



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS E SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

CAMILA GUEDES BORGES DE ARAUJO

**ZINCEMIA, ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE E SUA
RELAÇÃO COM MARCADOR DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

TERESINA

2014

CAMILA GUEDES BORGES DE ARAUJO

**ZINCEMIA, ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE E SUA
RELAÇÃO COM MARCADOR DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

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

Orientadora

Prof^a Dr^a Dilina do Nascimento Marreiro

Coorientador

Prof Dr Benedito Borges da Silva

TERESINA

2014

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

Araújo, Camila Guedes Borges de.

A658z Zincemia, atividade da enzima superóxido dismutase e sua relação com marcador do estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama / Camila Guedes Borges de Araújo. -- Teresina, 2014.

88 f. : il.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, 2014.

Orientador: Profª. Drª. Dilina do Nascimento Marreiro.

Bibliografia

1. Câncer de mama. 2. Zinco. 3. Superóxido dismutase. I. Título. II. Teresina -- Universidade Federal do Piauí.

CDD 616.994 49

CAMILA GUEDES BORGES DE ARAUJO

**ZINCEMIA, ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE E SUA
RELAÇÃO COM MARCADOR DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

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

Aprovada em ___ / ___ / ___.

Banca examinadora:

Presidente: Prof^a Dr^a Dilina do Nascimento Marreiro

1º Examinador: Prof Dr Benedito Borges da Silva

2º Examinador: Prof^a Dr^a Ione Maria Ribeiro Soares Lopes

Examinador Suplente: Prof^a Dr^a Lina Gomes dos Santos

Dedico esta vitória a Deus, aos meus amados pais (Joaquim Borges e Socorro Guedes) e aos meus irmãos (Joaquim Filho e Cecília Guedes). Obrigada pelo amor, carinho, ajuda e compreensão. Vocês tornaram essa caminhada muito melhor e prazerosa. Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Deus único e verdadeiro, por guiar os meus caminhos e muitas vezes me carregar no colo, pois eu já não tinha mais forças. Ele me permitiu sonhar e quis realizar esse sonho em minha vida. Sou imensamente grata a Deus pelo seu amor e misericórdia. Sei que tudo que tenho e que sou, devo a Ele, e ao longo dessa jornada Ele sempre esteve comigo me mostrando que tudo ia dar certo. E deu tudo certo para glória de Deus!

À Universidade Federal do Piauí (UFPI), por me acolher desde a graduação e assim foram sete anos e meio de vivências e aprendizados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, na pessoa do meu querido Coordenador Prof. Dr. Viriato Campelo. Professor, obrigada pela oportunidade de ganhar mais conhecimento, não tenho palavras para agradecer toda sua ajuda e dedicação. Nos momentos em que mais precisei o senhor não negou esforços para me ajudar, e quando eu chegava com um problema, já tinha a solução. Agradeço a Deus pela sua vida. Obrigada também à Edilene, pela alegria, disposição e comprometimento com esse mestrado.

Ao corpo docente do Mestrado em Ciências e Saúde; e funcionários do Departamento de Nutrição, por vivenciarem e dividirem esses anos importantes comigo. Aprendi com cada um de vocês ensinamentos que levarei pra toda vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Dilina Marreiro, que me deu a oportunidade de acompanhá-la desde a Iniciação Científica, e a qual agradeço pelos ensinamentos desde então. Ela me mostrou o amor pela pesquisa e que sempre temos algo a acrescentar ao universo científico. Deus colocou a senhora em minha vida para que eu pudesse aprender e crescer como pessoa. Hoje posso ver o mundo de maneira diferente. Obrigada!

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Benedito Borges, pelo ensinamento, aprendizado e contribuição desse trabalho.

À Profa Ione, pelo cuidado, atenção e disponibilidade em contribuir para esse estudo.

Ao Hospital Getúlio Vargas, na pessoa do Dr. Ricardo e da Dra. Jaqueline, pela experiência e conhecimento enquanto estive lá.

Às minhas queridas e tão solícitas pacientes, que em seus momentos de luta e dor, se fizeram presentes e dispostas a ajudar e permitir a realização dessa pesquisa.

Aos companheiros do Grupo de Pesquisa em Câncer de Mama, Aldenora Oliveira, Cinthya Vivianne e Thiago Hipólito. Obrigada pela grande ajuda e contribuição. Vocês foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho, desde o recrutamento das pacientes até as análises dos dados.

Às minhas tão amadas amigas “zinquetes”. As quais eu fui agraciada por Deus com vocês em minha vida. Aldenora Oliveira, Camila Revoredo e Heila Dias, nós rimos e choramos, nos preocupamos e nos acalmamos, confirmamos que tudo na vida tem seu lado bom, e sabemos que Deus esteve conosco em meio às lutas e barreiras. Vocês nunca sumiram e me abandonaram mesmo que muitas vezes as análises nem fossem suas, e muitas dessas análises nos fizeram sair da UFPI depois das 21:00h. Aldenora, obrigada pela ajuda nas análises dos registros alimentares e discussão dos resultados; Camilinha, obrigada pela alegria e animação de sempre, você nos fez rir até nas agonias (risos); e Heila, obrigada pela paciência nas análises estatísticas e pela companhia nas inúmeras tentativas de análises de zinco no Espectrofotômetro de absorção atômica. Obrigada por sempre estarem comigo, obrigada pelas risadas sem hora (e essas foram muitas), e pela enorme ajuda e amizade nesses mais de dois anos de mestrado. Aprendemos e ensinamos umas às outras, ganhamos conhecimento e crescemos juntas. Hoje nós inspiramos e expiramos zinco (risos). Obrigada minhas lindas amigas. Amo vocês!!!

À minha linda PIBIC, Ayla Soares. Minha querida, queria que você estivesse aqui comemorando comigo esta vitória, mas sei que dos Estados Unidos você está torcendo. Obrigada pela amizade, conversas, ajuda, esforço, disponibilidade, dedicação, pelas noites em claro na tabulação dos dados e análises dos Diários Alimentares com Aldenora. Obrigada pela presença nas coletas de sangue e as inúmeras trocas de conhecimento. Deus tem planos perfeitos para você onde quer que você esteja.

Às minhas colaboradoras, Tatiana Barros e Alana Gleyka, pela amizade, disponibilidade no recrutamento, separação de sangue e análises dos dados. Obrigada pelas vezes que cheguei ao LANEX e vi seus lindos rostinhos lá para me ajudar, meu sorriso enlarguecia.

À família LANEX, em especial à Elise Saffnauer e Larisse Monteles, pelo apoio e compreensão, pois sempre que precisei vocês se mantiveram dispostas a me ajudar em minhas análises.

À minha querida Turma 2012/2014 do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde. Muitas vezes não entendemos os planos de Deus em nossa vida, mas hoje eu sei que não poderia estar em uma turma melhor do que a nossa, onde tudo se transforma em alegria e todos ajudam uns aos outros. Um caminhar saudável e prazeroso, sem egoísmo e disputas.

À amiga Vanessa Lima, por me apresentar o mundo da pesquisa e me ensinar grande parte do que sei hoje no laboratório. Obrigada pela amizade construída, pelas conversas, conselhos, ensinamentos e aprendizados para toda a vida.

Ao LIMAV, representado pelo Prof. Dr. Edvan Vieira e seus alunos de IC (Antonieli, Darlisson e Micael), pela contribuição, paciência e manipulação do Espectrofotômetro de Absorção Atômica.

Ao Alexandre Pimentel, pela realização das análises de zinco no Laboratório de Ciências Farmacêuticas da USP.

Ao amigo José Mário, por sua atenção e disposição em ajudar nas análises e interpretação dos dados estatísticos.

Aos meus amados pais, Joaquim Borges e Socorro Guedes, pelo amor, incentivo, apoio, conselhos, e principalmente, por me ensinarem a entregar e confiar tudo nas mãos de Deus, pois só Ele sabe o que é melhor para mim. Vocês me deram asas e me ensinaram a voar, priorizaram os meus estudos e dos meus irmãos, e tudo que queremos hoje é que vocês se orgulhem de nós. Meus lindos pais, o Senhor Deus foi muito bom comigo e me abençoou com pais maravilhosos. Amos vocês!

Aos meus lindos irmãos, Joaquim Filho e Cecília Guedes, os melhores irmãos que alguém poderia ter. Vocês fazem meus dias mais felizes e a minha felicidade é ver vocês felizes. Juntos, nós sonhamos e lutamos, choramos e rimos muito, fazemos de simples coisas grandes momentos, e assim vamos caminhando por caminhos iluminados por Deus. Obrigada pelo amor, carinho e incentivo. Cecí, obrigada pela Revisão textual dessa Dissertação. Amo vocês, meus amores, e só peço o melhor de Deus nas suas vidas.

À minha querida Igreja, pelas inúmeras orações, e ao Departamento de Mocidade, minha família e meus irmãos em Cristo, pelo apoio e paciência.

A toda minha família, por sempre se fazerem presentes em momentos importantes como este.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para que meus dias fossem mais felizes nessa caminhada, seja com um olhar ou mesmo com palavras de incentivo e apoio. Meu muito obrigada!

“Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém.”

Romanos 11.36

RESUMO

ARAUJO, C. G.B. **Zincemia, atividade da enzima superóxido dismutase e sua relação com o marcador do estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama.** 2014. Dissertação (Mestrado) - Programa de Mestrado em Ciências e Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI.

INTRODUÇÃO: Estudos têm mostrado alterações no metabolismo do zinco em mulheres com câncer de mama. Este mineral possui ação antioxidante, e distúrbios nos seus parâmetros bioquímicos estão relacionados ao pior prognóstico da doença e agravamento do processo carcinogênico. Portanto, esse estudo avaliou a atividade da enzima superóxido dismutase e parâmetros bioquímicos relativos ao zinco, bem como investigou a existência de correlação entre essas variáveis e o marcador do estresse oxidativo nestas pacientes. **MÉTODOS:** Estudo caso-controle, envolvendo 66 mulheres, com idade entre 20 e 50 anos, sendo distribuídas em dois grupos: grupo caso (mulheres com câncer de mama, n=34) e grupo controle (mulheres saudáveis, n=32). Foram realizadas medidas do índice de massa corpórea e da circunferência da cintura, bem como analisados a ingestão de zinco, concentrações plasmáticas e eritrocitárias desse mineral, além da atividade da enzima superóxido dismutase e da concentração do malondialdeído. A análise da ingestão de zinco foi realizada por meio do registro alimentar de três dias, utilizando o software Nutwin versão 1.5. As concentrações de zinco plasmático e eritrocitário foram determinadas segundo o método de espectrofotometria de absorção atômica de chama ($\lambda = 213,9$). A determinação da atividade eritrocitária da enzima superóxido dismutase foi realizada pelo método colorimétrico de Griess. A concentração plasmática do malondialdeído foi analisada pela medida da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os dados foram organizados no programa estatístico SPSS for Windows 18.0. **RESULTADOS:** Os valores médios da ingestão de zinco estavam superiores às recomendações, sem diferença estatística entre os grupos estudados ($p > 0,05$). As concentrações médias do zinco plasmático foram de 60, 45 \pm 7,46 $\mu\text{g/dL}$ para as mulheres com câncer de mama e de 64,59 \pm 10,07 $\mu\text{g/dL}$ para o controle ($p > 0,05$). A média do zinco eritrocitário foi de 37,51 \pm 8,26 $\mu\text{gZn/gHb}$ e de 35,97 \pm 5,57 $\mu\text{gZn/gHb}$ para as mulheres com câncer de mama e para o controle, respectivamente ($p > 0,05$). As médias da atividade da enzima superóxido dismutase e da concentração do malondialdeído foram respectivamente, 8924,32 \pm 3829,35 $\mu\text{gSOD/gHb}$ e 5,02 \pm 4,55 $\mu\text{mol/L}$ para as mulheres com câncer de mama e 7170,14 \pm 3132,32 $\mu\text{gSOD/gHb}$ e 3,95 \pm 1,55 $\mu\text{mol/L}$ para o grupo controle. Não houve correlação estatística significativa entre os parâmetros do zinco e a concentração da enzima superóxido dismutase e do malondialdeído. **CONCLUSÃO:** A partir dos resultados desse estudo, pode-se pressupor que a ingestão de zinco pelas mulheres com câncer de mama não influencia as concentrações plasmáticas e eritrocitárias desse mineral. A atividade da enzima superóxido dismutase elevada nas mulheres com câncer de mama parece ser decorrente de um mecanismo de regulação compensatório mediante o estresse oxidativo presente nessa doença.

Palavras-chave: Câncer de Mama, Zinco, Superóxido Dismutase, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Araujo, CGB. **Zincemia, superoxide dismutase activity and its relationship with the marker of oxidative stress in women with breast cancer.** 2014 Thesis (MS) - Master's Program in Health Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, PI.

INTRODUCTION: Studies have shown changes in zinc metabolism in women with breast cancer. This mineral has antioxidant activity and disturbances in their biochemical parameters are related to worse prognosis and worsening of the carcinogenic process. Therefore, this study evaluated activity of superoxide dismutase and the biochemical parameters related to zinc, and investigated the correlation between these variables and the marker of oxidative stress in these patients. **METHODS:** A case-control study, involving 66 women, aged between 20 and 50 years, divided into two groups: study group (women with breast cancer, n=34) and control group (healthy women, n=32). Measures of body mass index and waist circumference, as well as analyzed zinc intake, plasma and erythrocyte concentrations of this mineral were held, besides the activity of superoxide dismutase and concentration of malondialdehyde. Analysis of zinc intake was performed using the three-day food record using Nutwin software version 1.5. Concentrations of plasma and erythrocyte zinc were determined by the method of atomic absorption spectrophotometry flame ($\lambda=213.9$). The determination of the activity of erythrocyte superoxide dismutase was performed by the colorimetric method of Griess. The plasma concentration of malondialdehyde was analyzed by measuring the production of thiobarbituric acid reactive substances. Data were organized in SPSS for Windows 18.0. **RESULTS:** The mean values of zinc intake were higher than recommendations, with no statistical difference between groups ($p > 0.05$). The mean plasma zinc concentrations were 60, 45 ± 7.46 mg/dL for women with breast cancer and 64.59 ± 10.07 mg/dL in the control ($p > 0.05$). The mean erythrocyte zinc was 37.51 ± 8.26 $\mu\text{gZn/gHb}$ and 35.97 ± 5.57 $\mu\text{gZn/gHb}$ for women with breast cancer and the control, respectively ($p > 0.05$). The average activity of superoxide dismutase and concentrations of malondialdehyde were respectively , $8924,32 \pm 3829,35$ $\mu\text{gSOD/gHb}$ and $5,02 \pm 4,55$ $\mu\text{mol/L}$ for women with breast cancer and $7170,14 \pm 3132,32$ $\mu\text{gSOD/gHb}$ and $3,95 \pm 1,55$ $\mu\text{mol/L}$ for the control group. There was no statistically significant correlation between the parameters of zinc and the concentration of superoxide dismutase and malondialdehyde. **CONCLUSION:** The results of this study, it can be assumed that zinc intake by women with breast cancer does not affect the plasma concentrations and erythrocyte of this mineral. The activity of the enzyme superoxide dismutase higher in women with breast cancer seems to be due to a mechanism for compensatory regulation by oxidative stress present in this disease.

Keywords: Breast Cancer, Zinc, Superoxide Dismutase, Oxidative Stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Classificação do estado nutricional, segundo o índice de massa corpórea, em adultos. 40

Quadro 2 - Valores de referência para avaliação do risco cardiovascular utilizando a medida da circunferência da cintura. 41

Figura 1 - Localização subcelular dos transportadores de zinco e das metalotioneínas. Localização e funções potenciais dos transportadores de zinco para famílias Slc39/Zip (azul) e Slc30/ ZnT (vermelho), metalotioneína, e elemento de resposta metal (MRE) – fator de transcrição 1 (MTF1) com a célula. ER = retículo endoplasmático. 27

Figura 2 - Distribuição das participantes do estudo, segundo o grupo e estado nutricional. Teresina-PI, Brasil, 2014. 51

Figura 3 - Ingestão dietética de zinco das pacientes com câncer de mama e do grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014. 52

Figura 4 - Ingestão dietética de zinco por indivíduos das pacientes com câncer de mama. Teresina-PI, Brasil, 2014. 53

Figura 5 - Ingestão dietética de zinco por indivíduos do grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014. 53

Figura 6 - Análise de correlação linear simples entre a enzima superóxido dismutase e o malondialdeído em pacientes com câncer de mama. Teresina – PI, Brasil, 2014. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios e desvios padrão da idade, peso corporal, estatura, 50 índice de massa corpórea e circunferência da cintura das pacientes com câncer de mama e do grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014.

