



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

JULIANA MARIA LIBÓRIO EULÁLIO

**CONCENTRAÇÕES DE ZINCO E COBRE E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Teresina
2017

JULIANA MARIA LIBÓRIO EULÁLIO

**CONCENTRAÇÕES DE ZINCO E COBRE E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Métodos Diagnósticos e Análise das Condições de Saúde

Linha de Pesquisa: Nutrição e Saúde

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

Teresina
2017

Universidade Federal do Piauí
Serviço de Processamento Técnico
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde

E88c Eulálio, Juliana Maria Libório.
Concentrações de zinco e cobre e sua relação com marcadores de estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama / Juliana Maria Libório Eulálio. -- 2017.
53 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, 2017.
“Orientadora: Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira.”
Bibliografia

1. Câncer de mama. 2. Estresse oxidativo. 3. Antioxidantes. I. Título.
II. Teresina – Universidade Federal do Piauí.

CDD 616.99449

JULIANA MARIA LIBÓRIO EULÁLIO

**CONCENTRAÇÕES DE ZINCO E COBRE E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Métodos Diagnósticos e Análise das Condições de Saúde

Linha de Pesquisa: Nutrição e Saúde

Aprovado em: 14 / 07 / 2017

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

1º Examinador: Profa. Dra. Liliane Viana Pires

2º Examinador: Profa. Dra. Ione Maria Ribeiro Soares Lopes

Teresina
2017

*À minha família, pelo apoio
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado mais essa oportunidade de crescimento e por ser sempre a minha fonte de força e amparo em todos os momentos da minha vida.

À minha família, em especial aos meus pais, Socorro Libório e Gentil Eulálio, pelo amor dedicado a mim em todos esses anos e pela oportunidade de estudo e formação pessoal. Ao meu esposo Fábio pelo apoio, paciência, companheirismo e incentivo incansável aos meus projetos de vida. Ao meu filho Mateus, por ser tão compreensivo e por me incentivar na reta final do projeto. Às minhas irmãs pela amizade e presença constante em minha vida.

À professora Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira, por ter aceitado ser minha orientadora, pela confiança na minha capacidade para a execução desse trabalho, pela compreensão nos momentos de dificuldade e de ajustes no projeto e acima de tudo pelo seu modo de ser, de orientar e de ensinar.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI), ao Departamento de Nutrição, à Coordenação do Programa de Pós- Graduação em Alimentos e Nutrição e a todos os professores e funcionários que contribuíram para meu aprendizado. Agradeço de forma especial às professoras Marize Melo, Clélia Moura Fé, Mercês de Araújo, Martha Siqueira, Adriana de Azevedo e Socorro Alencar pelo incentivo e amizade.

Às professoras Dilina do Nascimento, Regina Célia (*in memoriam*) e Betânia de Jesus pelas contribuições na qualificação do projeto.

Ao Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais - NPPM, ao Departamento de Biofísica e Fisiologia - UPFI, à professora Dra. Maria do Carmo e aos amigos Benedito, Karoline e Giovany, pela valiosa ajuda na análise de SOD e TBARS.

Ao Laboratório de Química Analítica da UFPI e ao grupo GERATEC da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), especificamente ao professor Dr. Edivan Carvalho e aos amigos Mikael e Thomas pela disponibilidade e orientações no processo de pré-digestão das amostras e análises de zinco e cobre.

Ao Laboratório de Nutrição Experimental – LANEX e às amigas do grupo de pesquisa em câncer de mama: Luana Mota, Camila Revoredo, Fabiane Sampaio e Gilmara Peres, pela ajuda nas coletas e análises. Às amigas Nina, Susy e Nayane Pierot pela disponibilidade em ajudar e orientações.

Aos colegas de turma pela amizade verdadeira nessa jornada, e de forma especial ao Paulo Victor e à Vanessa Lira, que não mediram esforços para ajudar sempre que precisei.

Aos colegas Cinthya Vivianne e Thiago Hipólito pela parceria.

Ao Israel pela contribuição nas análises estatísticas.

Ao Hospital Getúlio Vargas - HGV e toda sua equipe de profissionais, em especial à Dr^a. Patrícia e Dr. Benedito Borges pela viabilização nas coletas de dados.

Às pacientes que aceitaram participar da pesquisa, bem como aos seus familiares, minha eterna gratidão por terem sido muito solícitas, mesmo em momento delicado de suas vidas.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

EULÁLIO, J. M. L. **Concentrações de zinco e cobre e sua relação com marcadores de estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama.** 2017. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI.

INTRODUÇÃO: O câncer de mama é um dos maiores problemas de saúde pública, sendo a neoplasia mais prevalente entre pessoas do sexo feminino e a causa mais comum de morte nesse grupo. O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o sistema de defesa antioxidante, promove danos à biomoléculas e desempenha papel importante na promoção e progressão do câncer de mama. O sistema de defesa antioxidante pode impedir a formação dos radicais livres e favorecer a reconstituição das estruturas biológicas lesadas, reduzindo os danos causados pelas espécies reativas. A superóxido dismutase é uma enzima antioxidante, essencial na defesa do organismo contra radicais livres e que possui zinco e cobre como cofatores. Estes oligoelementos são considerados nutrientes com propriedades antioxidantes, com papel fundamental na prevenção e progressão do câncer de mama. Este trabalho avaliou as concentrações de zinco e cobre plasmáticos e sua relação com marcadores do estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama. **METODOLOGIA:** Estudo analítico de corte transversal, realizado com 90 mulheres, entre 20 e 50 anos, assistidas em hospital público do estado do Piauí, que foram distribuídas em dois grupos: Grupo caso (n=45) composto por mulheres com câncer de mama e Grupo controle (n=45) por mulheres com doença benigna da mama. As concentrações de zinco e cobre plasmáticos foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica de chama. A análise da peroxidação lipídica foi realizada a partir da determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) por meio da inibição da formação de nitrito. A análise estatística foi realizada no programa IBM Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0, adotando-se o nível de significância de 5%. Para comparação entre os grupos, correlação e associação entre as variáveis, utilizou-se os testes t-student, Wilcoxon, Spearman e teste exato de Fisher. **RESULTADOS:** As médias das concentrações de zinco ($56,13 \mu\text{g/dL} \pm 10,95$ e $44,29 \mu\text{g/dL} \pm 14,09$), e de cobre ($86,28 \mu\text{g/dL} \pm 29,57$ e $61,82 \mu\text{g/dL} \pm 17,63$), estavam significativamente mais elevadas nas mulheres com câncer de mama, em comparação com mulheres com doença benigna da mama ($p < 0,001$). Em relação ao zinco observou-se que, em ambos os grupos, as médias encontradas estão abaixo dos valores de referência adotados para este mineral. A atividade da SOD foi significativamente maior nas mulheres com câncer de mama quando comparadas às mulheres com doença benigna da mama. As concentrações de TBARS estavam elevadas nos dois grupos com diferença significativa entre os mesmos. Verificou-se correlação negativa significativa ($r = -0,346$; $p = 0,023$) entre as concentrações de TBARS e atividade da SOD eritrocitária em mulheres com câncer de mama, e associação entre a concentração de zinco plasmático e TBARS e o câncer de mama. **CONCLUSÃO:** As mulheres com câncer de mama apresentam deficiência de zinco e normocuprimia. A elevada peroxidação lipídica e o aumento da atividade da enzima superóxido dismutase, caracteriza a presença de estresse oxidativo nas mulheres com câncer de mama. A deficiência de zinco e a elevada peroxidação lipídica são fatores presentes no câncer de mama.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de Mama. Estresse Oxidativo. Antioxidantes. Zinco. Cobre.

ABSTRACT

EULÁLIO, J. M. L. **Zinc and Copper Concentrations and their Relationship with Oxidative Stress Markers in Women with Breast Cancer.** 2017. Thesis (Master) – Master's Program in Food and Nutrition, Federal University of Piauí, Teresina - PI.

INTRODUCTION: Breast cancer is one of the major public health problems, with neoplasm being the most prevalent among females and the most common cause of death in this group. The imbalance between the production of reactive oxygen species and the antioxidant defense system, promotes damage to biomolecules and plays an important role in the promotion and progression of breast cancer. The antioxidant defense system can prevent the formation of free radicals and favor the reconstitution of damaged biological structures, reducing the damage caused by reactive species. Superoxide dismutase is an antioxidant enzyme, essential in defending the body against free radicals and having zinc and copper as cofactors. These trace elements are considered nutrients with antioxidant properties, with a key role in the prevention and progression of breast cancer. This work evaluated plasma zinc and copper concentrations and their relationship with oxidative stress markers in women with breast cancer. **METHODOLOGY:** A cross-sectional, cross-sectional study of 90 women between 20 and 50 years of age, assisted in a public hospital in the state of Piauí, which were divided into two groups: Case group (n = 45) Breast cancer and control group (n = 45) by women with benign breast disease. Plasma zinc and copper concentrations were determined by flame atomic absorption spectrophotometry. The analysis of lipid peroxidation was performed by the determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and the activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) by inhibition of nitrite formation. The statistical analysis was performed in the IBM Statistical Package for Social Sciences version 20.0, adopting the significance level of 5%. The t-student, Wilcoxon, Spearman and Fisher's exact tests were used to compare groups, correlation and association between variables. **RESULTS:** Averages of zinc concentrations ($56.13 \mu\text{g} / \text{dL} \pm 10.95$ and $44.29 \mu\text{g} / \text{dL} \pm 14.09$) and copper ($86.28 \mu\text{g} / \text{dL} \pm 29.57$ and $61.82 \text{Mg} / \text{dL} \pm 17.63$) were significantly higher in women with breast cancer compared to women with benign breast disease ($p < 0.001$). In relation to zinc, it was observed that in both groups, the means found were below the reference values adopted for this mineral. SOD activity was significantly higher in women with breast cancer compared to women with benign breast disease. TBARS concentrations were elevated in the two groups with a significant difference between them. There was a significant negative correlation ($r = -0.346$; $p = 0.023$) between TBARS concentrations and erythrocyte SOD activity in women with breast cancer, and association between plasma zinc concentration and TBARS and breast cancer. **CONCLUSION:** Women with breast cancer have zinc deficiency and normocuprimia. The high lipid peroxidation and the increased activity of the enzyme superoxide dismutase, characterize the presence of oxidative stress in women with breast cancer. Zinc deficiency and high lipid peroxidation are factors present in breast cancer.

