



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

DAILA LEITE CHAVES BEZERRA

**HIPOMAGNESEMIA E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

TERESINA

2017

DAILA LEITE CHAVES BEZERRA

**HIPOMAGNESEMIA E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES DO 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.

Linha de Pesquisa: Nutrição e Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Dilina do Nascimento Marreiro

Coorientadora: Profa. Dra. Betânia de Jesus e Silva Almendra Freitas

TERESINA

2017

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

B574h Bezerra, Daila Leite Chaves.
Hipomagnesemia e sua relação com marcadores do estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama / Daila Leite Chaves Bezerra. -- 2017.
75 f. : il.

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

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

CDD 618.19

DAILA LEITE CHAVES BEZERRA

**HIPOMAGNESEMIA E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES DO 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.

Linha de Pesquisa: Nutrição e Saúde

Aprovada em ____/____/____

Banca examinadora:

Presidente: Profa. Dra. Dilina do Nascimento Marreiro

1º Examinador: Prof. Dra. Roberta Soares Lara Cassani

2º Examinador: Prof. Dr. Sabas Carlos Vieira

Examinador Suplente: Prof. Dr. Francisco Leonardo Torres-Leal

A minha família - meus pais João e Deusolita e meus irmãos Jairon e Daiane - meu Céu aqui na Terra. Amo vocês.

Às mulheres incríveis que conhecemos, exemplos de força e coragem. Nossos corações estão com vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de todo amor, por ter me guiado nesse sonho desde o início da jornada. Obrigada meu Senhor por ter me sustentado e dado força nos momentos de angústia e dificuldade, por cuidar tão bem de mim e colocar em minha vida pessoas de luz, que tornaram esse caminho mais fácil. Graças e louvores sejam dados a Ti, Senhor, que esteve sempre comigo, segurando minha mão e acalmando meu coração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, pela oportunidade de crescimento acadêmico e ao corpo docente do Programa, pelos conhecimentos transmitidos.

À minha turma do Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição: Ana Cibele, Ednelda, Eduardo, Ennya, Jéssica, Juliana, Laís, Layanna, Lays, Lúcia, Luciana, Luís Michel, Lunna, Olímpio, Paulo, Rosiane, Sabrina e Vanessa. Nossa convivência foi única e maravilhosa! Obrigada pelo companheirismo a cada passo dado, vocês estarão eternamente no meu coração.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição, pela atenção e disponibilidade em todos os momentos. Agradeço em especial a seu Oswaldo e seu Gilson, que, mesmo à noite, esperavam por nós “alguns minutinhos” enquanto fazíamos análises no Laboratório de Nutrição Experimental.

A minha orientadora Profa. Dra. Dilina do Nascimento Marreiro, por todo o carinho, paciência e apoio ao longo dessa jornada. Agradeço pelo nosso convívio, por todos os ensinamentos, por ser uma orientadora sempre atenciosa e presente. Aprendi muito e serei sempre grata pela oportunidade de ser uma das suas “Meninhas”. Obrigada por tudo!

A todas as mulheres que participaram do estudo. Obrigada pelo tempo dedicado a essa pesquisa, pela confiança e colaboração, que tornaram esse trabalho possível.

Ao Hospital Universitário, pelo apoio para a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Sabas Carlos Vieira e sua equipe, pela parceria e atenção, fundamentais no recrutamento das participantes da pesquisa. Obrigada por nos receberem tão carinhosamente nos centros cirúrgicos!

Ao Prof. Dr. Gilberto Simeone pela importante contribuição na realização da análise do magnésio. Obrigada por todo o apoio e atenção!

À Profa. Dra. Maria do Carmo de Carvalho e Martins, profa. Carminha, por ter gentilmente cedido equipamentos e reagentes para a realização de análises para este estudo.

À Profa. Dra. Regina Célia de Assis (*in memoriam*), por despertar em mim o amor pela Bioquímica e pela pesquisa, me acompanhando desde o início da minha caminhada acadêmica. Serei sempre grata por ter tido a oportunidade de tê-la em minha vida.

À Universidade Federal do Piauí, *Campus* Almícar Ferreira Sobral – CAFS, representada pelo nosso diretor Prof. Dr. Mauro Sérgio Cruz Souza Lima, pela acolhida no CAFS e oportunidade em continuar com a realização desse estudo.

À equipe do Restaurante Universitário – *Campus* Almícar Ferreira Sobral, em especial, à Olga Diocesano e Ana Lúcia, pelo apoio integral e por cuidar tão carinhosamente do nosso amado RU nos momentos de ausência.

À Profa. Ma. Michelle de Paula, por me ouvir e apoiar desde que nos conhecemos. A saudade de casa ficou mais suportável por causa da sua amizade, companhia e seus conselhos.

Aos meus queridos amigos de mestrado, Eduardo, Ednelda e Laís, pela troca de conhecimentos e ajuda nas análises de consumo alimentar. Agradeço também à Juliana, pela palavra amiga e apoio certo em todas as horas.

Aos queridos da Farmacologia, os mestrandos Ana Karolinne “Karolzinha” e Geovanni, e o doutorando Benedito, que ajudaram nas análises da SOD, e tornaram a rotina nos laboratórios mais leve e alegre.

Agradeço em especial à Vanessinha, pela paciência, companhia, troca de conhecimentos, por ser essa pessoa ímpar e “fofa”, que estava sempre disposta a ajudar, mesmo nos dias de recesso escolar, quando a universidade estava fechada. Muito obrigada minha querida!

A minha parceira de pesquisa e amiga Priscyla Maria, por tudo. Não existem palavras suficientes para expressar o quanto Deus me abençoou ao colocar você ao meu lado durante essa jornada. Obrigada pela amizade, pelo carinho e apoio, pelas discussões científicas (e outras nem tanto) ao telefone no início das madrugadas e inúmeras caronas. Agradeço também pelas divergências e desentendimentos, que nos ajudaram a crescer profissionalmente e fortalecer a nossa confiança, parceria e amizade. Flor, obrigada pela partilha dos dias do Senhor e companhia nos laboratórios à noite e aos sábados. Muito obrigada por “segurar as pontas” nos momentos de ausência. Admiro muito a pessoa e excelente profissional que você é. Sem você, não sei se teria chegado até aqui. Vou sentir saudades!!!

As minhas queridas amigas e colaboradoras Stéfany Rodrigues, Loanne Santos e Raísa Santos, pela importante contribuição em todas as etapas deste trabalho. Vocês tornaram meus dias mais leves e divertidos! Agradeço toda a dedicação e disposição. Tenho muito orgulho de quem vocês são e tenho certeza que Deus reserva um futuro glorioso em suas vidas. Estarei eternamente na torcida, a jornada de vocês está apenas começando! Contem comigo sempre!

À família LANEX, aqui representadas por Mayara Feitosa, Larissa Cristina, Ana Raquel, Kyria Jayanne, Juliana Severo, Jennifer Beatriz, Jéssica Batista, Nina Rosa e Mayara Storel, por todos os momentos que compartilhamos. Obrigada a todas as “Meninhas”, que tornaram o final dessa caminhada mais fácil, em especial às queridas Juliana e Jennifer, que me acolheram tão carinhosamente no início do mestrado e se fizeram presentes nas muitas discussões finais!

À Fabiane Araújo e Vanessa Lima, que me ajudaram nos meus primeiros passos na pesquisa!

A todos os meus amigos da vida, que caminham ao meu lado há um longo tempo, pelo apoio e incentivo em todos os momentos. Obrigada por fazerem parte da minha história!!!

Aos meus pais, João e Deusolita, pelo amor incondicional. Essa vitória é de vocês, que sempre me apoiaram e jamais me deixaram sozinha. Sonhei muito com esse mestrado, e mesmo tendo que abdicar de muitas coisas por ele, vocês sempre me incentivaram. Pai, obrigada por ser exemplo de força e garra, o senhor batalhou muito pelo seu crescimento profissional, sem desistir, mesmo nos momentos mais difíceis. Mãe, obrigada pelos “ditados” que a senhora fazia quando éramos pequenos e pelo amor sem reservas, sem limites. Nunca serei grata o suficiente pelo presente que Deus me deu ao permitir ser filha de vocês. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos, pelo companheirismo de todas as horas. Jairon, apesar da distância que a vida nos impôs, você é exemplo do que quero ser como profissional. Você foi o primeiro de nós a sonhar e sempre nos estimulou para que realizássemos nossos próprios sonhos. Sinto saudades todo dia. Daiane, meu amor maior, já passamos por tantas coisas nessas idas e vindas, mas nossos caminhos nunca se separaram. Obrigada por me apoiar, escutar, por dividir comigo nosso quarto e reclamar quando eu falo demais. Agradeço por você ser tudo e um pouco mais. Amo vocês.

Ao Marcos Vítor, meu namorado, meu amigo, meu amor, por todo o apoio durante esses nossos quase cinco anos juntos. Obrigada pelo incentivo, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência. Agradeço também pelas incontáveis caixas de luvas gentilmente doadas para a realização dessa pesquisa!

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

*Mas o Senhor ficou comigo e me encheu de
força, a fim de que eu pudesse anunciar
toda a mensagem, e ela chegasse aos
ouvidos de todas as nações.*

II Timóteo 4,17

RESUMO

BEZERRA, D. L. C. **Hipomagnesemia e sua Relação com Marcadores do 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: Estudos têm mostrado concentrações séricas reduzidas de magnésio em mulheres com câncer de mama, o que parece comprometer o sistema de defesa antioxidante, sendo considerado fator importante na manifestação da tumorigênese. **OBJETIVO:** O estudo avaliou parâmetros do magnésio, atividade da enzima superóxido dismutase e sua relação com marcador do estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama. **MÉTODOS:** Estudo transversal, envolvendo 60 mulheres, na faixa etária entre 29 e 65 anos, distribuídas em dois grupos: grupo caso (mulheres com câncer de mama, n=30) e grupo controle (mulheres sem câncer de mama, n=30). Foram realizadas medidas do peso corporal e estatura, bem como analisadas a ingestão de magnésio e parâmetros bioquímicos do mineral. A análise da ingestão de magnésio foi realizada por meio do registro alimentar de três dias, utilizando o programa *Dietpro* clínico, versão 5i. As concentrações do magnésio plasmático, ionizado, eritrocitário e urinário foram determinadas segundo o método de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente. O estresse oxidativo foi analisado pelo método das concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. A determinação da atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária foi feita usando método colorimétrico. Os dados foram analisados no programa estatístico *GraphPrad Prism*[®], versão 6.01. **RESULTADOS:** Os valores médios da quantidade de magnésio nas dietas estavam abaixo da recomendação, sem diferença estatística entre os grupos estudados ($p>0,05$). As concentrações de magnésio plasmático, ionizado e eritrocitário das mulheres com câncer de mama estavam reduzidas em relação ao grupo controle ($p<0,0001$) e inadequadas segundo os valores de referência. A excreção urinária estava elevada, com diferença significativa entre os grupos ($p<0,0001$). A concentração média das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico estava elevada nas participantes do estudo, sem diferença estatística significativa entre os grupos ($p>0,05$). Os valores médios da atividade da enzima superóxido dismutase estavam adequados nas participantes do estudo, sem diferença estatística significativa entre os grupos ($p>0,05$). O estudo não mostrou correlação significativa entre os parâmetros do magnésio e os marcadores do estresse oxidativo ($p>0,05$). A análise de correlação entre a atividade da superóxido dismutase eritrocitária e as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico também não revelou resultado significativo ($p>0,05$). **CONCLUSÃO:** A partir dos resultados deste estudo, pode-se concluir que as mulheres com câncer de mama apresentam comprometimento na homeostase do magnésio, caracterizada pela sua redução na dieta, no plasma, nos eritrócitos e aumento na urina. Além disso, o estudo de correlação não demonstra influência desse mineral sobre o estresse oxidativo, distúrbio importante na patogênese do câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de Mama. Magnésio. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

BEZERRA, D. L. C. **Hypomagnesaemia and its Relationship with Markers of Oxidative Stress in Women with Breast Cancer.** 2017. Dissertation (Master's Degree) - Postgraduate Program in Food and Nutrition, Federal University of Piauí, Teresina-PI.

INTRODUCTION: Studies have shown reduced serum magnesium concentrations in women with breast cancer, which seems to compromise the antioxidant defense system, being considered an important factor in the manifestation of tumorigenesis. **OBJECTIVE:** This study evaluated magnesium parameters, activity of enzyme superoxide dismutase and its relationship with marker of oxidative stress in women with breast cancer. **METHODS:** A cross-sectional study involving 60 women in the age between 29 and 65 years, divided into two groups: case group (women with breast cancer, n = 30) and control group (women without breast cancer, n = 30) . Measurements of body weight and height were performed, as well as the ingestion of magnesium and biochemical parameters of the mineral. The analysis of magnesium intake was carried out using the three-day dietary record, using the *Dietpro* clinical program, version 5i. Plasma, ionized, erythrocyte and urinary magnesium concentrations were determined using the inductively coupled plasma optical emission spectrometry method. Oxidative stress was analyzed by the plasma concentrations of thiobarbituric acid reactive substances. The determination of erythrocyte superoxide dismutase enzyme activity was done using a colorimetric method. Data were analyzed in the statistical program *GraphPradPrism®*, version 6.01. **RESULTS:** The mean values of the amount of magnesium in the diets were below the recommendation, with no statistical difference between the groups studied ($p > 0.05$). Plasma, ionized and erythrocyte magnesium concentrations of women with breast cancer were reduced in relation to the control group ($p < 0.0001$) and inadequate according to the reference values. Urinary excretion was high, with significant difference between groups ($p < 0.0001$). The mean concentration of thiobarbituric acid reactive substances was high in the study participants, with no significant statistical difference between the groups ($p > 0.05$). Mean values of superoxide dismutase enzyme activity were adequate in the study participants, with no significant statistical difference between the groups ($p > 0.05$). The study did not show a significant correlation between the parameters of magnesium and the markers of oxidative stress ($p > 0.05$). The correlation analysis between the activity of erythrocyte superoxide dismutase and plasma concentrations of thiobarbituric acid reactive substances did not reveal a significant result ($p > 0.05$). **CONCLUSION:** From the results of this study, it can be concluded that women with breast cancer have a compromised magnesium homeostasis, characterized by their reduction in diet, plasma, erythrocytes and increase in urine. In addition, the correlation study does not show influence of this mineral on oxidative stress, an important disorder in the pathogenesis of breast cancer.