Tabela 2 - Valores médios e desvios padrão da contribuição energética dos 51 nutrientes presentes nas dietas ingeridas pelas pacientes com câncer de mama e do grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014.

Tabela 3 - Valores médios e desvios padrão das concentrações eritrocitárias e 54 plasmáticas de zinco das pacientes com câncer de mama e do grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014.

Tabela 4 - Valores médios e desvios padrão da atividade da enzima superóxido 55 dismutase eritrocitária das pacientes com câncer de mama e do grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014.

Tabela 5 - Valores médios e desvios padrão das concentrações plasmáticas de 55 malondialdeído das pacientes com câncer de mama e do grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014.

Tabela 6 - Análise de correlação linear simples entre os parâmetros 56 bioquímicos do zinco, enzima superóxido dismutase e malondialdeído em pacientes com câncer de mama. Teresina-PI, Brasil, 2014.

Tabela 7 - Análise de correlação linear simples entre os parâmetros 56 bioquímicos do zinco, enzima superóxido dismutase e malondialdeído no grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC - Circunferência da Cintura

DNA - Ácido Desoxirribonucléico (Deoxyribonucleic Acid)

EAR- Estimated Average Requirement

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

IMC - Índice de Massa Corpórea

MDA - Malondialdeído

MMP - Metaloproteinases

MT- Metalotioneína

O₂ - Oxigênio

RNA - Ácido Ribonucléico (Ribonucleic Acid)

SOD - Superóxido Dismutase

ZIP - Zrt- and Irt-like Proteins

ZnT - Zinc Transporter

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	20
2.1 Câncer de Mama e Estresse Oxidativo	21
2.2 Aspectos Metabólicos e Fisiológicos do Zinco	24
2.3 Zinco e Câncer de Mama	29
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	37
4.1 Caracterização do Estudo e Protocolo Experimental	38
4.2 Avaliação Antropométrica	39
4.2.1 Peso (kg) e Estatura (cm)	39
4.2.2 Índice de Massa Corpórea (IMC)	40
4.2.3 Circunferência da Cintura	40
4.3 Avaliação do Consumo Alimentar	41
4.4 Coleta do Material Biológico	42
4.5 Parâmetros Bioquímicos de Determinação de Zinco	42
4.5.1 Controle de Contaminação e Preparo de Reagentes	42
4.5.2 Separação dos Componentes do Sangue	42
4.5.3 Determinação do Zinco Plasmático	43
4.5.4 Determinação do Zinco Eritrocitário	43
4.6 Determinação da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase Eritrocitária	44
4.7 Determinação do Malondialdeído Plasmático	45
4.8 Análise Estatística	45
4.8.1 Análise dos Dados Dietéticos	46
5 RESULTADOS	49
5.1 Estado Nutricional das Participantes	50
5.2 Consumo alimentar	51
5.3 Parâmetros Bioquímicos de Avaliação do Zinco	54
5.4 Parâmetros Bioquímicos de Avaliação da Enzima Superóxido Dismutase	54

5.5 Parâmetros Bioquímicos de Avaliação do Malondialdeído	55
5.6 Correlação entre Parâmetros Bioquímicos do Zinco, Enzima Superóxido Dismutase e Malondialdeído	55
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65
APÊNDICES	75
APÊNDICE A	76
APÊNDICE B	77
APÊNDICE C	80
ANEXOS	84
ANEXO A	85

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A neoplasia maligna da mama é caracterizada pela multiplicação e propagação descontrolada e anormal de células do tecido mamário, constituindo o resultado de um acúmulo progressivo de mutações no material genético (VIEIRA, 2008). É uma doença crônica com causas endógenas e ambientais, em que a susceptibilidade genética interage com fatores sócio-demográficos, reprodutivos, nutricionais e outros fatores de risco relacionados ao estilo de vida, sendo responsável por cerca de 22% da incidência de câncer e por 14% do total de mortes associadas às neoplasias, entre as mulheres (AL-QALLAF; SORKHOU; SARKHOU, 2007; INCA/MS, 2012).

A relação entre estresse oxidativo e câncer de mama tem sido bastante investigada (SINHA et al., 2009; KASAPOVIC et al., 2010; MA et al., 2010; PAN et al., 2011; KLINGELHOEFFER et al., 2012). Alguns carcinógenos favorecem a produção de radicais livres que danificam as células, predispondo às transformações malignas. Esses compostos podem modificar os efeitos moleculares e celulares, resultando em mutagenicidade, citotoxicidade e alterações na expressão de genes envolvidos na iniciação e promoção da carcinogênese (RAY et al., 2001).

A concentração de espécies reativas de oxigênio elevada no meio intracelular, bem como o comprometimento no reparo do DNA, torna esse ácido nucléico susceptível ao dano oxidativo, que contribui de forma relevante para a carcinogênese mamária (CAI et al., 2004). As espécies reativas de oxigênio participam tanto de reações inflamatórias quanto de mecanismos de transdução de sinais, atuando como segundos mensageiros para manter diversas funções celulares (BARBIERI; SESTILI, 2012). Esta resposta inflamatória estimula a produção de novos radicais livres, mantendo a lesão tecidual progressiva (BURINI, 2002).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e em estruturas celulares, podendo resultar inclusive na morte celular (BARBIERI; SESTILI, 2012).

Paralelamente, na defesa antioxidante, enzimas específicas atacam diretamente as espécies reativas de oxigênio, as quais impedem, por meio de sua

própria redução, o dano oxidativo celular e minimizam a toxicidade causada pelos radicais livres; e também podem seletivamente induzir a apoptose em células cancerosas e inibir a proliferação celular (OLIVEIRA, 2004; PAN et al., 2011).

As enzimas constituintes em organismos aeróbicos na prevenção ou atenuação dos efeitos deletérios promovidos por espécies reativas de oxigênio são: superóxido dismutase, catalase, glutathiona peroxidase e glutathiona redutase (SINGH et al., 2010). A enzima superóxido dismutase atua como anticarcinogênico, inibindo a fase de iniciação, promoção e progressão na carcinogênese mamária (PRABASHEELA et al., 2011).

Nesse sentido, Sinha et al. (2009); Goswami et al. (2010) e Prabasheela et al. (2011), avaliaram a ação antioxidante da enzima superóxido dismutase em pacientes com câncer de mama e verificaram atividade dessa enzima reduzida e significativo aumento de oxidantes nessas pacientes quando comparado ao grupo controle, evidenciando que a produção de radicais livres em pacientes com câncer de mama ocorre em situações de comprometimento da defesa antioxidante.

Nessa perspectiva, o zinco é um nutriente que possui papel importante em vários processos biológicos, na inibição ou ativação de reações enzimáticas e na competição com outros elementos, alterando a permeabilidade das células, exercendo, portanto, ação direta ou indireta no processo carcinogênico (SANCAK et al., 2003; DUTRA et al., 2004).

Diversos estudos vêm sendo realizados visando esclarecer a associação entre o zinco e as neoplasias da mama. Ainda em 2002, Kuo et al. encontraram concentrações séricas de zinco reduzidas em pacientes com câncer de mama e sugeriram que o zinco plasmático poderia ser utilizado como um possível marcador prognóstico e terapêutico nesse tipo de câncer.

As concentrações séricas reduzidas de zinco aumentam a peroxidação lipídica em membranas mitocondriais e microssomais, e ainda a fragilidade osmótica de membranas dos eritrócitos. No entanto, em concentrações normais, o zinco previne a peroxidação lipídica, desempenhando papel importante na proteção das células contra o estresse oxidativo, pois esse mineral atua na regulação da atividade de enzimas antioxidantes (DHAWAN; CHADHA, 2010).

Embora algumas pesquisas já tenham demonstrado a importante atuação do zinco como um nutriente antioxidante em diversos mecanismos envolvidos na patogênese de doenças crônicas, como por exemplo, o câncer de mama; dados

referentes ao estado nutricional relativo a esse mineral em mulheres com neoplasia da mama são escassos. Assim, a determinação das concentrações plasmáticas e eritrocitárias de zinco, bem como a investigação de uma possível relação entre essas variáveis e a atividade da enzima superóxido dismutase e o malondialdeído contribui para o melhor entendimento acerca do papel desse mineral em mecanismos envolvidos nos distúrbios metabólicos associados ao câncer de mama.

Referencial Bibliográfico

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 Câncer de Mama e Estresse Oxidativo

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. Sua incidência vem aumentando ao longo do tempo, concomitantemente ao aumento da industrialização e da urbanização (INUMARU; SILVEIRA; NAVES, 2011). A neoplasia maligna da mama é responsável por cerca de 22% da incidência de câncer e por 14% do total de mortes associadas às neoplasias entre as mulheres (INCA/MS, 2014).

No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61% (INCA/MS, 2012). Esse tipo de câncer é uma neoplasia rara antes dos 35 anos, e a partir dessa idade a incidência tende a crescer progressivamente, sendo mais frequente na faixa etária entre 65 e 70 anos (FILGUEIRAS et al., 2007).

Nas últimas décadas, diversas pesquisas têm sido conduzidas na perspectiva de esclarecer as causas do câncer de mama. Nesse sentido, sobre os fatores associados ao maior risco para a manifestação dessa doença, vale destacar as situações de maior exposição estrogênica como a menarca precoce, nuliparidade, menopausa tardia, uso de contraceptivo oral e ainda terapias de reposição hormonal (INCA/MS, 2012).

Um ponto importante envolvido na patogênese do câncer de mama diz respeito ao aumento da peroxidação lipídica e à diminuição da capacidade da defesa antioxidante, sendo esta mais pronunciada durante o envelhecimento das pacientes (KASAPOVIC et al., 2008). É oportuno mencionar, que durante o desenvolvimento do processo da carcinogênese mamária, a presença de elevadas concentrações de espécies reativas de oxigênio podem iniciar o dano oxidativo ao DNA e, conseqüentemente, as fases de iniciação e promoção da carcinogênese (NICOLSON; SETTINERI, 2011; PRABASHEELA et al., 2011).

Assim, o estresse oxidativo contribui de forma relevante para o desenvolvimento do câncer de mama, sendo que para manter o equilíbrio antioxidante-oxidante, o organismo dispõe de enzimas que atuam convertendo as espécies reativas de oxigênio em metabólitos menos reativos (PHAM et al., 2009;

MA et al., 2010). Esses compostos estão elevados no interior das células cancerosas e estão associadas à promoção e à progressão da malignidade do tumor no câncer de mama (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004; TAS et al., 2005).

Vale ressaltar, que drogas utilizadas no tratamento de pacientes com câncer de mama parecem potencializar a produção de radicais livres, sendo que o estresse oxidativo resultante da quimioterapia em particular, pode danificar sistemas biológicos e contribuir para a proliferação do tumor (NICOLSON; CONKLIN, 2008).

Estudos recentes revelam existência de associação entre a quimioterapia, atividade da enzima superóxido dismutase e aumento do estresse oxidativo. Weydert et al. (2008) e Kasapović et al. (2010) encontraram atividade reduzida dessa enzima em pacientes com câncer de mama em resposta à quimioterapia. Segundo os autores, a enzima superóxido dismutase atua contribuindo para redução da formação de tumores e da angiogênese, enquanto que a quimioterapia promove mudança oxidativa, que potencializa o estresse oxidativo crônico já existente em pacientes com câncer.

É oportuno chamar atenção para o fato de que os agentes antitumorais utilizados na quimioterapia interferem na síntese de DNA e RNA, de proteínas ou no funcionamento adequado de moléculas pré-formadas (NEVES, 2011). Esse fato favorece a liberação de substâncias tóxicas ao organismo, que por sua vez atacam novas células de tecidos de rápida proliferação celular (SANTOS; CRUZ, 2001).

A literatura mostra alterações na atividade e expressão da enzima superóxido dismutase, bem como na concentração do malondialdeído, produto final da peroxidação lipídica, em células do tumor da mama. Tas et al. (2005) e Rajneesh et al. (2008) observaram produção excessiva de espécies reativas de oxigênio no tecido mamário cancerígeno, sendo essa evidenciada pelo aumento significativo do malondialdeído e pela atividade da enzima superóxido dismutase elevada quando comparado ao grupo controle. Segundo os autores, o aumento da peroxidação lipídica no tecido mamário cancerígeno parece estar associado ao excesso de radicais livres que, em consequência, aumenta a capacidade antioxidante e induz a atividade da enzima superóxido dismutase.

No estudo de Yeh et al. (2005), os resultados mostram que as concentrações de oxigênio, de malondialdeído e de substâncias antioxidantes como, por exemplo, a enzima superóxido dismutase estavam elevadas nas pacientes com câncer de mama quando comparado ao grupo controle. De forma semelhante,

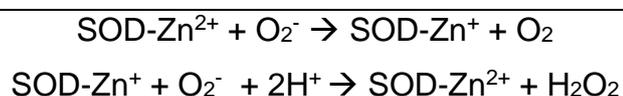
Khanzode et al. (2004) verificaram aumento gradativo das concentrações desses compostos do estágio I para o estágio IV da doença quando comparado ao grupo controle.

No entanto, Sener et al. (2007) e Goswami et al. (2010) avaliaram a concentração sérica de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase) e de marcadores da peroxidação lipídica em mulheres com câncer de mama e em mulheres saudáveis, e verificaram concentrações reduzidas dessas substâncias antioxidantes.

Alguns estudos têm sido realizados na perspectiva de avaliar marcadores do estresse oxidativo e de identificar mecanismos de ação antioxidante, e da via inflamatória em pacientes com câncer de mama. Nesse sentido, vale ressaltar que as espécies reativas de oxigênio atuam estimulando o aumento da expressão de genes codificantes de enzimas do sistema de defesa antioxidante (VIEIRA, 2008).

O mecanismo de ação dos antioxidantes envolve desde a remoção do oxigênio do meio, varredura das espécies reativas de oxigênio, “sequestro” dos metais catalizadores da formação de radicais livres, bem como aumento da geração de antioxidantes endógenos (GOWANI et al., 2010; PRABASHEELA, 2011).

A enzima superóxido dismutase, em particular, atua transformando dois ânions radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio. Essa enzima, primeiro adiciona um elétron (reação de redução) ao radical superóxido (O_2^-), para formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). Por sua vez, a catalase e a glutatona peroxidase então, trabalham simultaneamente com a proteína glutatona para reduzir o peróxido de hidrogênio e por fim produzir água (PHAM et al., 2009).



Assim, na perspectiva de contribuir no controle do câncer de mama, alguns estudos têm demonstrado o papel antioxidante de alguns nutrientes na proteção da carcinogênese mamária, dentre eles as vitaminas A, C e E, e os minerais como o zinco e o selênio (LESPERANCE et al., 2002; NISSEN et al., 2003; TERRY et al., 2002; PAN et al., 2011). O zinco, por exemplo, possui função importante na defesa

do paciente nas fases de iniciação e progressão do câncer (DHAWAN; CHADHA, 2010).

2.2 Aspectos Metabólicos e Fisiológicos do Zinco

O zinco é um elemento traço essencial de grande importância para o metabolismo humano (MEUNIER et al., 2005), pois atua como componente catalítico de mais de 300 metaloenzimas e em mais de 2000 fatores de transcrição, sendo componente integrante de proteínas e enzimas, e cofator de diversos processos metabólicos, incluindo carboidratos, lipídios, proteínas e síntese e degradação de ácidos nucleicos (MIAO et al., 2013).

O metabolismo do zinco começou a ser esclarecido por Raulin em 1869, quando demonstrou a sua importância para *Aspergillus niger*. Em 1960, O'Dell mostrou que este mineral era essencial para crianças, e que a sua deficiência poderia causar alterações no sistema imune, danos oxidativos, falta de apetite, problemas neuropsicológicos e de pele (KAGARA et al., 2007).

O papel do zinco sobre a imunidade e os efeitos da sua deficiência na resposta imune têm sido bastante pesquisado. Esse mineral atua sobre os mediadores da imunidade, como enzimas, peptídeos tímicos e citocinas, o que justifica a importância do seu estado nutricional adequado para a regulação da atividade, proliferação e apoptose das células linfóides (BOBROWSKA-KORCZAK et al., 2012). Além disso, como cofator, esse elemento traço influencia a secreção da timulina e, portanto, regula a função imune mediada pelas células tipo linfócito "T" (HÖNSCHEID; RINK; HAASE, 2009).

O zinco também desempenha papel na organização polimérica de macromoléculas como DNA e RNA e é indispensável para a atividade de enzimas envolvidas diretamente na síntese desses ácidos nucleicos, como a RNA polimerase. Além disso, participa da divisão celular, por meio da atividade da dioxitimidinaquinase e adenosina (5') tetrafosfato (5')-adenosina. Portanto, em situação de deficiência de zinco ocorrem alterações na síntese ou prejuízo da função do RNA mensageiro (LEMOS, 2008).