KEYWORDS: Breast Cancer. Oxidative stress. Antioxidants. Zinc. Copper.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Condições de trabalho do forno microondas para digestão de amostras sanguíneas.....27
- Tabela 2** – Valores médios e desvios padrão da idade e da menarca em anos e parâmetros antropométricos de mulheres com câncer de mama e com doença benigna da mama. Teresina – PI, Brasil, 2017.....28
- Tabela 3** - Valores médios e desvio padrão das concentrações de zinco e cobre plasmáticos nas mulheres com câncer de mama e com doença benigna da mama.....28
- Tabela 4** – Valores médios e desvios padrão da atividade enzimática da SOD eritrocitária e de concentrações plasmáticas de TBARS nos grupos caso e controle.....29
- Tabela 5** - Correlação das concentrações de zinco e cobre plasmáticos e atividade da enzima SOD eritrocitária com TBARS nas mulheres com câncer de mama e com doença benigna da mama.....29
- Tabela 6** - Análise univariada dos fatores associados ao câncer de mama.....30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹O₂ – Oxigênio singlet

CAF – Fibroblastos associados ao câncer

CAM – Macrófagos associados ao câncer

Cu – Cobre

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

EO – Estresse oxidativo

ER- α – receptor de estrogênio alfa

ERO – Espécie reativa de oxigênio

GPx - Glutathione peroxidase

GTS - Glutathione S-Transferase

Hb - hemoglobina

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HGV – Hospital Getúlio Vargas

HIF-1 α – Fator indutor de hipóxia

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

LPO – Peroxidação lipídica

MAPKS - proteína Quinase Ativada por Mitogênese

MDA – Malondialdeído

MDA-TBA- Malondialdeído-TBA

Mn – manganês

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NPPM – Núcleo de pesquisa em plantas medicinais

NRF-2 - Fator Nuclear Eritróide 2 –(fator de transcrição)

O₂ – Ânion superóxido

O₃ – Ozônio

OH- - Radical hidroxila

PUFAs – Ácidos graxos poli-insaturados

RNA – Ácido ribonucléio

rpm – Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SOD – Superóxido dismutase

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS –Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico

TEP – Tetraetóxiopropano

TP – Timidina fosforilase

UFPI – Universidade Federal do Piauí

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

Zn – Zinco

ZnT – Transportador de zinco

ZIP - Zrt- and Irt-like proteins

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	14
2.1 Câncer de mama: aspectos clínicos, epidemiológicos e etiológicos	14
2.2 Estresse oxidativo e câncer de mama	15
2.3 Marcadores de estresse oxidativo: TBARS e SOD	17
2.4 Papel do zinco e cobre no câncer de mama	20
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4 METODOLOGIA	24
4.1. Caracterização do estudo e protocolo experimental	24
4.2 Controle de contaminação e preparo de reagentes	24
4.3 Coleta do material biológico e separação dos componentes do sangue	24
4.4 Análise dos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo e de minerais	25
4.4.1 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS	25
4.4.2 Determinação da atividade da enzima SOD eritrocitária	26
4.4.3 Determinação de zinco e cobre plasmáticos	26
4.5 Análise Estatística	27
4.6 Aspectos Éticos	27
5 RESULTADOS	28
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
APÊNDICES	44
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	45
APÊNDICE B - CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO	47
APÊNDICE C - FORMULÁRIO DE CADASTRO DA PARTICIPANTE DA PESQUISA	48
ANEXOS	49
ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	50

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um dos maiores problemas de saúde pública, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. É a neoplasia mais prevalente entre pessoas do sexo feminino e a causa mais comum de morte nesse grupo (SIEGEL; NAISHADHA; JEMAL, 2013; PARK et al., 2014; KILIC et al., 2014). Dentre as principais causas de morte, o câncer de mama ocupa o segundo lugar, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares, e entre as causas de morte por neoplasias, está na quinta posição. No Brasil, a taxa de mortalidade anual da doença é de aproximadamente 6,6 mortes por 100.000 mulheres (ANGULO et al., 2013; SOUSA, 2013).

O estresse oxidativo (EO) tem sido implicado na patogênese do câncer de mama. É definido como um distúrbio no equilíbrio entre a produção de oxidantes e sistema de defesa antioxidante. Em células de indivíduos saudáveis, os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade de defesa antioxidante estão equilibrados, entretanto, a condição de desequilíbrio favorece a produção excessiva de EROs, promovendo a lipoperoxidação, danos às proteínas e mutações ao ácido desoxirribonucleico (DNA), que desempenha papel importante na promoção e progressão do câncer de mama (HIMMETUGLU et al., 2009; MAIA; SANTOS; REIS, 2014; KILIC et al., 2014). Vale ressaltar que estudos recentes buscam ampliar o conceito de estresse oxidativo, sendo este definido, como uma interrupção da sinalização e controle redox (HALLIWELL, 2011; SIES, 2015).

O aumento da incidência de câncer de mama requer uma compreensão mais detalhada dos mecanismos envolvidos na gênese do tumor. A detecção precoce da doença aumenta as chances do tratamento ser bem sucedido, porém, as espécies reativas são instáveis, dificultando a análise das mesmas por métodos bioquímicos atuais. Sobre esse aspecto, estudos mostram que a análise dos produtos do dano oxidativo é mais viável, devido a maior estabilidade que essas substâncias apresentam (PANDE et al., 2012; KILIC et al., 2014).

Quando a produção de espécies reativa de oxigênio supera a capacidade de ação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, promove-se a oxidação de biomoléculas e os produtos dessa oxidação são metabólitos específicos, que podem ser identificados e quantificados. Tais substâncias são derivadas da oxidação de lipídeos, proteínas e DNA, e funcionam como marcadores do estresse oxidativo (VINCENT, INNES, VINCENT, 2007).

Além do sistema de defesa antioxidante enzimático, alguns oligoelementos podem desempenhar papel relevante na carcinogênese, cooperando com o sistema antioxidante na eliminação de radicais livres, como o zinco e cobre. Pesquisas mostram que a ocorrência de

vários tipos de câncer incluindo o de mama, é acompanhada tanto pelo desequilíbrio no sistema oxidante / antioxidante, quanto por alterações nas concentrações dos oligoelementos. (SIDDIQUI et al., 2006; SADATI et al., 2016). Portanto, a oferta de nutrientes antioxidantes é capaz de prevenir o desequilíbrio entre o sistema de defesa e a produção de espécies reativas geradas no processo de estresse oxidativo. Desta forma, os antioxidantes provenientes da dieta podem auxiliar tanto na prevenção do câncer de mama quanto no seu tratamento (SUHAIL et al., 2012).

Sobre esse aspecto, estudos mostram concentrações de zinco e selênio em menores quantidades em pacientes com câncer de mama, e elevadas concentrações de cobre, quando comparados a pacientes sem a doença (GUPTE e MUMPER, 2009; FENG et al., 2012).

Considerando a necessidade do desenvolvimento de novos métodos propedêuticos para detectar o câncer de mama em estágios iniciais, e que o estresse oxidativo está relacionado com o aporte de nutrientes com ação antioxidante e com o desenvolvimento e progressão da doença, a realização da pesquisa justifica-se em função do papel desses nutrientes e da identificação de marcadores de estresse oxidativo, que possam ser aplicados no diagnóstico precoce, monitoramento e prevenção da doença.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 Câncer de mama: aspectos clínicos, epidemiológicos e etiológicos

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo difundir-se para as outras regiões do corpo. Essas células quando se dividem rapidamente, tendem a ser agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas (INCA, 2016).

O câncer de mama é um grupo heterogêneo de doenças com comportamentos distintos, devido à sua complexidade e alterações moleculares. O acúmulo de mutações, alterações genéticas e instabilidades cromossômicas, estimulam a proliferação e o dano celular, prejudicando a regulação do crescimento e apoptose. A heterogeneidade deste câncer pode ser observada pelas variadas manifestações clínicas e morfológicas, diferentes assinaturas genéticas e consequentes diferenças nas respostas terapêuticas (CINTRA et al., 2012).

Um dos sintomas mais comum de câncer de mama é o aparecimento de nódulo duro e irregular ou de consistência branda, globoso e bem definido. Outros sinais podem ser: edema cutâneo semelhante à casca de laranja, linfonodos palpáveis na axila, retração cutânea, dor, inversão do mamilo, hiperemia, descamação ou ulceração do mamilo e secreção mamilar geralmente transparente, podendo ainda ser rosada ou avermelhada devido à presença de glóbulos vermelhos (INCA, 2016).

Os carcinomas invasivos com origem no epitélio ductal e no epitélio lobular são as formas mais comuns de câncer de mama. Mais de 70% dos casos têm origem no epitélio ductal, enquanto que a prevalência de carcinoma lobular está em torno de 5 a 15%. Outros tipos mais raros de câncer de mama invasivos podem ser detectados, como: carcinoma medular, mucinoso, papilífero e inflamatório. Apesar dos tumores malignos apresentarem grande variedade, possuem comportamento biológico semelhante quanto ao crescimento, invasão local, destruição dos órgãos vizinhos e disseminação regional e sistêmica (GONÇALVES et al., 2012).

O câncer de mama é o tipo de câncer mais prevalente entre as mulheres no mundo. A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde, em estimativa para o Brasil no biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer, sendo o de mama o mais frequente em mulheres e correspondendo a 58 mil

casos. A estimativa para o estado do Piauí é de 580 casos novos, ficando a capital com 40% destes (INCA 2016).

O Brasil tem acompanhado as altas taxas de incidência e mortalidade dos países desenvolvidos em relação a essa doença, entretanto, as medidas necessárias à prevenção, ao diagnóstico e ao controle da patologia, não têm atingido o mesmo crescimento (SILVA e RIUL, 2011).

O desenvolvimento da maioria dos cânceres envolve múltiplas etapas que ocorrem em longo prazo, e alguns casos podem ser evitados pela eliminação da exposição aos fatores determinantes (INCA, 2014). A etiologia do câncer de mama é multifatorial e estudos apontam idade, menarca precoce, menopausa tardia, uso de contraceptivo oral, terapia hormonal, história familiar, história de doença benigna da mama, obesidade e excesso de peso, como os principais fatores de risco para o surgimento da doença (NOURAZARIAN; KANGARI; SALMANINEJAD, 2014).

Os fatores de risco para o câncer de mama estão associados ao estresse oxidativo, que está envolvido em muitos tipos de doenças crônicas. Sabe-se ainda, que além do estresse oxidativo, o sedentarismo e hábitos alimentares inadequados, podem aumentar o risco de desenvolvimento dessa doença em 40%. Estudos mostram que dietas ricas em frutas, legumes e grãos integrais, atuam na prevenção e controle do câncer de mama, devido aos compostos antioxidantes frequentemente encontrados nesses alimentos (LIMA et al., 2008; ANJOS e HOFELMANN, 2011, GUPTA et al., 2012).

2.2 Estresse oxidativo e câncer de mama

O desenvolvimento do câncer de mama pode ser explicado, por meio da interação entre fatores ambientais, susceptibilidade genética e produção excessiva de ERO, que são produtos instáveis, provenientes da redução tetravalente sofrida pela molécula de oxigênio, que aceita elétrons durante a fosforilação oxidativa (PANDE et al., 2012; FRANÇA et al., 2013).

Estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio na proporção entre os sistemas oxidantes e antioxidantes em favor da produção elevada de espécies reativas ou em detrimento da velocidade de remoção dessas substâncias, promovendo a ocorrência de danos oxidativos (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

O estresse oxidativo é capaz de alterar muitos processos celulares incluindo o metabolismo celular, vias de sinalização, vias reguladoras de expressão gênica, proliferação celular e apoptose (CHANDRA et al., 2000; KIM et al., 2013).

As ERO são substâncias químicas que contêm oxigênio com propriedades reativas, derivadas de reações metabólicas que ocorrem na mitocôndria, nos peroxissomos e no retículo endoplasmático. Os peroxissomos estão envolvidos na produção de ERO, através da β -oxidação de ácidos graxos, e o retículo endoplasmático constitui um ambiente favorável à oxidação de proteínas, elevando a produção de espécies reativas (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013).