Keywords: Breast Cancer. Magnesium. Oxidative Stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Fluxograma do recrutamento e seleção das participantes do estudo. 29
Teresina-PI, Brasil, 2017.
- Figura 2** – Fluxograma das etapas realizadas pelas participantes do estudo. 31
Teresina-PI, Brasil, 2017.
- Figura 3** – Prevalência de inadequação da ingestão habitual de magnésio das 40
mulheres com câncer de mama e do grupo controle segundo o método do ponto de
corte pela EAR. Teresina-PI, Brasil, 2017.
- Figura 4** – Atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária nas mulheres 42
com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.
- Figura 5** – Concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido 42
tiobarbitúrico das mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI,
Brasil, 2017.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios e desvios padrão da ingestão ajustada de energia e macronutrientes das mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.	39
Tabela 2 – Valor médio e desvio padrão da ingestão de magnésio das mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.	40
Tabela 3 – Valores médios e desvios padrão das concentrações plasmáticas, ionizadas, eritrocitárias e urinárias de magnésio das mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.	41
Tabela 4 – Análise de correlação linear simples entre a atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária e as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.	43
Tabela 5 – Análise de correlação linear simples entre os parâmetros do magnésio e a atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária nas mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.	44
Tabela 6 – Análise de correlação linear simples entre parâmetros do magnésio e as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

AMDR – Intervalo aceitável de distribuição de macronutrientes

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

DRIs – *Dietary Reference Intakes*

EAR – Necessidade média estimada

EDTA – Ácido etileno diaminotetracético

Hb – Hemoglobina

HIF-1 – Fator induzido por hipoxia-1

HNO₃ – Ácido nítrico

ICP-OES – Espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente

Mg – Magnésio

MSM – *Multiple Source Method*

MCF-7 – Linhagem celular de adenocarcinoma mamário em humanos

mTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NF-E2 – Fator nuclear eritróide 2

pH – Potencial hidrogeniônico

RNA – Ácido ribonucleico

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SOD – Superóxido dismutase

TAMA – Surfactante de alta pureza

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TEP – Tetraetoxipropano

TNM – Classificação de Tumores Malignos

TRPM6 – Receptor de potencial transitório do tipo melastatina tipo 6

TRPM7 – Receptor de potencial transitório do tipo melastatina tipo 7

UFPI – Universidade Federal do Piauí

UV – Ultravioleta

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Estresse Oxidativo e Câncer de Mama	18
2.2 Aspectos Metabólicos e Fisiológicos do Magnésio	21
2.3 Câncer de Mama, Estresse Oxidativo e Magnésio	24
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
4.1 Caracterização do Estudo e Protocolo Experimental	29
4.2 Caracterização das Participantes da Pesquisa	31
4.2.1 Peso corporal e Estatura	31
4.3 Avaliação do Consumo Alimentar	31
4.4 Análise dos dados dietéticos	32
4.5 Coleta do Material Biológico	33
4.6 Determinação dos Parâmetros Bioquímicos do Magnésio	34
4.6.1 Controle de Contaminação e Preparo dos Reagentes	34
4.6.2 Separação dos Componentes do Sangue	34
4.6.3 Determinação da Hemoglobina	35
4.6.4 Determinação do Magnésio Plasmático, Ionizado, Eritrocitário e Urinário	35
4.7 Determinação de Marcadores do Estresse Oxidativo	36
4.8 Análise Estatística	38
5 RESULTADOS	39
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICES	61
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	62
APÊNDICE B – FICHA DE CADASTRO DAS PARTICIPANTES DA PESQUISA	65
APÊNDICE C – REGISTRO ALIMENTAR	67
APÊNDICE D – INSTRUÇÕES ÀS PARTICIPANTES QUANTO À OBTENÇÃO DE URINA DE 24 HORAS	69

ANEXOS	70
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA/UFPI	71
ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO/UFPI	75

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama constitui a forma mais comum de neoplasia maligna entre as mulheres, sendo responsável por taxas elevadas de mortalidade no mundo. Essa doença é caracterizada pelo crescimento e proliferação celular descontrolados do tecido mamário, decorrente de mutações na estrutura e/ou função do seu material genético (NOURAZARIAN; KANGARI; SALMANINEJAD, 2014; PAVITHRA et al., 2015).

Atualmente tem havido um interesse crescente no que diz respeito aos distúrbios bioquímicos e nutricionais presentes nas pacientes com câncer de mama, na perspectiva de elucidar os mecanismos envolvidos na patogênese dessa doença. Nesse cenário, estudos clínicos têm destacado o papel relevante do estresse oxidativo na promoção e progressão da tumorigênese mamária (KARKI et al., 2015a; KILIC et al., 2014; PRABASHEELA et al., 2011).

O estresse oxidativo é uma desordem metabólica que altera funções proteicas e enzimáticas, fluidez e estabilidade da membrana celular, bem como induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio induz instabilidade genética e contribui para a progressão de células tumorais, atuando nas fases de iniciação, promoção e progressão da carcinogênese (ESREFOGLU, 2012; KARKI et al., 2014; PANDE et al., 2012; RÍOS-ARRABAL et al., 2013; ROBERTS et al., 2010; VERA-RAMIREZ et al., 2011).

Nessa perspectiva, considerando a importante atuação de nutrientes no equilíbrio do sistema de defesa antioxidante, diversos estudos têm buscado identificar a participação de minerais na prevenção do câncer de mama (FENG et al., 2012; KARKI et al., 2015a). O magnésio, em particular, tem sido bastante estudado por participar como cofator essencial em várias reações enzimáticas envolvidas na defesa antioxidante, na proliferação celular, replicação do DNA, reparo e expressão de genes, as quais são relevantes para a manutenção da estabilidade genômica (BLASZCZYK; DUDA-CHODAK, 2013; DEEPTI; NALINI, 2014; KARKI et al., 2015b; MORAIS et al., 2017; PAVITHRA et al., 2015).

Nesse sentido, pesquisas recentes revelam ingestão reduzida de magnésio pelas pacientes com câncer de mama, bem como um comprometimento na distribuição desse mineral no organismo de indivíduos com carcinogênese mamária

(FENG et al., 2012; TAO et al., 2015). Os estudos também mostram que a deficiência do nutriente parece influenciar a progressão do tumor (BLASZCZYK; DUDA-CHODAK, 2013; KARKI et al., 2015a; KO et al., 2014).

Portanto, considerando a contribuição das espécies reativas de oxigênio em mecanismos envolvidos na gênese do câncer de mama, bem como a participação do magnésio na defesa antioxidante, a realização desse estudo visou identificar a relação entre esse nutriente e marcadores do estresse oxidativo no câncer de mama, o que certamente trará perspectivas para a elaboração de estratégias que estabeleçam concentrações adequadas do mineral e, conseqüentemente, possam contribuir para o controle da doença.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estresse Oxidativo e Câncer de Mama

O câncer de mama é uma doença com etiologia complexa, envolvendo alterações nos sistemas celulares de transdução de sinais e tradução de ácidos nucleicos que favorecem a proliferação tumoral, por fornecer energia para a proliferação do tumor (KARKI et al., 2015b; PAVITHRA et al., 2015; REZNICK; SANDER, 2015).

Entre os fatores envolvidos na patogênese do câncer de mama, a literatura tem evidenciado a participação do estresse oxidativo na etiologia da doença, pois a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio favorece a oxidação de biomoléculas, alterações celulares e, conseqüentemente, a tumorigênese (FENG et al., 2012; NANDY et al., 2015).

Ressalta-se que o estresse oxidativo é uma condição de desequilíbrio entre a produção e degradação das espécies reativas de oxigênio, o que altera os mecanismos redox-sensíveis, seja pela superprodução dessas moléculas e/ou pela atividade deficiente do sistema enzimático de defesa antioxidante do organismo (FENG et al., 2012; HECHT et al., 2016).

Nessa perspectiva, as espécies reativas de oxigênio induzem a instabilidade genética, participando da sobrevivência celular, por se ligarem a receptores de fator trófico, além de contribuir para a progressão de células tumorais, aumentando o seu potencial metastático (ESREFOGLU, 2012; KARKI et al., 2014; PANDE et al., 2012; ROBERTS et al., 2010).

Outro ponto importante a ser destacado, diz respeito à participação dos compostos oxidantes nas fases de iniciação, promoção e progressão da carcinogênese da mama. Na fase de iniciação, essas moléculas promovem danos oxidativos ao DNA, direta e indiretamente, por meio da geração de produtos de oxidação altamente reativos, como peróxidos lipídicos e peroxinitrito, o que contribui para o processo inicial da mutagênese (VERA-RAMIREZ et al., 2011).

Na fase de promoção do câncer de mama, esses compostos atuam como sinalizadores celulares, alterando os processos de proliferação, crescimento celular, apoptose e autofagia, por meio de três mecanismos específicos, a saber: o primeiro envolve aumento da síntese do DNA, estimulando a proliferação celular, devido à

exposição a agentes cancerígenos genotóxicos, que além de induzir mutações que não são reparadas, possibilitam a expansão de células pré-neoplásicas iniciadas, formando o tumor primário. O segundo trata da interação entre espécies reativas de oxigênio e receptores de citocinas, hormônios e fatores de crescimento na membrana plasmática, além da ativação de proteínas tirosina quinases, inibindo a apoptose, com consequente aumento da atividade do tumor e da expressão de oncogenes (KLAUNIG et al., 2011; VERA-RAMIREZ et al., 2011).

O terceiro mecanismo proposto diz respeito à ativação da via de autofagia, processo envolvido na sobrevivência das células cancerígenas, por meio da degradação de componentes celulares danificados, possibilitando a progressão do tumor da mama. Associado a isso, em situações de comprometimento do sistema de defesa antioxidante, ocorre aumento da síntese de compostos oxidantes que alteram a função das proteínas tirosina quinases e proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), estimulando a autofagia (ABRANTES et al., 2014; AKKOÇ et al., 2015; SCHERZ-SHOVAL; ELAZAR, 2007; WONG et al., 2010).

Na fase de progressão tumoral, as espécies reativas de oxigênio regulam a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) por meio da ativação do fator induzido por hipoxia-1 (HIF-1), bem como conduzem à ação da c-myc, um proto-oncogene que codifica fatores de transcrição envolvidos na proliferação e maturação celular, condições que favorecem a proliferação, angiogênese e, conseqüentemente, a metástase do tumor (BHATTARAI et al., 2011; CRAIGE KANT; KEANEY, 2015; RÍOS-ARRABAL et al., 2013).

Nessa temática, ressalta-se que pesquisas recentes têm verificado aumento nas concentrações de marcadores do dano oxidativo em mulheres com tumor maligno da mama quando comparados àquelas sem a doença, sendo o estresse oxidativo relacionado com degradação ao DNA, às proteínas ou ainda aos lipídios (KILIC et al., 2014; FENG et al., 2012; GUPTA et al., 2012; KARKI et al., 2014; KARKI et al., 2015a; KARKI et al., 2015b; KHANNA et al., 2012; PANDE et al., 2012).

De forma particular, o dano lipídico, que pode ser evidenciado pelo aumento nas concentrações plasmáticas do malondialdeído, é caracterizado pela modificação da fluidez e permeabilidade da membrana celular, transdução de sinal, alterações no receptor da membrana, bem como alteração no DNA mitocondrial e no núcleo celular. Esses distúrbios no metabolismo lipídico podem favorecer mutações

celulares, potencializando o desequilíbrio oxidativo presente na carcinogênese da mama (AGNOLETTO et al., 2007; BADID et al., 2010; FENG et al., 2012; KHANNA et al., 2012).

Gupta et al. (2012) verificaram aumento na concentração plasmática de malondialdeído, bem como atividade reduzida das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase em mulheres com câncer de mama. De modo semelhante, na pesquisa de Pande et al. (2012) foi observado concentrações significativamente elevadas de malondialdeído em mulheres com o tumor maligno da mama quando comparado às saudáveis. Além disso, o estudo mostrou associação negativa significativa entre as concentrações de malondialdeído e *status* antioxidante total.

É importante chamar atenção para a atuação relevante das enzimas antioxidantes na proteção contra o câncer de mama. Pesquisas têm demonstrado redução na atividade desses substratos, como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase, o que está associado ao aumento da peroxidação lipídica nas pacientes com a doença (FENG et al., 2012; KARKI et al., 2015a; KHANNA et al., 2012).

Por outro lado, a peroxidação lipídica presente no tecido mamário cancerígeno pode conduzir à elevação da capacidade antioxidante, induzindo, por exemplo, aumento na atividade da enzima superóxido dismutase (ARAÚJO et al., 2015; KILIC et al., 2014). Assim, as espécies reativas de oxigênio estimulam a expressão de genes codificantes de enzimas do sistema de defesa antioxidante, como resultado de um mecanismo de regulação compensatório (ARAÚJO et al., 2015).

Gupta et al. (2012), em estudo realizado em mulheres com câncer de mama, verificaram concentrações elevadas de óxido nítrico e malondialdeído em relação ao grupo sem a doença. Dessa forma, o estresse oxidativo parece induzir atividade prooxidante da proteína p53, por ativar genes oxidantes tais como o gene indutível-p53 3 e a prolina oxidase, bem como reprimir a expressão dos genes antioxidantes superóxido dismutase 2 e fator relacionado ao NF-E2, potencializando o dano oxidativo celular (LIU; XU, 2011).

O gene supressor de tumor p53 codifica uma proteína de mesmo nome, que atua por meio de um mecanismo de *checkpoint* do ciclo celular. Sua inativação contribui para a progressão do câncer, pois favorece a ativação das proteínas

tirosina quinases e, conseqüentemente, inibição da apoptose (DE LA CRUZ-MORCILLO et al., 2013; VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005).

Na presença do estresse oxidativo, a atividade protetora da proteína p53 está comprometida, o que conduz à instabilidade genética e à produção acentuada de espécies reativas de oxigênio, além de favorecer o desenvolvimento das células tumorais (BENSAAD; VOUSDEN, 2007; BURHANS; HEINTZ, 2009).

Em estudo conduzido em mulheres com câncer de mama, Brancato et al. (2016) verificaram *in vitro* que, ao submeter células tumorais a um ambiente prooxidante, ocorre aumento nas concentrações de 8-oxi-7,8dihidroxi-2'-deoxiguanosina, marcador de lesão ao DNA. O estudo mostra que esse marcador estava elevado entre os códons 163 e 175, regiões com alta prevalência de mutações no p53, o que pode implicar na desregulação da expressão da proteína e redução da apoptose.

Milićević et al. (2014) observaram a presença de mutações do gene p53 em tecido tumoral mamário de mulheres com a doença, o que pode ser associado com a evolução clonal e progressão metastática do câncer de mama. Além disso, verificaram concentração elevada de peróxidos lipídicos, bem como baixa atividade das enzimas catalase, glutathione redutase e concentração reduzida de glutathione.

No mesmo estudo, também foi verificado que a expressão elevada da proteína p53 estava correlacionada negativamente com a atividade da catalase, a qual parece estar reduzida em função da atuação do gene indutível-p53. Somado a isso, a concentração elevada de peróxidos lipídicos correlacionou-se positivamente com a p53, evidenciando dano oxidativo decorrente da produção excessiva de peróxido de hidrogênio no câncer de mama (MILIĆEVIĆ et al., 2014).

2.2 Aspectos Metabólicos e Fisiológicos do Magnésio

O magnésio é o segundo cátion intracelular mais abundante no organismo e está envolvido em diversos processos de produção e utilização de proteínas e energia, síntese de DNA e RNA, bem como estabilização de membranas mitocondriais. Além disso, esse íon modula a condução e contração neuromuscular e cardiovascular, regula a função hormonal e imunológica, assim como atua na estabilidade genômica e genética (BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015; EVANGELOPOULOS et al., 2008; VOLPE, 2013).

A participação do magnésio na estabilidade genômica diz respeito a sua ação nos diferentes compartimentos celulares. No citoplasma, esse nutriente contribui para a manutenção da integridade da membrana, proteção contra o estresse oxidativo, bem como atua na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular. No núcleo, o magnésio mantém a integridade da estrutura, reduz a possibilidade de mutações durante a replicação e favorece a ativação dos processos de reparo do DNA (ANASTASSOPOULOU; THEOPHANIDES, 2002; HARTWIG, 2001).

O magnésio está distribuído em três compartimentos principais no organismo: tecido ósseo (65%), tecido muscular (34%) e fluidos intersticial e plasmático (1%). No plasma, esse nutriente pode ser encontrado no estado livre ou ionizado (60%); ligado a proteínas, como a albumina (20 a 30%); ou complexado com ânions, como fosfato, bicarbonato, citrato e lactato (1 a 2%) (KOLTE et al., 2014; SEVERO et al., 2015). Sua concentração normal varia de 0,75 a 1,05 mmol/L (TOPF; MURRAY, 2003).

Os valores considerados normais de magnésio eritrocitário estão entre 1,65 a 2,65 mmol/L (TIETZ, 1995). Este nutriente está presente em estruturas intracelulares, como o núcleo, mitocôndrias e retículos, bem como no citosol ligado a ribossomos e ainda nas moléculas de ATP, ADP e ácidos nucléicos (BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015; BELIN; HE, 2007; SEVERO et al., 2015).

A homeostase do magnésio é determinada, principalmente, por sua absorção no trato gastrointestinal, pelas necessidades teciduais e pela excreção renal (BELIN; HE, 2007). A absorção desse íon ocorre primordialmente no cólon, embora também possa ser realizada no jejuno e no íleo. Do conteúdo total de magnésio ingerido, cerca de 30 a 50% é absorvido, variando de acordo com as reservas do organismo e do seu aporte na dieta (BLANCHARD; VARGAS-POUSSOU, 2012; HOUILLIER, 2014; JAHNEN-DECHENT; KETTELER, 2012).