O zinco possui atuação enzimática, seja na estrutura da enzima ou em sua ação regulatória ou catalítica no organismo, contribuindo para a permeabilidade e estabilidade de membranas estruturais e, conseqüentemente, para a proteção

celular, pois possui papel antioxidante importante na prevenção da peroxidação lipídica (ARIAS; SANTOS, 2008).

As propriedades antioxidantes do zinco são fundamentadas pelo seu papel na regulação da síntese da metalotioneína, na estrutura da enzima superóxido dismutase e na proteção de agrupamentos sulfidrila de proteínas de membranas celulares, onde promove a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio por antagonismo com metais pró-oxidantes como o ferro e cobre (AZZIZ, 2011), o que reforça a ação desse oligoelemento como estabilizador da membrana plasmática e de outras membranas e organelas encapsuladas (ROODBEEN; HEST, 2009).

Com relação à absorção do zinco, a sua captação na superfície da borda em escova ocorre por meio de mecanismos de transporte mediados por transportadores e por difusão simples, que varia em importância, conforme a concentração desse mineral presente na dieta. O mecanismo mediado por carreadores predomina em situação de baixa concentração de zinco na dieta, enquanto que a absorção por difusão simples é predominante quando a concentração desse mineral é elevada (ANDRADE; MARREIRO, 2011).

Dentro das células intestinais, o zinco liga-se a metalotioneína, proteína responsável pela regulação homeostática de sua absorção (KRIZKOVA et al., 2012). Essa proteína de baixo peso molecular contém de 61 a 68 aminoácidos, dos quais 20 são cisteínas. A metalotioneína contém domínios de grupamentos de zinco com diferentes afinidades de ligação, dos quais 7 átomos de zinco presentes na proteína estão ligados às moléculas de cisteínas, e é importante regulador da concentração livre desse mineral. Tiolatos de cisteína ligam-se ao zinco e formam os grupos Zn_3S_9 e Zn_4S_{11} , sendo essa interação regulatória da ação redox e liberação de zinco mediante reação com óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e outras espécies oxidantes (OTEIZA, 2012).

Na presença do estresse oxidativo o zinco liberado da metalotioneína funciona como modulador da homeostase redox celular, sinalizador celular e assim, regula diversos eventos celulares, incluindo a defesa antioxidante, proliferação e diferenciação celular (ADAM et al., 2010). A expressão de genes codificantes da metalotioneína é estimulada por hormônios, como os glicocorticóides, e pela ingestão alimentar elevada de zinco (FEITOSA et al., 2013).

Outra proteína presente na mucosa intestinal é a proteína intestinal rica em cisteína. Essa proteína liga-se ao zinco dentro do enterócito e tem função de carreador intracelular, aumentando a velocidade de absorção. Em situações de concentração elevada de zinco no organismo, esse mineral permanece ligado à metalotioneína, sendo, em seguida, excretado nas fezes, juntamente com as células intestinais descamadas. Por outro lado, em situação de deficiência, o zinco é transferido à proteína intestinal rica em cisteína e é, então, transportado para a corrente sanguínea (MARQUES; MARREIRO, 2006).

As metalotioneínas participam de funções como: transporte, armazenamento e metabolismo de metais essenciais; transporte e detoxificação de metais tóxicos; proteção contra radicais livres; ação como metalochaperonas por transportar íons metálicos para outras proteínas; controle da concentração de elementos traços livres como o zinco e cobre e proteção contra danos cerebrais (ARIAS; SANTOS, 2008).

A propriedade antioxidante da metalotioneína é evidenciada em condições como a exposição a radiações, drogas e metais pesados, inibindo a propagação de radicais livres por meio de ligações seletivas de íons de metais pró-oxidantes como o ferro e o cobre, e dos potencialmente tóxicos como o mercúrio e o cádmio (ARIAS; SANTOS, 2008). Na presença do estresse oxidativo, a metalotioneína libera o zinco ligado à sua molécula e inibe a produção excessiva de radicais livres (BATISTA, 2009).

Após absorção, o zinco é liberado pela célula intestinal, passa para os capilares mesentéricos e é transportado no sangue portal, sendo captado pelo fígado e subsequentemente distribuído para os demais tecidos (DEVIRGILIIS et al., 2007). A excreção desse mineral ocorre por meio dos rins, pele e intestino (SEKLER et al., 2007).

No sangue, cerca de 80% do zinco é encontrado nos eritrócitos, 16% no plasma ligado principalmente à albumina (70%) e α 2-macroglobulina. A circulação representa a menor parte do total de zinco do organismo, e o *turnover* plasmático é o mais elevado. A concentração plasmática normal é de aproximadamente 100mg/dL e apesar de representar apenas cerca de 0,1% do conteúdo corporal, é a fonte primária deste mineral para todas as células, tendo uma dinâmica rápida e estando sob controle homeostático (ALMEIDA, 2013).

A complexidade da homeostase do zinco necessita da sua compartimentalização em organelas intracelulares, que é regulada por meio da

integração de mecanismos de transporte do mineral. Vinte e quatro proteínas que transportam o zinco foram identificadas, bem como o papel desses transportadores sobre a eficiência da sua absorção (KELLEHER et al., 2011).

Esses transportadores são classificados em duas famílias: transportador de zinco (ZnT: família de proteínas facilitadoras da difusão cátion dos vertebrados, família Slc30a) e Zip (proteína Zrt/Irt-like, família Slc39a). Membros da família ZnT são responsáveis pelo efluxo de zinco do citoplasma para o meio extracelular ou compartimentos intracelulares, enquanto as Zips movem esse mineral na direção oposta. A ação coordenada dos dois tipos de transportadores de zinco é essencial para a manutenção da homeostase no citoplasma (figura 1), que desempenha papel importante na regulação das vias de sinalização (MIAO et al., 2013).

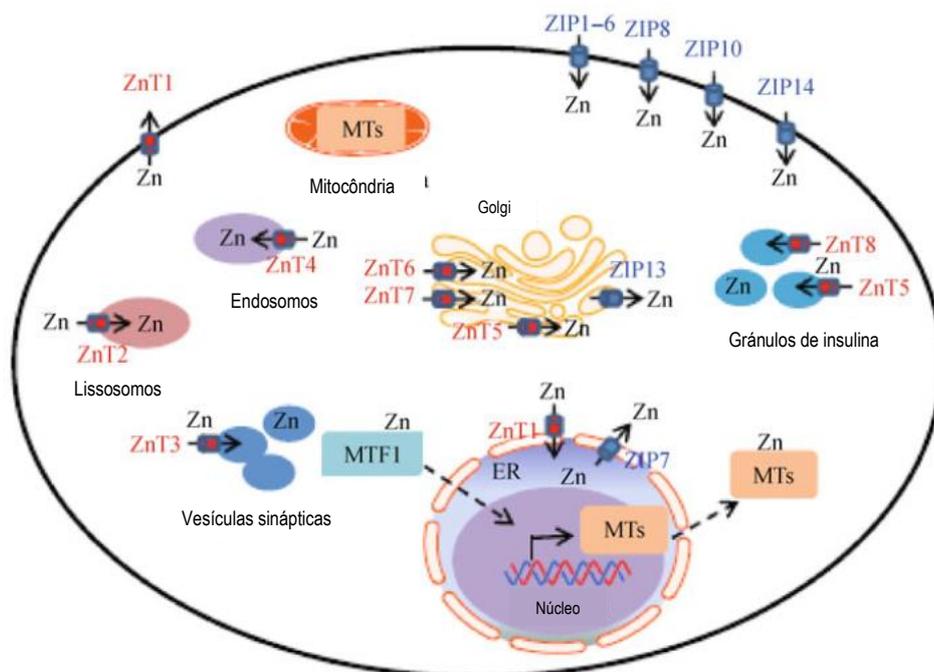


Figura 01 - Localização subcelular dos transportadores de zinco e das metalotioneínas. Localização e funções potenciais dos transportadores de zinco para famílias Slc39/Zip (azul) e Slc30/ ZnT (vermelho), metalotioneína, e elemento de resposta metal (MRE) – fator de transcrição 1 (MTF1) com a célula. As setas mostram a direção prevista da mobilização de zinco. ER = retículo endoplasmático.

Fonte: adaptada de MIAO et al. 2013

Em seres humanos já foram identificados dez genes que codificam os ZnT (ZnT1 a ZnT10), no entanto, foram caracterizados apenas ZnT-1, ZnT-2, ZnT-3, ZnT-4, ZnT-5, ZnT-6 e ZnT-7. As ZnT-1 localizam-se na membrana basolateral dos enterócitos e das células tubulares renais e são reguladas pela quantidade de zinco ingerido. As ZnT-2 estão envolvidas na captação do zinco no intestino, rins e nos testículos. Enquanto que as ZnT-3 estão presentes nas vesículas neuronais e

testículos, a ZnT-4 possui localização neuronal e nas glândulas mamárias (AZZIZ, 2011), e ZnT-5, ZnT-6 e ZnT-7 estão localizados nos compartimentos subcelulares e transportam o zinco para o lúmen da via secretora (KAMBE, 2011).

Sobre os transportadores da família Slc39a, já foi estabelecido que o Zip-1 é expresso na maioria dos tecidos humanos, sendo predominante no intestino delgado e no pâncreas, enquanto o Zip-3 apresenta elevada expressão na medula óssea e no baço e reduzida no intestino delgado e no fígado (LIUZZI et al., 2004). O Zip-4 está localizado nas células intestinais e nos rins, sendo que qualquer alteração na síntese deste transportador pode comprometer a absorção do mineral proveniente da dieta, favorecendo a sua deficiência. Os genes dos Zip-5, Zip-6 e Zip-7 apresentam elevada expressão nas células pancreáticas (COUSINS; LIUZZI; LICHTEN, 2006; DEVIRGILIIS et al., 2007).

O Zip-14 está localizado principalmente na membrana plasmática dos hepatócitos e a sua expressão pode ser induzida por citocinas inflamatórias. No estudo de Aydemir et al. (2012), foi demonstrada a necessidade do Zip14 para a captação hepática de zinco durante a regeneração hepática e a proliferação de hepatócitos. Esses achados indicam que o transportador de zinco atua regulando o crescimento de células hepáticas, pois promovem a captação do mineral nessas células. Segundo os autores, a estimulação da atividade do Zip14 pode ser uma estratégia terapêutica para promover a regeneração hepática em pacientes com doença hepática crônica.

A avaliação do estado nutricional relativo ao zinco tem sido realizada por meio da concentração do zinco eritrocitário e plasmático. Estudos têm demonstrado que a fragilidade osmótica dos eritrócitos está relacionada à função do mineral na membrana celular. O zinco encontrado nessas células não reflete mudanças recentes nos níveis desse elemento no organismo, e é um parâmetro utilizado na avaliação do estado nutricional relativo ao zinco a longo prazo, sendo seu conteúdo nestas células expresso em microgramas por grama de hemoglobina (GIBSON, 2008).

No entanto, apesar de sua sensibilidade baixa, o zinco plasmático é atualmente um biomarcador bastante utilizado. Na deficiência desse oligoelemento, o organismo tenta conservar os seus valores normais e apenas na deficiência grave, ocorre redução das concentrações de zinco nesse componente sanguíneo (HAMBIDGE, 2003).

2.3 Zinco e Câncer de Mama

A importância do zinco para a saúde humana é evidenciada pelo número crescente de doenças crônicas cuja patogênese está associada diretamente às concentrações inadequadas desse mineral, como por exemplo, a obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e o câncer (TAYLOR, 2012).

Existem evidências de que um percentual significativo de mortes por câncer poderia ser evitado por meio de uma maior atenção à alimentação adequada. Resultados de vários estudos demonstram a contribuição de compostos dietéticos na prevenção do câncer, o zinco em particular, é importante na defesa do organismo contra o início e a progressão dessa doença (DHAWAN; CHADHA, 2010).

Destaca-se a participação do zinco no reparo do DNA e na defesa antioxidante, onde atua estimulando a síntese da metalotioneína, enzima com ação relevante no controle da produção excessiva de radicais livres (GRANT, 2008). Na condição do estresse oxidativo, as metalotioneínas protegem o DNA de danos causados por espécies reativas de oxigênio, sendo que a liberação do zinco ligado a essa enzima resulta em maior disponibilidade de agrupamentos sulfidrilas para atuar na proteção antioxidante (BATISTA, 2008).

Vale mencionar que a concentração intracelular de zinco é importante para o desenvolvimento da célula, tanto na sua proliferação e diferenciação, quanto na morte por necrose, pois diversas proteínas envolvidas na sinalização e reparo do dano ao DNA, enzimas replicadoras como DNA e RNA polimerase e fatores de transcrição, como a proteína p53 necessitam desse mineral para suas funções adequadas (DHAWAN; CHADHA, 2010; BOBROWSKA-KORCZAK et al., 2012).

A deficiência de zinco contribui para danos no DNA e modificações oxidativas que favorecem o risco do câncer de mama (GRANT, 2008; BOBROWSKA-KORCZAK et al., 2012). Memon et al. (2007) avaliaram a concentração de zinco no sangue e no cabelo de 65 mulheres com câncer de mama e de 50 mulheres saudáveis da mesma faixa etária. Nesse estudo, os autores encontraram concentração reduzida de zinco no sangue total das mulheres com câncer de mama quando comparado ao grupo controle, sugerindo a existência de relação entre os níveis de zinco e o câncer.

Nessa perspectiva, alguns estudos foram conduzidos com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação com zinco em pacientes com câncer de mama e

os resultados mostram redução do estresse oxidativo e melhora da resposta imune nessas pacientes. Adzersen et al. (2003), Ho (2004) e Pan et al. (2011) avaliaram o efeito da suplementação com esse mineral em mulheres com câncer de mama e observaram reduções significativas do risco para esse tipo de câncer em mulheres premenopausadas. Segundo os autores, a suplementação com zinco contribui para redução do estresse oxidativo e de danos ao DNA e, ainda, para o atraso da apoptose.

Por outro lado, dados de várias investigações revelam que alterações na homeostase do zinco estão envolvidas na patogênese do câncer de mama (GRANT, 2008; KELLEHER; SEO; LOPEZ, 2009; BOBROWSKA-KORCZAK et al., 2012). De acordo com o estudo de Kelleher et al. (2011), o aumento das concentrações de zinco no tecido mamário está associado ao início do processo da carcinogênese.

Segundo os dados obtidos de alguns estudos, o aumento das concentrações de zinco na célula mamária ocorre devido à expressão acentuada de transportadores que fazem o influxo desse mineral, como a metalotioneína, Zip5, Zip6, Zip7, Zip8 e Zip10, e à expressão reduzida de transportadores de efluxo (ZnT 1-10). O acúmulo de zinco no tumor mamário estimula mecanismos acumulatórios e inibe transportadores transmembrana desse mineral para as demais células, que predispõe às transformações malignas (KELLEHER et al., 2011).

Assim, alterações na homeostase do zinco favorecem a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e o processo de apoptose celular (FAVAROLO, et al., 2012), o que contribui para o desenvolvimento do câncer de mama. Sabe-se que o metabolismo alterado desse mineral e a expressão de genes codificantes da metalotioneína são de grande interesse em estudos da oncogênese e prognóstico do câncer. O papel da metalotioneína e do zinco no desenvolvimento do tumor estão ligados, e a estrutura e função dessa proteína são fortemente dependentes do estado redox do zinco e da sua ligação às proteínas (KRIZKOVA et al., 2012).

Além disso, a metalotioneína aumenta o potencial proliferativo das células neoplásicas, por meio de interação específica com a subunidade p50 do fator de transcrição nuclear NF- κ B, contribuindo para a inibição do processo apoptótico (GOMULKIEWICZ et al., 2010).

Sobre a participação da metalotioneína, a expressão dessa proteína pode ser considerada um biomarcador prognóstico potencial para o câncer de mama e

sua superexpressão ocorre na fase inicial da doença (PEDERSEN et al., 2009; YAP et al., 2009; ADAM et al., 2010; GOMULKIEWICZ et al., 2010; LAI et al., 2011).

Vários mecanismos envolvidos na participação dessa proteína sobre a proliferação de células e progressão de tumores têm sido propostos. A metalotioneína é uma fonte direta de fornecimento de zinco para as enzimas envolvidas em processos de replicação, transcrição e biossíntese de proteínas, favorecendo intensa proliferação de células neoplásicas. Este processo foi evidenciado tanto pela elevada concentração da metalotioneína na região de hiperplasia, quanto pela translocação desta proteína do citoplasma para o núcleo da célula na fase de síntese de DNA em células proliferativas (GOMULKIEWICZ et al., 2010).