As ERO incluem ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot), oxigênio singlete (1O_2) e ozônio (O_3), e os danos que essas substâncias causam às células, dependem das suas concentrações intracelulares e principalmente do desequilíbrio entre as mesmas e espécies antioxidantes endógenas (SOSA et al., 2013).

A geração de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico, entretanto, quando há excesso, causa lesões oxidativas em biomoléculas. Podemos citar como exemplo, a peroxidação lipídica, caracterizada por reação em cadeia dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, alterando a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas e predispondo às neoplasias (ALVES et al., 2011).

Além da peroxidação lipídica, o estresse oxidativo causa aberrações cromossômicas, promove a oxidação de outras biomoléculas e afeta a estrutura das células, causando perda das funções biológicas. Estudos mostram que os radicais livres provenientes desse processo, estão associados aos danos na molécula de DNA, favorecendo a transformação, o crescimento celular e contribuindo para a promoção e progressão do câncer de mama (FARIAS et al., 2011; FRANÇA et al., 2013; KILIC et al., 2014).

Alterações oxidativas ocorrem frequentemente devido à atividade metabólica da mitocôndria, que durante a cadeia respiratória dá origem às espécies reativas em excesso. Essas alterações foram descritas em células cancerosas, e um número crescente de estudos têm investigado as modificações que ocorrem em tumores sólidos, especialmente no câncer de mama, pois sendo a mama um ambiente rico em lipídios, permite que haja a formação de metabólitos derivados da peroxidação lipídica, com papéis ainda não esclarecidos na promoção da tumorigênese (MENCALHA et al., 2014).

Os fibroblastos associados ao câncer (CAF), macrófagos associados ao câncer (CAM) e hipóxia são fatores que contribuem para o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em células cancerosas. As EROs derivadas da atividade desses macrófagos em

células tumorais, causam expressão aumentada do fator indutor de hipóxia (HIF-1a) e de proteínas de sinalização, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que contribui para angiogênese e progressão tumoral. Além disso, alteram a expressão do gene supressor p53, que regula a apoptose. Portanto, o estresse oxidativo causado por alterações na expressão gênica, proliferação celular, apoptose e angiogênese, desempenha papel significativo na iniciação e progressão tumoral (VIEIRA et al., 2011; BARRERA, 2012; FIASCHI e CHIARUGI, 2012; SOSA et al., 2013).

A produção excessiva de ERO, afeta vias de sinalização como a via da proteína quinase ativada por mitogênese (MAPKS), que está diretamente associada ao estresse oxidativo, por meio da fosforilação de moléculas responsáveis pela transcrição, diferenciação e iniciação da proliferação celular (BEHREND et al., 2003; VALKO et al., 2006; SILVA et al., 2009).

Além do aumento de radicais livres, mudanças ocorridas nos agentes antioxidantes, estão frequentemente relacionadas ao risco de desenvolvimento do câncer de mama. O sistema de defesa antioxidante pode impedir a formação dos radicais livres e favorecer a reconstituição das estruturas biológicas lesadas, reduzindo os danos causados pelas espécies reativas às biomoléculas (BARBOSA et al., 2010; NOURAZARIAN; KANGARI; SALMANINEJAD, 2014).

Os antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de um substrato de maneira eficiente. O sistema de defesa antioxidante é dividido em enzimático e não-enzimático. O enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase, que agem impedindo ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicais causadoras do dano oxidativo. O sistema não-enzimático é composto por substâncias antioxidantes de origem endógena ou dietética, como os minerais zinco e cobre, que atuam como co-fatores de enzima antioxidante (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). Portanto, o aumento simultâneo da produção de ERO e a diminuição da capacidade antioxidante, indicam o papel desempenhado pelo estresse oxidativo na patogênese e progressão do câncer de mama (PANDE et al., 2012).

2.3 Marcadores de estresse oxidativo: TBARS e SOD

Para que um biomarcador seja considerado ideal, deve apresentar as seguintes características: mostrar alta especificidade para o efeito de interesse; refletir o efeito desde o início; ser passível de determinação e análise fácil; ter baixo custo e ser analisado por técnica

não invasiva e de alta sensibilidade no fluido biológico escolhido (VASCONCELOS et al., 2007).

As ERO são produtos instáveis e possuem baixas concentrações nos tecidos e fluidos biológicos, e devido a essas características, a detecção dessas espécies torna-se inviável. Sobre esse aspecto, a determinação dos produtos do dano oxidativo às biomoléculas, é considerada mais eficaz, pois essas substâncias possuem maior estabilidade (MAYNE, 2003; FRANÇA et al., 2013).

Produtos derivados do estresse oxidativo são usados como biomarcadores na avaliação e diagnóstico de todos os cânceres, especialmente em neoplasias mamárias. Os marcadores do estresse oxidativo derivados da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas, são frequentemente identificados em pacientes com câncer de mama (SOSA et al., 2013; EXPÓSITO et al., 2014).

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) das membranas celulares são os principais alvos de ERO e são oxidados durante o processo de peroxidação lipídica (LPO). Os marcadores da oxidação de lipídios podem ser classificados em primários e secundários, sendo os últimos derivados da β -ruptura dos hidroperóxidos lipídicos (SOSA et al., 2013).

O malondialdeído (MDA) é um biomarcador secundário da peroxidação lipídica, derivado da β -ruptura da endociclicização de ácidos graxos polinsaturados, como ácido linoléico, araquidônico e docosahexaenóico. Atualmente é considerado um potencial biomarcador plasmático de lesão oxidativa, devido à sua fácil reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Nessa reação, uma molécula de malondialdeído reage com duas de TBA formando um cromógeno de cor vermelha, encontrado com concentração aumentada em tecidos mamários com neoplasias e que pode ser lido em comprimento de onda específico (532-535 nm) (MAYNE, 2003; VASCONCELOS et al., 2007; PANDE et al., 2012; FRANÇA et al., 2013).

Apesar de ser um método simples e de fácil execução, o teste do TBA não é específico para o MDA. O ácido tiobarbitúrico reage também com vários compostos como outros aldeídos, açúcares, aminoácidos, proteína, aminas e bilirrubina, sendo denominado de teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico – TBARS (MAYNE, 2003).

O teste de TBARS é considerado inespecífico, entretanto é amplamente aplicado, devido ao seu baixo custo quando comparado aos demais métodos. Uma adaptação desse método seria relevante, o que pode ser realizado pela associação da técnica com a separação do composto malondialdeído-TBA (MDA-TBA) por meio de cromatografia. Entre essas técnicas, pode-se destacar o HPLC, na qual o soro é acidificado para liberar o MDA ligado ao

grupo amino de proteínas (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004; GROTTO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

Os produtos da peroxidação lipídica são capazes de alterar vários mecanismos fisiológicos do corpo humano pela capacidade de reação com outras moléculas, como proteínas e DNA. Essas alterações indicam alto risco de mutações e são reconhecidas como causa de algumas patologias como o câncer. Dessa forma, o malondialdeído constitui-se tanto um biomarcador da oxidação de lípidios, quanto causa potencial de desenvolvimento do câncer (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). Sobre esse aspecto, estudos indicam que as TBARS podem ser usadas como indicador de peroxidação lipídica e tem suas concentrações aumentadas em vários tipos de neoplasias, inclusive nas mamas (SOSA et al., 2013).

Com relação ao sistema antioxidante, vale destacar a capacidade de ação do mesmo em três linhas de defesa orgânica contra as ERO. A primeira é definida pela proteção contra a formação de substâncias agressoras; a segunda linha atua na interceptação de radicais livres, e a última caracteriza-se pelo reparo que ocorre quando as duas primeiras linhas não foram completamente efetivas (ROHENKOHL; CARNIEL; COLPO, 2011).

Sobre esse aspecto, ressalta-se a atividade da enzima SOD, que é considerada um antioxidante primário, por estar diretamente envolvida na eliminação de espécies reativas. Possui um centro ativo com íon de cobre e zinco e promove a conversão de dois radicais superóxido em peróxido de hidrogênio, reduzindo a toxicidade das ERO. Suas principais formas no organismo humano incluem a ZnCu-SOD encontrada no citoplasma e núcleo da célula, a Mn-SOD nas mitocôndrias e a SOD extracelular, que também contém cobre e zinco (HATHAMA; MATHKOR; AL-HABAL, 2012; NOURAZARIAN; KANGARI; SALMANINEJAD, 2014).

Estudos mostram que a atividade dessa enzima encontra-se mais elevada no sangue de pacientes com câncer de mama, ainda nas fases iniciais da doença. A atividade da SOD pode ser utilizada como um marcador para o diagnóstico de câncer de mama, visto que nessa patologia, há um aumento das defesas antioxidantes como forma de compensar a elevada produção de radicais livres, visando à manutenção da homeostase e redução do dano oxidativo às biomoléculas (RAJNESSH et al., 2008; SOSA et al., 2013). Sendo assim, a SOD pode ser considerada uma enzima anti-carcinogênica e está associada à inibição das fases de iniciação, promoção e progressão da carcinogênese mamária (PRABASHEELA et al., 2011).

2.4 Papel do zinco e cobre no câncer de mama

O sistema não-enzimático de proteção das células contra o estresse oxidativo, inclui os antioxidantes dietéticos. Essas substâncias representam um conjunto de fatores com capacidade de reduzir a produção de ERO. Uma dieta rica em substâncias antioxidantes pode ser capaz de minimizar os danos oxidativos, além de diminuir a probabilidade de progressão do câncer (ROCKENBACH et al., 2011; VIEIRA et al., 2011).

Os efeitos anti-carcinogênicos dos alimentos consistem em sua ação antioxidante, anti-inflamatória, anti-hormonal e anti-angiogênica. Os nutrientes antioxidantes bloqueiam as ERO promovendo apoptose de células tumorais, inibindo a angiogênese e atuando como antagonistas de fatores de crescimento neoplásico. Acredita-se, que uma alimentação adequada possa prevenir de três a quatro milhões de casos novos de câncer por ano. Porém, há a necessidade de mais estudos a respeito do papel desses compostos bioativos na prevenção do câncer (SANTOS; MELO; SOUSA; 2013). Sobre esse aspecto, vale destacar o papel do zinco e do cobre como nutrientes com propriedade antioxidante no câncer de mama.

O zinco (Zn) é um mineral encontrado em vários tecidos e secreções corporais, encontra-se em sua maioria no músculo esquelético - 85-90% e sua quantidade média no adulto é aproximadamente 1,5-2,5 g. A absorção desse mineral ocorre predominantemente no jejuno, por difusão passiva e por processos mediados por carreadores. Após a absorção na borda em escova das células intestinais, a metalotioneína e a proteína intestinal rica em cisteína, regulam a concentração de zinco no organismo. As metalotioneínas são proteínas que atuam como citoprotetores celulares, neutralizando radicais livres. Vale ressaltar, que na presença de baixas concentrações do mineral, a metalotioneína regula a transferência do zinco para a proteína intestinal rica em cisteína, aumentando a velocidade de absorção desse oligoelemento (SALGUEIRO et al., 2000; MAFRA; COZZOLINO, 2004; BLINDAUER; LESZCZYSZYN, 2010; CHASAPIS et al., 2012).