O magnésio pode ser absorvido por meio de dois mecanismos específicos: transportes paracelular e ativo, a depender do aporte desse mineral na dieta. O transporte paracelular envolve a difusão do nutriente através de pequenos espaços entre as células epiteliais. Em condições de consumo adequado ou baixo (< 20 mmol/dia), a absorção do magnésio ocorre por meio de transporte ativo, o qual se dá por meio de transportadores pertencentes à família denominada receptor de potencial transitório do tipo melastatina (especificamente TRPM6 e TRPM7) (BAAIJ;

HOENDEROP; BINDELS, 2012; HOUILLIER et al., 2014; JAHNEN-DECHENT; KETTELER, 2012).

O TRPM6 e TRPM7 estão localizados em maior quantidade no intestino e nos rins, e são regulados pelas concentrações de magnésio intracelular (ROMANI, 2011). O TRPM6 é expresso na membrana apical do enterócito, e provavelmente constitui o primeiro passo na absorção do magnésio, contribuindo para a homeostase do mineral (CASTILLO et al., 2010; DEASON-TOWNE; PERRAUD; SCHMITZ, 2011; MIDDELBEEK et al. 2012; VISSER et al., 2013; WOLF; TRAPANI, 2012).

A deficiência de magnésio pode ser resultante de sua excreção aumentada ou ingestão inadequada. Dessa forma, os rins constituem papel relevante na regulação da homeostase desse nutriente, sendo que aproximadamente 95% do mineral filtrado é reabsorvido. O limiar máximo de sua concentração plasmática é próximo dos valores de referência, sendo o excesso do nutriente quase totalmente excretado (SEVERO et al., 2015).

A maior parte da reabsorção do magnésio ocorre no ramo ascendente espesso da alça de Henle (65%) e no túbulo proximal (20 a 30%), por meio de vias paracelulares, que parecem ser reguladas por receptores de cálcio extracelular. O restante do mineral é reabsorvido no túbulo contorcido distal (10%), via transporte ativo transcelular, envolvendo canais específicos como o TRPM6. No entanto, o consumo excessivo do magnésio ou sua administração parenteral, bem como teor elevado de proteínas, sódio, cálcio, cafeína e álcool na dieta podem potencializar sua excreção renal (MARTÍN; GONZÁLEZ; SLATOPOISKY, 2009; NAITHANI; BHARADWAJI; DARBARI, 2014; SEVERO et al., 2015).

As principais fontes alimentares de magnésio são cereais integrais, vegetais folhosos verdes, espinafre, nozes, frutas, legumes e tubérculos (BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015; SEVERO et al., 2015). A recomendação de ingestão diária do mineral é de 310 a 320 mg para mulheres adultas e 400 a 420 mg para homens adultos (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997).

Alguns fatores dietéticos podem interagir com o magnésio inibindo sua absorção, como fibras alimentares, fitatos, oxalatos, fosfatos e ingestão proteica inferior a 30 g/dia; ou aumentando seu processo absorptivo, a exemplo de lactose e carboidratos (NAITHANI; BHARADWAJI; DARBARI, 2014; SEVERO et al., 2015).

No que diz respeito à avaliação do estado nutricional relativo ao magnésio,

esta pode ser realizada por meio da determinação de sua concentração plasmática, eritrocitária e urinária. O magnésio plasmático tem sido bastante utilizado, embora não reflita seu conteúdo corporal total, uma vez que, mesmo com ingestão deficiente do mineral, as concentrações no plasma permanecem constantes por um longo período de tempo (BARBAGALLO; DOMINGUEZ, 2007; ELIN, 2010; JAHNEN-DECHENT; KETTELER, 2012; ROCHA, 2009). Os valores considerados normais estão entre 0,75 e 1,05 mmol/L (TOPF; MURRAY, 2003).

Uma das frações do magnésio presente no plasma, o magnésio ionizado, também pode ser mensurado, e este corresponde a sua forma biológica mais ativa. Seus valores considerados normais estão entre 0,55 a 0,75 mmol/L (JAHNEN-DECHENT; KETTELER, 2012).

Com relação à concentração eritrocitária do magnésio, este marcador possibilita avaliação de médio a longo prazo do estoque desse mineral no organismo, pois apresenta meia-vida de 120 dias (JAHNEN-DECHENT; KETTELER, 2012; ROCHA, 2009). Os valores de referência para as concentrações de magnésio nos eritrócitos considerados normais estão entre 1,65 e 2,65 mmol/L (TIETZ, 1995).

A urina é um bom indicador para alterações recentes do estado nutricional relativo ao magnésio, visto que em casos de deficiência, sua excreção é reduzida por mecanismos de reabsorção renal para manutenção da homeostase do mineral no organismo. De forma particular, a urina de 24 (vinte e quatro) horas é um teste valioso, pois permite avaliar alterações na homeostase do magnésio nos rins relacionando-se com o estado fisiológico dos pacientes. Aproximadamente 3 a 4 mmol do mineral são perdidos diariamente por meio da via de excreção renal (GIBSON, 2004; JAHNEN-DECHENT; KETTELER, 2012). Os valores de referência estão entre 3,00 a 5,00 mmol/24 h para magnésio urinário (TIETZ, 1995).

2.3 Câncer de Mama, Estresse Oxidativo e Magnésio

A literatura tem destacado o papel relevante de minerais, a exemplo do magnésio, como nutriente importante na proteção contra a tumorigênese da mama, pois este estabiliza a estrutura de ácidos nucleicos e atua como cofator de enzimas envolvidas no metabolismo da glicose, replicação do DNA, reparo e expressão de genes (BLASZCZYK; DUDA-CHODAK, 2013; FENG et al., 2012; KHANNA et al., 2012; KO et al., 2014).

É oportuno mencionar a participação do magnésio na produção da glutatona, substrato responsável pela proteção da membrana celular contra o dano oxidativo, detoxificação e por processos coenzimáticos. Esse mineral é necessário para a ação da enzima gama-glutamil-transpeptidase, localizada externamente à membrana celular plasmática, onde se decompõe a glutatona extracelular circulante. Seu mecanismo de ação possibilita a liberação de cisteína, aminoácido necessário para que ocorra a regeneração de glutatona no meio intracelular (GATÉ et al., 2011; ZHANG; FORMAN; CHOI, 2005).

A deficiência de magnésio plasmático diminui a expressão e atividade de enzimas antioxidantes, a exemplo da glutatona peroxidase, superóxido dismutase e catalase, bem como reduz a concentração da glutatona extracelular, substrato que ajuda na regeneração de compostos importantes como o ácido ascórbico e tocoferol, os quais também estão reduzidos na hipomagnesemia. Além disso, a depleção desse mineral aumenta a produção de óxido nítrico por favorecer a atividade da enzima óxido nítrico sintase 2 nas células endoteliais (BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015; BELIN; HE, 2007; DEEPTI; NALINI, 2014; ROCHA et al., 2015).

Em situações de estresse oxidativo, como no câncer de mama, a enzima gama-glutamil-transpeptidase é necessária para manutenção do equilíbrio redox entre a glutatona reduzida e a oxidada. No entanto, tem sido sugerido que a deficiência de magnésio perturba a manutenção desse equilíbrio, pois não há substrato suficiente para a regeneração da glutatona e, conseqüentemente, a glutatona peroxidase, bem como outras enzimas antioxidantes, têm sua atividade reduzida, favorecendo a manifestação do estresse oxidativo (STARK et al., 2003).

Estudo conduzido por Feng et al. (2012), em mulheres com neoplasia mamária benigna e maligna, mostrou correlação negativa entre as concentrações séricas de magnésio e marcadores do estresse oxidativo, o que corrobora o potencial antioxidante do mineral sobre a atividade de enzimas do sistema de defesa do organismo, bem como demonstra o efeito deletério da deficiência desse nutriente sobre o DNA e estabilidade das membranas.

De forma semelhante, as pesquisas de Karki et al. (2015a) e Karki et al. (2015b) mostraram redução dos valores séricos de magnésio na população com câncer mamário, quando comparados a indivíduos saudáveis e com tumor benigno. Sobre esses resultados, pode-se inferir que o estresse oxidativo presente no grupo com a doença contribui para a redução da atividade das enzimas antioxidantes

superóxido dismutase e glutatona peroxidase, comprometendo a sua ação na neutralização de espécies reativas de oxigênio no tecido tumoral (KARKI et al., 2014).

Uma meta-análise de Ko et al. (2014) demonstrou que a ingestão elevada de magnésio tem efeito protetor contra o câncer. Tao et al. (2015) realizaram uma pesquisa de coorte com 1.170 mulheres com o tumor mamário e mostraram que aquelas que possuíam o maior tercil de ingestão do mineral tinham menor risco de mortalidade quando comparadas àquelas com o menor tercil de ingestão.

A partir dos resultados dos estudos que revelaram alterações nas concentrações de magnésio no câncer de mama, foram conduzidas pesquisas na perspectiva de avaliar o efeito da suplementação com mineral na inibição da carcinogênese (ABDELGAWAD et al., 2015). Um estudo *in vitro* com células MCF-7 desenvolvido por Mirmalek et al. (2016) mostrou que o uso de sulfato de magnésio (40 µg/mL) utilizado como terapia no tratamento do câncer de mama tem efeito positivo citotóxico, pois promove a redução da permeabilidade celular de células neoplásicas, conduzindo a 50% de morte celular do tumor mamário.

Ressalta-se que o magnésio também participa da estrutura e função da p53, em particular, na sua capacidade de ligação ao DNA celular. Sobre este aspecto, Wang et al. (2011) demonstraram, por meio de análise computacional, que este mineral possui afinidade relevante na manutenção de uma orientação favorável para o resíduo Arg248 em sua interação com o DNA, etapa crítica para a atividade da p53. Logo, o magnésio favorece a ligação p53-DNA, efeito este que pode ser comprometido em situações de deficiência do nutriente (MURATA et al., 2015).

A hipomagnesemia presente no câncer de mama leva à redução da atividade da p53 e entrada de cálcio na célula, contribuindo para a produção excessiva de ácido úrico e radical hidroxila, o qual reage, então, com o óxido nítrico, formando peroxinitrito, o que agrava o estresse oxidativo e a inflamação (BLASZCZYK; DUDA-CHODAK, 2013; MURATA et al., 2015; MORAIS et al., 2017; VESPER et al., 2010; ZHOU et al., 2012).

Este processo inflamatório pode ser potencializado, pois o principal canal transportador de magnésio no organismo, o TRPM7, favorece o influxo de cálcio e promove a proliferação celular e metástase (BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2012; DEASON-TOWNE; PERRAUD; SCHMITZ, 2011; DHENNIN-DUTHILLE et al., 2014; WOLF; TRAPANI, 2012).

Nas últimas décadas tem sido bastante investigado a condição nutricional de mulheres com câncer de mama em relação ao magnésio. Os resultados desses estudos revelam comprometimento na homeostase do mineral, com valores séricos reduzidos (ABDELGAWAD et al., 2015; CZERNY et al., 2014; KARKI et al., 2015b). Sobre esse aspecto, na fase proliferativa do crescimento tumoral mamário ocorre aumento da concentração intracelular do magnésio, pois o tumor “sequestra” esse íon, o que pode contribuir para a sua deficiência no plasma e aumentar o estresse oxidativo (BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015).

Com base nos dados existentes na literatura, torna-se evidente a complexidade da patogênese do câncer de mama, com diversos mecanismos ainda não totalmente elucidados. Nesse sentido, destaca-se a participação do estresse oxidativo como umas das desordens bioquímicas e celulares de grande importância para manifestação da doença. Assim, a busca da definição sobre a possível atuação do magnésio na defesa antioxidante dessas pacientes é conduzida na perspectiva de obter estratégias nutricionais que possam contribuir na prevenção e/ou controle da mesma.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar parâmetros bioquímicos do magnésio e a atividade da enzima superóxido dismutase e relacioná-los com marcador do estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama.

3.2 Objetivos Específicos

- o Estimar o consumo alimentar e a adequação da dieta em relação a macronutrientes e magnésio;
- o Determinar as concentrações de magnésio plasmático, ionizado, eritrocitário e urinário nas participantes do estudo;
- o Determinar a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase eritrocitária e as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas mulheres com câncer de mama e comparar com o grupo controle.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

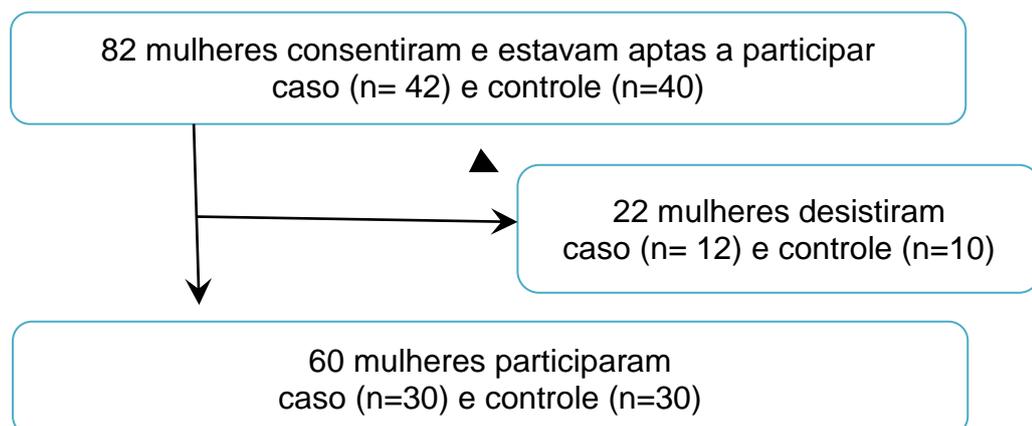
4.1 Caracterização do Estudo e Protocolo Experimental

Estudo transversal desenvolvido com 30 mulheres diagnosticadas com câncer de mama, na faixa etária entre 20 a 69 anos de idade, atendidas em um consultório da rede particular em Teresina/PI. Simultaneamente, foram coletados dados de 30 mulheres saudáveis, sem diagnóstico de câncer de mama, com características semelhantes ao grupo caso em relação à idade e sexo, as quais constituíram o grupo controle.

Para a seleção das participantes foram considerados os seguintes critérios de inclusão: diagnóstico de câncer de mama comprovado histologicamente (grupo caso); não fumar, não ingerir álcool de forma crônica, não apresentar diabetes mellitus, insuficiência renal crônica, doenças hepáticas e inflamatórias intestinais; não estar grávida ou amamentando, não ter realizado tratamento prévio da doença, bem como não fazer uso de medicamentos e/ou suplementos nutricionais que possam interferir no estado nutricional relativo ao magnésio.

A técnica de amostragem utilizada foi não probabilística por conveniência. Assim, a definição da amostra do grupo caso foi baseada nos critérios de inclusão apresentados e na demanda espontânea de atendimentos em um consultório da rede particular no período de maio de 2016 a janeiro de 2017. O recrutamento e a seleção das participantes do estudo estão descritos na figura 1.

Figura 1- Fluxograma do recrutamento e seleção das participantes do estudo. Teresina-PI, Brasil, 2017.