Quatro classes de metalotioneína foram caracterizadas em mamíferos. Os genes MT-1 e 2 são expressos em vários tecidos, sendo sua concentração elevada predominante no fígado e no rim. A expressão de MT-3 é restrita ao cérebro e órgãos reprodutores masculinos, enquanto que a da MT-4 é específica do epitélio escamoso estratificado (THIRUMOORTHY et al., 2011).

Dentre essas isoformas, o RNAm da série MT-1 nomeado como A, E, F, G, H, X e a isoforma MT-3 foram detectados em tecidos de câncer da mama. Também foi demonstrado que a superexpressão da isoforma MT-3 está associada a um mau prognóstico em pacientes com câncer de mama. O RNAm da MT-2A é a isoforma mais expressa em tecidos mamários. A expressão da isoforma MT-1F contribui para a diferenciação histológica do câncer de mama invasivo, e uma vez que o estrogênio atua na tumorigênese mamária, essa isoforma tem sido exigida para participar em processos alternativos que substituem a função do estrogênio (THIRUMOORTHY et al., 2011).

No estudo de Lee et al. (2003), foram encontrados níveis elevados de metalotioneína em tumores de câncer de mama. A superexpressão dessa proteína em tecidos mamários está relacionada com tumores mais agressivos, de grau superior, e ainda com o pior prognóstico do câncer, evidenciando a importância da metalotioneína na proliferação das células cancerígenas mamárias.

Yap et al. (2009) determinaram a expressão da metalotioneína em mulheres com carcinoma ductal invasivo de mama e verificaram superexpressão dessa proteína em 87,9% dos tecidos com câncer de mama com porcentagem média de 30% de células positivas. A superexpressão da metalotioneína foi relacionada ao

pior grau histológico e à reduzida sobrevida, sugerindo que essa proteína possa prever a recorrência da doença e ser um potencial marcador de quimiorresistência e alvo molecular terapêutico.

Na perspectiva de avaliar a importância clínica da metalotioneína em carcinoma ductal invasivo de mama, Zhang et al. (2000), avaliaram 96 casos de mulheres com câncer de mama e encontraram expressão positiva para a proteína em 52,1% dos casos. Segundo os autores, a expressão acentuada da proteína pode ser um indicador da presença de células de carcinoma mais agressivo.

Numa pesquisa conduzida por Kagara et al. (2007) foi demonstrada participação do zinco e de seu transportador Zip10 no comportamento invasivo das células com câncer de mama. Além disso, também foi verificado que o transportador Zip10 está associado à metástase do câncer de mama para o linfonodo.

No estudo de Gumulec et al. (2011) foram encontradas alterações nas concentrações de zinco intracelular e plasmático, bem como um desequilíbrio entre os transportadores de zinco Zip (Zip6, Zip7 e Zip10), ZnT e a metalotioneína. Nesse estudo, foi verificada concentração sérica de metalotioneína elevada em tumores malignos, que quando associada ao zinco, altera a proliferação celular e favorece a apoptose celular, potencializando a evolução de doença.

Outro ponto importante a ser destacado, diz respeito à participação das metaloproteinases (especialmente MMP-2 e MMP-9) em mecanismos envolvidos na patogênese do câncer de mama. Essas proteínas contribuem para a invasão tumoral e metástase das células, por serem capazes de degradar o colágeno do tipo IV encontrado em membranas basais e de induzir a angiogênese (VIZOSO et al., 2009).

Diversas pesquisas têm demonstrado o potencial das metaloproteinases (MMPs) como novos biomarcadores tumorais e indicadores de metástase para o câncer de mama com utilidade diagnóstica e prognóstica (NAKAHATA et al., 2009; BAHAR et al., 2010; MANNELLO, 2011). As MMPs (2 e 9) pertencem a uma família de gelatinases, endopeptidases dependentes de zinco, envolvidas em vários processos fisiológicos como a remodelação de tecidos, diferenciação e proliferação celular e apoptose, e ainda em diversas condições patológicas como a degeneração, inflamação crônica e o câncer (MANNELLO, 2011).

A MMP-2 é um marcador preditivo de tumores, incluindo o crescimento, progressão e metástase, e ainda alterações no processo da angiogênese associada

a esses estágios. Essa proteína está associada a um prognóstico desfavorável em pacientes com nódulo positivo de câncer de mama. Nos estudos de Bahar et al. (2010), a expressão da MMP-2 foi encontrada em 78% dos tumores primários de carcinoma de mama, indicando a existência de associação entre essa metaloproteinase e o câncer.

Com relação à MMP-9, o aumento da expressão dessa metaloproteinase também relaciona-se à agressividade tumoral e ao pior prognóstico do câncer, tendo sua ativação durante a fase tardia da doença, enquanto a MMP-2 possui sua produção elevada durante as fases iniciais do câncer de mama, o que justifica o impacto dessa proteína sobre o prognóstico clínico detectado em tumores de mama invasivos (VIZOSO et al., 2010).

É oportuno detalhar alguns aspectos relacionados a apoptose, processo biológico importante na homeostase celular que é influenciado pelo zinco. A apoptose é um mecanismo biológico regulado e necessário para remover células supérfluas, mutantes ou moderadamente prejudicadas, além de ser o maior mecanismo de morte celular frente a agentes tóxicos (DHAWAN; CHADHA, 2010).

A desregulação no mecanismo apoptótico é importante na patogênese de doenças crônicas, como por exemplo, o câncer de mama. Na deficiência de zinco, as células tornam-se mais sensíveis a elementos tóxicos, aumentando as taxas de apoptose, principalmente em tecidos de maior taxa mitótica. Assim, a atrofia de tecidos na deficiência desse mineral, parece ocorrer não pela redução da taxa de mitoses, mas pelo aumento da taxa de apoptose celular (TRUOG-TRAN et al., 2000). O mecanismo de apoptose depende da ativação de caspases que atuam destruindo substratos, favorecendo alterações bioquímicas e morfológicas típicas da morte celular. Existem duas vias moleculares que levam à ativação de caspases de apoptose: as vias extrínseca e intrínseca. A via apoptótica extrínseca indica uma forma de morte induzida por sinais extracelulares que induzem a ligação de ligantes específicos em receptores transmembrana, conhecidos como receptores de morte, sendo a principal iniciadora a caspase 8 (FAVALORO et al., 2012). Enquanto que a via intrínseca é ativada pelo estresse intracelular ou extracelular, como a privação de fatores de crescimento, danos ao DNA e hipóxia. Em resposta a estes fatores, a mitocôndria sofre modificações no potencial de membrana interna, na permeabilidade da membrana e aumento na densidade da matriz celular.

Vale destacar que alterações mitocondriais contribuem de forma relevante para morte celular, podendo facilitar a translocação de proteínas mitocondriais, bloqueio na síntese de ATP e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, o que leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, além de contribuir para a ativação de caspases-9 e 3 (MARIA, 2009; FERREIRA et al., 2010; FAVALORO et al., 2012).

Sobre este aspecto, os genes supressores de tumor codificam proteínas que atuam como reguladoras negativas da proliferação celular por meio do retardo na progressão do ciclo celular e do bloqueio da diferenciação, ou induzindo a morte celular programada (OLIVEIRA, 2009). Por outro lado, as alterações que inativam esses genes fazem com que a célula não seja inibida nos pontos de checagem do ciclo celular, levando à proliferação desordenada, característica da célula cancerosa (OLDENBURG et al., 2007).

Portanto, a importância do zinco na redução de espécies reativas de oxigênio sugere sua participação em mecanismos da apoptose, atuando na modulação do estado redox intracelular (FAVALORO et al., 2012). A ação desse mineral em células cancerosas ocorre por meio de uma mudança estrutural da proteína p53, produto de um gene supressor, que permite a restauração da sua atividade biológica. A proteína p53 atua regulando negativamente a proliferação celular ou positivamente a morte celular programada, codificando proteínas que atuam na manutenção da integridade do genoma e protegendo as células de um crescimento desordenado (AMENDOLA; VIEIRA, 2005).

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar parâmetros bioquímicos relativos ao zinco e atividade da enzima superóxido dismutase e relacioná-los com marcador do estresse oxidativo em pacientes com câncer de mama.

4.2 Objetivos Específicos

- Verificar a adequação da dieta em relação ao mineral zinco;
- Determinar a concentração de zinco plasmático e eritrocitário em pacientes com câncer de mama e comparar com o grupo controle;
- Determinar a atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária e a concentração do malondialdeído plasmático;
- Investigar a existência de relação entre as concentrações de zinco, da enzima superóxido dismutase eritrocitária e do malondialdeído em mulheres com câncer de mama.

Casuística e Métodos

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Caracterização do Estudo e Protocolo Experimental

Estudo de natureza transversal, envolvendo 66 mulheres pré-menopáusicas, na faixa etária de 25 a 50 anos, distribuídas em 2 grupos: experimental (com câncer de mama, n= 34) e controle (sem câncer de mama, n= 32). As mulheres com câncer de mama foram recrutadas do Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas (HGV)-Teresina/PI.

As mulheres elencadas para compor a amostra do estudo foram submetidas a uma entrevista no Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas (HGV)-Teresina/PI. Foram excluídas as pacientes com níveis séricos de hormônio folículo estimulante (FSH) > 30 µg/ mL e aquelas com câncer de mama que tinham histórico de tratamento prévio para a doença. As pacientes em uso de medicamentos e suplementos vitamínicos/ minerais, que apresentavam doenças agudas ou crônicas que pudessem interferir no metabolismo do zinco, também foram excluídas.

O grupo controle foi constituído por mulheres voluntárias, pré-menopáusicas, sem diagnóstico do câncer de mama, com características semelhantes ao grupo experimental quanto à faixa etária, gênero e nível sócio-econômico. As voluntárias foram recrutadas do Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas (HGV)-Teresina/PI, onde são atendidas para realização de exames de rotina.

A definição da amostra representativa das mulheres com câncer de mama que participaram do estudo foi baseada nos critérios de seleção e no número médio de pacientes atendidas anualmente no Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas (HGV)-Teresina/PI. O total de pacientes com câncer de mama atendidas por ano nesse serviço é de 70 casos. O número de mulheres foi definido considerando as perdas da amostra pelos critérios de inclusão, aplicando-se uma margem de erro de 5%, índice de confiança de 95% e prevalência de 7,5% da patologia em estudo.

O projeto foi encaminhado à Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí, CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) nº 15861213.2.0000.5214. Todas as participantes assinaram um termo de consentimento livre (Apêndices B), após

esclarecimento à respeito da natureza da investigação, obedecendo as normas do Conselho Nacional de Pesquisa contidas na Resolução 466/12 (BRASIL, 2012). Após assinatura do termo, foram entregues formulário para o registro alimentar (Apêndice C), bem como foram agendadas datas para obtenção de medidas antropométricas (peso, estatura e circunferência da cintura), coleta de sangue e entrega do registro alimentar. Associado a isso, foi verificado o resultado da biópsia nas mulheres com câncer de mama para identificar o estadiamento da doença.

Para a seleção das participantes do estudo foram seguidas as seguintes etapas:

- ✓ Seleção das participantes após aplicação dos critérios de inclusão;
- ✓ Procedimentos éticos, consentimento esclarecido;
- ✓ Entrega de formulário para o registro alimentar;
- ✓ Agendamento da coleta de sangue;
- ✓ Obtenção de amostras de sangue e recebimento do registro alimentar;
- ✓ Avaliação antropométrica;
- ✓ Avaliação do consumo alimentar;
- ✓ Determinação dos parâmetros bioquímicos.

4.2 Avaliação Antropométrica

Para avaliação antropométrica, aferiu-se peso, estatura e circunferência da cintura das participantes, conforme metodologia descrita pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2004).

4.2.1 Peso (kg) e Estatura (cm)

Anteriormente à coleta de sangue, o peso corporal das pacientes foi aferido utilizando uma balança digital Filizola® (São Paulo, Brasil), com capacidade máxima de 150 Kg com graduações em 100 gramas, estando as participantes da pesquisa descalças e vestidas com roupas leves. A estatura foi mensurada com antropômetro de pé, graduado em 0,1 centímetros e com barra de madeira vertical e fixa para posicionamento sobre a cabeça da paciente, estando em posição ereta, descalças, pés unidos, com os braços estendidos ao longo do corpo, calcanhares encostados no antropômetro, cabeça erguida e olhando para um ponto fixo na altura dos olhos.

O peso corporal e a estatura foram medidos três vezes para cada participante, sendo então obtida a média dessas medidas (BRASIL, 2004).

4.2.2 Índice de Massa Corpórea (IMC)

O índice de massa corpórea foi calculado a partir do peso da participante dividido por sua estatura elevada ao quadrado (WHO, 2000).

$$\text{IMC (kg/m}^2\text{)} = \frac{\text{Peso atual (kg)}}{\text{Estatura (m)}^2}$$

A classificação do estado nutricional, a partir da distribuição do índice de massa corpórea, foi realizada segundo a recomendação da World Health Organization (WHO, 2000), apresentada no quadro 1.

Quadro 1 - Classificação do estado nutricional, segundo o índice de massa corpórea, em adultos.

Classificação	IMC (kg/m ²)
Magreza classe III	<16
Magreza classe II	16 - 16,9
Magreza classe I	17 - 18,4
Eutrófico	18,5 - 24,9
Pré-obesidade	25,0 – 29,9
Obesidade classe I	30,0 – 34,9
Obesidade classe II	35,0 – 39,9
Obesidade classe III	≥ 40

Fonte: World Health Organization (2000).

4.2.3 Circunferência da Cintura

A medida da circunferência da cintura foi realizada utilizando uma fita métrica marca Seca® (São Paulo, Brasil), flexível e inelástica, com precisão de 0,1 centímetros, circundando a linha natural da cintura, na região mais estreita entre o

tórax e o quadril, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. As participantes estavam em posição ereta, com abdômen relaxado, braços estendidos ao longo do corpo e pés afastados um do outro. O quadro 2 apresenta os valores de referência da circunferência da cintura associados ao desenvolvimento de complicações relacionadas à obesidade.

Quadro 2 - Valores de referência para avaliação do risco cardiovascular utilizando a medida da circunferência da cintura.

Sexo	Risco de Complicações Metabólicas Associadas à Obesidade	
	Elevado	Muito Elevado
Homem	≥ 94 cm	≥ 102 cm
Mulher	≥ 80 cm	≥ 88 cm

Fonte: World Health Organization (2008).

4.3 Avaliação do Consumo Alimentar

A avaliação do consumo alimentar foi realizada por meio de um inquérito alimentar de acordo com a técnica do registro alimentar durante três dias, compreendendo dois dias da semana e um dia do final de semana (APÊNDICE C). No momento da entrega dos formulários às participantes do estudo, foram dadas orientações quanto à forma correta de anotar os alimentos, discriminando o tipo de refeição, preparações, porcionamento, medidas caseiras, quantidades e horários em que seriam consumidas. Esta metodologia foi escolhida devido à possibilidade de abranger, em curto prazo, a variabilidade de alimentos consumidos por um grupo de indivíduos (BASLOTIS et al., 1987).

As quantidades de energia, macronutrientes e zinco foram calculadas pelo programa *Nutwin*, versão 1.5 do Departamento de Informática em Saúde da Universidade Federal de São Paulo (ANÇÃO et al., 2002). As informações nutricionais dos alimentos não encontrados no programa foram inseridas a partir dos dados da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011) e da Tabela de Composição de Alimentos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011), de forma que todos os alimentos apresentassem

informação nutricional. Para verificar a adequação da ingestão alimentar do zinco, foi utilizado como referência a *Estimated Average Requirement* (EAR), contida nas *Dietary Reference Intakes* (DRI's) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).

4.4 Coleta do Material Biológico

Amostras de 15 mL de sangue foram retiradas no período da manhã, 7:30 às 9:00 horas, estando as pacientes no mínimo 12 horas de jejum. O sangue foi coletado com seringas plásticas descartáveis e agulhas de aço inoxidável, estéreis e descartáveis, sendo a seguir colocado em tubos distintos: (1) tubo de vidro contendo citrato de sódio a 30% como anticoagulante (10 mg/mL de sangue) para análise de zinco; (2) tubo de vidro com EDTA para determinação da atividade da enzima superóxido dismutase e malondialdeído e (3) tubo de vidro sem anticoagulante para verificar a concentração de FSH.