Em relação ao transporte de zinco, destacam-se as famílias de genes SLC30A e SLC39A, que são conhecidas como transportadores ZnT (Zinc Transporter) e Zip (Zrt- and Irt-like proteins), respectivamente. As proteínas transportadoras da família Zip, favorecem o aumento das concentrações citoplasmáticas de zinco por meio do influxo deste mineral ou da liberação do mesmo de organelas intracelulares, e a família ZnT diminui o conteúdo intracelular de zinco por meio do efluxo do citoplasma para o meio extracelular e/ou para vesículas citoplasmáticas. Sobre esse aspecto, vale destacar o Zip-14, transportador localizado principalmente na membrana plasmática dos hepatócitos, cuja expressão está comumente

elevada durante processos inflamatórios, favorecendo baixas concentrações de zinco nos tecidos periféricos (LIUZZI et al., 2005; DEVIRGILIIS et al., 2007; CHISTIYAKOV; VORONOVA, 2009).

O zinco é um mineral essencial em várias funções no organismo. Estudos apontam esse oligoelemento como estabilizador das membranas celulares, além de favorecer a ação da insulina e possuir papel importante na manutenção do sistema imunológico. Destaca-se também, o papel que o zinco desempenha na função normal do sistema antioxidante endógeno, atuando como co-fator de enzima redutora de estresse oxidativo. Sobre esse aspecto, o zinco é componente de mais de 300 enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante a exemplo da enzima SOD, além de ser essencial na proteção de grupos sulfidrilo de proteínas e enzimas contra a oxidação, suprimindo a formação de radicais livres e prevenindo a peroxidação lipídica (MCCALL; HUANG; FIERKE, 2000; LUKASKI, 2000; POWELL, 2000; MASAKI et al., 2007).

O zinco induz a expressão da metalotioneína intracelular, proteína antioxidante capaz de se ligar a 5-7 átomos de zinco por molécula, a qual na presença de estresse oxidativo e inflamação crônica regula a transferência de átomos de zinco para outras proteínas antioxidantes zinco-dependentes, bem como desempenha importante papel na detoxificação de metais pró-oxidantes como ferro e cobre por meio de seus grupamentos sulfidrila (KIM et al., 2006; DEVIRGILIIS et al., 2007, MARET; KREZEL, 2007).

Além da atividade antioxidante, o zinco é essencial para atividades de enzimas envolvidas na síntese de DNA e RNA, como a DNA e RNA polimerase. Também influencia a divisão celular, pela atividade da dioximidina quinase e adenosina (5') tetrafosfato (5') – adenosina, o que o torna protetor para o crescimento de células cancerosas (BARGELLINI et al., 2003).

Estudos relatam que a deficiência de zinco aumenta a produção de radicais livres, representando um importante fator para a progressão do câncer. (HO, 2004; EIDE, 2011). Sendo o zinco cofator de enzimas antioxidantes como a SOD, o aumento do estresse oxidativo pode ser explicado em parte pela deficiência desse mineral no organismo, visto que estudos apontam associações entre deficiência de zinco e aumento de danos oxidativos, como oxidação de DNA e proteínas, peroxidação lipídica e declínio da atividade das principais enzimas antioxidantes contendo zinco (MARET, 2003; JOMOVA, BAROS; VALKO, 2012).

Jonh et al. (2010) apontam que a concentração de zinco apresenta alterações no soro e tecido de pacientes com carcinoma, indicando envolvimento desse mineral no desenvolvimento do câncer. Vale destacar ainda, que níveis séricos baixos de zinco podem

causar dano ao DNA e impedir os mecanismos de reparo, resultando em um potencial risco de desenvolvimento de câncer.

Outro mineral que desempenha papel fundamental no sistema de defesa antioxidante é o cobre (Cu), que é um elemento traço essencial amplamente distribuído na natureza, e que atua em diversas funções fisiológicas e bioquímicas. A maior parte desse micronutriente é obtida pelos humanos por meio da dieta, e seu consumo diário em adultos varia de 0,9 a 2,2 mg (NAGANO et al., 2005).

O cobre possui duas formas principais, a cuprosa (Cu⁺) e a cúprica (Cu²⁺) e essa característica de adotar dois estados redox, torna-o importante integrante das metaloenzimas, bem como de outras proteínas e enzimas essenciais em processos biológicos, como fotossíntese, respiração, metabolismo do ferro, função neurológica e interceptação e eliminação de radicais livres prejudiciais. É cofator de enzimas como SOD, lisil oxidase, citocromo C oxidase, sendo que 85% a 95% desse mineral no organismo encontra-se ligado covalentemente à ceruloplasmina sérica (KOZLOWSKI et al., 2014).

Assim como o zinco, o cobre tem função antioxidante por ser cofator da SOD, entretanto, quando em seu estado livre, a capacidade redox do cobre lhe permite catalisar a geração de ERO que são prejudiciais ao organismo. Esse processo está associado a danos no DNA e à oxidação de lipoproteínas presentes na maioria das doenças crônicas (RAVEH et al., 2000; PRUSEK, 2007 BREWER, 2010).

A capacidade de gerar radicais livres faz com que o cobre seja associado ao crescimento de tumores malignos, e seus níveis séricos estão significativamente elevados em vários tipos de carcinomas quando comparados ao grupo controle. Outro fator importante que merece ser destacado é o aumento de ceruloplasmina no câncer, proteína associada ao processo de angiogênese na doença (GUPTE e MUMPER, 2009; VALKO et al., 2016).

Com base no referencial teórico apresentado, pode-se verificar a importância de estudos acerca do papel dos nutrientes antioxidantes na prevenção e progressão do estresse oxidativo, bem como a relevância da análise de marcadores nutricionais que possam ser aplicados no diagnóstico precoce e monitoramento do câncer de mama.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar as concentrações plasmáticas de zinco e cobre e sua relação com marcadores do estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar as concentrações de zinco e cobre plasmáticos nas mulheres com câncer de mama e com doença benigna da mama;
- Determinar as concentrações das TBARS e atividade da enzima SOD eritrocitária nas mulheres dos grupos investigados;
- Verificar a relação entre as concentrações de zinco e cobre e marcadores de estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama e seus respectivos controles.

4 METODOLOGIA

4.1. Caracterização do estudo e protocolo experimental

O estudo analítico de corte transversal foi realizado com 90 mulheres, atendidas no setor de mastologia da clínica ginecológica do Hospital Getúlio Vargas (HGV). As mulheres foram distribuídas em dois grupos: Grupo caso (n= 45) composto por mulheres com câncer de mama e Grupo controle (n= 45) por mulheres com doença benigna da mama - fibroadenoma. A determinação do tamanho da amostra foi baseada na estimativa de atendimentos por demanda espontânea, de mulheres diagnosticadas com câncer de mama da referida clínica.

No grupo caso foram incluídas mulheres com diagnóstico histológico de câncer de mama, com idade entre 20 e 50 anos, que não tinham realizado tratamento oncológico prévio e sem recidiva do tumor. Como grupo controle, foram incluídas mulheres com diagnóstico histológico de doença benigna da mama, com a mesma faixa etária do grupo caso. Não foram incluídas, em ambos os grupos, mulheres que faziam uso de suplementos vitamínico/mineral medicamentos de uso contínuo e que apresentassem doenças crônicas como diabetes, hipertensão arterial, hipertireoidismo e outras patologias que pudessem interferir nos marcadores estudados, bem como gestantes, lactantes e fumantes.

Após o consentimento das participantes, realizou-se o agendamento pra coleta de sangue e para preenchimento do formulário de cadastro da participante da pesquisa (APÊNDICE C).

4.2 Controle de contaminação e preparo de reagentes

A vidraria e o material de polipropileno utilizado na coleta e análise do zinco e cobre foram todos desmineralizados antes do uso, em banho de solução de ácido nítrico a 30%, por no mínimo 12 horas. Posteriormente, foram enxaguados em água deionizada, no mínimo 10 vezes, secos em estufa e mantidos em recipientes hermeticamente fechados até o momento da utilização, com o objetivo de minimizar a contaminação por minerais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Todos os reagentes foram preparados e diluídos em água ultrapura.

4.3 Coleta do material biológico e separação dos componentes do sangue

Amostras de 20 mL de sangue venoso foram colhidas no período da manhã, entre 7 e 8 horas, estando as participantes da pesquisa em jejum de no mínimo 12 horas. A colheita foi realizada por técnico de enfermagem do HGV, utilizando seringas e agulhas de aço inoxidáveis, estéreis e descartáveis. O sangue colhido foi transferido para dois tubos de

ensaio: um contendo ácido etileno diamino tetracético (EDTA), para análise de TBARS e determinação da atividade da enzima SOD nos eritrócitos (10 ml) e outro contendo citrato de sódio, para análise de zinco e cobre (10 ml).

O plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 3000 rpm, durante 15 minutos a 4° C, utilizando uma centrífuga da marca CIENTEC® 4K15. Após a centrifugação, o plasma foi extraído com pipeta automática, acondicionado em microtubos de polipropileno e armazenado a -80° C em freezer, para posterior análise.

Para separação dos eritrócitos, foi utilizado o método proposto por Whithehouse et al. (1982). A massa eritrocitária obtida do sangue total foi lavada com 5 mL de solução salina isotônica a 0,9%, sendo homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos a 4° C, utilizando centrífuga CIENTEC® 4K15.

O procedimento descrito foi realizado três vezes para a completa remoção dos contaminantes dos eritrócitos. Após a última centrifugação, a solução salina foi aspirada e descartada e a massa eritrocitária foi cuidadosamente extraída com o auxílio de uma pipeta automática, transferida para microtubos de polipropileno e mantidos à temperatura de -80° C.

4.4 Análise dos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo e de minerais

4.4.1 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS

A peroxidação lipídica foi determinada pela produção de TBARS, segundo o método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), com adaptações. As análises foram realizadas em triplicatas e antes do processamento das amostras foi preparada a curva analítica de calibração, utilizando-se 1,1,3,3-tetraetóxiopropano (TEP) como padrão.

Em microtubos contendo 200 µl de plasma, foram adicionados 350 µl de ácido acético a 20% e pH 3,5 e 600 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5%, diluído em ácido acético. Em seguida, os microtubos foram incubados em banho-maria por 1 hora com agitação a 85° C e posteriormente, foram imersos em banho de gelo por 15 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 50 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 8,1%, seguido de centrifugação a 12000 rpm a 25° C por 15 minutos.

O sobrenadante foi extraído e a leitura da absorbância foi lida a 532 nm, utilizando espectrofotômetro BEL®SP 1102. Os resultados foram expressos em µM/L. As análises foram realizadas no laboratório de Biofísica do Departamento de Fisiologia da UFPI.