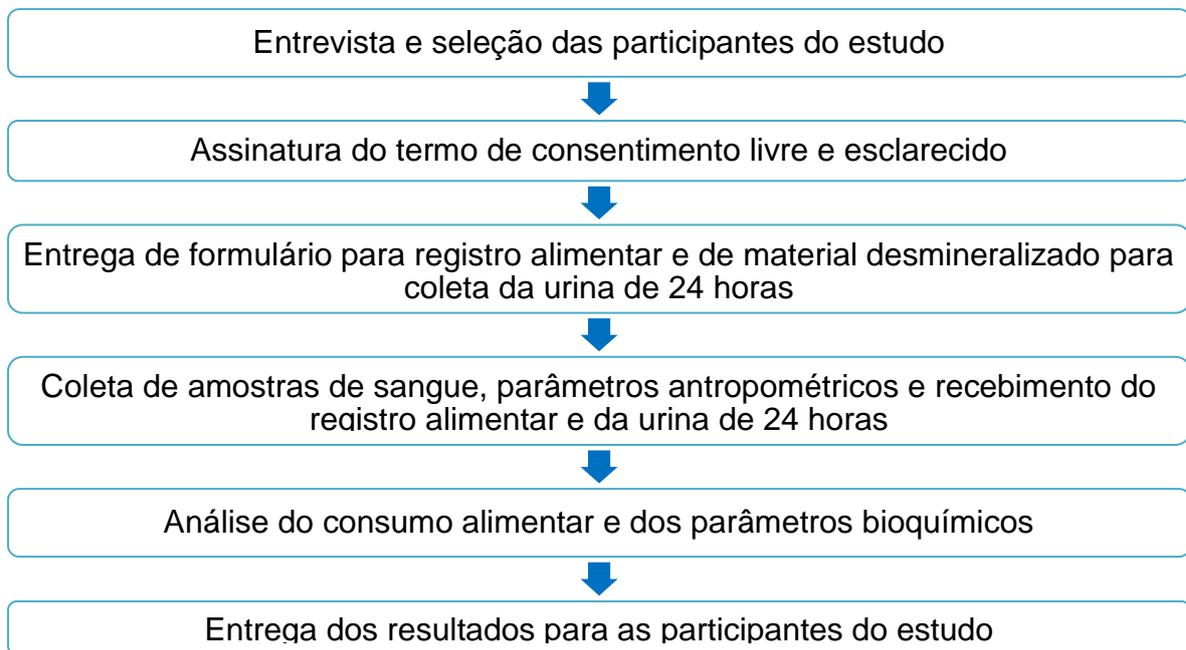
Todas as mulheres que aceitaram participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A), bem como receberam informações detalhadas sobre a pesquisa com linguagem adequada, conforme estabelecido pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012). Foi preenchida uma ficha de cadastro da participante (Apêndice B) e entregues os formulários para obtenção do registro alimentar (Apêndice C) e material para a coleta da urina de 24 horas (Apêndice D).

Para o grupo controle, foi feito agendamento de datas de acordo com a disponibilidade das participantes para aferição das medidas antropométricas (peso corporal e estatura), além de coleta de sangue, recebimento da urina de 24 horas e do registro alimentar. Para o grupo caso, esses parâmetros foram obtidos momentos antes do procedimento cirúrgico. Os dados foram registrados nas fichas de cadastro da participante e, para as mulheres que possuíam câncer de mama, de acordo com o exame histopatológico, foi incluída informação acerca do tipo e do grau histológico do tumor mamário.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí, CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) nº 46458515.0.0000.5214 e número do parecer nº 1.322.988 (ANEXO A) e também aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário com o parecer de nº 53/15 (ANEXO B).

As etapas realizadas pelas participantes do estudo estão descritas na figura 2.

Figura 2- Fluxograma das etapas realizadas pelas participantes do estudo. Teresina-PI, Brasil, 2017.



4.2 Caracterização das Participantes da Pesquisa

4.2.1 Peso corporal e Estatura

Anteriormente à coleta de sangue, o peso corporal foi determinado utilizando uma balança digital (Plenna® modelo SIM09190), com capacidade máxima de 180 Kg, graduada em 100 gramas, estando as participantes do estudo descalças, em posição ereta, com os pés unidos e braços estendidos ao longo do corpo. A estatura foi mensurada com antropômetro (Secar®), graduado em centímetros e com barra vertical fixa, para posicionamento sobre a cabeça, estando as participantes descalças, em posição ereta, com os braços estendidos ao longo do corpo, pés unidos, cabeça erguida e olhando para um ponto fixo na altura dos olhos (BRASIL, 2011).

4.3 Avaliação do Consumo Alimentar

Para a avaliação do consumo de alimentos, foi utilizado um inquérito alimentar de acordo com a técnica de registro alimentar de 3 dias (Apêndice C),

compreendendo dois dias alternados durante a semana e um dia no final de semana (sábado ou domingo). No momento da entrega dos formulários às participantes da pesquisa, foi dada orientação quanto à forma correta de anotar os alimentos, como discriminar os tipos de refeições, preparações, porcionamento, medidas caseiras, quantidades e horários em que as mesmas foram consumidas.

A quantidade de energia, macronutrientes e magnésio foram calculados pelo *software* “Dietpro clínico”, versão 5i (A. S. Sistemas). Os alimentos foram analisados com base em tabelas de composição e preparações de alimentos, utilizando a seguinte ordem de prioridade: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011), Tabela de Composição de Alimentos (PHILIPPI, 2002) e Tabela da *USDA Nutrient Data Base For Standard Reference Release 20* do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2007), de forma que todos os alimentos apresentassem informação nutricional. O percentual médio de adequação de macronutrientes e magnésio foi calculado com base nas *Dietary Reference Intakes – DRIs* (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997, 2005).

4.4 Análise dos dados dietéticos

Após aplicação do registro alimentar de três dias, os valores de ingestão de magnésio e de macronutrientes foram ajustados pela variabilidade intrapessoal e interpessoal, corrigida por técnicas de modelagem estatística incorporadas na plataforma *online Multiple Source Method – MSM* (versão 1.0.1) (HAUBROCK et al., 2011; MSM, 2011).

O MSM estima a ingestão habitual de alimentos e nutrientes de indivíduos e grupos populacionais a partir dos dados provenientes de dois ou mais inquéritos alimentares de curto prazo coletados em cada indivíduo da amostra (HARTTIG et al., 2011; HAUBROCK et al., 2011).

Para estimar o consumo habitual, foi feita análise de regressão logística, verificando a probabilidade de ingerir um alimento ou nutriente em um dia aleatório, incluindo no modelo estatístico as covariáveis consideradas preditivas para a ingestão alimentar, como sexo e idade (LAUREANO et al., 2016; MSM, 2011; SOUVEREIN et al., 2011).

Para avaliar a quantidade habitual consumida de alimentos a partir do registro alimentar de três dias, foi feita regressão linear simples, considerando-se

também as covariáveis preditivas (sexo e idade) para ingestão alimentar. Em seguida, foi feita a estimativa da ingestão diária usual dos nutrientes para cada participante, a partir da multiplicação entre a probabilidade do consumo e a quantidade usual de ingestão (MSM, 2011; SARTORELLI; BARBIERI; PERDONÁ, 2014).

Para estimar a prevalência de inadequação do magnésio nos grupos, utilizou-se a necessidade média estimada (EAR) como ponto de corte, avaliando-se a proporção das mulheres na faixa etária de 31 a 70 anos cujo consumo estava abaixo de 265 mg/dia (BEATON, 1994; INSTITUTE OF MEDICINE, 1997). Para análise dos macronutrientes foi utilizado como referência o intervalo aceitável de distribuição de macronutrientes (AMDR) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005).

Para o cálculo da prevalência de inadequação do magnésio, foi aplicado o teste Z, (BEATON, 1994), conforme fórmula descrita a seguir:

$$\text{Escore } z = \frac{(\text{EAR} - \text{média})}{dp}$$

Onde:

EAR = necessidade média estimada para o magnésio

média = média ajustada do grupo

dp = desvio padrão da distribuição ajustada

4.5 Coleta do Material Biológico

4.5.1 Coleta de Sangue

Amostras de 20 mL de sangue venoso foram coletadas estando as participantes em jejum mínimo de 12 horas, sendo utilizadas seringas plásticas descartáveis e agulhas de aço inoxidável, estéreis e descartáveis. O sangue colhido foi distribuído em tubos distintos: (1) tubo de polipropileno contendo citrato de sódio a 30% como anticoagulante (10 µL/ mL sangue) para a análise do magnésio (08 mL de sangue) e (2) tubo contendo ácido etileno diaminotetracético (EDTA) para análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e da atividade da enzima superóxido dismutase (12 mL de sangue).

4.5.2 Coleta de Urina de 24 Horas

Para a coleta de urina de 24 h, foram fornecidos frascos desmineralizados, que foram pesados antes e após a coleta em balança semianalítica para a determinação do volume urinário a partir da densidade. A urina foi acidificada com ácido clorídrico a 3 mol/L e homogeneizada, para melhorar sua conservação e evitar a precipitação de magnésio. Após esse procedimento, foram retirados 8 mL do volume urinário e distribuídos em 4 microtubos (2 mL cada) previamente desmineralizados, devidamente identificados e conservados em *freezer* a -20°C para análise posterior (ELIN, 1987).

4.6 Determinação dos Parâmetros Bioquímicos do Magnésio

4.6.1 Controle de Contaminação e Preparo dos Reagentes

A fim de garantir o controle de contaminação por minerais, toda a vidraria e material de polipropileno utilizado para as análises foram desmineralizados antes do uso, por meio do banho em solução de ácido nítrico a 10%, durante um período mínimo de 24 horas. Posteriormente, foram enxaguados em água deionizada, no mínimo 10 vezes, secos em estufa e mantidos em depósitos fechados, até o momento da utilização (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Os reagentes foram preparados e diluídos em água livre de íons processada pelo Milli-Q (Millipore, Bedford, MA).

4.6.2 Separação dos Componentes do Sangue

O plasma foi separado do sangue total por centrifugação (SIGMA® 4K15) a 1831xg durante 15 minutos a 4 °C. Em seguida, o plasma foi extraído com pipeta automática e acondicionado em microtubos de polipropileno previamente desmineralizados, sendo posteriormente conservados a -20 °C.

Para separação dos eritrócitos e subsequente determinação do magnésio, foram utilizados os métodos propostos por Whitehouse et al. (1982). A massa eritrocitária foi lavada com 10 mL de solução salina isotônica (NaCl a 0,9%), sendo cuidadosamente homogeneizada por inversão e, posteriormente, centrifugada

(SIGMA[®] 4K15) a 2493xg por 10 minutos. Este procedimento foi repetido três vezes para remover contaminantes dos eritrócitos (plaquetas e leucócitos). Após a última centrifugação, a solução salina foi aspirada e descartada, e a massa eritrocitária foi extraída cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta automática, quando foi transferida para tubos de polipropileno desmineralizados, que foram mantidos à temperatura de -20°C para posterior análise (WHITEHOUSE et al. 1982).

4.6.3 Determinação da Hemoglobina

A concentração de hemoglobina na massa eritrocitária foi determinada conforme o método da cianometahemoglobina para expressar as concentrações de magnésio eritrocitário e atividade da enzima superóxido dismutase (VAN ASSENDELFT, 1972). Inicialmente, em um microtubo contendo 200 µL de massa eritrocitária foi adicionado 600 µL de água ultrapura, perfazendo um lisado com proporção 1:4. Em seguida, a uma alíquota de 20 µL desse lisado foi acrescentado 5 mL de solução de *Drabkin* (Labtest®, Brasil). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV visível (Bel Photonics®, SP1102), considerando o comprimento de onda de 540 nm.

4.6.4 Determinação do Magnésio Plasmático, Ionizado, Eritrocitário e Urinário

As análises de magnésio plasmático, ionizado, eritrocitário e urinário foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Emissão Atômica - Embrapa (Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo), localizado em Sete Lagoas – Minas Gerais. A análise elementar do mineral foi realizada em um espectrômetro de plasma indutivamente acoplado - Espectrometria de Emissão Óptica com uma configuração de vista axial e um nebulizador V-Groove (720 ICP/OES, Varian Inc., Califórnia, Estados Unidos). Os limites de detecção foram medidos a partir da equação 3 x desvio padrão de 10 medições do branco, dividido pela declividade da curva de calibração. Soluções estoque monoelementais de magnésio 1000 mg.L⁻¹ (Titrisol e Certipur - Merck, Germany) foram utilizados na preparação de soluções de referência para a curva de calibração e otimização das condições analíticas. Todas as soluções aquosas e as diluições foram preparadas com água ultrapura (18 MΩ.cm⁻¹), obtida por meio de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA).

As amostras de plasma foram diluídas em 1:50, v/v da seguinte forma: 3,0% (m/v) 1-butanol, 0,1% (v/v) TAMA (surfactante de alta pureza), 0,05% (v/v) HNO₃. A massa eritrocitária foi diluída 1:100 v/v da seguinte forma: 3,0% (m/v) 1-butanol, 0,2% (v/v) TAMA (surfactante de alta pureza), 0,1% (v/v) HNO₃, para auxiliar na dissolução dos elementos traço nas amostras. Duas linhas de emissão para cada elemento foram testadas antes da seleção.

O magnésio foi lido em 280,271 nm (linha iônica). A escolha da linha espectral de análise foi baseada tanto na sua sensibilidade quanto na interferência espectral. As amostras foram medidas em triplicata. Amostras de material de referência certificado, Seronorm TM Oligoelement Serum L-1 e L-2 (Billingstad, Noruega), foram determinadas para validar as medições analíticas em ICP-OES.

Para realização da leitura das amostras, o aparelho foi configurado nas seguintes condições: Potência: 1,4 kW; Fluxo de plasma (gás): 15 L/min; Fluxo de Gás auxiliar: 1,5 L/min; Tipo de Câmara de Spray: Ciclônica; e Fluxo do Nebulizador: 0,7 L/min. As curvas de calibração foram preparadas nas seguintes concentrações para os analitos testados: 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µg/L em soluções diluentes contendo 3,0% (m/v) 1-butanol, 0,1% (v/v) TAMA (surfactante de alta pureza) e 0,05% (v/v) HNO₃.

Os valores de referência adotados foram de 0,75 a 1,05 mmol/L para magnésio plasmático (TOPF; MURRAY, 2003), 1,65 a 2,65 mmol/L para magnésio eritrocitário (TIETZ, 1995), 0,55 a 0,75 mmol/L para magnésio ionizado (JAHNEN-DECHENT, 2012) e 3,00 a 5,00 mmol/24 h para magnésio urinário (TIETZ, 1995).

4.7 Determinação de Marcadores do Estresse Oxidativo

4.7.1 Determinação das Concentrações Plasmáticas das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

As concentrações plasmáticas de TBARS foram determinadas seguindo-se método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), com adaptações. Antes do processamento das amostras, uma curva analítica de calibração foi preparada nas concentrações 1; 5; 10 e 25 nmol, utilizando-se o tetraetoxipropano (TEP) como padrão.

Em microtubos contendo 200 μL de plasma e um com 200 μL de água destilada (branco), foram adicionados 350 μL de ácido acético a 20% (pH 3,5) e 600 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5%, diluído em ácido acético. As amostras foram preparadas em triplicata e incubadas em banho-maria, com sistema de agitação a 85°C por uma hora e, após esse período, submetidos a banho de gelo por 15 minutos.

Em seguida, adicionou-se 50 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 8,1% nos microtubos, procedendo-se à centrifugação por 15 minutos a 13680xg a 25°C. O sobrenadante foi extraído e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV visível (Bel Photonics®, SP1102), considerando o comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mL.

4.7.2 Determinação da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase Eritrocitária

A determinação da atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária foi realizada de acordo com o método descrito por Das, Samanta e Chainy (2000), que analisa a quantidade da enzima capaz de inibir em 50% a formação de nitrito em reação de ponto final. Previamente ao processamento das amostras, uma curva analítica de calibração foi construída utilizando nitrito de sódio em concentrações variando entre 5 e 50 μM .

Inicialmente, foram adicionados os seguintes reagentes em tubos de ensaio de 5 mL, que constituíram a mistura da reação: 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 massa eritrocitária ou do tampão fosfato (branco). Em seguida, essa mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Após esse período, foram adicionados 80 μL de riboflavina à solução, e os tubos foram submetidos a banho de luz durante 10 minutos. Finalmente, 1 mL de reagente de Griess foi adicionado ao sistema, sendo seguido pela leitura de absorbância em leitor de microplacas EZ Read 400 (Biochrom), considerando o comprimento de onda de 543 nm.

O cálculo da atividade da enzima superóxido dismutase foi feito conforme a fórmula:

$$\text{SOD} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Absorbância do branco}}{\text{Absorbância do teste} - 1} \times \text{Diluição}$$

A atividade da enzima superóxido dismutase foi corrigida utilizando as concentrações de hemoglobina encontradas nos eritrócitos, segundo cálculo abaixo:

$$\text{SOD} \left(\frac{\text{U}}{\text{g Hb}} \right) = \frac{\text{SOD (U/mL)}}{[\text{Hb}](\text{g/mL})}$$

4.8 Análise Estatística

Os dados foram organizados em planilhas do Excel[®] e exportados para o programa *GraphPrad Prism*[®] (versão 6.01) para análise estatística dos resultados. Realizou-se estatística descritiva, comparação entre médias e análise de correlação das variáveis observadas nos grupos estudados.