4.5 Parâmetros Bioquímicos de Determinação de Zinco

4.5.1 Controle de Contaminação e Preparo de Reagentes

A fim de garantir o controle de contaminação por minerais, toda a vidraria e o material de polipropileno utilizados para as análises foram desmineralizados antes do uso, por meio de banho em solução de ácido nítrico a 30%, durante um período de 12 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® Water System (Millipore, Massachusetts, EUA). Todos os reagentes utilizados tinham grau de pureza analítica.

4.5.2 Separação dos Componentes do Sangue

Para determinação do zinco, o plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 3000 x g durante 15 minutos a 4°C (centrífuga SIGMA 2K15). Foi

extraído com pipeta automática, acondicionado em tubos “eppendorfs” de polipropileno previamente desmineralizados, sendo a seguir conservados a -20°C para análises posteriores.

Para a separação do eritrócito e subsequente determinação de zinco foi utilizado o método de Whitehouse et al. (1982). A massa eritrocitária obtida do sangue total foi lavada três vezes com 5mL de solução salina a 0,9%, homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a $10000 \times g$ por 10 minutos (SORVALLÒ RC-SB) a 4°C , sendo o sobrenadante descartado. Após a última centrifugação, a solução salina foi aspirada e a massa de eritrócitos extraída com micropipeta, colocada em tubos “eppendorfs” desmineralizados, e acondicionada à -20°C , para análises do zinco.

4.5.3 Determinação do Zinco Plasmático

A determinação da concentração do zinco no plasma foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica, segundo método proposto por Rodriguez et al. (1989). Duas alíquotas de cada amostra de plasma foram separadas, diluindo-se em água Milli-Q® na proporção de 1:5 e aspirada diretamente na chama do aparelho. Como padrão, foi utilizado o Tritizol® (MERCK), preparado por diluição em água Milli-Q® com glicerol a 3%, nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados calculados a partir das absorbâncias obtidas foram expressos em $\mu\text{g/dL}$, representando a média das concentrações das amostras preparadas em duplicatas.

4.5.4 Determinação do Zinco Eritrocitário

A determinação da concentração de zinco no eritrócito foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica (WHITEHOUSE, 1982) seguindo a padronização de metodologia feita por Cordeiro (1994), na qual se constata um nível de precisão desejável nas análises e não interferência de matriz neste tipo de material biológico. Uma alíquota de $400\mu\text{L}$ de massa de eritrócito foi diluída em $1200\mu\text{L}$ água Milli-Q®. Esta diluição foi feita em duas etapas chamadas *lisado* 1 e 2, correspondentes respectivamente, a uma primeira diluição da alíquota de $400\mu\text{L}$ na

proporção de 1:4; e a uma segunda diluição na qual foram pipetados em triplicata 200µL do *lisado* 1 e diluídos novamente na proporção de 1:4.

Após homogeneização, as amostras do *lisado* 2 foram aspiradas diretamente no espectrofotômetro de absorção atômica. Como padrão foi utilizado o Tritizol® (MERCK), preparado por diluição em água Milli Q®, nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0 µg/mL. Para expressar os resultados de zinco/massa de hemoglobina foi determinada paralelamente a concentração de hemoglobina no *lisado* 1, e feitos os ajustes das diluições no cálculo final das análises. Uma alíquota de 20 mL deste *lisado* foi diluída em 5mL de solução de Drabkin para determinação de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina (VAN ASSENDELFT, 1972).

O espectrofotômetro UV visível (FEMTO Modelo 700S) foi utilizado para leitura da hemoglobina, num comprimento de onda de 540 nm. A partir dos valores das concentrações de zinco e de hemoglobina foi calculada a concentração de zinco, expressa em µgZn/gHb.

4.6 Determinação da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase Eritrocitária

A atividade da superóxido dismutase eritrocitária foi determinada pela quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a formação de nitrito. O óxido nítrico foi quantificado pela concentração de nitrito nos eritrócitos pelo método colorimétrico de Griess.

A atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada nos eritrócitos, preparados pelo método *in vitro*. As amostras de sangue total foram centrifugadas para separação do plasma, a 3000 x g durante 10 minutos a 4º C, posteriormente o plasma foi extraído com pipeta automática e acondicionado em tubos “eppendorfs” de polipropileno previamente desmineralizados.

Em seguida, o enxágue dos eritrócitos foi realizado com 5 mL de solução salina a 0,9%, sendo cuidadosamente homogeneizado por inversão e centrifugado. Após a última centrifugação, a solução salina foi aspirada e descartada, e a massa de eritrócitos foi extraída cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta automática, colocada em tubos “eppendorfs” de polipropileno desmineralizados, que foram mantidos à temperatura de -80 °C.

Para a análise da atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária, uma alíquota de 100µL de eritrócitos foi diluída em 1110µL de tampão fosfato, 75 µL de L-metionina, 40 µL de Triton X-100, 75 µL de cloreto de hidroxilamina e 100 µL de EDTA. As amostras foram incubadas em banho maria a 37°C por 5 minutos, após esse processo adicionou-se 80 µL de riboflavina e expôs-se a luz durante 10 minutos. ao final, foi adicionado 1mL de reagente de Griess e realizada leitura em λ de 543 nm. Os resultados obtidos foram utilizados posteriormente para cálculo da atividade enzimática pela quantidade de SOD capaz de inibir em 50% a formação de nitriro, neste caso, 36 ng de SOD inibem 50% da formação de nitrito.

4.7 Determinação do Malondialdeído Plasmático

As concentrações do malondialdeído foram determinadas pela produção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, 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: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 nmol, utilizando-se 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) como padrão.

Em tubos *ependorfs*, contendo 200 µL de plasma e um com 200 µL de água destilada (branco), foram adicionados 350 µL de ácido acético pH 3,5 e 600 µL de ácido tiobarbitúrico 0,5%, diluído em ácido acético, as amostras foram preparadas em triplicada. Em seguida, os tubos foram incubados 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.

Após o resfriamento, 50 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 8,1% foram adicionados aos tubos, procedendo-se à centrifugação por 15 minutos a 13201 x g a 25°C. O sobrenadante foi extraído e a absorbância lida no λ de 532 nm em espectrofotômetro BEL SP 1102. Os resultados foram expressos em µmol de malondialdeído por L.

4.8 Análise Estatística

Os dados foram organizados em planilhas do Excel® (2007) para realização de análise descritiva das variáveis observadas nos grupos estudados.

Posteriormente, os dados foram exportados para o programa SPSS (for Windows® versão 18.0) para análise estatística dos resultados.

O teste de Qui-quadrado foi aplicado para verificar a normalidade dos dados. Considerando que as variáveis apresentaram distribuição normal, o teste “t” de Student foi utilizado para fins de comparação entre os grupos estudados e o coeficiente de correlação linear de Pearson para a análise das correlações. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando o valor de $p < 0,05$, adotando-se um intervalo de confiança de 95%.

4.8.1 Análise dos Dados Dietéticos

Após verificar a normalidade da distribuição do zinco, os valores de ingestão foram ajustados em relação à energia pelo cálculo do nutriente e corrigidos pela variabilidade intrapessoal e interpessoal, evitando distorções geradas por diferenças no consumo energético (FISBERG et al., 2005; JAIME et al., 2003; WILLETT; STAMPFER, 1986). O cálculo possui quatro etapas:

Inicialmente realizou-se análise de regressão linear simples, considerando-se o total de energia ingerida como variável independente e o valor absoluto do nutriente como variável dependente. Utilizando-se a equação geral da regressão linear, pôde-se determinar a quantidade estimada de nutriente (Y_e) que o indivíduo deveria consumir com a sua média de consumo de energia.

$$\text{Equação 1 : } Y_e = \beta_0 + \beta_1 \times \text{média do consumo energético do indivíduo}$$

Onde:

β_0 = intercepto da regressão linear simples

β_1 = tangente

O resíduo da regressão (Y_r) representa a diferença entre a ingestão atual observada (Y_o) para cada indivíduo e a ingestão estimada.

$$\text{Equação 2 : } Y_r = Y_o - Y_e$$

Por definição, o resíduo possui média zero e pode apresentar valores positivos e negativos. Com isso, faz-se necessária a adição de uma constante, que

é estatisticamente arbitrária. Willett; Howe; Kushi (1997) propõem que a constante seja o consumo do nutriente estimado para a média do total de energia consumida pela população de estudo.

$$\text{Equação 3 : } Y_c = \beta_0 + (\beta_1 \times \text{média do consumo energético da população})$$

O valor do nutriente ajustado ou residual (Y_a) consiste na soma do Y_r e da constante Y_c e refere-se ao valor do nutriente ingerido não correlacionado com o total de energia consumida.

$$\text{Equação 4 : } Y_a = Y_r + Y_c$$

Após o ajuste por energia, os valores de zinco foram corrigidos pela variabilidade intrapessoal e interpessoal. Foi feita a análise de variância One-way ANOVA, para se obter o coeficiente de correlação corrigido pela variação intrapessoal e interpessoal. Por meio da média quadrática intrapessoal fornecida pela ANOVA têm-se o valor da variância intrapessoal (S_{intra}^2), inerentes ao consumo de zinco (SLATER; MARCHIONI; FISBERG, 2004).

$$S_{\text{intra}}^2 = MQ_{\text{intra}}$$

Onde,

MQ_{intra} = Média quadrática intrapessoal

Além da variância intrapessoal também foi calculada a variância interpessoal (S_{inter}^2):

$$S_{\text{inter}}^2 = (MQ_{\text{inter}} - S_{\text{intra}}^2) / K$$

Onde,

MQ_{inter} = Média quadrática interpessoal

K = número de dias de aplicação de inquérito alimentar

Em seguida, calculou-se a variância total (S_{obs}) da distribuição observada, que é dada pela diferença das variâncias intra e interpessoal:

$$S_{\text{obs}} = S_{\text{inter}}^2 - S_{\text{intra}}^2/K$$

Onde,

S_{obs} = variância total

S_{intra} = variância intrapessoal

S_{inter} = variância interpessoal

Posteriormente, para remover a variância intrapessoal, utilizou-se a equação proposta pelo US National Academy of Science Subcommittee on Criteria for Dietary Evaluation:

$$\text{Valor ajustado do nutriente} = \text{média} + (x_1 - \text{média}) \times S_{inter} / S_{obs}$$

Onde:

Média = valor médio de ingestão do grupo

x_1 = valor de ingestão de cada indivíduo

Utilizando a fórmula acima foi feita a distribuição do zinco ajustado do grupo, com redução do desvio padrão. A EAR utilizada foi de 6,8 mg/dia para as mulheres na faixa etária entre 19 e 70 anos (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Estado Nutricional das Participantes

Os resultados referentes à idade e aos parâmetros antropométricos utilizados na avaliação do estado nutricional das pacientes com câncer de mama e do grupo controle estão apresentados na tabela 1. Foram encontradas diferenças estatísticas em relação à idade e estatura ($p < 0,05$).

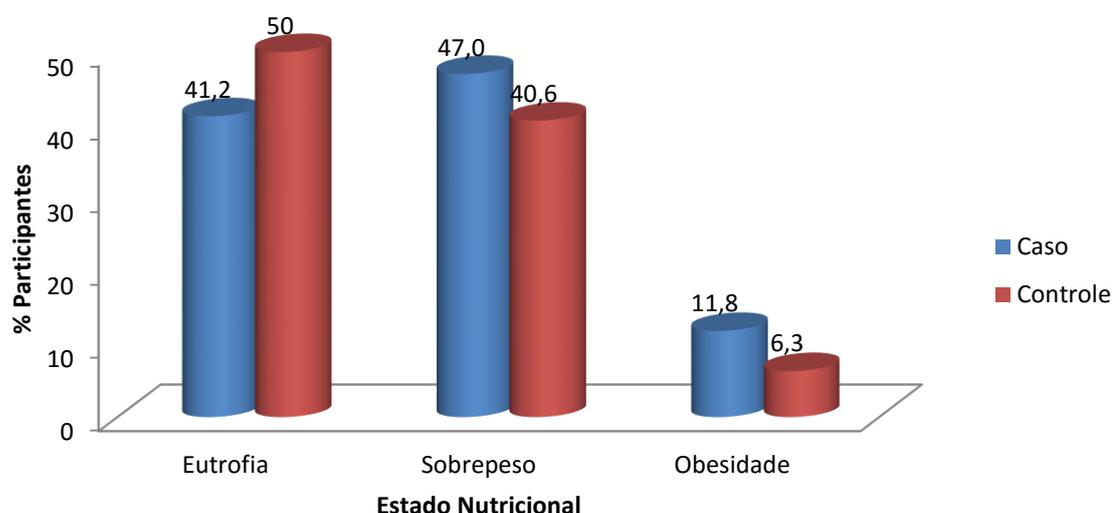
Tabela 1 - Valores médios e desvios padrão da idade, peso corporal, estatura, índice de massa corpórea e circunferência da cintura das pacientes com câncer de mama e do grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014.

Parâmetros	Grupo caso	Grupo controle	p
	(n=34)	(n=32)	
	Média ± DP	Média ± DP	
Idade (anos)	40,91 ± 5,98	36,41 ± 7,23*	0,008
Peso (kg)	62,90 ± 13,40	63,32 ± 10,09	0,885
Estatura (cm)	1,55 ± 0,06	1,59 ± 0,06*	0,017
IMC (kg/m ²)	26,17 ± 4,91	25,20 ± 4,16	0,388
CC (cm)	83,62 ± 10,83	80,24 ± 9,97	0,192

*Valores significativamente diferentes entre as mulheres com câncer de mama e controle. Teste *t de Student* ($p < 0,05$). IMC = Índice de Massa Corporal; DP = desvio padrão; CC = circunferência da cintura.

A figura 2 apresenta a distribuição das participantes, segundo o grupo e estado nutricional.

Figura 2 - Distribuição das participantes do estudo, segundo o grupo e estado nutricional. Teresina-PI, Brasil, 2014.



5.2 Consumo alimentar

Os resultados da análise das dietas consumidas pelas pacientes com câncer de mama e grupo controle estão descritos na tabela 2. Houve diferença estatística significativa no consumo alimentar das pacientes e grupo controle em relação à energia e proteína.

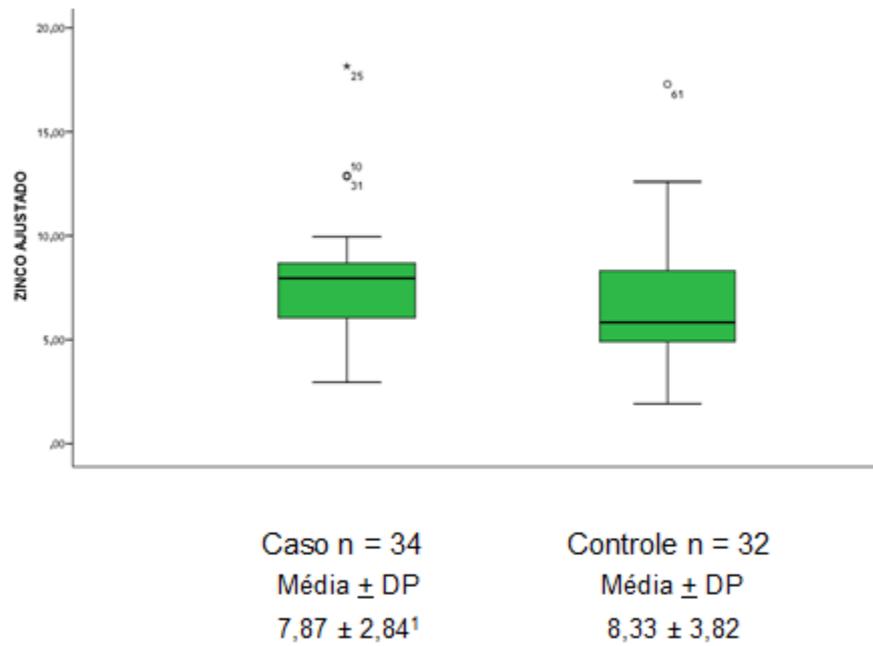
Tabela 2 - Valores médios e desvios padrão da contribuição energética dos nutrientes presentes nas dietas ingeridas pelas pacientes com câncer de mama e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014.

Energia/Nutrientes	Grupo caso	Grupo controle	P
	(n=34)	(n=32)	
	Média ± DP	Média ± DP	
Energia (Kcal)	1420,20 ± 437,12	2064,41 ± 536,17*	0,000
Carboidrato (%)	55,51 ± 7,34	53,60 ± 9,35	0,358
Proteína (%)	23,90 ± 8,72	19,55 ± 8,38*	0,043
Lipídio (%)	25,70 ± 4,63	26,16 ± 6,84	0,745
Zinco (mg/dia)	7,87 ± 2,84 ¹	8,33 ± 3,82	0,585

*Valores significativamente diferentes entre as mulheres com câncer de mama e controle. Teste *t de Student* ($p < 0,05$). 1 – Os valores brutos de zinco do grupo caso foram ajustados pela energia e corrigidos pela variância intra e interpessoal; DP = desvio padrão; Valores de referência: 10 a 35% de proteína, 20 a 35% de lipídio e 45 a 65% de carboidratos (IOM, 2005); e EAR = 6,8 mgZn/dia, faixa etária entre 19 e 70 anos para o sexo feminino (IOM, 2001).

