klotho (DY5334-05) were measured in the cell culture supernatant by using DuoSet ELISA kit (R&D Systems; Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's recommendations. The readings were done using the multireader platform SpectraMax i3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The results were expressed as pg/mL [14].

#### **2.5. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)**

Total RNA of treated and untreated K562 cells were performed using Trizol® (GIBCO-BRL, Gaithersburgh, MD., USA), according to classical protocol following the manufacturer's instruction.  $\beta$ -actin was used as a control and correction factor for the expression of P2X7 receptor, for which the sequences of primers are described as follow:  $\beta$ -actin forward (5'GTGGGCCGCTCTAGGCACCA3') and reverse primers (5'CTCTTTGATGTCACGCACGATTTTC3' 540 bp) [15] and P2X7 forward, 5'-AGATCGTGGAGAATGGAGTG-3', and (5'-TTCTCGTGGTGTAGTTGTGG-3') reverse primers [16].

#### **2.6. Statistical Analysis**

The software Graph Pad Prism 5.0 was used to perform the statistical analysis and build the graphs. The results were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) from at least three independent experiments.

Paired data was evaluated by Student's t-test. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for multiple comparisons, followed by the Bonferroni test for comparison among the groups. A p value <0.05 was considered significant.

### **3. Results**

#### **3.1. Effects of LPS and Vitamin C on Cell Viability**

Figure 1 shows the effects of increasing doses of vitamin C (0.1, 1, 10, 100, 1000 $\mu$ M) on cell viability. Considering the IC<sub>80</sub>, the dose to reduce 20% of cell viability was higher than 10 $\mu$ M, demonstrating and reinforcing the safety of vitamin C supplementation.

#### **3.2. Effects of LPS and Vitamin C on Pro and Anti-inflammatory Cytokines**

Figure 2 shows the effects of Vitamin C (5 and 10ng/mL) on pro-inflammatory (Figure 2B, IL-6 and Figure 2D, TNF-alpha) and anti-inflammatory cytokines (Figure 2B, IL-1ra, Figure 2C, IL-10 and Figure E) released by K-562 cells. While LPS (10ng/mL) induced the release of IL-6 (Figure 2B, p<0.01) and TNF-alpha (Figure 2D, p<0.01), 2 hours of pre-treatment of vitamin C at both doses (5 and 10 $\mu$ g/mL) significantly reduced LPS-induced the release of IL-6 (Figure 2B, p<0.01) and TNF-alpha (Figure 2D, p<0.01). No differences were observed for the anti-inflammatory cytokine IL-1ra (Figure 1A) for LPS and for vitamin C. In contrast, the levels of IL-10 were shown to be increased in LPS+vitamin C 5 $\mu$ g/mL (Figure 2C; p<0.01) and LPS+vitamin C 10 $\mu$ g/mL. Regarding the release of klotho, LPS significantly inhibited klotho release compared to control group (Figure 2E; p<0.05), while

only the dose of 10µg/mL of vitamin C positively increasing klotho release (Figure 2E;  $p < 0.01$ ).

### **3.3. Effects of LPS and Vitamin C on Purinergic Signaling**

Figure 3 shows the levels of adenosine triphosphate (ATP) (Figure 3A) in K-562 and on the mRNA expression of P2X7 receptor (Figure 3B) of cells pretreated with Vitamin C (5 or 10 µg/mL) for 2 hours and then stimulated with LPS (10ng/mL) for 24 hours. LPS-stimulated cells presented higher levels of ATP compared to control ( $p < 0.01$ ), while the cells pre-treated with Vitamin C for both doses of 5µg/mL ( $p < 0.01$ ) and 10µg/mL ( $p < 0.05$ ), resulted in significant decrease of ATP. In addition, LPS-stimulated cells presented higher expression of P2X7 receptors compared to control ( $p < 0.01$ ), while the cells pre-treated with Vitamin C, but only for the dose of 10µg/mL ( $p < 0.05$ ), resulted in significant decrease of expression of P2X7 receptor.

## **4. Discussion**

This study shows for the first time that vitamin C supplementation can prevent chronic myeloid cancer cells (K-562 cells) hyperactivation, as demonstrated by reduced release of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  and by increased release of anti-inflammatory cytokine IL-10 and Klotho, involving concomitant reduction of ATP release and consequent reduction in the expression of P2X7 receptor.

Increased levels of pro-inflammatory mediators, which may also reflect hyperactivation of myeloid cancer cells, is implicated in increased proliferation

and higher survival of cancer cells [17]. In this regard, IL-6, which is a pleiotropic cytokine centrally involved in inflammation and cancer development, is increased in patients with different types of myeloid cancer [18]. Also, increased levels of IL-6 create a favorable microenvironment for development of infectious process, which are extremely dangerous and often follow cancer patients [19]. In addition, increased expression of IL-6 receptor, due to increased IL-6 release, is pointed out as a possible promising target for diagnosis and therapeutic purposes in myelomas [17]. In the present study, it was observed that LPS increased IL-6 release by K-562 cells and the both doses (5 $\mu$ g/mL and 10 $\mu$ g/mL) significantly reduced IL-6 release. These results point out the potential role of vitamin C supporting the control or inhibiting the inflammatory process in chronic myeloid cancer cells. However, whether this inhibitory effect of vitamin C on IL-6 release may result in reduced cell proliferation or in other functional effects need to be further investigated. For instance, the possible role of vitamin C reducing leukemogenesis and the induction of malignance in untransformed cells, once IL-6 is one of the cytokines involved in these processes [19], certainly is a hypothesis that need to be tested.

Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) is a pro-inflammatory cytokine, involved in several process in health and disease [20]. TNF-alpha is produced by all leukocytes, but also by different tumor cells, including CML cells [21]. In the context of chronic myeloid leukemia, increased plasma/serum levels of TNF-alpha are normally found [21]. In fact, TNF-alpha has been described as a key regulator of all steps of malignancies, such as tumorigenesis, increases in cancer cell proliferation and survival, angiogenesis, cellular invasion, and



metastasis [22]. In addition, TNF-alpha induces the release of bigger amounts of other pro-inflammatory cytokines, perpetuating the inflammatory processes [21, 22]. In the present study, we found that LPS-induced K-562 cells release TNF-alpha. On the other side, it was observed that both doses of vitamin C (5µg/mL and 10µg/mL) strongly reduced TNF-alpha release, denoting a potent anti-inflammatory of vitamin C supplementation. In fact, the present study is limited to demonstrate this important inhibitory effect of vitamin C administration, without an evidence of functional effectiveness in terms of its possible effects on all steps of malignancies, as described above. Herein, this hypothesis must be tested, at least as an adjunct therapy for chronic myeloid leukemia, once the actual gold standard treatment for chronic myeloid leukemia, the imatinib, exert part of its effects by down-regulating TNF-alpha in CML patients [21].

Interleukin 10 (IL-10) was originally described as cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF) once its main effects are related to inhibition of cytokine production [23]. Actually, IL-10 is known to be produced by several cell types including dendritic cells, macrophages, B cells, various subsets of CD4+ and CD8+ T cells [24], including lung structural cells [25]. In addition, IL-10 exert its anti-inflammatory effects by inhibiting DCs activation and maturation as well as antigen presentation [26], which results in reduced release of many pro-inflammatory cytokines, such as IL-1beta, IFN-gamma and TNF-alpha [24-26]. In the present study, we found that K-562 cells, when stimulated with LPS and treated with 5 ug/mL or 10 ug/mL of vitamin C, responded to increased release of IL-10, suggesting a potential role of vitamin C to induce IL-10 release by K-562 cells. So, this particular mechanism can be a potential way to fight

leukemia cells, once the main anti-cancer drugs, like gold standard imatinib, also works blocking the release of pro-inflammatory cytokines [21]. In addition, a study has demonstrated that vitamin C supplementation is capable to restore the sensitivity of the cells to imatinib [11]. However, although we found that both doses, 5 ug/mL or 10 ug/mL, of vitamin C stimulate the release of IL-10 by K-562 cells, whether these effects can result in inhibition of K-562 proliferation, needs to be further investigated.

Another protein involved in cancer biology including cancer cell proliferation is klotho. Klotho was first discovered as an anti-ageing protein, particularly into the kidneys [27], although it was further and additionally linked to several age-related diseases, such as cardiovascular, renal, musculoskeletal, and neurodegenerative conditions [27]. Herein, a growing number of studies has pointed out the potential role of Klotho in cancer biology [27]. In fact, cancer, and aging share underlying pathophysiological mechanisms, such as time-dependent accumulation of DNA damage, genomic instability, increased mutagenesis, and in both cases, reduced levels of klotho are found [27]. So, this study found that LPS stimulation resulted in reduced release of klotho by K-562 cancer cells and demonstrated for the first time that vitamin C at 10 ug/mL can reestablish klotho release, while reduced the levels of IL-6 and TNF-alpha and increased IL-10. However, the mechanism by whether vitamin C induces klotho release needs to be further investigated.

These regulations of pro and anti-inflammatory response can be attributed to several regulatory mechanism [28-30]. In this context, purinergic signaling, particularly through the up regulation and activation of P2X7 receptor induced by increased ATP accumulation in the extracellular milieu,

have been pointed out as a key mediator of several aspects of cancer [30, 31]. Herein, the present study demonstrated that LPS stimulation induced an increased ATP release by K-562 cells, with followed by an up-regulation of P2X7 receptor in such cells. In fact, P2X7 activation classically induces IL-6 release [32], while P2X7 deletion inhibit such response [33]. Furthermore, as observed in the present study, vitamin C, at both doses, 5 ug/mL and 10 ug/mL, reduced ATP release and the expression of P2X7 receptor in K-562 cells. Of note, such response was followed by reduced release of pro-inflammatory cytokine, such as IL-6 and TNF-alpha, suggesting purinergic signaling as a possible pathway for the anti-inflammatory effects of vitamin C in the context of LPS-induced activation of K-562 cells.

## **5. Conclusions**

So, in conclusion, vitamin C inhibits hyperactivation of K-562 cells induced by LPS by damping purinergic signaling.

## **6. Acknowledgements**

This study was supported by Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), grant #2012/15165-2. MARBR holds a PhD fellowship from FAPESP (#2019/05739-0). ASR holds a MSc fellowship from FAPESP (#2019/11244-4).