4.4.2 Determinação da atividade da enzima SOD eritrocitária

A determinação da atividade da enzima SOD foi realizada por meio do método proposto por DAS; SAMANTA; CHAINY (2000), adicionando em tubo de ensaio 1110 µL de tampão fosfato, 75 µL L-metionina, 40 µL de Triton X-100, 75 µL de cloreto de hidroxilamina, 100 µL de EDTA e 100 µL da amostra. Após homogeneização, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 80 µL de riboflavina aos tubos, os quais foram expostos à luz por 10 minutos. Por fim, adicionou-se 1 mL do reagente de Griess ao sistema e a leitura foi realizada a 543 nm em leitor de microplaca de elisa EZ Read 400. As análises foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais (NPPM) da UFPI. A atividade da SOD foi calculada por meio da fórmula: $SOD (U/ml) = v_0 / v - 1$; onde v_0 é a absorbância do controle e v é a absorbância do teste. Paralelo à essa análise, foram preparadas as amostras de sangue para determinação de hemoglobina, realizada pelo método calorimétrico com reagentes da Labtest Diagnóstica. Os resultados da atividade da SOD foram expressos em U/g Hb utilizando o cálculo:

$$SOD (U/g Hb) = SOD (U/ml) / [Hb] (g/ml)$$

4.4.3 Determinação de zinco e cobre plasmáticos

A determinação de zinco e cobre plasmáticos foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica de chama, utilizando o equipamento FAAS 240FS, Varian, calibrado nas seguintes condições de trabalho: comprimento de onda (λ) 213,9 nm, fenda espectral 0,7 nm, chama oxidante com mistura de acetileno e ar, e leituras com tempo de integração de 3 segundos. Como padrão de zinco e cobre foi utilizado o Tritizol® (MERCCK), com os pontos da curva preparados com água ultrapura, ácido nítrico a 65% e seguindo as concentrações de 0,00 (branco); 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5 µgZn/mL para o zinco e de 0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 µgCu/mL para o cobre.

O preparo e diluição das amostras foi realizado segundo o método proposto por Massocatto et al., (2013); Menezes (2010); e Sisti (2001), que inclui uma prévia digestão em forno microondas da marca Anton Paar, modelo Multiwave 3000, nas condições descritas na Tabela 1. Esta digestão tem por finalidade reduzir a viscosidade da amostra pela decomposição de resíduos orgânicos, deixando-a com viscosidade semelhante à da solução padrão e evitando depreciação do espectrofotômetro de absorção atômica. As amostras foram diluídas na proporção de 1:4 com volume final de 6 ml, utilizando 1.500 µl de amostra, 1.700 µl de água ultrapura, 550 µl de peróxido de hidrogênio à 30% e 2.250 µl de ácido nítrico à 65%.

Após a digestão, as amostras foram diretamente aspiradas pelo espectrofotômetro de absorção atômica e lidas em triplicata. Os resultados foram calculados a partir das absorbâncias médias obtidas e expressos em $\mu\text{g/dL}$. A classificação do estado nutricional relativo ao zinco e cobre no plasma foi realizada utilizando como referência os respectivos valores: 70-110 $\mu\text{gZn/dL}$ (GIBSON, 2005) e 70-140 $\mu\text{gCu/dL}$ (YOUNG, 1987).

Tabela 1 – Condições de trabalho do forno microondas para digestão de amostras sanguíneas. Teresina – PI, Brasil, 2017.

Temperatura	Rampa	Aquecimento	Ventilação
80°C	7 minutos	5 minutos	1
120°C	8 minutos	5 minutos	1
180°C	7 minutos	15 minutos	1
0°C	-	20 minutos	3

4.5 Análise Estatística

Para caracterização da amostra foi feito um estudo descritivo analítico através de medidas de tendência central e medidas de dispersão. O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a aderência à distribuição normal, determinando os tipos de testes estatísticos a serem utilizados. Para a comparação das médias das variáveis, foi usado o teste t de Student para amostras pareadas e o teste Wilcoxon quando as suposições paramétricas não foram atendidas. Utilizou-se a correlação de Spearman para análise de relação entre as variáveis, teste Exato de Fisher para associação entre os parâmetros e análise univariada odds ratio. O nível de significância adotado para todos os testes estatísticos foi de $\alpha = 0,05$. Os dados foram tabulados e analisados no programa IBM Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0.

4.6 Aspectos Éticos

A pesquisa é um recorte de projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE N° 43447015.8.0000.5214 do parecer 1.022.96 (ANEXO A) e aditivo 4. Todos os participantes do estudo assinaram um termo de consentimento livre, após esclarecimento a respeito da natureza da investigação, obedecendo às normas do Conselho Nacional de Pesquisa, contidas na Resolução 466/12 (APÊNDICES A e B).

5 RESULTADOS

O estudo investigou 90 mulheres com idade entre 20 e 50 anos, sendo 45 com câncer de mama (grupo caso) e 45 com doença benigna da mama (grupo controle). As médias da idade e da menarca, em anos e os parâmetros antropométricos das participantes estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores médios e desvios padrão da idade e da menarca em anos e parâmetros antropométricos de mulheres com câncer de mama e com doença benigna da mama. Teresina – PI, Brasil, 2017.

Variáveis	Grupo caso (n=45)	Grupo controle (n=45)	p-valor*
	Média ± DP	Média ± DP	
Idade (anos)	40,49 ± 6,61	31,66 ± 6,13	0,001
Menarca(anos)	13,33 ± 1,88	13,10 ± 1,18	0,381
Peso (Kg)	62,59 ± 12,26	57,71 ± 10,72	0,039
Estatura (m)	1,55 ± 0,05	1,54 ± 0,06	0,455
IMC (Kg / m ²)	26,05 ± 4,46	24,36 ± 4,55	0,118
CC (cm)	83,73 ± 10,08	81,14 ± 12,64	0,235

* Teste de Wilcoxon.

Conforme demonstrado na Tabela 3, pode-se observar que as médias das concentrações de zinco e cobre estão significativamente mais elevadas nas mulheres com câncer de mama em comparação com àquelas com fibroadenoma ($p < 0,001$). Em relação ao zinco, observa-se também que em ambos os grupos, as médias encontradas estão abaixo dos valores de referência adotados para este mineral.

Tabela 3 – Valores médios e desvios padrão das concentrações de zinco e cobre plasmáticos nas mulheres com câncer de mama e com doença benigna da mama. Teresina- PI, Brasil, 2017.

Variáveis	Grupo caso (n=45)	Grupo controle (n=45)	p-valor
	Média ± DP	Média ± DP	
Zinco (µg/dL)	56,13 ± 10,95	44,29 ± 14,09	<0,001*
Cobre (µg/dL)	86,28 ± 29,57	61,82 ± 17,63	<0,001*

*Teste t pareado; DP: desvio padrão. Valor de referência/zinco = 70 a 110 µg/dL (GIBSON, 2005). Valor de referência /cobre = 70 a 140 µg/dL (YOUNG, 1987).

A Tabela 4 mostra os valores médios da atividade da enzima SOD eritrocitária nos dois grupos investigados. Observa-se que houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre os

grupos para esse parâmetro, com maior atividade da enzima nas mulheres com câncer de mama.

Em relação à concentração plasmática de TBARS, a Tabela 4 mostra diferença significativa entre as médias dos dois grupos de mulheres ($p = 0,009$), estando às mesmas acima dos valores de referência para esse parâmetro.

Tabela 4 – Valores médios e desvios padrão da atividade enzimática da SOD eritrocitária e de concentrações plasmáticas de TBARS nos grupos caso e controle. Teresina- PI, Brasil, 2017.

Variáveis	Grupo caso	Grupo controle	p-valor
	(n=45)	(n=45)	
	Média ± DP	Média ± DP	
TBARS ($\mu\text{M/L}$)	5,8 ± 4,78	7,9 ± 2,84	<0,009*
SOD (U/g Hb)	8080,14 ± 3834,85	4818,28 ± 885,01	<0,001*

*Teste de Wilcoxon. Valor de referência/SOD = 6.500 a 14.500 U/g Hb (ARMSTRONG, 1998). Valor de referência/TBARS = 1 a 3 $\mu\text{M/L}$ (VASCONCELOS et al., 2007).

Os resultados da análise das correlações entre as concentrações de zinco e cobre plasmáticos, atividade da SOD eritrocitária e o marcador de peroxidação lipídica estão apresentados na Tabela 5. Verificou-se relação negativa significativa ($r = -0,346$; $p = 0,023$) entre a atividade da SOD e concentrações de TBARS em mulheres com câncer de mama.

Tabela 5 - Correlação das concentrações de zinco e cobre plasmáticos e atividade da enzima SOD eritrocitária com TBARS nas mulheres com câncer de mama e com doença benigna da mama. Teresina- PI, Brasil, 2017.

Variáveis	TBARS			
	Grupo caso		Grupo controle	
	R	P	R	P
Zinco ($\mu\text{g/dL}$)	-0,020	0,898	-0,179	0,262
Cobre ($\mu\text{g/dL}$)	-0,131	0,439	-0,282	0,074
SOD (U/g Hb)	-0,346	0,023*	-0,093	0,564

*Correlação significativa. (Spearman).

Buscando-se conhecer a contribuição das variáveis no câncer de mama, realizou-se a análise univariada (Tabela 6). Foram incluídas no modelo àquelas que apresentaram associação com o evento e as que tiveram $p < 0,05$. Os resultados demonstram associação entre os parâmetros zinco e TBARS com o câncer de mama.

Tabela 6 – Análise univariada dos fatores associados ao câncer de mama. Teresina- PI, Brasil, 2017.

Variáveis	p-valor	OR	IC95%
Zinco ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	0,040	1,577	0,413 - 6,016
Cobre ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	0,001	0,221	0,090 - 0,540
SOD (U/g Hb)	<0,001	0,034	0,007 - 0,158
TBARS ($\mu\text{M}/\text{L}$)	0,030	3,143	0,314 - 31,420

p-valor: teste de Fisher; IC95% = Intervalo de confiança de 95%; OR = *Odds Ratio*.

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo analisou-se a relação entre as concentrações de zinco e cobre plasmáticos e marcadores do estresse oxidativo – SOD e TBARS em mulheres com câncer de mama.

Analisando a Tabela 2 observou-se que a média das idades das mulheres com doença benigna da mama foi significativamente menor quando comparadas às mulheres com câncer de mama. Estudos mostram que o fibroadenoma pode ocorrer desde a menarca até a senectude, sendo mais comum em mulheres entre 20 e 35 anos de idade (NAZARIO; REGO; OLIVEIRA, 2007).

Verificou-se que nas mulheres de ambos os grupos, com câncer de mama e com doença benigna da mama, as concentrações médias de zinco plasmático estão abaixo dos valores de normalidade para o mineral, caracterizando o quadro de deficiência para esse parâmetro. As baixas concentrações de zinco plasmático encontradas em ambos os grupos investigados, podem ser atribuídas a mecanismos homeostáticos desse mineral, bem como à ingestão dietética insuficiente. Estima-se que 17,3% da população mundial possui consumo inadequado de zinco, estando em risco de deficiência desse metal, além disso, somente 35% do zinco ingerido é de origem animal (WESSELLS e BROWN, 2012).

Ainda sobre esse aspecto o controle homeostático do zinco em humanos é realizado pela metalotioneína e por transportadores transmembrana de zinco, que envolve as famílias ZIP/SLC39 e ZnT/SLC30 (HUANG e TEPAAMORNDEC, 2013; JEONG e EIDE, 2013). Evidências apontam a existência de aumento na expressão do transportador de zinco Zip-14, no câncer de mama, que atua como supressor do tumor maligno, ocasionando influxo de zinco nas células neoplásicas e diminuição nas concentrações plasmáticas desse mineral (WESSELLS e BROWN, 2012; HUANG e TEPAAMORNDEC, 2013). Baixas concentrações de zinco contribuem para a ocorrência de instabilidade genômica e mutações celulares, além de resistência à apoptose, características associadas à patogênese de diferentes tipos de neoplasias malignas, incluindo o câncer de mama (HANAHAN e WEINBER, 2011).