A figura 3 apresenta a ingestão dietética de zinco das pacientes com câncer de mama e do grupo controle.

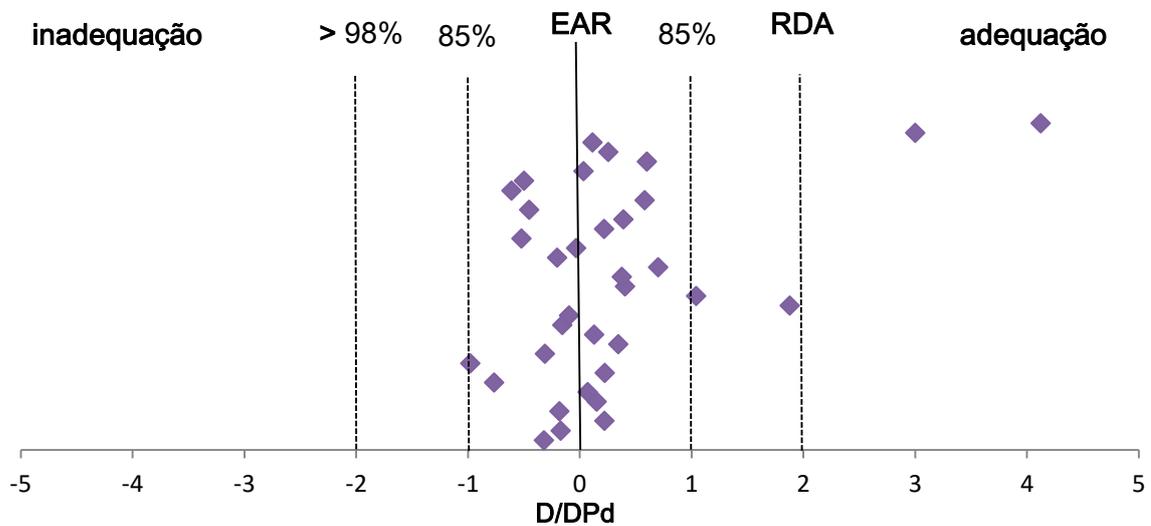
Figura 3 – Ingestão dietética de zinco das pacientes com câncer de mama e do grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014.



Teste *t de Student* ($p < 0,05$). 1 - Valores brutos de zinco do grupo caso foram ajustados pela energia e corrigidos pela variância intra e interpessoal; DP = desvio padrão; Recomendações segundo IOM (2001), EAR para micronutrientes na faixa etária de 19 a 70 anos para o sexo feminino.

A figura 4 apresenta a ingestão dietética de zinco por indivíduo das pacientes com câncer de mama.

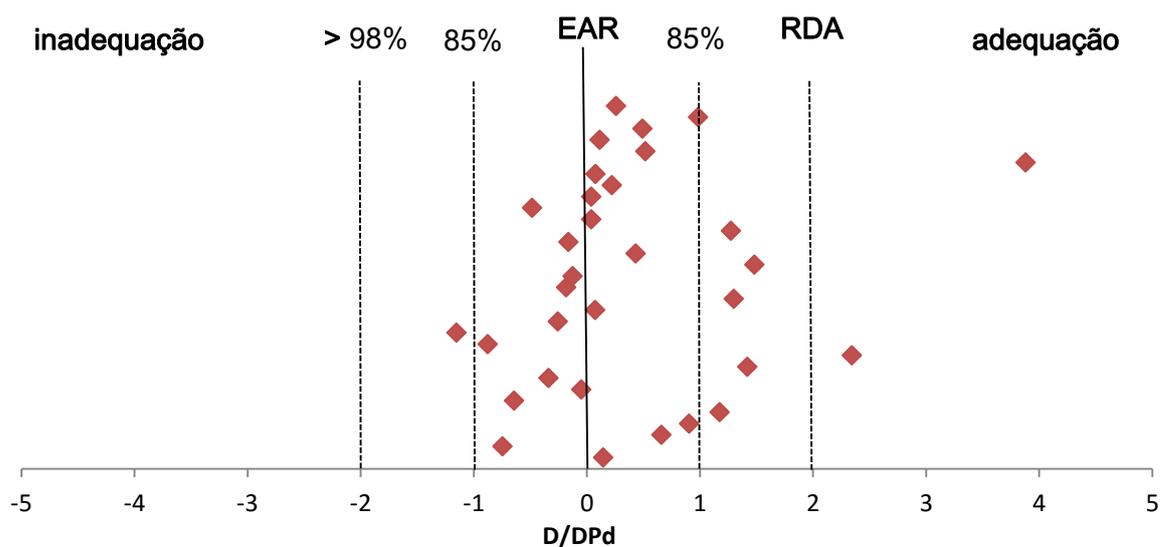
Figura 4 – Ingestão dietética de zinco por indivíduos das pacientes com câncer de mama. Teresina-Pi, Brasil, 2014.



EAR: valor médio estimado para suprir a necessidade de 50% dos indivíduos saudáveis. RDA: recomendação média estimada para suprir a necessidade de 97% a 98% os indivíduos. D/DPd: diferença (D) entre a ingestão observada e a EAR (ingestão – EAR)/ desvio padrão (DP) da diferença.

A figura 5 apresenta a ingestão dietética de zinco por indivíduo do grupo controle.

Figura 5 – Ingestão dietética de zinco por indivíduos do grupo controle. Teresina-Pi, Brasil, 2014.



EAR: valor médio estimado para suprir a necessidade de 50% dos indivíduos saudáveis. RDA: recomendação média estimada para suprir a necessidade de 97% a 98% os indivíduos. D/DPd: diferença (D) entre a ingestão observada e a EAR (ingestão – EAR)/ desvio padrão (DP) da diferença.

5.3 Parâmetros Bioquímicos de Avaliação do Zinco

Na tabela 3 encontram-se os valores médios obtidos das concentrações de zinco no plasma e nos eritrócitos das pacientes com câncer de mama e do grupo controle. Em relação às concentrações de zinco plasmático e eritrocitário, verifica-se que não houve diferença estatística.

Tabela 3 - Valores médios e desvios padrão das concentrações eritrocitárias e plasmáticas de zinco das pacientes com câncer de mama e do grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014.

Parâmetros	Grupo caso	Grupo controle	P
	(n=34) Média ± DP	(n=32) Média ± DP	
Zinco Plasmático (µg/dL)	60,45 ± 7,46	64,59 ± 10,07	0,065
Zinco Eritrocitário (µgZn/gHb)	37,51 ± 8,26	35,97 ± 5,57	0,383

Não houve diferença significativa entre as mulheres com câncer de mama e controle. Teste *t de Student* ($p < 0,05$). Valores de referência no plasma: 70-110 µg/dL (GIBSON, 2008); Valores de referência no eritrócito: 40 a 44 µg Zn/gHb (GUTHRIE; PICCIANO, 1994); DP = desvio padrão.

5.4 Parâmetros Bioquímicos de Avaliação da Enzima Superóxido Dismutase

Os valores médios e desvios padrão da atividade da enzima superóxido dismutase nos eritrócitos das pacientes com câncer de mama e do grupo controle estão na tabela 4. Verifica-se que houve diferença estatística significativa entre os dois grupos ($p < 0,05$), com concentrações elevadas nas mulheres com câncer de mama.

Tabela 4 - Valores médios e desvios padrão da atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária das pacientes com câncer de mama e do grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014.

Parâmetros	Grupo caso (n=34) Média ± DP	Grupo controle (n=32) Média ± DP	P
SOD (µgSOD/gHb)	8924,32 ± 3829,35	7170,14 ± 3132,32*	0,047

*Valores significativamente diferentes entre as mulheres com câncer de mama e controle. Teste *t de Student* ($p < 0,05$). Valores de referência da SOD: 6500-14500 µgSOD/gHb (ARMSTRONG, 1998); SOD= superóxido dismutase. DP = desvio padrão

5.5 Parâmetros Bioquímicos de Avaliação do Malondialdeído

Os valores médios e desvios padrão das concentrações plasmáticas do malondialdeído das pacientes com câncer de mama e do grupo controle estão na tabela 5.

Tabela 5 - Valores médios e desvios padrão das concentrações plasmáticas de malondialdeído das pacientes com câncer de mama e do grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014.

Parâmetros	Grupo caso (n=34) Média ± DP	Grupo Controle (n=32) Média ± DP	p
MDA (µmol/L)	5,02 ± 4,55	3,95 ± 1,85	0,212

Não houve diferença significativa entre as mulheres com câncer de mama e controle. Teste *t de Student* ($p < 0,05$). Valores de referências MDA: 1 a 3 µmol/L. MDA = malondialdeído; DP = desvio padrão

5.6 Correlação entre Parâmetros Bioquímicos do Zinco, Enzima Superóxido Dismutase e Malondialdeído

A tabela 6 mostra os resultados da análise de correlação entre os parâmetros bioquímicos de avaliação do zinco, superóxido dismutase e malondialdeído em pacientes com câncer de mama. Verificou-se que não houve

correlação significativa entre os parâmetros bioquímicos do zinco, enzima superóxido dismutase e malondialdeído em pacientes com câncer de mama.

Tabela 6 - Análise de correlação linear simples entre os parâmetros bioquímicos do zinco, enzima superóxido dismutase e malondialdeído em pacientes com câncer de mama. Teresina-PI, Brasil, 2014.

Parâmetros	Zn Plasmático		Zn Eritrocitário		Zn Dietético	
	(µg/ dL)		(µgZn/ gHb)		(g/dia)	
	R	p	r	p	r	p
SOD (µgSOD/gHb)	-0,260	0,137	-0,134	0,450	-0,139	0,435
MDA (µmol/L)	0,089	0,615	0,048	0,786	0,165	0,352

Correlação Linear de Pearson ($p < 0,05$). Zn = zinco; SOD = superóxido dismutase; MDA = malondialdeído.

A tabela 7 mostra os resultados da análise de correlação entre os parâmetros avaliados no grupo controle. Verificou-se que não houve correlação significativa entre os parâmetros bioquímicos, enzima superóxido dismutase e malondialdeído em pacientes do grupo controle.

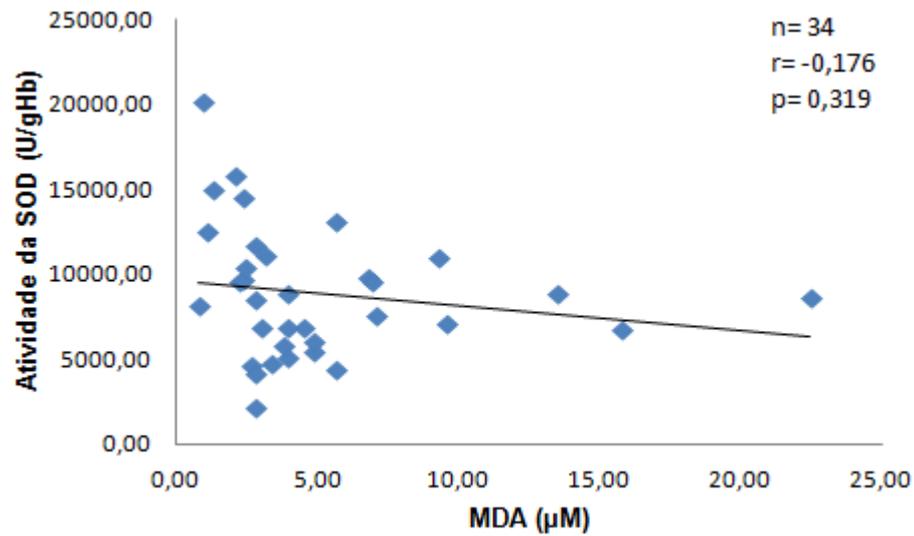
Tabela 7 - Análise de correlação linear simples entre os parâmetros bioquímicos do zinco, enzima superóxido dismutase e malondialdeído no grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2014.

Parâmetros	Zn Plasmático		Zn Eritrocitário		Zn Dietético	
	(µg/ dL)		(µgZn/ gHb)		(g/dia)	
	r	p	r	p	r	p
SOD (µgSOD/gHb)	-0,128	0,487	0,136	0,457	0,056	0,763
MDA (µmol/L)	0,109	0,554	-0,135	0,461	-0,107	0,560

Correlação Linear de Pearson ($p < 0,05$). Zn = zinco; SOD = superóxido dismutase; MDA = malondialdeído.

A figura 6 mostra o resultado da análise de correlação entre a enzima superóxido dismutase e o malondialdeído em pacientes com câncer de mama. Não foi verificada correlação estatística significativa entre a atividade da enzima e o marcador do estresse oxidativo nas pacientes com câncer de mama.

Figura 6 – Análise de correlação linear simples entre a enzima superóxido dismutase e o malondialdeído em pacientes com câncer de mama. Teresina – PI, Brasil, 2014.



Correlação Linear de Pearson ($p < 0,05$). SOD = superóxido dismutase; MDA = malondialdeído.

Discussão

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram determinados parâmetros bioquímicos relativos ao zinco, bem como foi investigada a existência de correlação entre essas variáveis e as concentrações da enzima superóxido dismutase e o malondialdeído em mulheres com câncer de mama.

Com relação aos resultados obtidos da avaliação do estado nutricional, pode-se observar que os valores médios do índice de massa corporal das pacientes com câncer de mama estavam elevados quando comparados ao grupo controle. Nesse sentido, deve-se destacar que o excesso de peso está associado positivamente com o risco para manifestação desse tipo de câncer tanto na pós-menopausa quanto na pré-menopausa (AZVOLINSKY, 2014). Associado a isso, o ganho de peso em mulheres com câncer de mama após o diagnóstico da doença é frequente, o que aumenta o risco de mortalidade e complicações nessas pacientes (CHEN et al., 2010; CAAN et al., 2012).

Nessa discussão, é importante destacar a relevante contribuição da gordura abdominal no desenvolvimento e evolução do câncer de mama (OLIVEIRA et al., 2014). Os resultados do presente estudo mostram que tanto as pacientes com câncer quanto o grupo controle estavam com valores da circunferência da cintura elevados. Sobre esse resultado, destaca-se a influência de alterações hormonais e de marcadores inflamatórios envolvidos na patogênese da neoplasia maligna. Assim, concentrações reduzidas de adiponectina e elevadas de proteína C reativa e do fator de crescimento semelhante à insulina -1 estão associadas com o risco para a manifestação dessa doença. Além disso, vale mencionar que a formação do tumor da mama também é influenciada pela hiperinsulinemia, característica do diabetes tipo 2 (GAUDET et al., 2013)

Quanto à ingestão de zinco pelas participantes desse estudo, verifica-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados, e que o consumo desse mineral estava superior à quantidade diária recomendada, segundo a *Estimated Average Requirement* (EAR). Sobre esse dado, é importante destacar que as dietas possuíam quantidades significativas de alimentos fonte desse nutriente e, além disso, foi observada elevada ingestão de proteína, por ambos os grupos, a qual é normalmente acompanhada de considerável conteúdo de zinco, como por exemplo, carne vermelha, fígado e peixe (DEVIRGILIIS, et al, 2007).

No que diz respeito às concentrações plasmáticas de zinco, estas encontravam-se reduzidas em relação aos valores de normalidade em ambos os grupos, sendo que não houve diferença estatística significativa. Nesse sentido, alguns fatores poderiam ter exercido influência sobre os valores encontrados de zinco no plasma das participantes desse estudo, como por exemplo, o teor desse mineral presente nas dietas ingeridas. No entanto, tanto a quantidade quanto a biodisponibilidade de zinco presente nesses alimentos estava elevada, o que parece não ter influenciado as suas concentrações plasmáticas.

Outro ponto importante que pode justificar as concentrações reduzidas de zinco no plasma, diz respeito às alterações na compartimentalização desse oligoelemento em pacientes com câncer de mama. Nessa abordagem, mediante a carcinogênese estabelecida, ocorreria uma redistribuição do zinco nessas pacientes, por meio do fluxo deste mineral do compartimento plasmático para o interior das células tumorais, e conseqüentemente, haveria redução da sua concentração neste compartimento (TINOCO-VERAS, 2009).