## References

1. Singh, P., et al., *Combating TKI resistance in CML by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway in combination with TKIs: a review*. *Med Oncol*, 2021. 38(1): p. 10.
2. Huang, X., J. Cortes, and H. Kantarjian, *Estimations of the increasing prevalence and plateau prevalence of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy*. *Cancer*, 2012. 118(12): p. 3123-7.
3. Society, A.C., *Cancer facts & figures 2014*. 2014: American Cancer Society.
4. Jabbour, E. and H. Kantarjian, *Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring*. *Am J Hematol*, 2018. 93(3): p. 442-459.
5. Kin, A. and C.A. Schiffer, *Infectious Complications of Tyrosine Kinase Inhibitors in Hematological Malignancies*. *Infect Dis Clin North Am*, 2020. 34(2): p. 245-256.
6. Willig JB, Vianna DRB, Beckenkamp A, Beckenkamp LR, Sévigny J, Wink MR, Buffon A, Pilger DA. Imatinib mesylate affects extracellular ATP catabolism and expression of NTPDases in a chronic myeloid leukemia cell line. *Purinergic Signal*. 2020 Mar;16(1):29-40. doi: 10.1007/s11302-019-09686-x. Epub 2020 Jan 18.
7. Gillberg L, Ørskov AD, Liu M, Harsløf LBS, Jones PA, Grønbæk K. Vitamin C - A new player in regulation of the cancer epigenome. *Semin Cancer Biol*. 2018 Aug;51:59-67. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.11.001. Epub 2017 Nov 2.
8. Cimmino L, Dolgalev I, Wang Y, Yoshimi A, Martin GH, Wang J, Ng V, Xia B, Witkowski MT, Mitchell-Flack M, Grillo I, Bakogianni S, Ndiaye-Lobry D, Martín MT, Guillaumot M, Banh RS, Xu M, Figueroa ME, Dickins RA, Abdel-Wahab O, Park CY, Tsirigos A, Neel BG, Aifantis I. Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression. *Cell*. 2017 Sep 7;170(6):1079-1095.e20. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.032. Epub 2017 Aug 17.
9. Agathocleous M, Meacham CE, Burgess RJ, Piskounova E, Zhao Z, Crane GM, Cowin BL, Bruner E, Murphy MM, Chen W, Spangrude GJ, Hu Z, DeBerardinis RJ, Morrison SJ. Ascorbate regulates haematopoietic stem cell function and leukaemogenesis. *Nature*. 2017 Sep 28;549(7673):476-481. doi: 10.1038/nature23876. Epub 2017 Aug 21.
10. Foster MN, Carr AC, Antony A, Peng S, Fitzpatrick MG. Intravenous Vitamin C Administration Improved Blood Cell Counts and Health-Related Quality of Life of Patient with History of Relapsed Acute Myeloid Leukaemia. *Antioxidants (Basel)*. 2018 Jul 16;7(7):92. doi: 10.3390/antiox7070092.
11. Tarumoto T, Nagai T, Ohmine K, Miyoshi T, Nakamura M, Kondo T, Mitsugi K, Nakano S, Muroi K, Komatsu N, Ozawa K. Ascorbic acid

- restores sensitivity to imatinib via suppression of Nrf2-dependent gene expression in the imatinib-resistant cell line. *Exp Hematol.* 2004 Apr;32(4):375-81. doi: 10.1016/j.exphem.2004.01.007.
12. Pfeiffer ZA, Guerra AN, Hill LM, Gavala ML, Prabhu U, Aga M, Hall DJ, Bertics PJ. Nucleotide receptor signaling in murine macrophages is linked to reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med.* 2007 May 15;42(10):1506-16. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.010. Epub 2007.
  13. Barbosa CM, Oliveira CR, Nascimento FD, Smith MC, Fausto DM, Soufen MA, Sena E, Araújo RC, Tersariol IL, Bincoletto C, Caires AC. Biphosphinic palladacycle complex mediates lysosomal-membrane permeabilization and cell death in K562 leukaemia cells. *Eur J Pharmacol.* 2006 Aug 7;542(1-3):37-47. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.06.004. Epub 2006 Jun 10.
  14. Garcia M, Santos-Dias A, Bachi ALL, Oliveira-Junior MC, Andrade-Souza AS, Ferreira SC, Aquino-Junior JCJ, Almeida FM, Rigonato-Oliveira NC, Oliveira APL, Savio LEB, Coutinho-Silva R, Müller T, Idzko M, Siepmann T, Vieira RP. Creatine supplementation impairs airway inflammation in an experimental model of asthma involving P2 × 7 receptor. *Eur J Immunol.* 2019 Jun;49(6):928-939. doi: 10.1002/eji.201847657. Epub 2019 Apr 18.
  15. S. Alonso, A. Minty, Y. Bourlet, M. Buckingham. Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates. *J. Mol. Evol.*, 23 (1986), pp. 11-22.
  16. Ferrari D, Idzko M, Dichmann S, Purlis D, Virchow C, Norgauer J, Chiozzi P, Di Virgilio F, Luttmann W. P2 purinergic receptors of human eosinophils: characterization and coupling to oxygen radical production. *FEBS Lett.* 2000 Dec 15;486(3):217-24. doi: 10.1016/s0014-5793(00)02306-1.
  17. Camacho X, Perroni C, Machado CL, Carneiro CG, Junqueira MS, Faria D, García MF, Fernández M, Oddone N, Benech J, Buchpiguel CA, Cerecetto H, Chammas R, Riva E, Cabral P, Gambini JP. 99mTechnetium- or Cy7-Labeled Fab(Tocilizumab) as Potential Multiple Myeloma Imaging Agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2021 Jan 4. doi: 10.2174/1871520621999210104181238. Online ahead of print.
  18. Wang XS, Shi Q, Shah ND, Heijnen CJ, Cohen EN, Reuben JM, Orłowski RZ, Qazilbash MH, Johnson VE, Williams LA, Mendoza TR, Cleeland CS. Inflammatory markers and development of symptom burden in patients with multiple myeloma during autologous stem cell transplantation. *Clin Cancer Res.* 2014 Mar 1;20(5):1366-74. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2442. Epub 2014 Jan 14.
  19. Wang L, Wang M, Dou H, Lin W, Zou L. Sirtuin 1 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in chronic myelogenous leukemia k562 cells through interacting with the Toll-like receptor 4-nuclear factor kappa B-reactive oxygen species signaling axis. *Cancer*

Cell Int. 2020 Mar 6;20:73. doi: 10.1186/s12935-020-1152-z. eCollection 2020.