O teste de *Kolmogorov-Smirnov* foi aplicado para verificar a normalidade dos dados. Em seguida, para fins de comparação entre os grupos, o teste “t” de *Student* foi utilizado para as variáveis com distribuição normal e o teste de *Mann Whitney* para aquelas com distribuição não paramétrica.

Para o estudo de correlações, o coeficiente de correlação linear de *Pearson* foi utilizado para os dados com distribuição normal, e o coeficiente de correlação de *Spearman* para aqueles com distribuição não paramétrica. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando o valor de $p < 0,05$, adotando-se um intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das Participantes da Pesquisa

O estudo foi realizado com um grupo de 30 mulheres com câncer de mama e 30 mulheres sem a doença, que constituíram o grupo controle. A média de idade das mulheres com câncer de mama e do grupo controle foi de $50,9 \pm 9,78$ e $46,43 \pm 9,36$ anos, respectivamente. O grupo caso apresentou valores médios de peso corporal de $62,41 \pm 10,89$ kg e estatura de $1,57 \pm 0,07$ m. Os valores médios de peso corporal e estatura do grupo controle foram de $59,79 \pm 8,46$ kg e $1,58 \pm 0,06$ m, respectivamente. Não houve diferença estatística significativa nesses parâmetros entre os grupos avaliados ($p > 0,05$).

5.2 Consumo Alimentar

Os valores médios e desvios padrão para energia e macronutrientes encontrados nas dietas consumidas pelas mulheres com câncer de mama e grupo controle estão apresentados na tabela 1. Essas variáveis também não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Valores médios e desvios padrão da ingestão ajustada de energia e macronutrientes das mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.

Energia/Nutrientes	Grupo caso (n=25) Média \pm DP	Grupo controle (n=28) Média \pm DP	p
Energia (kcal)	1473,94 \pm 415,76	1583,28 \pm 337,12	0,2958
Carboidrato (%)	49,91 \pm 9,29	50,92 \pm 6,15	0,3910
Proteína (%)	26,62 \pm 6,73	23,94 \pm 3,65	0,7540
Lipídio (%)	23,78 \pm 5,23	25,46 \pm 4,48	0,0741

Teste *t* de Student ($p < 0,05$). Valores de referência: 10 a 35% de proteína, 20 a 35% de lipídio e 45 a 65% de carboidratos (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005).

A tabela 2 apresenta a ingestão de magnésio ajustada das mulheres com câncer de mama e do grupo controle. Verificou-se que não houve diferença

estatística significativa entre os grupos em relação ao consumo do mineral ($p>0,05$) e que ambos apresentaram ingestão reduzida de magnésio.

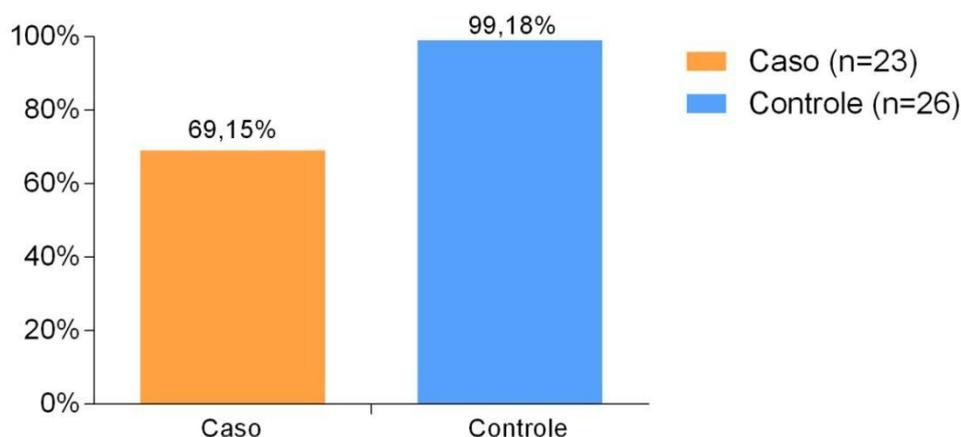
Tabela 2 – Valor médio e desvio padrão da ingestão de magnésio das mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.

Nutriente	Grupo caso (n=25)	Grupo controle (n=28)	p
	Média ± DP	Média ± DP	
Magnésio ajustado (mg)	220,2 ± 79,9	188,9 ± 34,3	0,0648

Teste *t* de *Student* ($p<0,05$). Valores de referência de ingestão do magnésio para o sexo feminino: EAR = 255 mg Mg/dia (faixa etária entre 20 e 30 anos) e 265 mg Mg/dia (faixa etária entre 31 e 70 anos) (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997).

A figura 3 apresenta a prevalência de inadequação da ingestão habitual de magnésio das mulheres com câncer de mama e do grupo controle segundo o método do ponto de corte pela necessidade média estimada. O grupo controle apresentou maior percentual de inadequação em relação ao grupo caso.

Figura 3 – Prevalência de inadequação da ingestão habitual de magnésio das mulheres com câncer de mama e do grupo controle segundo o método do ponto de corte pela EAR. Teresina-PI, Brasil, 2017.



Valores de referência de ingestão do magnésio para o sexo feminino: EAR = 265 mg Mg/dia (faixa etária entre 31 e 70 anos) (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997).

5.3 Parâmetros Bioquímicos de Avaliação do Magnésio

Na tabela 3 encontram-se as concentrações plasmáticas, ionizadas, eritrocitárias e urinárias de magnésio das mulheres com câncer de mama e grupo controle. Esses resultados mostram diferença estatística significativa entre os grupos em relação aos parâmetros avaliados ($p < 0,0001$).

Tabela 3 – Valores médios e desvios padrão das concentrações plasmáticas, ionizadas, eritrocitárias e urinárias de magnésio das mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.

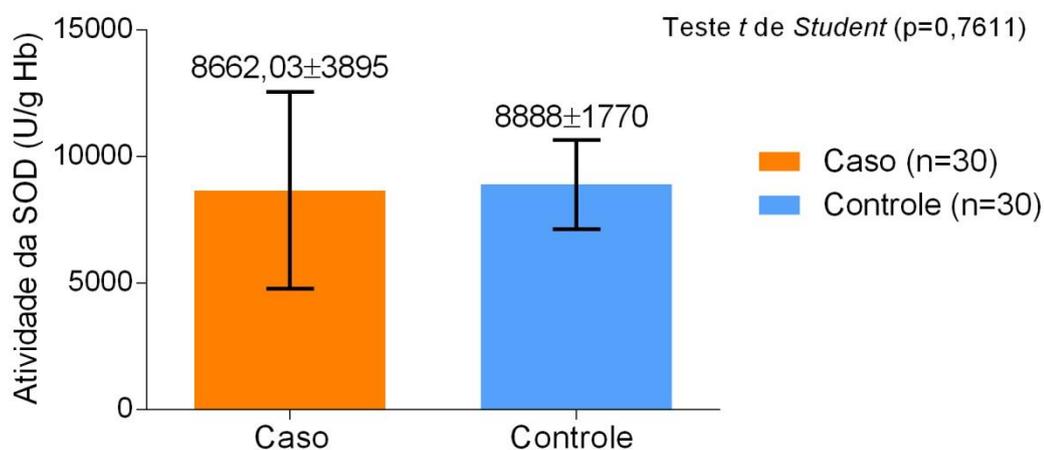
Parâmetros	Grupo caso	Grupo controle	p
	(n=30)	(n=30)	
	Média ± DP	Média ± DP	
Magnésio plasmático (mmol/L)	0,52 ± 0,05***	0,88 ± 0,10	p<0,0001
Magnésio ionizado (mmol/L)	0,44 ± 0,05***	0,68 ± 0,05	p<0,0001
Magnésio eritrocitário (mmol/L)	1,38 ± 0,14***	2,07 ± 0,14	p<0,0001
Magnésio urinário ^a (mmol/24h)	6,64 ± 2,66***	3,36 ± 1,77	p<0,0001

^aMagnésio urinário: grupo caso (n=24) e controle (n=27).***Valores significativamente diferentes entre as mulheres do grupo caso e grupo controle, teste *t* de *Student* ou *Mann-Whitney* ($p < 0,0001$). Valores de referência: magnésio plasmático = 0,75 a 1,05 mmol/L (TOPF; MURRAY, 2003), magnésio plasmático ionizado = 0,55 a 0,75 mmol/L (JAHNEN-DECHENT, 2012), magnésio eritrocitário = 1,65 a 2,65 mmol/L (TIETZ, 1995) e magnésio urinário = 3,00 a 5,00 mmol/24h (TIETZ, 1995).

5.4 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase Eritrocitária

O resultado da análise da atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária nas mulheres com câncer de mama e grupo controle está apresentado na figura 4. Verificou-se que não houve diferença estatística significativa na atividade dessa enzima entre os grupos caso e controle ($p > 0,05$).

Figura 4 – Atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária nas mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.

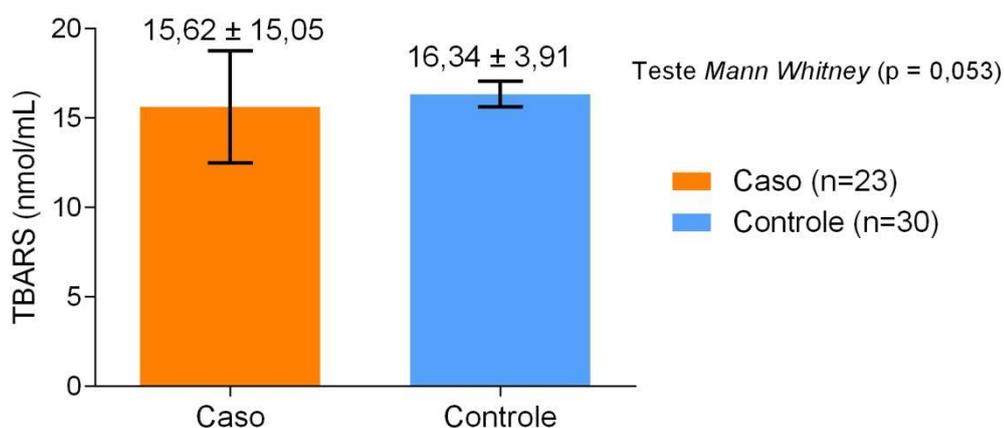


Teste *t* de Student ($p>0,05$).

5.5 Concentrações Plasmáticas das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

Os valores das concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, marcador da peroxidação lipídica, nas mulheres com câncer de mama e grupo controle estão apresentados na figura 5. Pôde-se identificar que não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Figura 5 – Concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico das mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.



Teste *Mann Whitney* ($p<0,05$).

5.6 Estudo de Correlação entre a Atividade da Enzima Superóxido Dismutase Eritrocitária e as Concentrações Plasmáticas das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

A tabela 4 apresenta os resultados da análise de correlação entre a atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária e as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas mulheres com câncer de mama e grupo controle. Verificou-se que não houve correlação significativa entre esses parâmetros nos grupos avaliados ($p > 0,05$).

Tabela 4 – Análise de correlação linear simples entre a atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária e as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.

Parâmetro	Atividade da SOD (U/gHb)			
	Grupo caso (n=23)		Grupo controle (n=30)	
	r	p	r	p
TBARS (nmol/mL)	-0,2846	0,1881	0,2533	0,1768

Correlação Linear de *Pearson* ou *Spearman* ($p < 0,05$). SOD = Superóxido dismutase, TBARS = Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

5.7 Estudo de Correlação entre Parâmetros do Magnésio e a Atividade da Enzima Superóxido Dismutase Eritrocitária

A tabela 5 apresenta os resultados da análise de correlação entre os parâmetros do magnésio e a atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária nas mulheres com câncer de mama e grupo controle. Houve correlação significativa negativa entre a atividade da enzima e o magnésio eritrocitário no grupo controle ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Análise de correlação linear simples entre os parâmetros do magnésio e a atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária nas mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.

Parâmetros	Atividade da SOD (U/gHb)			
	Grupo caso (n=30)		Grupo controle (n=30)	
	r	p	r	p
Mg dietético ^a (mg/dia)	-0,1036	0,6221	0,0586	0,7672
Mg plasmático (mmol/L)	0,0264	0,8900	0,1135	0,5505
Mg ionizado (mmol/L)	0,2018	0,2850	0,1779	0,3468
Mg eritrocitário (mmol/L)	0,1062	0,5764	-0,4586*	0,0108
Mg urinário ^b (mmol/24h)	0,1008	0,6317	0,1859	0,3533

^aMagnésio dietético: grupo caso (n=25) e controle (n=28). ^bMagnésio urinário: grupo caso (n=25) e controle (n=27). *Valores significativamente diferentes entre as mulheres do grupo caso e grupo controle, correlação Linear de *Pearson* ou *Spearman* ($p < 0,05$). SOD = Superóxido dismutase, Mg = magnésio.

5.8 Estudo de Correlação entre Parâmetros do Magnésio e as Concentrações Plasmáticas das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

A tabela 6 apresenta os resultados da análise de correlação entre os parâmetros do magnésio e as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas mulheres com câncer de mama e grupo controle. Verificou-se que houve correlação negativa significativa entre o magnésio urinário e as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no grupo caso ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Análise de correlação linear simples entre parâmetros do magnésio e as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas mulheres com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2017.

Parâmetros	TBARS (nmol/mL)			
	Grupo caso (n=23)		Grupo controle (n=30)	
	r	p	r	p
Mg dietético ^a (mg/dia)	-0,0602	0,8011	-0,1738	0,3764
Mg plasmático (mmol/L)	-0,3772	0,0524	-0,1549	0,4136
Mg ionizado (mmol/L)	-0,3511	0,0725	-0,0241	0,8993
Mg eritrocitário (mmol/L)	0,0056	0,9776	-0,1168	0,5389
Mg urinário ^b (mmol/24h)	-0,5333*	0,0187	0,1488	0,4587

^aMagnésio dietético: grupo caso (n=20) e controle (n=28). ^bMagnésio urinário: grupo caso (n=19) e controle (n=27). *Valores significativamente diferentes entre as mulheres do grupo caso e grupo controle, correlação Linear de *Pearson* ou *Spearman* ($p < 0,05$). TBARS = Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, Mg = magnésio.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados parâmetros do magnésio, atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária e as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em mulheres com câncer de mama, bem como foi investigada a existência de correlação entre essas variáveis nos grupos estudados.

No que diz respeito ao consumo alimentar, observou-se que a ingestão de energia e macronutrientes não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos caso e controle. Os resultados encontrados mostram consumo habitual dos macronutrientes dentro da faixa recomendada pelas DRIs (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005), em ambos os grupos. Assim, percebe-se que a presença do câncer de mama não parece influenciar o hábito alimentar das pacientes.

Sobre a ingestão média de magnésio, verificou-se valores abaixo da recomendação para o nutriente, sem diferença estatística significativa entre os grupos. Associado a isso, a prevalência de inadequação do consumo do mineral foi de quase 70,0% para o grupo caso. O estudo também revela inadequação na ingestão desse nutriente no grupo controle (99,2%). Ressalta-se que nas pesquisas realizadas por Araújo et al. (2013) e Surwillo; Wawrzyniak (2013) também foram encontrados dados semelhantes.

Uma possível justificativa para tal resultado, diz respeito à provável ingestão deficiente de alimentos fontes de magnésio, a exemplo de vegetais folhosos verdes, cereais integrais e oleaginosas, o que certamente limita o alcance da recomendação estabelecida para o nutriente. Além disso, o consumo elevado de alimentos refinados pelas participantes do estudo, por possuir teor reduzido de magnésio em sua composição, influencia na ingestão de micronutrientes, em particular do magnésio (BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015; SEVERO et al., 2015).

Considerando a ação importante do magnésio na defesa do sistema antioxidante, com seu papel na proteção contra o câncer, é oportuno chamar atenção para o fato de que a sua ingestão deficiente é um aspecto negativo da dieta, pois pode contribuir para a manifestação do tumor por meio de diversos mecanismos (BLASZCZYK; DUDA-CHODAK, 2013; FENG et al., 2012).

Nessa temática, destaca-se o estudo conduzido por Tao et al. (2015), que mostrou efeito protetor da ingestão do magnésio sobre a mortalidade em mulheres com câncer de mama, embora a pesquisa de Bradshaw et al. (2013) não tenha

evidenciado associação entre o consumo alimentar do mineral e o risco da doença.