Nesta temática, deve-se destacar a participação de proteínas transportadoras de zinco, que exercem papel importante na distribuição desse mineral nos tecidos. Dessa forma, na presença de tumor da mama, ocorre hiperexpressão de genes codificantes dessas proteínas (Zip6, Zip7 e Zip10), que fazem o influxo de zinco para o interior das células tumorais e inibem transportadores transmembrana desse mineral para as demais células, o que predispõe às transformações malignas, sugerindo que as células tumorais aumentam seletivamente a absorção de zinco na doença (CHASAPIS, 2011; GRATTAN, FREAKE, 2012). Assim, o zinco plasmático reduzido está associado ao maior risco de desenvolvimento do câncer de mama, o que sugere ser este um fator prognóstico e terapêutico para doença.

Sobre os resultados do zinco eritrocitário, os valores médios encontrados desse parâmetro estavam reduzidos em ambos os grupos avaliados nesse estudo, também sem diferença estatística significativa. Vale ressaltar que na circulação, cerca de 80% do zinco está presente nos eritrócitos, principalmente ligado à anidrase carbônica, a apenas 16% se encontra no plasma (ALMEIDA, 2013). Numa análise global, em face da meia vida do eritrócito ser de 120 dias, o zinco eritrocitário torna-se um parâmetro do estado nutricional relativo a esse micronutriente de período mais longo, não refletindo mudanças recentes nas concentrações deste

mineral em um indivíduo, também não sendo influenciado pelo teor de zinco encontrado na dieta ingerida pelas pacientes avaliadas nesse estudo.

Com relação às concentrações eritrocitárias da enzima superóxido dismutase, pode-se verificar que essas estavam adequadas em ambos os grupos, sendo superior nas pacientes com câncer de mama, havendo diferença estatística significativa entre os grupos. Estes resultados corroboram os achados de Tas et al. (2005), Yeh et al. (2005), Rajnesh et al. (2008), que também encontraram valores elevados das concentrações dessa enzima em mulheres com câncer de mama.

Nessa perspectiva, deve-se ressaltar que o aumento da atividade do sistema de defesa antioxidante enzimático nas mulheres com câncer de mama parece ser resultado de um mecanismo de regulação compensatória que ocorre em resposta ao dano oxidativo presente nessas mulheres. Nesse sentido, as espécies reativas de oxigênio atuam estimulando a expressão de genes codificantes de enzimas que participam desse sistema, o que pode ter ocorrido entre as mulheres avaliadas nesse estudo.

Os resultados da análise da concentração do malondialdeído plasmático não revelam diferença estatística entre os grupos avaliados, embora os valores encontrados entre as pacientes com câncer de mama estivessem superiores. Dessa forma, é oportuno chamar atenção para o fato de que o excesso da produção de radicais livres pode causar danos oxidativos na membrana celular, resultando em peroxidação lipídica, mutagênese e, conseqüentemente, agrava o processo da carcinogênese presente nessas pacientes (TAS et al., 2005).

Outra hipótese que pode fundamentar o aumento da concentração plasmática do malondialdeído, diz respeito à presença do excesso de peso e da obesidade entre as pacientes com câncer de mama. Assim, vale mencionar que a presença da obesidade contribui para o aumento da respiração mitocondrial e consumo excessivo de oxigênio, o que favorece a produção de espécies reativas de oxigênio, como o ânio superóxido e o peróxido de hidrogênio. O segundo mecanismo por meio do qual o sobrepeso e a obesidade podem aumentar a peroxidação lipídica, se dar a partir da lesão celular progressiva e cumulativa devido à pressão induzida pela elevada massa corporal. A injúria celular, por sua vez, libera citocinas como o fator de necrose tumoral que gera espécies reativas de oxigênio (NEVES, 2010).

Outro aspecto importante nessa discussão é o fato de que apesar das pacientes com câncer de mama apresentarem consumo elevado de zinco, as concentrações plasmáticas de malondialdeído estavam mais elevadas entre essas pacientes quando comparadas ao grupo controle, o que pode indicar a incapacidade de atuação do zinco como componente do sistema de defesa antioxidante, provavelmente em função das concentrações reduzidas desse mineral nos componentes sanguíneos avaliados.

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, pode-se pressupor que as concentrações de zinco reduzidas encontradas nas mulheres com câncer de mama, tanto no plasma quanto nos eritrócitos, podem ser decorrentes do aumento da expressão de genes codificantes de proteínas que fazem influxo de zinco para o tecido tumoral, o que pode justificar as alterações verificadas nos parâmetros analisados.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

- As mulheres com câncer de mama participantes desse estudo ingerem teor dietético de zinco superior à quantidade diária recomendada.
- Os parâmetros bioquímicos do zinco nas mulheres com câncer de mama mostram concentrações reduzidas do mineral no plasma e nos eritrócitos, quando comparado ao grupo controle.
- A atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária e as concentrações plasmáticas do malondialdeído estão adequadas em ambos os grupos, no entanto a atividade da enzima foi significativamente superior nas mulheres com câncer.
- O estudo não demonstra influência do zinco sobre a atividade da enzima superóxido dismutase e as concentrações plasmáticas do malondialdeído nas mulheres com câncer de mama, pois a análise de correlação não revela diferença estatística significativa.

A partir dos resultados desse estudo, pode-se pressupor que a ingestão de zinco pelas mulheres com câncer de mama não influencia as concentrações plasmáticas e eritrocitárias desse mineral. A atividade da enzima superóxido dismutase elevada nas mulheres com câncer de mama pode ser decorrente de um mecanismo de regulação compensatório mediante o estresse oxidativo presente no câncer de mama.

Referências

REFERÊNCIAS

- ADAM, V. et al. Zeptomole electrochemical detection of metallothioneins. *PloS One*, San Francisco, v. 5, n. 7, p. 1-8, 2010.
- ADZERSEN, K. H. et al. Raw and cooked vegetables, fruits, selected micronutrients, and breast cancer risk: a casecontrol study in Germany. *Nutr Cancer*, United States, v. 46, n. 2, p. 131-137, 2003.
- AL-QALLAF, B.; SORKHOU, I.; SARKHOU, N. Breast cancer among ever married kuwaiti women reproductive, menstrual and menopausal factors. *Bull Alex Fac Med*, Mansoura, v. 43, n. 3, p. 1-10, 2007.
- ALMEIDA, I. S. *Avaliação do estado nutricional de mulheres obesas em relação ao zinco e sua associação com o estresse oxidativo e os polimorfismos Arg213Gln e +35A/C*. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, v. 51, n. 4, p. 325-330, 2005.
- ANÇÃO, M. S. et al. *Programa de apoio à nutrição Nutwin: versão 1.5*. São Paulo. Departamento de Informática em Saúde, SPDM, UNIFESP/EPM, 2002. 1CD-ROM.
- ANDRADE, L. S.; MARREIRO, D. N. Aspectos sobre a relação entre exercício físico, estresse oxidativo e zinco. *Rev Nutr*, Campinas, v. 24, n. 4, p. 629-640, 2011.
- ARIAS, A. R. L.; SANTOS, V. G. Metalotioneína: processos celulares e moleculares. *Caderno de Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 16, n. 4, p. 701-716, 2008.
- ARMSTRONG, D. Free Radical and Antioxidant Protocols. *Humana Press*, New Jersey, 1998, vol. 108.
- AYDEMIR, T.B.; SITREN, H.S.; COUSINS, R.J. The zinc transporter Zip14 influences c-Met phosphorylation and hepatocyte proliferation during liver regeneration in mice. *Gastroenterology*, USA, v. 142, n. 7, p. 1536-1546, 2012.
- AZVOLINSKY, A. Cancer Risk: The Fat Tissue–BMI–Obesity Connection. *J Natl Cancer Inst*, United States, v. 104, n. 4, p. 1-3, 2014.
- AZZIZ, Y. B. H. *O papel do cobre, ferro e zinco na doença de Parkinson*. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto.
- BAHAR, M. et al, Exogenous coenzyme Q10 modulates MMP-2 activity in MCF-7 cell line as a breast cancer cellular model. *Nutr J*, London, v. 9, n. 62, p. 1-8, 2010.

- BARBIERI, E.; SESTILI, P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *Journal of Signal Transduction*, London, v. 2012, p. 1-17, 2011.
- BASIOTIS, P. P. et al. Number of day of food intake records required to estimate individual and group nutrient intakes with defined confidence. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 117, n. 9, p. 1638-1641, 1987.
- BATISTA, L. M. B. B. *Determinação de zinco, da proteína C reativa e da expressão de genes codificantes de proteínas transportadoras de zinco e metalotioneína em pacientes hemodialisados*. 2009. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Saúde) – Universidade Federal do Piauí-UFPI, Teresina.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Resolução nº466/12*. Conselho Nacional de Pesquisa com Seres Humanos. Diário Oficial da União. Brasília, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Vigilância alimentar e nutricional - Sisvan: Orientações básicas para a coleta, processamento, análise de dados e informação em serviços de saúde*. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.
- BOBROWSHA-KORCZAK, B.; SKRAJNOWSKA, D.; BOBROWSHA-KORCZAK, A. T. The effect of dietary zinc - and polyphenols intake on DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats. *J Biomed Sci*, New York, v.19, n.43, p. 1-9, 2012.
- BURINI, C. H. P. *Caracterização clínica, citopatológica e bioquímica do câncer mamário de cadelas sem raça definida*. 2002. 164 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu.
- CAAN, B. J. et al. Pre-diagnosis body mass index, post-diagnosis weight change, and prognosis among women with early stage breast cancer. *Cancer Causes Control*, Netherlands, v 19, .10, p. 1319-1328, 2008.
- CAI, Q. et al. Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene, antioxidant intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Res*, London, v. 6, n. 6, p. 647-655, 2004.
- CHASAPIS, C.T. et al. Zinc and human health: An update. *Arch. Toxicol*, Germany, v. 86, n. 4, p. 521–534, 2011.
- CHEN, X. et al. Obesity and weight change in relation to breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat*, Netherlands, v. 122, n. 3, p. 823-833, 2010.
- CORDEIRO, M. B. *Adequação alimentar do estado nutricional em relação do zinco em grupos de idosos de São Paulo*. 120 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- COUSINS, R. J.; LIUZZI, J. P.; LICHTEN, L. A. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem*, Baltimore, v.281, n.34, p.24085-24089, 2006.

- CUI, Y. et al. Levels of zinc, selenium, calcium, and iron in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* Philadelphia, v. 16, n. 8, p. 1682–1685, 2007.
- DEVIRGILIIS, C. et al. Zinc fluxes and zinc transporter genes in chronic diseases. *Mutat Res*, Amsterdam, v. 622, n.1-2, p. 84-93, 2007.
- DHAWAN, D. K.; CHADHA, V. D. Zinc: a promising agent in dietary chemoprevention of cancer. *Indian J Med Res*, New Delhi, v. 132, n. 6, p. 676-682, 2010.
- DUTRA, R. L. et al. Determinação de zinco e soro sanguíneo pelo método de FAAS e sua correlação com o estado oxidativo. *Saúde Rev*, Piracicaba, v. 6, n. 14, p. 31-37, 2004.
- FAVALORO, B. et al. Role of Apoptosis in disease. *Aging*, New York, v. 4, n. 5, p. 330-349, 2012.
- FEITOSA, M.C.P. et al. Concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF- α e sua relação com a zincemia em mulheres obesas. *Rev Assoc Med Bras*, São Paulo, v. 59, n 5, p. 429-434. 2013.
- FERREIRA, C. S. et al. Metalonina: modulador de morte celular. *Rev Assoc Med Bras*, São Paulo, v. 56, n. 6, p. 715-718, 2010.
- FILGUEIRAS, M. S. T. et al. Avaliação psicossomática no câncer de mama: proposta de articulação entre os níveis individual e familiar. *Estudos de Psicologia*, Campinas, v. 24, n. 4, p. 551-560, 2007.
- FISBERG, R. M.; MARCHIONI, D. M. L.; SLATER, B.; MARTINI, L. A. Inquéritos alimentares: Métodos e Bases Científicas. São Paulo: *Manole*, 2005.
- GAUDET, M. M. et al. Obesity-related markers and breast cancer in CPS-II Nutrition Cohort. *Int J Mol Epidemiol Genet*, United States, v. 4, n. 3, p. 156-166, 2013.
- GIBSON, R. S. et al. Indicators of zinc status at the population level: a review of the evidence. *Br J Nutr*, New York, v.99, suppl. 3, p. 14S-23S, 2008.
- GOMULKIEWICZ, A. et al. Correlation between metallothionein (MT) expression and selected prognostic factors in ductal breast cancers. *Folia Histochem Cytobiol*, Warszawa, v. 48, n. 2, p. 242-248, 2010.
- GOSWAMI, B. et al. Breast cancer: interaction between oxidant-antioxidant dynamics and inflammation in Indian females. *Cancer Biomark*, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 95-103, 2010.
- GRANT, W. B. An ecological study of cancer mortality rates including indices for dietary iron and zinc. *Anticancer Res*, Greece, v. 28, n. 3B, p. 1955-1954, 2008.

- GRATTAN, B. J, FREAKE, H. C. Zinc and cancer: implications for LIV-1 in breast cancer. *Nutrients*, Switzerland, v. 4, n. 7, p. 648-675, 2012.
- GUMULEC, J. et al. Insight to physiology and pathology of zinc(II) ions and their actions in breast and prostate carcinoma. *Curr Med Chem*, Netherlands, v. 18, n. 33, p. 5041-5051, 2011.
- GUTHRIE, H. A.; PICCIANO, M. F. Micronutrient minerals. In: GUTHRIE, H. A.; PICCIANO, M. F. *Human nutrition*. New York: Mosby; 1994. p. 351-357.
- HAMBIDGE, M. Biomarkers of trace mineral intake and status. *J Nutr*, Philadelphia v. 133, suppl 3, p. 948S-955S, 2003.
- HO, E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J Nutr Biochem*, United States, v. 15, n. 10, p. 572-578, 2004.
- HÖNSCHEID, A.; RINK, L.; HAASE, H. T-lymphocytes: a target for stimulatory and inhibitory effects of zinc ions. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, Saif Zone, v. 9, n. 2, p. 132-144, 2009.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Tabelas de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil*. Rio de Janeiro, 2011.
- INSTITUTE OF MEDICINE. *Dietary Reference Intakes for Energy Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acid*. Washington, DC: National Academies Press, 2005.
- INSTITUTE OF MEDICINE. *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, cooper, iodine, iron, manganese, molybdenun, nickel, silicon, vanadium, and zinc*. National Academy, Washington, DC, 2001, 650p.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3. ed. São Paulo, 1985. v.1, p. 1:533.
- INUMARU, L. E.; SILVEIRA, E. A.; NAVES, M. M. V. Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. *Cad Saúde Pública*, São Paulo, v.27, n.7, p. 1259-1270, 2011.
- JAIME, P. C.; LATORRE, M. R. D. O.; FORNÉS, N. S.; ZERBINI, C. A. F. Comparative study among two methods for energy adjustment for nutrient intake. *Nutrire*, São Paulo, v. 26, n. único, p. 11-18, 2003.
- KAGARA, N. et al. Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cells. *Cancer Sci*, Tokyo, v. 98, n. 5, p. 692-697, 2007.
- KAMBE, T. An overview of a wide range of functions of ZnT and Zip zinc transporters in the secretory pathway. *Biosci Biotechnol Biochem*, England, v. 75, n. 6, p. 1036-1046, 2011.

- KASAPOVIC, J. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. *Cell Biochem Funct*, Oxford, v. 26, n. 6, p. 723-730, 2008.
- KASAPOVIC, J. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages after chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. *Clin Biochem*, Toronto, v. 43, n. 16-17, p. 1287-1293, 2010.
- KELLEHER, S. L.; SEO, Y. A.; LOPEZ, V. Mammary gland zinc metabolism: regulation and dysregulation. *Genes Nutr*, New Orleans, v. 4, n. 2, p. 83–94, 2009.
- KELLEHER, S. L. et al. Zinc in specialized secretory tissues: roles in the pancreas, prostate, and mammary gland. *Adv. Nutr*, Bethesda, v. 2, n. 2, p. 101–111, 2011.
- KHANZODE, S. S. et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different stages of breast cancer. *Free Radic Res*, Yverdon, v. 38, n. 1, p. 81-85, 2004.
- KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharm Toxicol*, USA, v. 44, p. 239-267, 2004.
- KLINGELHOEFFER, C. et al. Natural resistance to ascorbic acid induced oxidative stress is mainly mediated by catalase activity in human cancer cells and catalase-silencing sensitizes to oxidative stress. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, London, v. 12, n. 61, p. 1-10, 2012.
- KUO, H. W. A. et al. Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biol. Trace Elem. Res*, London, v. 89, n. 1, p. 1-11, 2002.
- LAI, Y.; Y. I. P., G. W.; BAY, B. H. Targeting metallothionein for prognosis and treatment of breast cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, Saif Zone, v. 6, n. 2, p. 178-185, 2011.
- LEMOS, A. R. *Caracterização físico-química, bioquímica e avaliação da atividade antioxidante em genótipos de urucueiros (*Bixa orellana* L.)*. 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Salvador.
- LESPERANCE, M. L. et al. Mega-dose vitamins and minerals in the treatment of non-metastatic breast cancer: an historical cohort study. *Breast Cancer Res Treat*, Netherlands, v. 76, n. 2, p. 137-143, 2002.
- LEE, R. et al. Zinc accumulation in *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced rat mammary tumors is accompanied by an altered expression of ZnT-1 and metallothionein. *Exp Biol Med (Maywood)*, Maywood, v. 228, n. 6, p. 689-696, 2003.
- LIUZZI, J. P. et al. Responsive transporter genes within the murine intestinal-pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, Washington, v. 101, n.40, p. 14355-14360, 2004.