20. Holbrook J, Lara-Reyna S, Jarosz-Griffiths H, McDermott M. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Res*. 2019 Jan 28;8:F1000 Faculty Rev-111. doi: 10.12688/f1000research.17023.1. eCollection 2019.
21. Zbaar SA. Serum level of TNF-alpha in patients with chronic myeloid leukemia on Imatinib therapy. *Tikrit Medical Journal* 2017;22(1):54-60.
22. Balkwill, F. Tumour necrosis factor and cancer *Nat Rev Cancer*. (2009).9(5): 361-371.
23. Fiorentino, D. F., M. W. Bond, T. R. Mosmann. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170: 2081-2095.
24. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*. 2008 May 1;180(9):5771-7. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5771.
25. Alberca-Custódio RW, Greiffo FR, MacKenzie B, Oliveira-Junior MC, Andrade-Sousa AS, Graudenz GS, Santos AB, Damaceno-Rodrigues NR, Castro-Faria-Neto HC, Arantes-Costa FM, Martins Mde A, Abbasi A, Lin CJ, Idzko M, Ligeiro Oliveira AP, Northoff H, Vieira RP. Aerobic Exercise Reduces Asthma Phenotype by Modulation of the Leukotriene Pathway. *Front Immunol*. 2016 Jun 14;7:237. doi: 10.3389/fimmu.2016.00237. eCollection 2016.
26. Mackenzie B, Andrade-Sousa AS, Oliveira-Junior MC, Assumpção-Neto E, Brandão-Rangel MA, Silva-Renno A, Santos-Dias A, Cicko S, Grimm M, Müller T, Oliveira AP, Martins MA, Idzko M, Vieira RP. Dendritic Cells Are Involved in the Effects of Exercise in a Model of Asthma. *Med Sci Sports Exerc*. 2016 Aug;48(8):1459-67. doi: 10.1249/MSS.0000000000000927.
27. Sachdeva A, Gouge J, Kontovounisios C, Nikolaou S, Ashworth A, Lim K, Chong I. Klotho and the Treatment of Human Malignancies. *Cancers (Basel)*. 2020 Jun 23;12(6):1665. doi: 10.3390/cancers12061665.
28. Almeida-Oliveira AR, Aquino-Junior J, Abbasi A, Santos-Dias A, Oliveira-Junior MC, Alberca-Custodio RW, Rigonato-Oliveira NC, Salles-Dias LP, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Arantes-Costa FM, Ligeiro-Oliveira AP, Belvisi MG, Vieira RP. Effects of aerobic exercise on molecular aspects of asthma: involvement of SOCS-JAK-STAT. *Exerc Immunol Rev*. 2019;25:50-62.
29. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*. 2014 May 15;509(7500):310-7. doi: 10.1038/nature13085.
30. Schmid S, Kübler M, Korcan Ayata C, Lazar Z, Haager B, Hoßfeld M, Meyer A, Cicko S, Elze M, Wiesemann S, Zissel G, Passlick B, Idzko M. Altered purinergic signaling in the tumor associated immunologic

- microenvironment in metastasized non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2015 Dec;90(3):516-21. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.10.005. Epub 2015 Oct 9.
31. Drill M, Jones NC, Hunn M, O'Brien TJ, Monif M. Antagonism of the ATP-gated P2X7 receptor: a potential therapeutic strategy for cancer. *Purinergic Signal*. 2021 Mar 17. doi: 10.1007/s11302-021-09776-9. Online ahead of print.
  32. Shieh CH, Heinrich A, Serchov T, van Calker D, Biber K. P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF- $\alpha$  in cultured mouse microglia. *Glia*. 2014 Apr;62(4):592-607. doi: 10.1002/glia.22628. Epub 2014 Jan 28.
  33. Larrouyet-Sarto ML, Tamura AS, Alves VS, Santana PT, Ciarlini-Magalhães R, Rangel TP, Siebert C, Hartwig JR, Dos Santos TM, Wyse ATS, Takiya CM, Coutinho-Silva R, Savio LEB. P2X7 receptor deletion attenuates oxidative stress and liver damage in sepsis. *Purinergic Signal*. 2020 Dec;16(4):561-572. doi: 10.1007/s11302-020-09746-7. Epub 2020 Oct 22.

### Figure Legends

**Figure 1.** Effects of different doses of vitamin C (0.1, 1, 10, 100, 1000 $\mu$ M) on cell viability. Considering the IC<sub>80</sub>, correspond to the dose able to reduce in 20% the cell viability.

**Figure 2.** Results of the concentrations of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) (A), IL-6 (B), IL-10 (C), tumor necrosis factor-alpha (TNF-A) (D), and klotho (E) obtained in the control, LPS-stimulated cells and pre-treated with Vitamin C (5 or 10 $\mu$ g/mL) for 2 hours and treated with LPS (1 $\mu$ g/mL) for 24 hours. Statistical analyses of two-way repeated-measures ANOVA test are presented as mean and standard deviation (SD) with a p value of \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

**Figure 3.** Effects of LPS stimulation and Vitamin C supplementation (5 or 10 10 $\mu$ g/mL) on adenosine triphosphate (ATP) concentrations (Figure 3A) obtained in the cells pre-treated with Vitamin C (5 or 10 $\mu$ g/mL) for 2 hours and

stimulated with LPS (10ng/mL) for 24 hours in K-562 cells. Effects of LPS stimulation and Vitamin C supplementation (5 or 10 10 $\mu$ g/mL) on the expression of mRNA of P2X7 receptor (Figure 3B) in K-562 cells. All assays have been performed in triplicate and the mean  $\pm$  standard deviations are shown as \* $p$ <0.05 versus LPS-treated cells or #  $p$ <0.05 versus LPS + Vitamin C-treated cells. The mRNA levels were determined using real-time qRT-PCR.



#### 4. Considerações Finais

O intuito deste trabalho foi verificar se a suplementação de vitamina C era capaz de inibir a ativação das células K562 através do envolvimento de sinalização purinérgica, avaliando, também o comportamento das citocinas pró inflamatórias e anti-inflamatórias e o comportamento da proteína Kloto.

Observamos que em ambas as doses de suplementação de vitamina C (5µg/ml e 10µg/ml) houve redução da citosina pró inflamatória (IL-6) o que mostra que a vitamina C tem potencial no controle ou inibição do processo inflamatório das células de LMC, também houve redução do fator tumoral TNF- $\alpha$ , que é considerado um regulador chave nas doenças malignas, induzindo a liberação de citocinas pró inflamatórias. A redução do TNF- $\alpha$  é conveniente ao tratamento de pacientes com câncer.