Em relação ao cobre, as concentrações do mineral nas mulheres com câncer de mama, encontram-se dentro dos valores de normalidade, podendo ser justificadas em função do cobre ser amplamente distribuído na natureza, e facilmente adquirido pela dieta, além de suas baixas recomendações diárias. Somado a esse aspecto, ressalta-se o aumento nas concentrações de ceruloplasmina no câncer de mama (WU et al, 2006; BAIERLE et al, 2010). Estudos demonstram que as concentrações de cobre aumentam em função da gravidade da

doença. Nos primeiros estágios do câncer, quando há aumento da peroxidação lipídica, o organismo tenta compensar esse processo, aumentando as concentrações da enzima SOD, que eleva a captação de cobre, zinco e magnésio, diminuindo, dessa forma, as concentrações plasmáticas desses minerais. Esse quadro é revertido, com a severidade da doença, e consequente aumento nas concentrações plasmáticas desses minerais (ZARRINI et al, 2016).

Os resultados encontrados nesse estudo relativos ao zinco e cobre plasmáticos, são apoiados por outros autores, que mostram concentrações mais elevadas de zinco e cobre em tumores malignos, quando comparados aos de natureza benigna (SIDDIQUI et al, 2006; EIDE, 2011, ZARRINI et al, 2016).

O estudo mostra que a peroxidação lipídica, avaliada por meio da concentração de TBARS está presente em ambos os grupos pesquisados, estando mais elevada nas mulheres com doença benigna da mama. A elevada peroxidação lipídica pode ser atribuída ao desequilíbrio entre a produção excessiva de ERO e o sistema de defesa antioxidante. Essa condição causa danos oxidativos à macromoléculas e mutações no DNA, favorecendo a gênese de várias doenças crônicas como, cardiovasculares, neurológicas, inflamatórias e neoplásicas (MAULIK et al., 2013).

Sobre esse aspecto, vale destacar que a ocorrência da inflamação, frequente no câncer de mama, é responsável pela produção elevada de ERO por meio da NADPH oxidase encontrada nas células cancerígenas. A inflamação provoca a ativação de neutrófilos e macrófagos que elevam a produção de ERO, causando peroxidação lipídica, instabilidade genética e crescimento seletivo de células tumorais (GOETZ e LUCH, 2008; REUTER et al., 2010). Somado a isso, a infiltração de macrófagos no tecido mamário, causada pela deficiência de zinco, está associada ao aumento da expressão do receptor de estrogênio alfa – ER α , provocando alterações ductais e aumento da fibrose na glândula mamária (BOSTANCI e MACK, 2015). Concordante com este resultado, estudo mostra concentrações maiores de TBARS em tumores benignos, comparados aos de natureza maligna (GÖNENÇ et al., 2006).

Para proteger o organismo contra o excesso de ERO e prevenir danos oxidativos às macromoléculas, o organismo utiliza o sistema de defesa antioxidante enzimático que inclui a ação da enzima SOD, envolvida na eliminação direta de radicais livres, por meio da conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Nesse estudo observou-se que a atividade antioxidante dessa enzima está significativamente mais elevada nas mulheres com câncer de mama, em comparação com àquelas com doença benigna da mama, decorrente da resposta do organismo ao estresse oxidativo no processo de carcinogênese, evento também identificado em outros estudos (HASAN et al., 2012; KILIC et al., 2014).

Soma-se a esse aspecto, as maiores concentrações de zinco e cobre nas mulheres com câncer de mama, minerais com ação antioxidante que participam como cofatores nos sítios ativos dessa enzima, contribuindo para a proteção contra a instabilidade genômica e mutações genéticas presentes no câncer. A disponibilidade de zinco eleva a atividade da SOD, enzima considerada anti-carcinogênica, por estar associada à inibição das fases de iniciação, promoção e progressão da carcinogênese mamária (PRABASHEELA et al., 2011; PRASAD, 2014).

Outro mecanismo que pode justificar o aumento na atividade da SOD em mulheres com câncer de mama é a hipóxia presente nas células cancerígenas devido ao aumento da angiogênese no câncer. A reoxigenação após a hipóxia aumenta a produção de ERO afetando a atividade de fatores de transcrição como o Fator Nuclear Eritróide 2 (NRF-2) que induz os genes que codificam enzimas antioxidantes como, SOD, GPx e GTS (SURH et al., 2008).

Quanto ao estudo das correlações entre os parâmetros analisados, verificou-se correlação negativa significativa entre atividade da SOD e concentração de TBARS nas mulheres com câncer de mama. Esse resultado reforça que a presença de estresse oxidativo nesse grupo gerou aumento na atividade da SOD, em resposta adaptativa à produção excessiva de ERO. Pode-se ressaltar ainda, que apesar da concentração de zinco plasmático estar abaixo dos valores de normalidade, a atividade da SOD mostrou-se aumentada nas mulheres com câncer de mama.

Com relação à análise univariada realizada nesse estudo, observou-se que as variáveis que mais contribuíram para o desfecho da doença foram o zinco plasmático e TBARS, cuja deficiência do mineral aumenta em 1,57 vezes a chance de pertencer ao grupo com câncer de mama e a elevação das concentrações de TBARS aumenta essa chance para 3,14 vezes. Esses resultados evidenciam a relação entre o zinco plasmático e a peroxidação lipídica no câncer de mama. A deficiência de zinco vem sendo associada ao aumento do estresse oxidativo e consequentes danos à biomoléculas, a exemplo da peroxidação lipídica. Os achados desse estudo estão apoiados por outros autores que mostram que o câncer de mama é acompanhado tanto pelo desequilíbrio entre os sistemas oxidante e anti-oxidante, quanto por alterações nas concentrações dos oligoelementos. Destaca-se ainda que o estresse oxidativo pode aumentar o risco de desenvolvimento da doença em 40% (SIDDIQUI et al., 2006; SADATI et al., 2016).

É importante destacar que o estudo apresenta algumas limitações, como a determinação do estresse oxidativo somente pelo uso de um marcador da peroxidação lipídica

- TBARS e um do sistema antioxidante – SOD, e a falta de dados relativos ao consumo dietético dos minerais investigados.

7 CONCLUSÃO

As mulheres com câncer de mama apresentam deficiência de zinco e normocuprimia. A elevada peroxidação lipídica foi acompanhada pelo aumento da atividade da enzima SOD, caracterizando a presença de estresse oxidativo nas mulheres com câncer de mama. A deficiência de zinco e a elevada peroxidação lipídica são fatores presentes no câncer de mama, o que remete à uma maior investigação sobre o estado nutricional relativo ao mineral e intervenção para o controle dessa deficiência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. R. M. et al. Avaliação do estresse oxidativo em indivíduos obesos no pré-operatório de cirurgia bariátrica. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 1, n. 9, p. 24, 2011.
- ANGULO, M. M. et al. Câncer de mama. **Medicine**, v 11, n. 27, p. 1629-40, 2013.
- ANJOS, J. C., HOFELMANN, D. A. Consumo Alimentar e Câncer de Mama em Mulheres de Joinville: um Estudo Caso-Controlle. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 57, n. 2, p. 177-187, 2011.
- ARMSTRON, D. Free Radical and Antioxidant Protocols. **Humana Press: Nem Jersey**, v. 108, 1998.
- BAIERLE, M.; VALENTINI, J.; PANIZ, C; MORO, A.; JUNIOR, F. B.; GARCIA, S. C. Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 6, p. 463-470, 2010.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n.4, p. 629-643, 2010.
- BARGELLINI, A. et al. Trace elements, anxiety and immune parameters in patients affected by cancer. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.17, suppl. 1, p. 3-9, 2003.
- BARRERA, G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. **ISRN Oncology**, v. 2012, p. 1-21, 2012.
- BEHREND, L.; HENDERSON, G.; ZWACKA, R. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n.6, p. 1441-1444, 2003.
- BLINDAUER, C. A.; LESZCZYSZYN, O. I. Metallothioneins: unparalleled diversity in structures and functions for metal ion homeostasis and more. **Natural Product Reports Articles**, v. 27, n. 5, p. 720-41, 2010.
- BOSTANCI, Z. et al. Paradoxical zinc toxicity and oxidative stress in the mammary gland during marginal dietary zinc deficiency. **Reproductive Toxicology**, v. 54, p. 84-92, 2015.
- BREWER, G. J. Risks of Copper and iron toxicity during aging in humans. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, p. 319-26, 2010.
- CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v 29, n. 3-4, p. 323-33, 2000.
- CHASAPIS, C. T.; LOUSIDOU, A. C.; SPILIOPOULOU, C. A.; STEFANIDOU, M. E. Zinc and human health: an update. **Archives of Toxicology**, v.86, n. 4, p. 521-534, 2012.

CINTRA, J. R. D. et al. Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n.2, p. 178-187, 2012.

CHISTIAKOV, D.A.; VORONOVA, N.V. Zn²⁺-transporters-8: a dual role in diabetes. **Biofactors, Oxford**, v.35, n.4, p. 356-363, 2009.

DAS, K.; SAMANTA, L.; CHAINY, G. B. D. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v 37, p. 201-204, 2000.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. v. 15, p. 316-328, 2005.

DEVIRGILIIS, C. et al. Zinc fluxes and zinc transporter genes in chronic diseases. **Mutation Research, Amsterdam**, v. 622, n.1-2, p. 84-93, 2007.

EIDE, D. J. The oxidative stress of zinc deficiency. **Metallomics**, v. 3, p. 1124–11239, 2011.

EXPÓSITO, M. J. R. et al. Circulating oxidative stress parameters in pre- and post-menopausal healthy women and in women suffering from breast cancer treated or not with neoadjuvant chemotherapy. **Experimental Gerontology**, v. 58, p. 34-42, 2014.

FARIAS, J. W. M. et al. Oxidative stress parameters in women with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy and treated with nutraceutical doses of oral glutamine. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.26, suppl.1, p. 82-87, 2011.

FENG, J.F. et al. Serum total oxidant/antioxidant status and trace element levels in breast cancer patients. **Journal Clinic Oncology.**, v.17, n.6, p.575-583, 2012.

FIASCHI, T.; CHIARUGI, P. Oxidative stress, tumor microenvironment and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação Lipídica e obesidade: métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastreterologia**, v. 20, n. 5, p. 199–206, 2013.

GIBSON, R. S. Assessment of chromium, copper and zinc status. In: _____. (Org.). **Principles of nutritional assessment**. Oxford: Oxford University Press, 2005. p. 683-730.

GOETZ, M.E.; LUCH, A. Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. **Cancer Letters**, v. 266, n. 1, p. 73-83, 2008.

GONÇALVES L. L. C. et al. Câncer de mama feminino: aspectos clínicos e patológicos dos casos cadastrados de 2005 a 2008 num serviço público de oncologia de Sergipe. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 12, n. 1, p. 47-54, 2012.

GÖNENÇ, A. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood and tissue of malignant breast tumor and benign breast disease. **Cell Biology International**, v. 30, p. 376-80, 2006.

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

GROTTO, D. et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.4, p. 619-624, 2007.