Com relação aos resultados da análise de magnésio no plasma, as mulheres com câncer de mama apresentaram concentrações reduzidas, com diferença estatística significativa entre os grupos. Nesse estudo, também pôde-se verificar que as mulheres com câncer apresentavam concentrações plasmáticas de magnésio inferiores aos valores de referência adotados por Topf; Murray (2003). Sobre esse aspecto, a baixa ingestão de magnésio observada nesse estudo, em particular pelo grupo caso, pode ser considerada um fator contribuinte para a sua redução no plasma.

Nessa discussão, é oportuno ressaltar que as concentrações plasmáticas reduzidas do magnésio nas mulheres com câncer de mama podem ser explicadas pelas possíveis implicações promovidas pela carcinogênese no metabolismo do mineral. Um dos mecanismos propostos na literatura para justificar tal fato, trata da superexpressão do transportador de magnésio TRPM7 na célula cancerígena mamária, a fim de que o nutriente possa fornecer substrato energético para o crescimento do tumor. Assim, como consequência, ocorre redução das concentrações de magnésio no plasma (BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015).

Ressalta-se dados semelhantes obtidos dos estudos conduzidos por Feng et al. (2012) e Karki et al. (2015a), os quais mostram concentrações séricas reduzidas de magnésio em mulheres com câncer de mama. Na opinião desses pesquisadores, os valores baixos do mineral no soro podem ser atribuídos à ingestão reduzida do magnésio, o que influencia as suas concentrações séricas, promovendo instabilidade genética e contribuindo para a progressão da carcinogênese.

No que diz respeito à fração ionizada do magnésio, que corresponde à forma biológica mais ativa do mineral, o estudo mostrou concentrações reduzidas desse parâmetro nas mulheres com câncer de mama, com diferença estatística significativa entre os grupos. Além disso, também pôde-se verificar que essas mulheres apresentavam concentrações de magnésio ionizado inferiores aos valores de referência adotados por Jahnen-Dechent (2012). Esse resultado mostra que houve compatibilidade entre os dados obtidos nesse componente sanguíneo e aqueles encontrados no plasma.

Com relação ao magnésio eritrocitário, suas concentrações estavam reduzidas nas mulheres com câncer de mama, com diferença estatística significativa entre os grupos. Verificou-se também que as mulheres com câncer apresentavam

concentrações eritrocitárias do nutriente inferiores aos valores de referência (TIETZ, 1995). Uma possível explicação para tal resultado é que nos eritrócitos também ocorre mobilização do mineral desse componente sanguíneo para a célula tumoral, semelhante ao comportamento do magnésio plasmático. Outro aspecto importante nesse contexto, é o fato de que o magnésio eritrocitário constitui um marcador de médio a longo prazo do mineral no organismo. Assim, a redução nos seus valores demonstra a existência de uma depleção crônica do nutriente.

No que diz respeito às concentrações urinárias de magnésio, verificou-se que as mulheres do grupo controle estavam dentro dos valores de referência adotados por TIETZ (1995). No entanto, as mulheres com câncer de mama apresentaram excreção superior ao padrão de normalidade, com diferença estatística significativa entre os grupos.

Nessa temática, ressalta-se o importante papel dos rins sobre a regulação das concentrações de magnésio no organismo. É importante destacar que, em situações de baixa ingestão do nutriente, ocorre redução na excreção do magnésio como um mecanismo de regulação compensatório para manter suas concentrações plasmáticas. No entanto, em organismos com câncer de mama, esse controle homeostático não atua de forma adequada, pois na presença da doença há comprometimento da reabsorção renal, como se pode verificar nos elevados valores dessa variável encontrados nesse estudo.

Sobre a atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária, não houve diferença estatística significativa entre os grupos, estando as mulheres com câncer de mama com atividade adequada da enzima. Esses resultados podem ser decorrentes do estímulo que a produção crônica de espécies reativas de oxigênio presentes no câncer de mama provoca sobre o mecanismo de regulação compensatório enzimático (ARAÚJO, et al. 2015; GUPTA et al., 2012). Dessa forma, o aumento das concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico encontrado nesse estudo parece induzir resposta antioxidante no organismo, o que pode justificar os valores adequados da atividade antioxidante da enzima superóxido dismutase encontrados nesse estudo.

Outra hipótese que pode fundamentar tal resultado diz respeito à inespecificidade do marcador de estresse oxidativo avaliado nesse estudo, verificada pelo aumento das concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, isto é, pode não haver relação direta entre esse marcador e a atividade da enzima

superóxido dismutase nas mulheres com câncer de mama avaliadas.

Sobre os resultados da análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, pôde-se verificar valores elevados em ambos os grupos, sem diferença estatística significativa. Esses dados estão de acordo com Araújo et al. (2015), que também não encontraram diferença estatística significativa entre a população com e sem câncer de mama.

Destaca-se que o fato das mulheres com câncer de mama apresentarem concentrações elevadas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, bem como atividade reduzida da enzima superóxido dismutase, provavelmente possa influenciar o processo da carcinogênese, pois as espécies reativas de oxigênio se ligam a fatores de crescimento, participando da sinalização de sobrevivência celular, bem como das fases de iniciação, promoção e progressão do tumor da mama (ESREFOGLU, 2012; KARKI et al., 2014). No entanto, os resultados da análise de correlação entre a atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária e as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico não mostraram diferença estatística significativa entre os grupos.

Considerando a importante atuação do magnésio na proteção contra o estresse oxidativo, suas concentrações plasmáticas reduzidas, conforme os dados desse estudo, podem comprometer a expressão e atividade de enzimas antioxidantes, favorecer a manifestação do estresse oxidativo, e, conseqüentemente, o desenvolvimento do tumor mamário (BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015; DEEPTI; NALINI, 2014).

Dessa forma, foi realizada uma análise de correlação entre parâmetros do magnésio e a atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária. Os resultados revelaram correlação negativa significativa entre magnésio eritrocitário e atividade da enzima apenas no grupo controle. Ressalta-se que esse estudo mostrou concentrações adequadas do mineral no eritrócito, bem como atividade antioxidante adequada da enzima nas mulheres do grupo controle. Uma hipótese que pode justificar essa correlação diz respeito à possível utilização do magnésio presente nos eritrócitos para a regeneração da glutathione extracelular, que explica a manutenção da atividade da enzima superóxido dismutase (STARK et al., 2003).

No entanto, o magnésio não parece exercer efeito direto sobre a atividade da enzima superóxido dismutase nas mulheres com câncer de mama, pois esse mineral parece atuar principalmente sobre a expressão da enzima na presença da

doença, o que pode justificar a ausência de correlação entre esses parâmetros, embora esse mecanismo não esteja bem esclarecido na literatura.

O resultado encontrado está de acordo com o que foi mostrado na pesquisa conduzida por Karki et al. (2015b), na qual não houve correlação entre a atividade da enzima superóxido dismutase e as concentrações séricas de magnésio, quando estas estavam reduzidas em mulheres com câncer de mama.

Os dados referentes à análise de correlação entre os parâmetros do magnésio e as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico também não mostraram diferença estatística significativa entre os grupos. Nessa temática, destaca-se que a inespecificidade do marcador avaliado neste estudo, bem como a provável participação de outros nutrientes antioxidantes com ação importante no controle da peroxidação lipídica, como a vitamina C, α -tocoferol, selênio, coenzima Q10 e β -caroteno, podem ter contribuído para a ausência de correlação (NIKI, 2014; SPICKETT et al., 2010).

Portanto, a partir dos resultados desse estudo, verifica-se concentrações reduzidas de magnésio na dieta, no plasma, na fração ionizada do plasma e nos eritrócitos, o que demonstra alteração dos parâmetros do magnésio nas mulheres com câncer de mama. Ressalta-se que esse mineral provavelmente foi mobilizado para o tumor mamário, o que resultou na depleção dos parâmetros avaliados. Além disso, o estudo mostrou atividade adequada da enzima superóxido dismutase eritrocitária nas mulheres com câncer de mama, o que pode ter sido resultado de mecanismo de regulação compensatório do sistema de defesa antioxidante.

Destaca-se algumas limitações do estudo, a exemplo do número amostral reduzido, ausência de outros marcadores que avaliassem o estresse oxidativo e as concentrações de magnésio no tumor, e ainda a expressão de seu transportador, o que poderia ajudar a esclarecer a homeostase do mineral no câncer de mama.

Nessa perspectiva, diante da complexidade dos mecanismos envolvidos na ação do magnésio sobre o estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama, torna-se evidente a necessidade da realização de novos estudos acerca desse tema, o que possivelmente contribuirá para um melhor entendimento do comportamento metabólico desse nutriente na patogênese do câncer de mama, bem como para propor intervenções que possam minimizar o estresse oxidativo presente nessa população.

7 CONCLUSÃO

o As mulheres com câncer de mama possuem teor dietético de magnésio inferior às recomendações, bem como concentrações plasmáticas, ionizadas e eritrocitárias do mineral reduzidas. Associado a isso, o estudo revela valores de magnésio urinário superiores ao padrão de normalidade.

o A atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária está adequada nas mulheres com câncer de mama e as concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico estão elevadas nessas pacientes.

o O estudo não demonstra relação entre os parâmetros do magnésio e o marcador do estresse oxidativo, distúrbio metabólico importante na patogênese do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- ABDELGAWAD, I.A.; EL-MOUSLY, R.H.; SABER, M.M.; MANSOUR, O.A.; SHOUMAN, S.A. Significance of serum levels of vitamin D and some related minerals in breast cancer patients. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 4, p. 4074-82, 2015.
- ABRANTES, J.L.F.; TORNATORE, T.F.; PELIZZARO-ROCHA, K.J.; DE JESUS, M.B.; CARTAXO, R.T.; MILANI, R.; FERREIRA-HALDER, C.V. Crosstalk between kinases, phosphatases and miRNAs in cancer. **Biochimie**, v. 107, p. 167-87, 2014.
- AGNOLETTO, M. H. GUECHEVA, T. N.; DONDE, F.; OLIVEIRA, A. F.; FRANKE, F.; CASSINI, C.; SALVADOR, M.; HENRIQUE, J. A. P.; SAFFI, J. Association of low repair efficiency with high hormone receptors expression and SOD activity in breast cancer patients. **Clinical Biochemistry**, v. 40, p. 1252-1258, 2007.
- AKKOÇ, Y.; BERRAK, O.; ARISAN, E. D.; OBAKAN, P.; ÇOKER-GÜRKAN, A.; PALAVAN-ÜNSAL, N. Inhibition of PI3K signaling triggered apoptotic potential of curcumin which is hindered by Bcl-2 through activation of autophagy in MCF-7 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 71, p. 161-171, 2015.
- ANASTASSOPOULOU, J.; THEOPHANIDES, T. Magnesium-DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, p. 79-91, 2002.
- ARAÚJO, M. C.; BEZERRA, I. N.; BARBOSA, F. S.; JUNGER, W. L.; YOKOO, E. M. PEREIRA, R. A. C; SICHIERI, R. Consumo de macronutrientes e ingestão inadequada de micronutrientes em adultos. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 1; p. 177S-89S, 2013.
- ARAÚJO, C.G.B.; HOLANDA, A.O.N.; ROCHA, C.V.S.; NASCIMENTO, A.P.S.; REVOREDO, C.M.S.; SILVA, B.B.; NOGUEIRA, N.N.; MARREIRO, D.N. Relationship between zincemia, superoxide dismutase activity and marker of oxidative stress in women with breast cancer. **Nutrición Hospitalaria**, v. 32, n. 2, p. 785-791, 2015.
- BAAIJ, J. H. F.; HOENDEROP, J. G. J.; BINDELS, R. J. M. Regulation of magnesium balance: lessons learned from human genetic disease. **Clinical Kidney Journal**, v. 5, n. 1, p. 15-24, 2012.
- BAAIJ, J. H. F.; HOENDEROP, G. J. J.; BINDELS, R. J. M. Magnesium in man: implications for health and disease. **Physiological Reviews**, v. 95, p. 1-46, 2015.
- BADID, N.; AHMED, F.Z.; MERZOUK, H.; BELBRAOUE, S.; MOKHTARI, N.; MERZOUK, S.A.; BENHABIB, R.; HAMZAOUI, D.; NARCE, M. Oxidant/antioxidant status, lipids and hormonal profile in overweight women with breast cancer. **Pathology & Oncology Research**, v. 16, n. 2, p. 159-67, 2010.

BARBAGALLO, M.; DOMINGUEZ, L. J. Magnesium metabolism in type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and insulin resistance. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 458, n. 1, p. 40-47, 2007.

BEATON, G. H. Approaches to analysis of dietary data: relationship between planned analyses and choice of methodology. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n. 1, p. 253-261, 1994.

BELIN, R. J.; HE, K. Magnesium physiology and pathogenic mechanisms that contribute to the development of the metabolic syndrome. **Magnesium Research**, v. 20, n. 2, p. 107-129, 2007.

BENSAAD, K.; VOUSDEN, K.H. p53: new roles in metabolism. **TRENDS in Cell Biology**, v. 17, n. 6, p. 286-91, 2007.

BHATTARAI, G.; LEE, Y.H.; LEE, N.H.; YUN, J.S.; HWANG, P.H.; YI, H.K. C-myb mediates inflammatory reaction against oxidative stress in human breast cancer cell line, MCF-7. **Cell Biochemistry & Function**, v. 29, n. 8, p. 686–693, 2011.

BLANCHARD, A.; VARGAS-POUSSOU, R. Désordres de la magnésémie. **Journal of Nephrology & Therapeutics**, v. 8, n. 6, p. 482-91, 2012.

BLASZCZYK, U.; DUDA-CHODAK, A. Magnesium: its role in nutrition and carcinogenesis. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 64, n. 3, p. 165-171, 2013.

BRADSHAW, P.T.; KHANKARI, N.K.; TEITELBAUM, S.L.; XU, X.; FINK, B.N.; STECK, S.E.; GAUDET, M.M.; KABAT, G.C.; WOLFF, M.S.; NEUGUT, A.I.; CHEN, J.; GAMMON, M.D. Nutrient pathways and breast cancer risk: the Long Island breast cancer study project. **Nutrition and Cancer**, v. 65, n. 3, p. 345-54, 2013.

BRANCATO, B.; MUNNIA, A.; CELLAI, F.; CENI, E.; MELLO, T.; BIANCHI, S.; CATARZI, S.; RISSO, G.G.; GALLI, A.; PELUSO, M.E.M. 8-Oxo-7,8-dihydro-20-deoxyguanosine and other lesions along the coding strand of the exon 5 of the tumour suppressor gene P53 in a breast cancer case-control study. **DNA Research**, v. 23, n. 4, p. 395–402, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução nº466/2012**. Conselho Nacional de Pesquisa com Seres Humanos. Brasília: Diário Oficial da União, 2012.

BURHANS, W.C.; HEINTZ, N.H. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1282-93, 2009.