Verificamos um aumento na IL-10, a qual exerce papel anti-inflamatório contribuindo para a redução de citocinas pró inflamatórias e TNF- $\alpha$ . Esse aumento na IL-10 pode ser comparado com o Imatinibe, fármaco “padrão ouro” utilizado no tratamento de pacientes com LMC e que age bloqueando a liberação de citocinas pro -inflamatórias;

Neste estudo, as células K562 estimuladas com LPS, aumentou positivamente a liberação da proteína Kloto. A proteína Kloto contribui com a redução das citocinas pró inflamatórias e TNF- $\alpha$  e aumento das citocinas anti-inflamatórias.

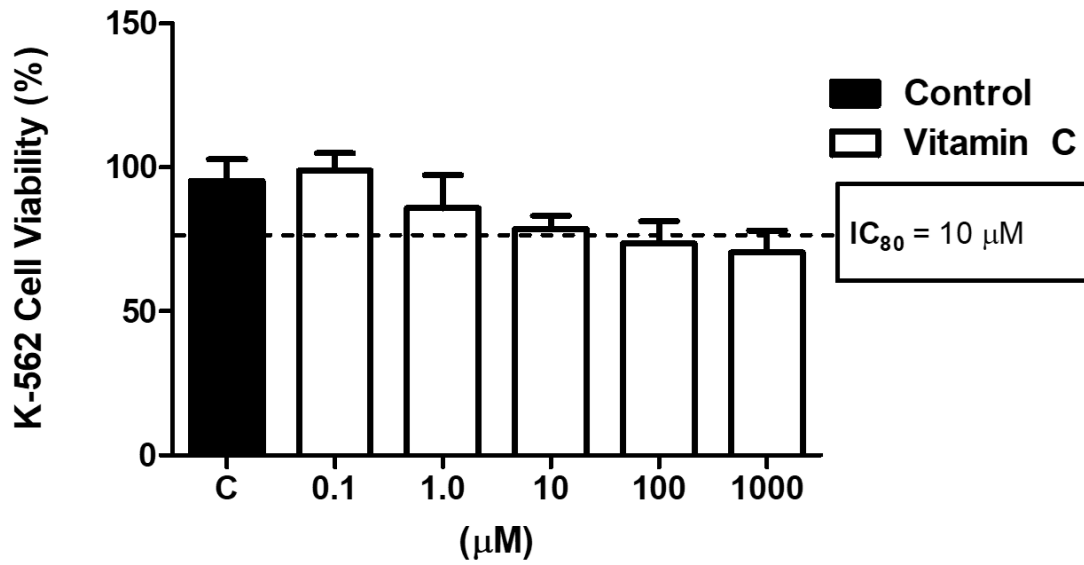
Outra descoberta é que níveis de ATP das células K562 estimulados com LPS aumentada, o que induz a liberação da IL-6, mas teve seu nível

reduzido quando tratado com as doses de vitamina C. As células estimuladas com LPS tem maior expressão do receptor P2x7 em relação ao grupo controle, porém só houve redução significativa desse receptor na suplementação de 10µg/mL de vitamina C.

Diante de todo exposto, em conclusão, a vitamina C inibe a hiperativação das células K-562 induzida por LPS por meio do amortecimento da sinalização purinérgica.