GUPTA R. K, PATEL A. K, KUMARI R, et al. Interactions between oxidative stress, lipid profile and antioxidants in breast cancer: a case control study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 12, p. 6295-6298, 2012.

GUPTE, A.; MUMPER, R. J. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. **Cancer Treatment Reviews**, v.35, n. 1, p. 32-46, 2009.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**. Cell press. v. 32 (3), p. 125-130, 2011.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n.2, p. 231-55, 2004.

HANAHAN, D; WEINBER, G. R. Hallmarks of cancer: the next generation. **Elsevier**, v.4; n.144, p.646-74, 2011.

HASAN, R. H. et al. Superoxide Dismutase Isoenzyme Activities in Plasma and Tissues of Iraqi Patients with Breast Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 6, p. 2571-2576, 2012.

HIMMETOGLU, S., et al. DNA oxidation and antioxidant status in breast cancer. **Journal of Investigative Medicine**, v. 57, n. 6, p. 720-723, 2009.

HO, E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 15, n. 10, p. 572-578, 2004.

HUANG, L.; TEPAAMORNDIC, H. S. The SLC30 family of zinc transporters - a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. **Molecular aspects of medicine**, v.34, n.2 p.548-560, 2013.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2014: **Incidência de Câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2014: **Incidência de Câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico-químicos para análise de alimentos. 1ª edição digital. São Paulo: **O Instituto**, 2008. 1020 p.

JEONG, J; EIDE, D. J. The SLC39 family of zinc transporters. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, p.612-619, 2013.

JOHN, E. et al. Zinc in innate and adaptive tumor immunity. **Journal of Translational Medicine**, v. 8, n. 118, p. 1-16, 2010.

JOMOVA, K.; BAROS, S.; VALKO, M. Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems. **Transition Metal Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 127–134, 2012.

KILIC, N. et al. An Investigation into the Serum Thioredoxin, Superoxide Dismutase, Malondialdehyde, and Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Breast Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 21, p. 4139–4143, 2014.

KIM, J.R et al. Association of anti- obesity activity of N- acetylcysteine with metallothionein-II down- regulation. **Experimental and Molecular Medicine, Seoul**, v. 38, n.2, p. 162-172, 2006.

KIM, M. C, CUI F. J, KIM, Y. Hydrogen peroxide promotes epithelial to mesenchymal transition and stemness in human malignant mesothelioma cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 6, p. 3625-30, 2013.

KOZLOWSKI, H.; KOLKOWSKA, P.; WATLY, J.; KRZYWOSZYNSKA, K.; POTOCKI, S. General aspects of metal toxicity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 33, p. 3721–3740, 2014.

LIMA F. et al. Dieta e câncer no Nordeste do Brasil: avaliação da relação entre alimentação e consumo de grupos de alimentos e câncer de mama. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 4, p. 820-828, 2008.

LIUZZI, J. P. et al. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia in the acute-phase response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, Washington**, v. 102, p. 6843–6848, 2005.

LUKASKI, H.C. Magnesium, zinc, and chromium nutrition and physical activity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 585-93, 2000.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S.M.F. Importância do zinco na nutrição humana. **Revista de Nutrição, Campinas**, v.17, n.1, p.79-87, 2004.

MAIA, F. M. M.; SANTOS, E. B.; REIS, G. E. Estresse oxidativo e lipoproteínas plasmáticas em pacientes com câncer. **Einstein**, v. 12, n. 4, p. 480-484, 2014.

MARET, W. Cellular zinc and redox states converge in the metallothionein/thionein pair **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 5, p1460S–1462S, 2003.

MARET, W.; KREZEL, A. Cellular zinc and redox buffering capacity of metallothionein/thionein in health and disease. **Molecular Medicine, Cambridge**, v.13, n.7-8, p.371-375, 2007.

MASAKI, H. et al. A zinc(II)-glycine complex is an effective inducer of metallothionein and removes oxidative stress. **Journal of Dermatological Science, Amsterdam**, v.45, n.1, p.73-75, 2007

MASSOCATTO, C. L. et al. Quantificação de elementos potencialmente tóxicos presentes em diferentes cultivares de grãos de soja e de milho comercializados na região Noroeste do Paraná. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 3, p. 182-92, 2013.

MAULIK, N.; MCFADDEN, D.; OTANI, H.; THIRUNAVUKKARASU, M.; PARINANDI, N. L. Antioxidants in longevity and medicine. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, p. 1-3, 2013.

MAYNE, S.T. Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **Journal of Nutrition**, v. 133, n.3, p. 933–940, 2003.

MCCALL, K. A.; HUANG, C.; FIERKE, C. A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1437-1446, 2000.

MENCALHA, A.; VICTORINO, V. J.; CECHINIA, R.; PANIS, C. Mapping Oxidative changes in breast cancer: Understanding the basic to reach the clinics. **Anticancer Research**, v. 34, n. 3, p. 1127-1140, 2014.

MENEZES, E. A. **Determinação da disponibilidade de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em Amostras de Carnes Bovinas, Suínas e de Frango In natura e Processadas Termicamente**. 2010. 108 p. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2010.

NAGANO, T. et al. Clinical features of hematological disorders caused by copper deficiency during longterm enteral nutrition. **Internal Medicine**, v. 44, n. 6, p. 554-9, 2005.

NAZARIO, A. C. P.; REGO, M. F.; OLIVEIRA, V. M. Nódulos benignos da mama: uma revisão dos diagnósticos diferenciais e conduta. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 29, n. 4, p. 211-219, 2007 .

NOURAZARIAN, A. R.; KANGARI, P.; SALMANINEJAD, A. Roles of Oxidative Stress in the Development and Progression of Breast Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 12, p. 4745-4751, 2014.

OHKAWA, H; OHISHI, N; YAGI, K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, 95, p.351-358, 1979.

PANDE, D. et al. Oxidative damage markers as possible discriminatory biomarkers in breast carcinoma. **Translational Research**, v. 160, n 6, p. 411-8, 2012

PARK, B. et al. Correlation of breast cancer incidence with the number of motor vehicles and consumption of gasoline in Korea. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 7, p. 2959-64, 2014.

POWELL, S. R. The antioxidant properties of zinc. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1447S-54S, 2000.

PRABASHEELA, B.; SINGH, A. K, FATHIMA, A.; PRAGULBH, K.; DEKA, N. J.; KUMAR, R. Association between Antioxidant Enzymes and Breast Cancer. **Recent Research in Science and Technology**, v. 3, n. 11, p. 93-95, 2011.

PRASAD, A. S. Zinc is an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Its Role in Human Health. **Frontiers in Nutrition**, v. 1, 2014.

PROUSEK, J. Fenton chemistry in biology and medicine. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 12, p. 2325–2338, 2007.

RAJNEESH, C. P.; MANIMARAN, A.; SASIKALA, K. R.; ADAIKAPPAN, P. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. **Singapore Medical Journal**. v. 49, n. 8, p. 640-643, 2008.

RAVEH, O.; PINCHUK, I.; SCHNITZER, E.; FAINARU, M.; SCHAFFER, Z.; LICHTENBERG, D. Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of HDL, autoaccelerated and tocopherol-mediated peroxidation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 2, p. 131-146, 2000.

REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

ROCKENBACH, G. et al. Dietary intake and oxidative stress in breast cancer: before and after treatments. **Nutrición Hospitalaria**, v. 26, n. 4, p. 737-44, 2011

ROHENKOHL, C. C.; CARNIEL, A. P.; COLPO, E. Consumo de antioxidantes durante tratamento quimioterápico. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 24, n. 2, p. 107-112, 2011.

SADATI Z. A. et al. The Status of Antioxidants, Malondialdehyde and Some Trace Elements in Serum of Patients with Breast Cancer. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 7, n. 1, p. 31–36, 2016.

SALGUEIRO, M. J. et al. Zinc as an essential micronutrient: a review. **Nutrition Research, USA**, v. 20, n.5, p. 737-755, 2000.

SANTOS, A. J. A. O.; MELO, M. W. L.; SOUSA, M. F. C. Avaliação do consumo de alimentos com compostos bioativos e com agentes cancerígenos em pacientes oncológicos. **HU Revista**, v. 39, n. 3, 2013.

SIDDIQUI, M. K.; JYOTI, S. S.; MEHROTRA, P. K.; SINGH, K.; SARANGI, R. Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor

tissues of women with benign and malignant breast lesions: an Indian study. **Environment International**, v. 32, n. 5, p. 630-637, 2006.

SIEGEL, R.; NAISHADHA, D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, p. 11-30, 2013.

SIES, A. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180-183, 2015.

SILVA, B. V.; HORTA, B. A. C.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 453-462, 2009.

SILVA, P. A.; RIUL, S. S. Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 64, n.6, p. 1016-1021, 2011.

SISTI, C. **Aplicação de diferentes metodologias na preparação de matrizes orgânicas para a determinação voltamétrica de elementos traço**. 2001. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Reatores Nucleares de Potência e Tecnologia do Combustível Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SOSA, V. et al . Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, p. 376-390, 2013.

SOUSA, M. M. et al. Taxa de mortalidade por neoplasia maligna de mama em mulheres residentes da Região Carbonífera Catarinense no período de 1980 a 2009. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 21, n. 4, p. 384-90, 2013.

SUHAIL, N. et al. Effect of vitamins C and E on antioxidant status of breast-cancer patients undergoing chemotherapy. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 37, n.1, p. 6-22, 2012.

SURH, Y. J.; KUNDU, J. K.; NA, H. K. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. **Planta Medica**, v. 74, n. 13, p. 1526-1539, 2008.

VALKO, M, et al. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 1-37, 2016.

VALKO, M.; RHODES, C.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n.1, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIEIRA, F. G. K. et al . Factors associated with oxidative stress in women with breast cancer. **Nutrición Hospitalaria**, v. 26, n. 3, p. 528-36, 2011.

VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, n. 6, p.813-39, 2007.

WESSELLS, K. R.; BROWN, K, H. Estimating the Global Prevalence of Zinc Deficiency: Results Based on Zinc Availability in National Food Supplies and the Prevalence of Stunting. **PLoS ONE**, v. 7, n.11, 2012.

WHITHEHOUSE, R. C. et al. Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes, and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. **Clinical Chemistry**, v.28, n.3, p.475-80, 1982.

WU, J.; RICKER, M.; MUENCH, J. Copper deficiency as cause of unexplained hematologic and neurologic deficits in patient with prior gastrointestinal surgery. **Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 19, p. 191-4, 2006.

YOUNG, DS. Implementation of SI Units for Clinical Laboratory Data: Style Specifications and Conversion Tables. **Annals of Internal Medicine**, v. 106, n. 1, p. 114-129, 1987.

ZARRINI, A. S.; MOSLEMI, D.; PARSIAN, H.; VESSAL, M.; MOSAPOUR, A.; KELAGARI, Z. S. The status of antioxidants, malondialdehyde and some trace elements in serum of patients with breast cancer. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 7, n. 1, p. 31-36, 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidada para participar, como voluntária, em uma pesquisa. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo sobre qualquer dúvida que tiver. Este estudo será conduzido pela Mestranda Juliana Maria Libório Eulálio sob orientação da Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine este documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizada. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí pelo telefone (086) 3215 5437.