- CASTILLO, B.; PÖRZGEN, P.; PENNER, R.; HORGEN, F. D.; FLEIG, A. Development and optimization of a high-throughput bioassay for TRPM7 ion channel inhibitors. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 15, n. 5, p. 498-507, 2010.
- CRAIGE, S. M.; KANT, S.; KEANEY, J. F. JR. Reactive Oxygen Species in endothelial function – From disease to adaptation. **Circulation Journal**, v. 79, p. 1145-1155, 2015.
- CZERNY, B.; KRUPKA, K.; OŻAROWSKI, M.; SEREMAK-MROZIKIEWICZ, A. Screening of trace elements in hair of the female population with different types of cancers in Wielkopolska region of Poland. **The Scientific World Journal**, 953181, 2014.
- DAS, K.; SAMANTA, L.; CHAINY, G. B. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 37, p. 201-204, 2000.
- DE LA CRUZ-MORCILLO, M.A.; GARCÍA-CANO, J.; ARIAS-GONZÁLEZ, L.; GARCÍA-GIL, E.; ARTACHO-CORDÓN, F.; RÍOS-ARRABAL, S.; VALERO, M.L.; CIMAS, F.J.; SERRANO-OVIEDO, L.; VILLAS, M.V.; ROMERO-FERNÁNDEZ, J.; NÚÑEZ, M.I.; SÁNCHEZ-PRIETO, R. Abrogation of the p38 MAPK a signaling pathway does not promote radioresistance but its activity is required for 5-fluorouracil-associated radiosensitivity. **Cancer Letters**, v. 335, n. 1, p. 66-74, 2013.
- DEASON-TOWNE, F.; PERRAUD, A. L.; SCHMITZ, C. The Mg²⁺ transporter MagT1 partially rescues cell growth and Mg²⁺ uptake in cells lacking the channel-kinase TRPM7. **FEBS Letters**, v. 585, n. 14, p. 2275-8, 2011.
- DEEPTI, R.; NALINI, G. Magnesium plays a salient role in the cells. **Journal of Biomedical Science**, v. 4, n. 4, p. 341-45, 2011.
- DHENNIN-DUTHILLE, I.; KORICHNEVA, I.; OUADID-AHIDOUCH, H. TRPM7 involvement in cancer: a potential prognostic factor. **Magnesium Research**, v. 27, n. 3, p. 103-112, 2014.
- ELIN, R. J. Assessment of magnesium status. **Clinical Chemistry**, v. 33, n. 11, p. 1965-1970, 1987.
- ELIN, R. J. Assessment of magnesium status for diagnosis and therapy. **Magnesium Research**, v. 23, n. 4, p. 194-8, 2010.
- ESREFOGLU, M. Oxidative Stress and benefits of antioxidant agents in acute and chronic hepatitis. **Hepatitis Monthly**, v. 12, n. 3, p. 160-167, 2012.
- EVANGELOPOULOS, A. A.; VALLIANOU, N. G.; PANAGIOTAKOS, D. B.; GEORGIU, A.; ZACHARIAS, G. A.; ALEVRA, A. N.; ZALOKOSTA, G. J. VOGIATZAKIS, E. D.; AVGERINOS, P. C. An inverse relationship between cumulating components of the metabolic syndrome and serum magnesium levels. **Nutrition Research**, v. 28, n. 10, p. 659-663, 2008.

FENG, J. F.; LU, L.; ZENG, Y. H.; LUO, J. YANG, Y. W. WANG, D. Serum total oxidant/antioxidant status and trace element levels in breast cancer patients. **International Journal of Clinical Oncology**, n. 17, p. 575-583, 2012.

GATÉ, K.M.; LARLAUD, I.; GIUMMELLY, P.; LEGRAND, R.; POMPELLA, A.; LEROY, P. Accurate measurement of reduced glutathione in gamma-glutamyl transferase-rich brain microvessel fractions. **Brain Research**, v. 1369, p. 95-102, 2011.

GIBSON, R. S. **Principles of nutrition assessment**. 1. ed. Oxford: Oxford University Press, 2004. 928p.

GUPTA, R.K.; PATEL, A.K.; KUMARI, R.; CHUGH, S.; SHRIVASTAV, C.; MEHRA, S.; SHARMA, A.N. 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. 6295-8, 2012.

HARTTIG, U.; HAUBROCK, J.; KNÜPPEL, S.; BOEING, H.; EFCOVAL, C. The MSM program: web-based statistics package for estimating usual dietary intake using the Multiple Source Method. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, n. 1, p. 87-91, 2011.

HARTWIG, A. Role of magnesium in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, n. 1-2, p. 113-21, 2001.

HAUBROCK, J.; NÖTHLINGS, U.; VOLATIER, J. L.; DEKKERS, A.; OCKÉ, M.; HARTTIG, U.; ILLNER, A. K.; KNÜPPEL, S.; ANDERSEN, L. F.; BOEING, H.; EFCOVAL, C. Estimating usual food intake distributions by using the multiple source method in the EPIC-Potsdam Calibration Study. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 5, p. 914-920, 2011.

HECHT, F.; PESSOA, C.F.; GENTILE, L.B.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D.P.; FORTUNATO, R.S. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. **Tumor Biology**, v. 37, n. 4, p. 4281-91, 2016.

HOUILLIER, P. Mechanisms and regulation of renal magnesium transport. **Annual Review of Physiology**, v. 76, p. 411-30, 2014.

INSTITUTE OF MEDICINE. FOOD AND NUTRITION BOARD. **Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D and Fluoride**. Washington, DC: National Academy Press: 1997.

INSTITUTE OF MEDICINE. FOOD AND NUTRITION BOARD. **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids**. Washington, DC: National Academy Press: 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985.

JAHNEN-DECHENT, W.; KETTELER, M. Magnesium basics. **Clinical Kidney Journal**, v. 5, n. 1, p. i3-i14, 2012.

KARKI, K.; PANDE, D.; NEGI, R.; KHANNA, S.; KHANNA, R. S.; KHANNA, H.D. Expression of serum toll-like receptor 9 and oxidative damage markers in benign and malignant breast diseases. **DNA and Cell Biology**, v. 33, n. 9, p. 630-636, 2014.

KARKI, K.; PANDE, D.; NEGI, R.; KHANNA, S.; KHANNA, R. S.; KHANNA, H.D. Association between biomarkers of oxidative stress, trace elements, and cell proliferation index in patients with benign and malignant breast diseases. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 34, p. 1-10, 2015a.

KARKI, K.; PANDE, D.; NEGI, R.; KHANNA, S.; KHANNA, R. S.; KHANNA, H.D. Correlation of serum toll like receptor 9 and trace elements with lipid peroxidation in the patients of breast diseases. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 30, p. 11-16, 2015b.

KHANNA, S.; PANDE, D.; NEGI, R.; KARKI, K.; KHANNA, R. S.; KHANNA, H.D. Oxidative stress induced damage in benign and malignant breast diseases: histopathological and biochemical aspects. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 8, p. 209-214, 2012.

KILIC, N.; YAVUZ, T. M.; GUNEY, Y.; TEKIN, E.; ONUK, E. 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.

KLAUNIG, J.E.; WANG, Z.; PU, X.; ZHOU, S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, n. 2, p. 86-99, 2011.

KO, H.J.; YOUN, C.H.; KIM, H.M.; CHO, Y.J.; LEE, G.H.; LEE, W.K. Dietary magnesium intake and risk of cancer: a meta-analysis of epidemiologic studies. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 6, p. 915-23, 2014.

KOLTE, D. VILAYARAGHAVAN, K.; KHERA, S.; SICA, D. A.; FRISHMAN, W. H. Role of magnesium in cardiovascular diseases. **Cardiology in Review**, v. 22, n. 4, p. 182-92, 2014.

LAUREANO, G. H. C.; TORMAN, V. B.; CRISPIM, S. P.; DEKKERS, A. L.; CAMEY, S. A.; Comparison of the ISU, NCI, MSM, and SPADE methods for estimating usual intake: a simulation study of nutrients consumed daily. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 166, 2016.

LIU, D.; XU, Y. p53, oxidative stress, and aging. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1669-78, 2011.

MARTÍN, K. J.; GONZÁLEZ, E. A.; SLATOPOISKY, E. Clinical consequences and management of hypomagnesemia. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 11, p. 2291-95, 2009.

MIDDELBEEK, J.; KUIPERS, A. J.; HENNEMAN, L.; VISSER, D.; EIDHOF, I.; VAN HORSSSEN, R.; WIERINGA, B.; CANISIUS, S. V.; ZWART, W.; WESSELS, L. F.; SWEEP, F. C.G.J.; BULT, P.; SPAN, P. N.; VAN LEEUWEN, F. N.; JALINK, K. TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis. **Cancer Research**, v. 72, n. 16, p. 4250–61, 2012.

MILIĆEVIĆ, Z.; KASAPOVIĆ, J.; GAVRILOVIĆ, L.; MILOVANOVIĆ, Z.; BAJIĆ, V.; SPREMO-POTPAREVIĆ, B. Mutant P53 protein expression and antioxidant status deficiency in breast cancer. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 691-708, 2014.

MIRMALEK, S.A.; JANGHOLI, E.; JAFARI, M.; YADOLLAH-DAMAVANDI, S.; JAVIDI, M.A.; PARSA, Y.; PARSA, T.; SALIMI-TABATABAEE, S.A.; KOLAGAR, H.G.; JALIL, S.K.; ALIZADEH-NAVAEI, R. Comparison of in vitro cytotoxicity and apoptogenic activity of magnesium chloride and cisplatin as conventional chemotherapeutic agents in the MCF-7 cell line. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, p. 131-4, 2016.

MORAIS, J.B.S.; SEVERO, J.S.; SANTOS, L.R.; MELO, S.R.S.; SANTOS, R.O.; OLIVEIRA, A.R.; CRUZ, K.J.C.; MARREIRO, D.N. Role of magnesium in oxidative stress in individuals with obesity. **Biological Trace Element Research**, v. 176, n. 1, p. 20-26, 2017.

MSM. Multiple Source Method (MSM) for estimating usual dietary intake from short-term measurement data: user guide. EFCOVAL: Potsdam, 2011. 41p.

MURATA, A.; ITO, Y.; KASHIMA, R.; KANBAYASHI, S.; NANATANI, K.; IGARASHI, C.; OKUMURA, M.; INABA, K.; TOKINO, T.; TAKAHASHI, S.; KAMAGATA, K. One-dimensional sliding of p53 along DNA is accelerated in the presence of Ca(2+) or Mg(2+) at millimolar concentrations. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 16, p. 2663-2678, 2015.

NAITHANI, M.; BHARADWAJI, J.; DARBARI, A. Magnesium: the fifth electrolyte. **Journal of Medical Nutrition and Nutraceuticals**, v. 3, n. 2, p. 186-92, 2014.

NANDY, S.B.; ARUMUGAM, A.; SUBRAMANI, R.; PEDROZA, D.; HERNANDEZ, K.; SALTZSTEIN, E.; LAKSHMANASWAMY, R. MicroRNA-125a influences breast cancer stem cells by targeting leukemia inhibitory factor receptor which regulates the hippo signaling pathway. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, p. 17366-78, 2015.

NIKI, E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, n. 2, p. 809-17, 2014.

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. 4745-51, 2014.

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

- PANDE, D.; NEGI, R.; KHANNA, K.; KHANNA, S.; KHANNA, R. S.; KHANNA, H.D. Oxidative damage markers as possible discriminatory biomarkers in breast carcinoma. **Translational Research**, v. 160, p. 411-418, 2012.
- PAVITHRA, V.; SATHISHA, T. G.; KASTURI, K.; MALLIKA, D. S.; AMOS, S. J.; RAGUNATHA, S.; Serum levels of metal ions in female patients with breast cancer. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, p. 25-27, 2015.
- PHILIPPI, S. T. **Tabela de composição de alimentos: Suporte para decisão nutricional**. 2. ed. Brasília: Coronário Editora, 2002.
- 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.
- REZNICK, E.; SANDER, C. Extensive decoupling of metabolic genes in cancer. **PLoS Computational Biology**, v. 11, n. 5, p. 1-25, 2015.
- RÍOS-ARRABAL, S.; ARTACHO-CORDÓN, F.; LEÓN, J.; ROMÁN-MARINETTO, E.; DEL MAR SALINAS-ASENSIO, M.; CALVENTE, I.; NÚÑEZ, M. I. Involvement of free radicals in breast cancer. **Springerplus**, v. 2, n. 404, 2013.
- ROBERTS, R. A.; LASKIN, D. L.; SMITH, C. V.; ROBERTSON, F. M.; ALLEN, E. M.; DOORN, J. A. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. **Toxicological Sciences**, v. 12, p. 4-16, 2010.
- ROCHA, V. S. **Avaliação bioquímica e do consumo alimentar de magnésio em mulheres saudáveis no terceiro trimestre gestacional**. 2009. 97 f. Dissertação (Pós-graduação em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ROCHA, V. S.; ROSA, F. B. D.; RUANO, R.; ZUGAIB, M.; COLLI, C. Association between magnesium status, oxidative stress and inflammation in preeclampsia: a case control study. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 6, p. 1166-71, 2015.
- ROMANI, A. M. P. Cellular magnesium homeostasis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 512, n. 1, p. 1-23, 2011.
- SARTORELLI, D. S.; BARBIERI, P.; PERDONÁ, G. C. S. Fried food intake estimated by the multiple source method is associated with gestational weight gain. **Nutrition Research**, v. 34, n. 8, p. 667-673, 2014.
- SCHERZ-SHOUVAL, R.; ELAZAR, Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. **Trends Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 422-7, 2007.
- SEVERO, J. S. MORAIS, J.B.S.; FREITAS, T. E. C.; CRUZ, K.J.C.; OLIVEIRA, A.R.; POLTRONIERI, F.; MARREIRO, D.N. Aspectos metabólicos e nutricionais do magnésio. **Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria**, v. 35, n. 2, p. 67-74, 2015.

SOUVEREIN, O. W.; DEKKERS, A. L.; GEELEN, A.; HAUBROCK, J.; DE VRIES, J. H.; OCKÉ, M. C.; HARTTIG, U.; BOEING, H.; VAN 'T VEER, P.; EFCOVAL Consortium. Comparing four methods to estimate usual intake distributions. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. S92-S101, 2011.

SPICKETT, C. M.; WISWEDEL, I.; SIEMS, W.; ZARKOVIC, K.; ZARKOVIC, N. Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. **Free Radical Research**, v. 44, n. 10, p. 1172-1202, 2010.

STARK, A.A.; PORAT, N.; VOLOHONSKY, G.; KOMLOSH, A.; BLUVSHTEIN, E.; TUBI, C.; STEINBERG, P. The role of gamma-glutamyl transpeptidase in the biosynthesis of glutathione. **Biofactors**, v. 17, n. 1-4, p. 139-49, 2003.

SURWILLO, A.; WAWRZYNIAK, A. Nutritional assessment of selected patients with cancer. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 64, n. 3, p. 225-233, 2013.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4 ed. rev. ampl. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4-versao_ampliada_e_revisada.pdf. Acesso em 20 jan. 2017.

TAO, M.H.; DAI, Q.; MILLEN, A.E.; NIE, J.; EDGE, S.B.; TREVISAN, M.; SHIELDS, P.G.; FREUDENHEIM, J.L. Associations of intakes of magnesium and calcium and survival among women with breast cancer: results from Western New York Exposures and breast cancer (WEB) Study. **American Journal of Cancer Research**, v. 6, n. 1, p. 105-13, 2015.

TIETZ, N.W. **Clinical guide to laboratory test**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1995.

TOPF, J. M.; MURRAY, P. T. Hypomagnesemia and hypermagnesemia. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 4, n. 2, p. 195-206, 2003.

USDA. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference**. Release 20. Riverdale, MD: U.S. Department of Agriculture, 2007.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1161-208, 2005.

VAN ASSENDELFT, O. W. The measurement of hemoglobin. In: IZAK, G.; LEWIS, S. M. **Modern Concepts in Hematology**: symposia of the International Committee for Standardization in Hematology. New York: Academic Press, 1972, p. 14-25.

VERA-RAMIREZ, L.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C.; RAMIREZ-TORTOSA, C.L.; GRANADOS-PRINCIPAL, S.; LORENTE, J.A.; QUILES, J.L. Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 80, n. 3, p. 347-68, 2011.

VESPER, B. J.; ELSETH, K. M.; TARJAN, G.; HAINESIII, G. K.; RADOSEVICH, J. A. Long-term adaptation of breast tumor cell lines to high concentrations of nitric oxide. **Tumor Biology**, v. 31, n. 4, p. 267-275, 2010.

VISSER, D.; LANGESLAG, M.; KEDZIORA, K. M.; KLARENBECK, J.; KAMERMANS, A.; HORGEN, F. D.; FLEIG, A.; VAN, L. F. N.; JALINK, K. TRPM7 triggers Ca²⁺ sparks and invadosome formation in neuroblastoma cells. **Cell Calcium**, v. 54, n. 6, p. 404-15, 2013.

VOLPE, S. Magnesium in disease prevention and overall health. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 378-383, 2013.

WANG, T.; SHAO, X.; CAI, W.; XUE, Y.; WANG, S.; FENG, X. Predicting the coordination geometry for Mg²⁺ in the p53 DNA-binding domain: insights from computational studies. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 3, p. 1140-1151, 2011.