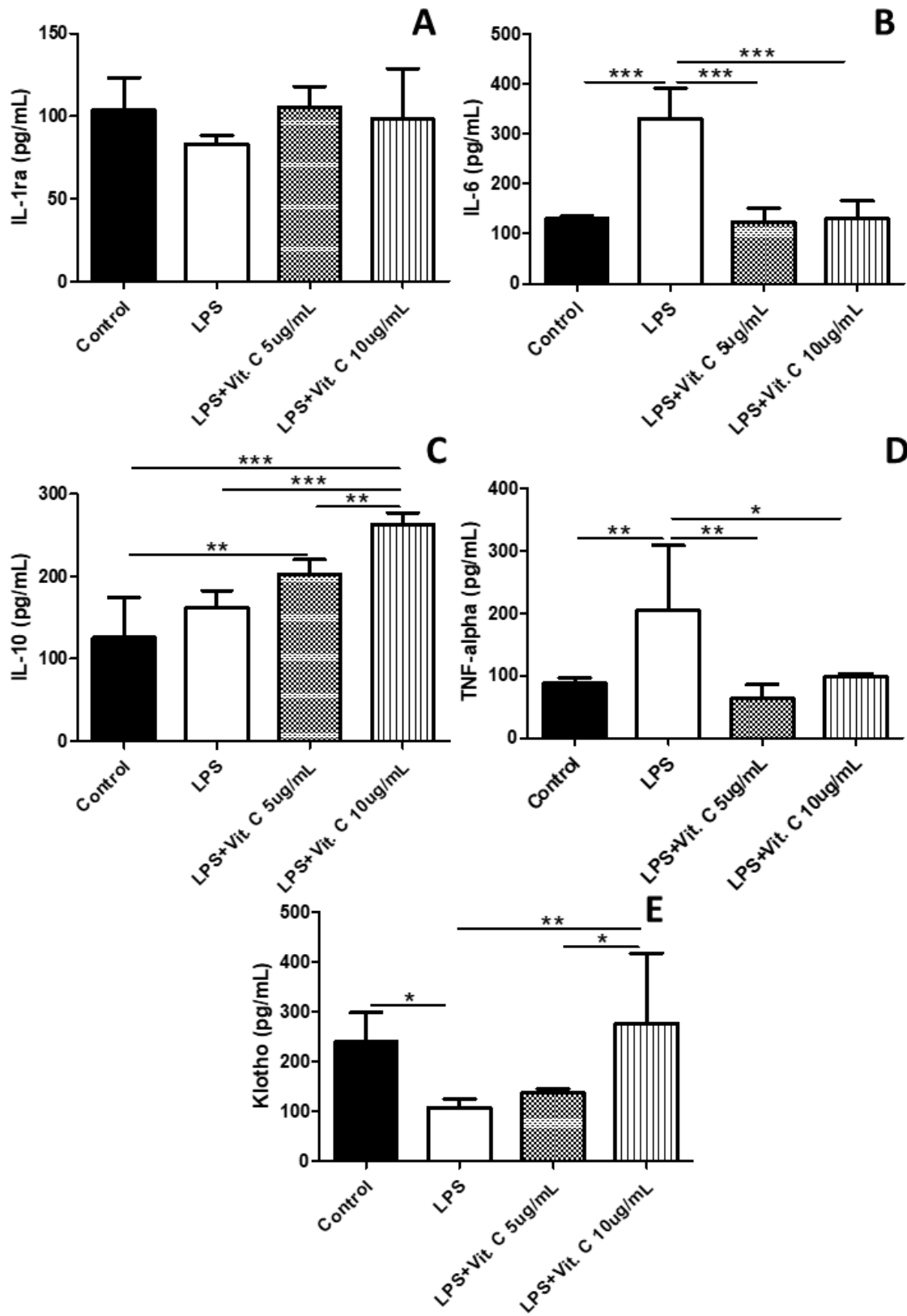
## 5 - FIGURAS

FIGURA 1 – Efeitos de diferentes doses de vitamina C



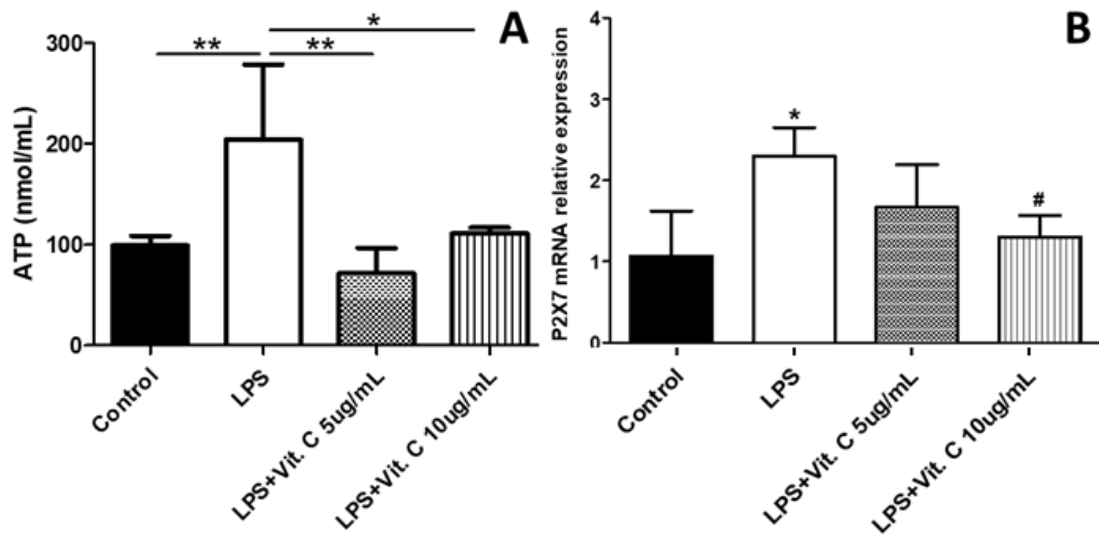
Fonte: autoria própria

FIGURA 2 - Citocinas



Fonte: autoria própria

FIGURA 3 – ATP P2X7



Fonte: autoria própria

## 6 - REFERÊNCIAS

ARANHA, F. Q. et al.; O papel da vitamina c sobre as alterações orgânicas no idoso; maio/ago 2000; Rev. Nutr., Campinas, 13(2): 89-97.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA (ABRALE) – Manual de Leucemia Mielóide Crônica, 2019; p 1-20.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA (ABRALE) – Manual de Leucemia Mielóide Aguda, 2020; p 1-21.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NUTROLOGIA (ABRAN) posicionamento a respeito de Micronutrientes e probióticos na infecção por Covid19, 01 de Maio de 2020.

BERRETTA, M.; Multiple Effects of Ascorbic Acid against Chronic Diseases: Updated Evidence from Preclinical and Clinical Studies - Antioxidants 2020, 9, 1182.

BERRETTA, M.; QUAGLIARIELLO, V.; MAUREA, N.; Di FRANZIA, R.; SHARIFI, S.; FACCHINI, G.; RINALDI, L.; PIEZZO, M.; MANUELA, C.; NUNNARI, G.; MONTOPOLI, M.; Múltiplos Efeitos do Ácido Ascórbico contra Doenças Crônicas: Evidências Atualizadas de Estudos Pré-Clínicos e Clínicos. Antioxidantes (Basileia). 2020 Nov 26;9(12):1182.

BOLLMANN, P. W.; DEL GIGLIO, A.; - Leucemia mieloide crônica: passado, presente, futuro; Einstein. 2011; 9 (2 Pt 1):236-43.

BORETTI, A.; BANIK, B. K.; Intravenoso ASC para redução de citocinas tempestade em síndrome de angústia respiratória aguda. Pharma Nutrition 2020, 12, 100190.

BRAY, F. et al.; Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.

BRAY, F. et al.; Planning and developing populations-based cancer registration in low-and middle-income settings. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2014. (IARC technical publication, n. 43).

BURSAĆ-MITROVIĆ, M.; MILOVANOVIĆ, D.; MITIĆ, R.; JOVANOVIĆ, D.; SOVRLIĆ, M.; VASILJEVIĆ, P.; TOMOVIĆ, J.; MANOJLOVIĆ, N.; Efeitos do Ácido L-Ascórbico e Alfa-Tocopherol em parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo induzido pela natação no soro dos cobaias. Tradit. Complementar. O Altern. A Med. 2016, 13, 29-33.