ESCLARECIMENTOS SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: CONCENTRAÇÕES DE ZINCO E COBRE E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA

Pesquisador Responsável: Juliana Maria Libório Eulálio

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (086) 99413-2789

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

DESCRIÇÃO DA PESQUISA

Esta pesquisa tem por objetivo analisar as concentrações plasmáticas de zinco e cobre e sua relação com marcadores do estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama.

Para tanto a voluntária será submetido à coleta de sangue venoso para exames bioquímicos. Não será realizada entrevista gravada ou filmada. Ao participar da pesquisa a voluntária não sofrerá nenhum prejuízo, poderá, no entanto sentir leve desconforto em vista da coleta do material biológico, requerido para realização desta. As participantes do estudo terão como benefícios os resultados dos exames bioquímicos das amostras de sangue, que serão fornecidos após a realização dos mesmos e orientação nutricional individualizada. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira, que pode ser encontrado no endereço Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; telefone: (86) 3215-5863. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Piauí (Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina - Piauí, Brasil, telefones: (86)3215-5734. Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe do estudo, Comitê de Ética independente e inspetores de agências regulamentadoras do governo (quando necessário) terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo. O projeto terá duração de um ano, com término previsto para o primeiro semestre de 2017. A participante terá o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem que passe por qualquer tipo de constrangimento por parte do pesquisador.

Nomes e assinaturas dos pesquisadores

Juliana Maria Libório Eulálio

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

**APÊNDICE B - CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO
SUJEITO**

Eu, _____, RG _____
_____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo
“CONCENTRAÇÕES DE ZINCO E COBRE E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA”, como
sujeito. Tive pleno conhecimento das informações que li ou que foram lidas para mim,
descrevendo o estudo. Discuti com a Mestranda Juliana Maria Libório Eulálio sobre a minha
decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais serão os propósitos do
estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de
confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha
participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar
quando necessário. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o
meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo. A retirada do
consentimento ao estudo não acarretará penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer
benefício que possa ter adquirido.

Teresina: ___/___/___

Assinatura do paciente

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite
do sujeito em participar**

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Observações complementares _____

APÊNDICE C - FORMULÁRIO DE CADASTRO DA PARTICIPANTE DA PESQUISA

Código para identificação: _____

Grupo: _____

Dados pessoais

Nome: _____

Data de nascimento: _____ Idade: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Tel: _____

Escolaridade: _____ Idade da menarca: _____

Profissão: _____

História Clínica:

1. Apresenta alguma doença como: diabetes, hipertensão, cardiopatias, etc.?
() Não () Sim
2. Se sua resposta for sim, relate a doença. _____
3. Faz uso de algum medicamento?
() Não () Sim
4. Se sua resposta for sim, quais os medicamentos? _____
5. Faz uso de algum suplemento nutricional?
() Não () Sim
6. Diagnóstico para câncer de mama positivo ou negativo? _____
7. Se positivo, qual o estágio da doença? _____
8. Está fazendo tratamento para o câncer?
() Não () Sim _____
9. É fumante?
() Não () Sim

ANEXOS

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAÚÍ - UFPI



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária.

Pesquisador: benedito borges da silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43447015.8.0000.5214

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.022.962

Data da Relatoria: 15/05/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto apresenta uma proposta de pesquisa de Mestrado intitulada: " Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária". Justifica a relevância da investigação devido a necessidade de identificação de substâncias relacionadas à carcinogênese como candidatos naturais para explorar novos fatores prognósticos ou alvos potenciais para terapias específicas, utilizados como fatores prognósticos das neoplasias mamárias como elemento facilitador do entendimento dos mecanismos fundamentais que regulam a proliferação, a diferenciação e o desenvolvimento de metástases tumorais. Inicialmente os marcadores tumorais eram identificados por meio de técnicas moleculares ou bioquímicas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar os biomarcadores moleculares em mulheres com neoplasias mamárias.

Objetivo Secundário: Expressão imunoistoquímica das metaloproteinases 2 e 9 na neoplasia mamária; Avaliar as concentrações plasmáticas de metaloproteinases 2 e 9; Determinar as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de zinco; Analisar o consumo alimentar e adequação da dieta em relação à macronutrientes e zinco; Avaliar a associação entre as metaloproteinases 2 e 9 com parâmetros de zinco; Correlacionar o polimorfismo do receptor

do fator de crescimento epidérmico e os subtipos moleculares de câncer de mama; Relacionar os dados antropométricos com subtipos moleculares de câncer de mama.

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAUÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 1.022.962

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Quanto aos riscos o pesquisador diz no Protocolo que: "Não há nenhum risco aos participantes da pesquisa". No entanto no TCLE afirma que "Como durante a pesquisa será aplicado um questionário, este poderá ocasionar um risco de constrangimento, mas as pesquisadoras responsáveis, [...] adotarão procedimentos éticos no decorrer dessa aplicação conforme Resolução 466/2012 para evitar esse risco. Ao participar da pesquisa, a voluntária não sofrerá nenhum prejuízo; no entanto, poderá sentir leve desconforto em vista da coleta do material biológico, requerido para realização desta pesquisa. No entanto providências e cautelas serão empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições adversas que possam causar dano, após a coleta de sangue será oferecido um lanche patrocinado pelos pesquisadores. Ratificamos que nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade". Sendo o TCLE o documento de acesso aos participantes a descrição dos riscos foi considerada.

Benefícios:

Os participantes da pesquisa receberão uma orientação nutricional de acordo com as necessidades após todas as coletas de dados; Bem como receberão todos os resultados referente as análises realizadas durante a pesquisa. Acrescentando, ainda no TCLE que; "As participantes do estudo terão como benefícios os resultados dos exames referente aos biomarcadores moleculares, que serão fornecidos após a realização dos mesmos, bem como receberão uma orientação nutricional, proporcionando uma orientação da melhor alimentação".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Caracteriza-se como um estudo quantitativo do tipo grupo controle, para identificação de substâncias relacionadas à carcinogênese como candidatos naturais para explorar novos fatores prognósticos ou alvos potenciais para terapias específicas. A população será constituída de pacientes portadoras de câncer de mama, atendidas no Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas (lôcus da investigação), no período de julho de 2015 a julho de 2018 que serão submetidas a tratamento especializado. Do universo populacional será selecionado o grupo controle constituído por 40 pacientes portadoras de fibroadenoma. Define como critérios de inclusão serem pacientes portadoras de câncer de mama, comprovado histologicamente; Mulheres com idade maior que 20 anos sem qualquer tratamento prévio quimio, hormônio ou radioterápico. Como critério de Exclusão: ter sido submetida a tratamento prévio quimio, hormônio ou radioterápico; Mulheres com idade menor que 20 anos; Mulheres que não aceitaram participar do estudo; Mulheres com uso de suplementos alimentares. Para a coleta

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAÚÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 1.022.962

de dados serão realizados os seguintes procedimentos: Anteriormente a coleta de sangue, o peso corporal será determinado utilizando uma balança digital Filizola®, com capacidade máxima de 150 kg, graduada em 100 gramas. A estatura será medida com um antropômetro marca Secar, graduado em centímetros e com barra de madeira vertical e fixa. O peso e a estatura serão medidos três vezes para cada participante, sendo então obtida a média dessas medidas. O índice de massa corpórea será calculado a partir do peso da participante do estudo dividido pela sua estatura elevada ao quadrado (WHO, 2000). A medida da circunferência da cintura será realizada com as mulheres em pé, utilizando uma fita métrica não extensível, circundando a linha natural da cintura, na região mais estreita entre o tórax e o quadril, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. Para a avaliação do consumo alimentar será utilizado um inquérito alimentar realizado de acordo com a técnica de registro alimentar de três dias, compreendendo dois dias durante a semana e um dia no final de semana. O consumo alimentar de macronutrientes e zinco será calculado pelo software Nutwin, versão 1.5 do Departamento de Informática em Saúde da Universidade Federal de São Paulo (ANÇÃO et al., 2002). Para verificar a adequação da ingestão alimentar de zinco das participantes do estudo, será utilizado como referência a Estimated Average Requirement (EAR), contida nas DRI's (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001). Amostras de 20 mL de sangue venoso serão coletadas no período de 7:30 às 8:30 horas, estando as participantes da pesquisa em jejum de no mínimo 12 horas. O sangue colhido será distribuído em tubo contendo citrato de sódio a 30% como anticoagulante (10 L/mL de sangue) para a análise de zinco (10 mL), tubo contendo EDTA para análise das metaloproteinases 2 e 9 (5 mL) e para análise do receptor do fator de crescimento epidérmico (5 mL). O plasma será separado do sangue total por centrifugação a 1831xg durante 15 minutos a 4°C, sendo o mesmo extraído com pipeta automática, acondicionado em tubos eppendorfs de polipropileno desmineralizados e armazenado em freezer a -20°C. Para separação dos eritrócitos será utilizado o método proposto por Whitelhouse et al. (1982). A massa eritrocitária será lavada com 5mL de solução salina isotônica 0,9%, sendo então homogeneizada lentamente por inversão e centrifugado a 2493xg por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. O procedimento descrito será realizado três vezes, para remover contaminantes dos eritrócitos. Após a última centrifugação, a solução salina será aspirada, descartada e a massa eritrocitária será cuidadosamente extraída com o auxílio de uma pipeta automática, transferida para tubos eppendorfs de polipropileno desmineralizados e mantidos à temperatura de -20°C para análise de zinco e hemoglobina. As pacientes serão submetidas a procedimento cirúrgico especializado para confirmação histológica do tumor, exérese dos tumores benignos

Endereço: Campus Universitário Ministro Petrólio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAÚÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 1.022.962

(fibroadenoma) e biópsia (Core biospy) das neoplasias malignas. A seguir, as amostras de tumor serão fixadas em formalina e emblocadas em parafina para confirmação diagnóstica. Para tal, as amostras serão então fixadas em formol tamponado, desidratadas em álcool etílico, diafanizadas pelo xilol e impregnadas pela parafina numa estufa a temperatura de 59 ° C (MASSON, 1956). Após este processo, parte da amostra será submetida a cortes seriados consecutivos e corados com hematoxilina-eosina. O bloco será então armazenado para posterior avaliação imunohistoquímica. A análise das metaloproteinases será realizada com base na plataforma Human MMP Panel 2 Magnetic Bead Kit (HMMP2MAG-55K).

Análise dos dados: Para a comparação dos grupos estudados quanto às variáveis envolvidas neste estudo, será realizado o teste t de Student, aplicada uma ANOVA – análise de variância, seguida do teste de Tukey para identificar as possíveis diferenças nas comparações entre os grupos. A diferença considerada significativa será quando $p < 0,05$ e intervalo de confiança adotado será de 95%. Na análise das variáveis possivelmente inter-relacionadas será utilizado o coeficiente de Pearson.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A proposta apresenta os componentes básicos exigidos por uma pesquisa acadêmica, referencial teórico que dará sustentação ao estudo, bem como os aspectos éticos do estudo, cronograma e orçamento afirmando ser financiada com recursos próprios. Os objetivos estão coerentes com a proposta de estudo. O coordenador é docente da UFPI com experiência na temática evidenciada e se compromete cumprir os termos da Resolução CNS nº 468/12 - e zelar pela privacidade e confidencialidade dos dados.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br