WHITEHOUSE, R. C.; PRASAD, A. S.; RABBANI, P. I.; COSSACK, Z. T. Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes, and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. **Clinical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 475-480, 1982.

WOLF, F. I.; TRAPANI, V. Magnesium and its transporters in cancer a novel paradigm in tumour development. **Clinical Science**, v. 123, p. 417-427, 2012.

WONG, G. K.; POON, W. S.; CHAN, M. T.; BOET, R.; GIN, T.; NG, S. C.; ZEE, B. C. Intravenous Magnesium Sulphate for Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage (IMASH): a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multicenter phase III trial. **Stroke**, v. 41, n. 5, p. 921–926, 2010.

ZHANG, H.; FORMAN, H.J.; CHOI, J. Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. **Methods in Enzymology**, v. 401, p. 468-83, 2005.

ZHOU, L.; WANG, Y.; TIAN, D.; YANG, J.; YANG, Y. Decreased levels of nitric oxide production and nitric oxide synthase-2 expression are associated with the development and metastasis of hepatocellular carcinoma. **Molecular Medicine Reports**, v. 6, n. 6, p. 1261-1266, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

*Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bloco 06 – Bairro Ininga
CEP: 64049-550 – Teresina-PI – Brasil – Fone (86) 3215-5863 – Fone/Fax (86)3215-5560
Fone (86) 3237-2062*

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: *Status* do Magnésio e sua Relação com Marcadores do Estresse Oxidativo em Mulheres com Neoplasia Mamária.

Pesquisador responsável: Dra. Dilina do Nascimento Marreiro.

Instituição/Departamento: UFPI/ Departamento de Nutrição.

Pesquisadores participantes: Dra. Dilina do Nascimento Marreiro, Daila Leite Chaves Bezerra, Priscyla Maria Vieira Mendes.

Telefone para contato (inclusive a cobrar): (86) 99801-0924/ (86) 99942-2702/
(86) 98842-5771

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 pelas Mestrandas Daila Leite Chaves Bezerra e Priscyla Maria Vieira Mendes, sob orientação da Profa. Dra. Dilina do Nascimento Marreiro. 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) 3237-2332.

DESCRIÇÃO DA PESQUISA

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar o “*Status* do magnésio e sua relação com marcadores do estresse oxidativo em mulheres com neoplasia mamária”. Para tanto, a voluntária será submetida à coleta de sangue venoso para análise do magnésio, dos marcadores do estresse oxidativo e de enzimas antioxidantes, à coleta de urina para determinação de magnésio urinário e, além disso, será determinado o consumo alimentar por meio de registros alimentares. Não será realizada entrevista gravada ou filmada.

Ao participar da pesquisa, a voluntária não sofrerá prejuízo; no entanto, poderá sentir leve desconforto em vista da coleta do material biológico, requerido para realização desta pesquisa. Alguns procedimentos deverão realizar-se junto à Universidade Federal do Piauí, cabendo à voluntária e/ou responsável comparecer à mesma quando for solicitada, em dia e hora a serem estabelecidos de acordo com a disponibilidade de ambas as partes (pesquisador e voluntária).

O início do tratamento não será prejudicado por conta da pesquisa. As participantes do estudo terão como benefícios os resultados dos exames bioquímicos das amostras de sangue e de urina, que serão fornecidos após a realização dos mesmos. Além disso, ao final da coleta será oferecido um café da manhã e orientação nutricional pela pesquisadora responsável, não havendo qualquer tipo de ônus pela participação no projeto.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. 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; telefone: (86) 3237-2332).

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 dois anos, com término previsto para o segundo semestre de 2016.

Nomes e assinaturas dos pesquisadores

Daila Leite Chaves Bezerra
Priscyla Maria Vieira Mendes

Dilina do Nascimento Marreiro

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____,
RG _____, CPF _____, abaixo assinado,
concordo em participar do estudo “*Status* do magnésio e sua relação com marcadores do estresse oxidativo em mulheres com neoplasia mamária”, como sujeito. Tive pleno conhecimento das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. Discuti com as mestrandas Daila Leite Chaves Bezerra e Priscyla Maria Vieira Mendes 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. 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.

Teresina ___/___/___

Assinatura da participante**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 B – FICHA DE CADASTRO DAS PARTICIPANTES DA PESQUISA



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

PROJETO: *STATUS DO MAGNÉSIO E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES COM NEOPLASIA MAMÁRIA*

SUBPROJETO 1: Estado Nutricional Relativo ao Magnésio em Mulheres com Câncer de Mama

SUBPROJETO 2: Hipomagnesemia e sua Relação com Marcadores do Estresse Oxidativo em Mulheres com Câncer de Mama

PROTOCOLO DA PESQUISA

INICIAIS:

Local da Coleta:	Data da Coleta:
Nº do Formulário:	Nº do Prontuário:

IDENTIFICAÇÃO		
Iniciais:		
Endereço:		
Bairro:		
Cidade:	Estado:	
Ponto de referência:		
Telefones:		
Data de nascimento: ____/____/____	Idade: ____ anos	
Qual seu estado civil?		
<input type="checkbox"/> casada	<input type="checkbox"/> viúva	
<input type="checkbox"/> desquitada ou separada judicialmente	<input type="checkbox"/> divorciada	
	<input type="checkbox"/> solteira	
Ou conjugal?		
<input type="checkbox"/> vive em união	<input type="checkbox"/> não vive, mas já viveu	
<input type="checkbox"/> nunca viveu em união		
Qual a sua escolaridade?		
<input type="checkbox"/> analfabeto	<input type="checkbox"/> fundamental incompleto	<input type="checkbox"/> fundamental completo
<input type="checkbox"/> médio incompleto	<input type="checkbox"/> médio completo	<input type="checkbox"/> superior incompleto
<input type="checkbox"/> superior completo	<input type="checkbox"/> pós-graduação	
Ocupação:		
Renda familiar:	Nº de pessoas na família:	
HÁBITOS DE VIDA		
Você fuma ? () sim () não () parou		
Há quanto tempo parou? _____		
Em sua casa, alguém fuma? () sim () não		
Você consome alguma bebida alcoólica ? () sim () não		
Qual? () cerveja () cachaça () vinho		
Quantos dias na semana? () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () 6 () 7 () raro/socialmente		
Qual a quantidade? _____		
Você pratica alguma atividade física/exercícios ? () sim () não () parou		
Qual? _____		

Quantas vezes por semana? _____	
Quantas horas por dia? _____	
Há quanto tempo você começou a praticar? _____	
Por que você parou a atividade? _____	
Há quanto tempo parou? _____	
Nível de atividade física: () sedentário () leve () moderado () intenso	
HISTÓRIA CLÍNICO-FAMILIAR	
Quando descobriu a doença? _____	
Entre seus pais e irmãos, alguém tem câncer de mama? () sim _____ () não _____	
Você está na menopausa ? () sim () não	
Há quanto tempo? _____	
Faz terapia de reposição hormonal? () sim () não	
Se SIM, qual? _____	
Você faz uso de algum suplemento vitamínico-mineral ? () sim () não	
Se SIM, qual? _____	
Há quanto tempo você usa? _____	
Você tem alguma doença ?	
() Doença cardiovascular () Diabetes Mellitos () Hepatopatia () Nefropatia	
() Doença Inflamatória Intestinal () Outra _____	
Você faz uso de medicamentos ? () sim () não	
() furosemida () tiazida () ciclosporina A () tacrolimus () cetuximab	
() omeprazol e afins () carboxiplatina () cisplatina	
Quais? _____	
Diagnóstico histopatológico da doença:	
Tipo histológico? _____	
Grau histológico? _____	
TNM? _____	
PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS	
Peso Usual: _____ kg	Tempo: _____
Peso Atual (kg) _____	
Altura (m) _____	
Índice de massa corporal: _____	kg/m ²
Estado nutricional segundo índice de massa corporal:	
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	
Magnésio plasmático	_____
Magnésio eritrocitário	_____
Magnésio urinário	_____
Volume Urinário (mL):	_____
Glutationa peroxidase	_____
Superóxido dismutase	_____
TBARS	_____
Observações:	_____

APÊNDICE C – REGISTRO ALIMENTAR

Registro diário de sua alimentação



Nº Formulário: _____

- ❖ Nós vamos avaliar sua alimentação. Pedimos que anote neste registro alimentar **tudo** que você **comer e beber** durante todo o dia e à noite. Você deverá anotar todos os alimentos consumidos, sendo 2 dias durante a semana e um dia no final de semana, totalizando 3 dias.
- ❖ Durante o preenchimento deste registro alimentar, alguns aspectos são importantes:
 1. Preencher logo **após o consumo** do alimento;
 2. Especificar as **marcas** dos alimentos industrializados;
 3. Procurar identificar o **tamanho** das frutas, vegetais, pedaços de carne, ou a **quantidade** que cada alimento é consumido, bem como o tipo de preparação (**frito, cozido, assado**) e caso haja molho, que tipo foi utilizado.
 4. Diferenciar qual o **utensílio** é usado, por exemplo:
 - A. Colher – de chá, de sobremesa, de sopa, de servir ou concha
 - B. Xícara – de chá ou de café
 - C. Copo – grande ou de requeijão (americano)
 - D. Prato de sobremesa
 - E. Consumo mensal de óleo e sal da família: _____



APÊNDICE D – INSTRUÇÕES ÀS PARTICIPANTES QUANTO À OBTENÇÃO DE URINA DE 24 HORAS

COLETA DE URINA

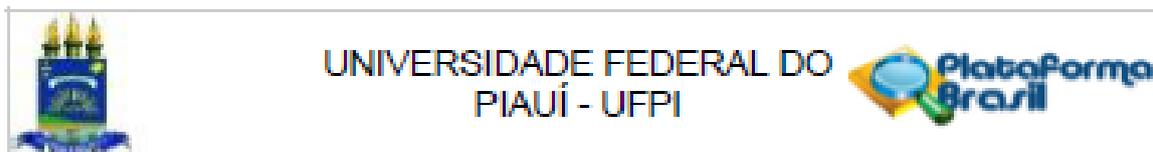
A obtenção da urina será realizada em frasco plástico de 5 litros, previamente desmineralizado, sem conservante e deve ser mantida REFRIGERADA até o horário da entrega. Será fornecido um funil plástico, desmineralizado, que não deverá ser lavado, sendo guardado em saco plástico limpo e protegido de contaminação por poeira.

A urina deverá ser obtida da seguinte forma: pela manhã, ao acordar o paciente irá desprezar a primeira urina, ou seja, não deverá guardá-la no frasco; a partir da segunda urina todas deverão ser guardadas no frasco com a ajuda do funil até a primeira urina do dia seguinte.

ATENÇÃO: Todo o material será fornecido pelo pesquisador.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA/UFPI



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: STATUS DO MAGNÉSIO E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES COM NEOPLASIA MAMÁRIA

Pesquisador: Dilina do Nascimento Marreiro

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 46458515.0.0000.5214

Instituição Proponente: Universidade Federal do Piauí - UFPI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.322.988

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa intitulado STATUS DO MAGNÉSIO E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES COM NEOPLASIA MAMÁRIA, que tem como pesquisador responsável Dilina do Nascimento Marreiro.

A pesquisadora informa que "O estudo será do tipo caso-controle com mulheres diagnosticadas com neoplasia mamária, na faixa etária entre 20 a 59 anos de idade. As participantes serão distribuídas em dois grupos: controle (mulheres não diagnosticadas com neoplasia mamária) = 34 e caso (mulheres com neoplasia mamária) = 34. Serão realizadas avaliação antropométrica, análise de consumo alimentar, das concentrações plasmáticas, eritrocitárias e urinárias de magnésio, das concentrações plasmáticas de malondialdeído e peróxido de hidrogênio, bem como a determinação das enzimas

glutathiona peroxidase e superóxido dismutase."

Como hipótese de pesquisa foi informado que "Hipótese:

A alteração da homeostase do magnésio e a presença de estresse oxidativo em pacientes com neoplasia mamária pode influenciar no desenvolvimento do tumor."

Como "Critério de Inclusão:

Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio 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



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAUI - UFPI



Continuação do Parecer: 1.322.988

Os critérios de inclusão para participação do grupo caso serão os seguintes: faixa etária entre 20 a 59 anos de idade, diagnóstico de neoplasia mamária comprovado histologicamente; não fumantes; não apresentar diabetes mellitus, insuficiência renal crônica, doenças hepáticas, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias intestinais; não ingerir álcool de forma crônica; não lactantes; não apresentar neoplasia mamária com histórico de tratamento prévio da doença; não estar em tratamento quimioterápico bem como não fazer uso de medicamentos e/ou suplementos nutricionais que possam interferir no estado nutricional relativo ao magnésio.”

A amostra é de 70 participantes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o status de magnésio e sua relação com marcadores do estresse oxidativo em mulheres com neoplasia mamária.

Objetivo Secundário:

o Determinar as concentrações de magnésio plasmático, eritrocitário e urinário nas participantes do estudo e comparar com o grupo controle; o

Estimar o teor de magnésio e sua adequação nas dietas consumidas;o Determinar as concentrações plasmáticas de malondialdeído e peróxido de

hidrogênio, bem como a atividade das enzimas antioxidantes glutationa peroxidase e superóxido dismutase;o Investigar a existência de relação

entre biomarcadores do status do magnésio, o malondialdeído e o peróxido de hidrogênio em mulheres com neoplasia mamária;o Investigar a

existência de relação entre biomarcadores do status do magnésio e enzimas antioxidantes em mulheres com neoplasia mamária.”

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Poderá sentir leve desconforto em vista da coleta do material biológico (sangue) requerido para realização desta pesquisa.

Benefícios:

As participantes do estudo terão como benefício os resultados dos exames bioquímicos das amostras de sangue e de urina, que serão fornecidos após a realização dos mesmos.”

Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio 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



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAUI - UFPI



Continuação do Parecer: 1.323.908

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Realizada a análise documental a partir da qual foi procedida a uma apreciação ética da pesquisa, restou evidenciada a sua pertinência e valor científico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Incluir no orçamento a previsão do café da manhã indicado no TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto apto a ser desenvolvido.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_529665.pdf	03/11/2015 10:21:43		Acelto
Outros	declaracao_pesquisadora.jpg	03/11/2015 10:18:36	Dilina do Nascimento Marreiro	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	APENDICE_B_TCLE.docx	21/10/2015 07:40:59	Dilina do Nascimento Marreiro	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto completo versão plataforma brasil 13.07.15.pdf	14/07/2015 22:47:02		Acelto
Folha de Rosto	Folha de Rosto preenchida ok.pdf	24/06/2015 01:03:17		Acelto
Outros	APENDICE A.docx	23/06/2015 01:10:52		Acelto
Outros	003.jpg	23/06/2015 01:10:19		Acelto
Outros	002.jpg	23/06/2015 01:10:08		Acelto
Outros	001.jpg	23/06/2015 01:09:52		Acelto
Outros	curriculo profa Dilina.pdf	12/06/2015 00:30:11		Acelto

Situação do Parecer:

Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga CEP: 64.040-550
UF: PI Município: TERESINA
Telefone: (86)3297-2332 Fax: (86)3297-2332 E-mail: cep.ufpi@ufpi.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAUI - UFPI



Continuação do Parecer: 1.322/2015

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

TERESINA, 13 de Novembro de 2015

Assinado por:
Adrianna de Alencar Setubal Santos
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga CEP: 64.040-550
UF: PI Município: TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 Fax: (86)3237-2332 E-mail: cep.ufpi@ufpi.edu.br

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO/UFPI



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO / UFPI
CAMPUS UNIVERSITÁRIO PETRÔNIO PORTELLA S/N – BAIRRO ININGA
CEP: 64049-550 – TERESINA-PI**

CARTA DE APROVAÇÃO Nº 53/15

Após análise do protocolo de pesquisa n. 53/15, intitulado **“STATUS DO MAGNÉSIO E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES COM NEOPLASIA MAMÁRIA”** comunicamos que o mesmo recebeu parecer **favorável** para realização da referida pesquisa, sendo realizada junto ao Setor de Saúde da Mulher do Hospital Universitário do Piauí.

Teresina, 04 de novembro de 2015

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Lauró", is written over a circular stamp or seal.

Dr. Lauró Louçival Lopes Filho
Presidente da CAPP- HUP