CARR, A.C. Um novo ensaio clínico para testar ASC de alta dose em pacientes com COVID-19. Crit. Care **2020**, 24, 133.

CASTILLO-VELARDE, E. R.; Vitamina C en la salud y en la enfermedad Rev. Fac. Med. Hum. 2019, vol.19, n.4, pp.95-100.

CAVALARI, T. G. F.; SANCHES, R. A.; OS EFEITOS DA VITAMINA C, Revista Saúde em Foco– Ano: 2018 p749-765.

CHALYA, P. L.; MABULA, J. B.; DASS, R. M.; MBELENGE, N., MSHANA, S. E.; GILYOMA, J. M.; Ten-year experiences with tetanus at a Tertiary hospital in Northwestern Tanzania: A retrospective review of 102 cases. World J Emerg Surg. 2011;6:20.

CHEN, Y.; ZHOU, Z.; MIN, W.; Mitocôndrias, Estresse Oxidativo e Imunidade Inata. Frente. Physiol. 2018 ,9, 1487.

CRAPO, J. D.; Estresse oxidativo como iniciador da liberação de citocinas e dano celular. EUR. Respir. J. 2003 , 22, 4s-6s.

DA MATA A. M. O. F.; ALENCAR M. V. O. B.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; SILVA, B. B.; Ácido ascórbico na prevenção e tratamento do câncer. Ver Assoc Med Bas 2016; 62(7): 680-686.

DOUGLAS, C. R.; – Tratado de Fisiologia Aplicada à Nutrição – Robe Editorial, 2020 p 120-127.

Duncan, M. T.; DELUCA, T. A.; KUO, H. Y.; YI, M.; MRKSICH, M.; MILLER, W. M.; SIRT1 is a critical regulator of K562 cell growth, survival, and differentiation Exp Cell Res. 2016 May 15; 344(1): 40–52.

DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S.; Ciências Nutricionais- São Paulo- Editora Sarvier, 1998 p203-205.

FIGUEROA-MÉNDEZ, R.; RIVAS-ARANCIBIA, S.; Vitamina C na saúde e na doença: seu papel no metabolismo das células e estado de redox no cérebro. Front Physiol 2015; 6: 397.

GILLBERG, L, et al.; Oral vitamin C supplementation to patients with myeloid cancer on azacitidine treatment: Normalization of plasma vitamin C induces epigenetic changes; 2019, Clin Epigenetics, 11(1):143.

GILLBERG, L, et al.; Vitamina C - um novo jogador na regulação do epigenoma do câncer, 2017, Semin Cancer Biol.; 51: 59–67.

GIRARD, S.; KADHIM, H.; ROY, M.; LAVOIE, K.; BROCHU, M. E.; LAROUCHE, A.; SEBIRE, G.; Papel do perinatal inflamação na paralisia cerebral. Pediatr. Neurol. 2009, 40, 168-174.

GORKOM, G. N. Y.; WOLTERINK, R. G. J. K.; ELSSEN, C. H. M. J. V.; WIETEN, L.; GERMERAAD, W. T. V.; BOS, G. M. J. Influência do ASC em Linfócitos: Uma Visão Geral. *Antioxidantes*, 2018, 7, 41.

HAMERSCHLAK, N.; Leukemia: genetics and prognostic factors. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(4 Suppl):S52-57.

HASSELHOLT, S.; TVEDEN-NYBORG, P.; LYKKESFELDT, J.; Distribuição de ASC e tecido específico com saturação precoce do cérebro e glândulas suprarrenais seguindo regimes diferenciais de dose oral em cobaias. *Nutr.* **2015**, 113, 1539-1549.

HEMIL, H.; CHALKER, E.; Vitamina C para prevenir e tratar o resfriado comum. *Syst Rev* 2013; 1.

HUIJSKENS, M. J. A. J. et al.; Os níveis séricos de ácido ascórbico são reduzidos em pacientes com hematológicas malignidades; 2016, *Res Immunol.*; 6: 8–10.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), Estimativas 2020: Incidência câncer no Brasil, 2020. Rio de Janeiro (Brasil); 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2011. Rio de Janeiro (Brasil); 2010.

KAMINSKA, B.; MAPK vias de sinalização como alvos moleculares para terapia anti-inflamatória – de mecanismos para benefícios terapêuticos. *Biochim. Biophys. Acta* 2005 , 1754, 253–262.

KARIMIANI, E.G.; CASAMENTO, F.; MERRITT, A.J.; BURTHEM, J.; BYERS, R.J.; DAY, P.J.; " Uma única célula análise de K562 células : um resistentes ao imatinib subpopulação é aderente e tem regulada positivamente a expressão de BCR-ABL de ARNm e proteína ". 2014, *Hematologia Experimental* . 42 (3): 183– 191.

KAUR, B.; ROWE, B.; STOVOLD, suplementação e ASC para asma. *Syst. Rev.* **2009**.

KOGUT, M.; LEE, A.; SANTIN, E.; Microbiome and pathogen interaction with the immune system. *Poult. Sci.* **2020**, 99, 1906–1913.

KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J.; Caminhos de transdução de sinal de proteína quinase ativada por mitogênio nos mamíferos ativado por estresse e inflamação. *Physiol. Rev.* 2001 , 81, 807–869.

LAURIDSEN, C.; Do estresse oxidativo à inflamação: equilíbrio redox e sistema imunológico. *Poult. Sci.* 2019, 4240-4246.



LI Y, SCHELLHORN HE. Novos desenvolvimentos e novas perspectivas terapêuticas para a vitamina C. J Nutr 2007; 137: 2171 -84. [PubMed ]

LIU, M.; OHTANI, H .; ZHOU, W .; ØRSKOV, A.D.; CHARLET, J.; ZHANG, Y.W.; et al. Vitamina C aumenta o mimetismo viral induzido por 5-aza-2'-desoxicitidina, 2016, Proc Natl Acad Sci; 113: 10238–44.

LOPES, N.; Qual a importância da vitamina C para a saúde? Série Micronutrientes – Revista Nutri Total Pro 10 de junho de 2019.

LYKKESFELDT, J.; TVEDEN-NYBORG, P.; A Farmacocinética da Vitamina, C. *Nutrientes* **2019**, 11, 2412.

MAIO, J. M.; A família Slc23 de transportadores ascorbate: garantindo que você receba e mantenha sua dose diária de vitamina C. Br J Pharmacol 2011; 164(7): 1793-801.

MANELA-AZULAY, M.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; PEREZ, M. A.; FILGUEIRA, A. L.; CUZZI, T.; Vitamin C, Anbras Dermatol, Rio de Janeiro, 78(3):265-274, maio/jun. 2003.

MARCOS, A.; NOVA, E.; MONTERO, A.; Alterações no sistema imunológico são condicionadas pela nutrição. EUR. J.Clin. Nutr. 2003, 57, S66-S69.

MARTINS, S.L.R.; FALCAO, R.P.; A importância da imunofenotipagem na Leucemia Mielóide Aguda. Rev. Assoc. Med. Bras., 2000, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 57-62.

MIKIROVA, N.; CASCIARI, J.; RIORDAN, N.; HUNNINGHAKE, R.; Experiência clínica com administração intravenosa de ácido ascórbico: níveis alcançáveis no sangue para diferentes estados de inflamação e doença em pacientes com câncer. J Transl Med 2013; 11: 191.

MITMESSER, S.H.; SIM, Q.; EVANS, M.; COMBS, M.; Determinação de concentrações de plasma e leucócito ASC em um ensaio randomizado, duplo-cego, controlado por placebo com Ester-C. Springerplus **2016**, 25, 1161.

MOHAMMED, B.M.; SANFORD, K.W.; FISHER, B.J.; MARTIN, E.J.; CONTAIFER, D. Jr.; WARNCKE, U.O.; WIJESINGHE, D.S.; CHALFANT, C.E.; BROPHY, D.F.; FOWLER, A.A.; NATARAJAN,R.; Impact of high dose vitamin C on platelet function. World J Crit Care Med. 2017 Feb 4;6(1):37-47.

MONACELLI, F.; ACQUARONE, E.; GIANNOTTI, C.; BORGHI, R.; et al. Vitamina C, envelhecimento e Doença de Alzheimer. *Nutrientes* 2017; 9(7): 670.

MONTENEGRO, V. da S.; VALPORTO, V. M.; SANTOS, O.; VEITH, M.; Análise citogenética na leucemia mielóide crônica Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba, v. 10, n. 3, p. 5 - 12, 2008.

MOYNAN, D.; O'RIORDAN, R.; O'CONNOR, R.; MERRY, C.; Tetanus – a rare but real threat. ID Cases. 2018;12:16-17.

NEMET, I.; MONNIER, V.M.; Produtos de degradação de vitamina C e caminhos na lente humana. J Biol Chem 2011; 286(43): 37128-37136.

PORCELLI, S.A.; Imunidade inata; Kelley e Firestein's Textbook of Rheumatology, 2017, 10ª ed.; cap. 17; JR, Eds.; Elsevier: Amsterdã, Holanda, 2017; 247–287.

ROHENKOHL, C. C.; CARNIEL, A. P.; COLPO, E.; Antioxidants consumption during chemotherapy treatment, ABCD Arq Bras Cir Dig, 2011;24(2): 107-112.

ROSSETTI, C. A.; REAL J. P.; PALMA, S.D.; Alta dose de ácido ascórbico usada no tratamento de Sars Covid-19: Scien-Suporte técnico e científico para sua implementação terapêutica - Ars Pharm. 2020; 61 (2): 145-148.

SANTOS, H.S., SOUZA CRUZ, W.M.; A Terapia Nutricional com Vitaminas Antioxidantes e o Tratamento Quimioterápico Oncológico. Ver Bras Cancerologia, Rio de Janeiro 2001; 47(3): 303-08.

SOARES, A. W.; MAIA, L. F. M.; VISCONTI, V.; SANTO, J. E.; OLIVEIRA, I.; Escorbuto, Deveria Deixar de Ser Uma Surpresa? Medicina Interna vol.27 n2 Lisboa abr. 2020 p161-164.

SOUZA, C. A. et al; Leucemia mieloide crônica. Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo, 2013; v. 59, n. 3, p. 220-232.

STADTFELD, M.; APOSTOLOU, E.; FERRARI, F.; CHOI, J.; WALSH, R.; CHEN, T.; OOI, S.; KIM, S.; BESTOR, T.; SHIODA, T.; et al. O ácido ascórbico previne a perda de impressão Dlk1-Dio3 e facilita a geração de camundongos células iPS de células B terminantemente diferenciadas. Genet. **2012**, *44*, 398-405.

STRÖHLE, A.; HAHN, A.; ASC und Immun function.; Med. Monatsschrift Pharm. 2009, 32, 49–54.

TAN, S.H.S.; HONG, C.C.; SAHA, S.; MURPHY, D.; HUI, J.H. Medicamentos em pacientes COVID-19: Resumindo a literatura atual de uma perspectiva ortopédica. Orthop. **2020**, *12*, e 7560.

VILLAGRAN, M. et al.; Una mirada actual de la vitamina C en salud y enfermedad. Rev. chil. nutr., Santiago, 2019, v. 46, n. 6, p. 800-808.

YANG, C.; CAI, H.; MENG, X.; Polifilina D induz apoptose e diferenciação em células de leucemia humana K562; 2016, *Imunofarmacologia interna*, 36: 17–22.