- MA, X. et al. No association between SOD2 Val16Ala polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis based on 9,710 cases and 11,041 controls. *Breast Cancer Res Treat*, Boston, v. 122, n. 2, p. 509-514, 2010.
- MANNELLO, F. What does matrix metalloproteinase-1 expression in patients with breast cancer really tell us? *BMC Med*, London, v. 9, n. 95, p. 1-7, 2011.
- MARIA, R. M. *Análise do ácido linoleico conjugado em carne bovina por RMN*. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo – Instituto de Química de São Carlos, São Carlos.
- MARQUES, R. C.; MARREIRO, D. N. Aspectos metabólicos do zinco na síndrome de Down. *Rev Nutr*, Campinas, v. 19, n.4, p. 501-510, 2006.
- MEMON, U. A. Evaluation of zinc status in whole blood and scalp hair of female cancer patients. *Clin Chim Acta*, Amsterdam, v. 379, n. 1-2, p. 66-70, 2007.
- MEUNIER, N. et al. Importance of zinc in the elderly: The ZENITH study. *Eur J Clin Nutr*, London, v. 59, suppl 2, p. 1S-4S, 2005.
- MIAO, X. et al. Zinc homeostasis in the metabolic syndrome and diabetes. *Front Med*, China, v. 7, n. 1, p. 31-52, 2013.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2012. Disponível em <http://www.inca.gov.br/conteudo>. Acesso em: 22 maio 2012.
- NAKAHATA, A. M. et al. Qual é a importância das peptidases em câncer? *Einstein*, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 237-242, 2009.
- NEVES, C. F. *Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo e estado inflamatório em pacientes no pré e pós-operatório de cirurgia da obesidade*. 2010. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Universidade de Brasília, Brasília.
- NEVES, J. P. *Influência dos efeitos adversos do tratamento de quimioterapia em portadores de câncer de mama*. 2011. 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade do Clube Náutico Mogiano, Mogi das Cruzes.
- NICOLSON, G. L.; CONKLIN, K.A. Reversing mitochondrial dysfunction, fatigue and the adverse effects of chemotherapy of metastatic disease by Molecular Replacement Therapy. *Clin Exp Metastasis*, London, v. 25, n. 2, p. 161-169, 2008.
- NICOLSON, G. L.; SETTINERI, R. Lipid replacement therapy: a functional food approach with new formulations for reducing cellular oxidative damage, cancer-associated fatigue and the adverse effects of cancer therapy. *Functional Foods in Health and Disease*, USA, v. 4, p. 135-160, 2011.
- NISSEN, S. B. et al. Intake of vitamins A, C, and E from diet and supplements and breast cancer in postmenopausal women. *Cancer Causes Control*, Oxford, v. 14, n. 8, p. 695-704, 2003.

- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, Orlando, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.
- OLDENBURG, R. A. et al. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? *Crit Rev Oncol Hematol*, Boca Raton, v. 63, n. 2, p. 125-149, 2007.
- OLIVEIRA, A. R.; SCHNEIDER, C. D. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento. *Rev Bras Med Esporte*, Porto Alegre; v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.
- OLIVEIRA et al. Avaliação nutricional de pacientes com câncer de mama atendidas no Serviço de Mastologia do Hospital das Clínicas, Belo Horizonte (MG), Brasil. *Ciênc saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p. 1573-1580, 2014.
- OLIVEIRA, S. F. V. *Análise de perda de heterozigose no braço curto do cromossomo 9 (9p) em pacientes com carcinomas primários de mama*. 2009. 147 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- OTEIZA, P. I. Zinc and the modulation of redox homeostasis. *Free Radic Biol Med*, United States, v. 53, n. 9, p. 1748-1759, 2012.
- PAN, S. Y.; ZHOU, J.; GIBBONS, L.; MORRISON, H.; WEN, S. W. Antioxidants and breast cancer risk- a population based case-control study in Canada. *BMC Cancer*, London, v. 1, n. 372, p. 1-12, 2011.
- PEDERSEN, M. Ø. et al. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog Histochem Cytochem*, Stuttgart, v. 44, n. 1, p. 29-64, 2009.
- PHAM, T. M. et al. Relationship between serum levels of superoxide dismutase activity and subsequent risk of lung cancer mortality: findings from a nested case-control study within the japan. *Asian Pac J Cancer Prev*, Bangkok, v. 10, suplem. 75-79, 2009.
- PRABASHEELA, B. et al. Association between Antioxidant Enzymes and Breast Cancer. *Rec Res Sci Tech*, India, v. 3, n. 11, p. 93-95, 2011.
- RAJNEESH, C. P. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. *Singapore Med J*, Singapore, v. 49, n. 8, p. 640-643, 2008.
- RAY, G. N., SHAHID, M., HUSAIN. S. A. Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast cancer. *Clin. Biochem*, Toronto, v. 34, n. 1, p. 71-76, 2001.
- RODRIGUEZ, M. P. et al. A simpler method for the determination of zinc human plasma levels by flame atomic absorption spectrophotometry. *At. Spectrosc*, Norwalk, v.10, n.2, p. 68-70, 1989.
- ROODBEEN, R.; HEST, J.C.M. Synthetic cells and organelles: compartmentalization strategies. *Bio essays*, United States, v. 31, n. 12, p. 1299-1308, 2009.

- SANCAK, B. et al. Association between oxidative stress and selenium levels in patients with breast cancer at different clinical stages. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, New York, v. 16, 2003.
- SANTOS, H. S.; SOUZA CRUZ, E.M. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. *Rev Bras Cancerologia*, Rio de Janeiro; v. 47, n. 3, p. 303-08, 2001.
- SEKLER, I. et al. Mechanism and Regulation of cellular Zinc Transport. *Mol Med*, Cambridge, v. 13, n. 7-8, p. 337-343, 2007.
- SENER, E. D. et al. Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. *Cell Biochem Funct*, Guildford, v. 25, n. 4, p. 377-82, 2007.
- SINHA, R. J.; SINGH, R.; MEHROTRA, S.; SINGH, R. K. Implications of free radicals and antioxidant levels in carcinoma of the breast: a never-ending battle for survival. *Indian J Cancer*, Bombay, v. 46, n. 2, p. 146-150, 2009.
- SINGH, G.; MAULIK, S. K.; JAISWAL, A.; KUMAR, P.; PARSHAD, R. Effect on antioxidant levels in patients of breast carcinoma during neoadjuvant chemotherapy and mastectomy. *Malaysian J MedSci*, Malaysia, v. 17, n. 2, p. 24-28, 2010.
- SLATER, B.; MARCHIONI, D. L.; FISBERG, R. M. Estimando a prevalência da ingestão inadequada de nutrientes. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 599-605, 2004.
- TABELA Brasileira de Composição de Alimentos - TACO. 2.ed. 2006. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nepa/taco/>>.
- TAS, F. et al. Oxidative stress in breast cancer. *Med Oncol*, Northwood, v. 22, n. 1, p.11-15, 2005.
- TAYLOR, K. M.; KILLE, P.; HOGSTRAND, C. Protein kinase CK2 opens the gate for zinc signaling. *Cell Cycle*, Austin, v. 11, n. 10, p. 1863-1864, 2012.
- TERRY, P. et al. Dietary carotenoids and risk of breast cancer. *Am J Clin Nutr*, Bethesda, v. 76, n. 4, p. 883-888, 2002.
- THIRUMOORTHY et al. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol*, England, v. 9, n. 54, p. 1-7, 2011.
- TINOCO-VERAS, C. M. et al. Analysis of plasma and erythrocyte zinc levels in premenopausal women with breast câncer. *Nutr Hosp*, Madrid, v. 26, n. 2, p. 293-297, 2011.
- TRUONG-TRAN. A. Q.; HO, L. H.; CHAIN, F.; ZALEWSKI, P. D. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. *J Nutr*, Philadelphia, v. 130, n. 5S Suppl, p. 1459-1466, 2000.

- VAN ASSENDELFT, O. W.; The measurement of hemoglobin. In: IZAK, G.; LEWIS, S.M. eds. *Modern concepts in hematology*. New York: Academic press, 1972. p. 14-25.
- VIEIRA, F. G. K. *Características sócio-demográficas, reprodutivas, clínicas, nutricionais e de estresse oxidativo de mulheres com câncer de mama*. 2008. 132 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- VIZOSO, F. J. et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer*, London, v. 96, n. 6, p. 903-911, 2007.
- WEST-WRIGHT, C. N. et al. Longterm and recent recreational physical activity and survival after breast cancer: the California Teachers Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, Philadelphia, v. 18, n. 11, p. 2851-2859, 2009.
- WEYDERT, C. J. et al. Increased oxidative stress created by adenoviral MnSOD or CuZnSOD plus BCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea) inhibits breast cancer cell growth. *Free Radic Biol Med*, New York, v. 44, n. 5, p. 856-867. 2008.
- WHITEHOUSE, R. C. et al. Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. *Clin Chem*, Baltimore, n.3, v. 28, p. 475-480, 1982.
- WILLETT, W.; STAMPFER, M. J. Total energy intake: implications for epidemiologic analyses. *American Journal of Epidemiology*, Baltimore, v. 124, n. 1, p. 17-27, 1986.
- WILLETT, W. C.; HOWE, G. R.; KUSHI, L. H. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 65, suppl4, p.1220-1228, 1997
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. *Technical report series*, n.894, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Waist Circumference and Waist-Hip Ratio: Report of a WHO Expert Consultation*. Geneva, 2008.
- YAP, X. et al. Over-expression of metallothionein predicts chemoresistance in breast cancer. *J Pathol*. London, v. 217, n. 4, p. 563-570, 2009.
- YEH, C. C. et al. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clin Chim Acta*, Amsterdam, v. 361, n. 1-2, p. 104-111, 2005.
- ZHANG, R. et al. Expression of metallothionein in invasive ductal breast cancer in relation to prognosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, New York, v. 19, n. 1-2, p. 95-97, 2000.

Apêndices

APÊNDICE A - FICHA DE CADASTRO DAS PARTICIPANTES DA PESQUISA

IDENTIFICAÇÃO Nº Formulário: _____

Grupo: _____

Nome: _____ Data: ___/___/___

DN: ___/___/___ Idade: ___ anos idade da menarca: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____

Telefone: _____ Celular 1: _____ Celular 2: _____

Profissão: _____

HISTÓRIA CLÍNICA:

1. Apresenta alguma doença (diabetes, hipertensão, doença cardiovascular, etc.)
() Sim () Não
2. Se sua resposta sim, quais as doenças _____
3. Faz uso de alguma medicação: Sim () Não ()
4. Se sua resposta for sim quais os medicamentos _____
5. Uso de suplementos nutricionais: Sim () Não () Quais? _____
6. Diagnostico de câncer de mama positivo ou negativo: _____
7. Se positivo qual estágio da doença? _____
8. Tratamento para o câncer: Sim () Não ()
9. Fumante: Sim () Não ()

AValiação DO ESTADO NUTRICIONAL

	1ªMEDIDA	2ª MEDIDA	3ªMEDIDA	MEDIA
Peso (kg)				
Altura (cm)				
IMC (kg/m²)				
Circunferência da Cintura (cm)				

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Zinco plasmático (µg/dL): _____

Zinco eritrocitári (µgZn/gHb): _____

Malondialdeído (µmol/L): _____

Superóxido dismutase (µgSOD/gHb): _____

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), 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 está sendo conduzido pela Mestranda Camila Guedes Borges de Araujo, orientada pela Prof^a Dr^aDilina do Nascimento Marreiro. Após ser esclarecido (a) 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 penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí pelo telefone (086) 3237 2332. Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portella-Bairro Ininga – Teresina – PI. Cep.: 64049-550.

ESCLARECIMENTOS SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Zincemia, atividade da enzima superóxido dismutase e sua relação com marcador do estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama.

Pesquisador Responsável: Camila Guedes Borges de Araujo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dilina do Nascimento Marreiro.

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (086) 99765920

DESCRIBÃO DA PESQUISA

Esta pesquisa tem por objetivo: “Avaliar parâmetros bioquímicos relativos ao zinco e atividade da enzima superóxido dismutase e relacioná-los com marcadores do estresse oxidativo em pacientes com câncer de mama”. Para tanto o voluntário será submetido a coletas de sangue venoso para exames bioquímicos e análise de alterações metabólicas e avaliações do consumo alimentar por meio de registros alimentares.

Ao participar da pesquisa o voluntário não sofrerá nenhum prejuízo, poderá, no entanto sentir dor na coleta de sangue devido a picada da agulha e algum desconforto em vista da coleta do material biológico, e formação de hematoma, requerido para realização desta. O voluntário poderá apresentar desconforto em alguns questionamentos relacionados a sua alimentação e sobre sua história clínica, no entanto você não será obrigado a respondê-las caso não se sinta a vontade. Os participantes do estudo terão como benefícios, os resultados dos exames bioquímicos, bem como os dados sobre a composição corporal, que serão fornecidos após a realização dos mesmos. 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)3215 5734). Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe do estudo, Comitê de Ética independente e inspetores de agências regulamentadoras do governo (quando necessário) terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo.

O projeto terá duração de um ano, com término previsto para o primeiro semestre de 2014. O participante terá o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem que passe por qualquer tipo de constrangimento por parte do pesquisador.

Nome e assinatura do Pesquisador (a)

Camila Guedes Borges de Araujo

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____,
RG/CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo: “Zincemia, atividade da enzima superóxido dismutase e sua relação com marcador do estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama”, como sujeito. Tive pleno conhecimento das informações que li ou que foram lidas para mim. Ficaram claros para mim quais são 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 ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido.

Teresina: ___/___/___

Assinatura do responsável

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: _____

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato: Comitê de Ética em Pesquisa/UFPI - Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa - Bairro Ininga - CEP: 64.049-550 - Teresina - PI tel.: (86) 3237-2332- email: cep.ufpi@ufpi.br web: www.ufpi.br/cep

APÊNDICE C - REGISTRO ALIMENTAR

Registro diário de sua alimentação



Nome: _____

- ❖ 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:
 1. Colher – de chá, de sobremesa, de sopa, de servir ou concha
 2. Xícara – de chá ou de café
 3. Copo – grande ou de requeijão (americano)
 4. Prato de sobremesa
 5. Consumo mensal de óleo e sal da família: _____



A: Colher de servir; **B:** Colher de sopa; **C:** Colher de sobremesa; **D:** Colher de chá; **E:** Concha de servir **F:** Prato de sobremesa



Copo americano



G: Xícara cheia; **H:** Xícara nivelada; **I:** Xícara média

Anexos

ANEXO A-PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA/UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAUI - UFPI

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ZINCEMIA, ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE E SUA RELAÇÃO COM MARCADOR DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA

Pesquisador: Dilina do Nascimento Marrelo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15861213.2.0000.5214

Instituição Proponente: Universidade Federal do Piauí - UFPI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 534.747

Data da Relatoria: 19/02/2014

Apresentação do Projeto:

A neoplasia maligna da mama é uma propagação anormal de células, constituindo assim um acúmulo progressivo de mutações no material genético. A relação entre estresse oxidativo e câncer de mama tem sido bastante investigada e foi observado elevada concentração de espécies reativas de oxigênio, que torna susceptível dano oxidativo ao DNA mitocondrial, contribuindo de forma relevante para a carcinogênese. Estudos demonstraram a atividade da enzima superóxido dismutase aumenta em pacientes com câncer de mama. O zinco possui papel importante em vários processos biológicos, na inibição ou ativação de reações enzimáticas e na competição com outros elementos, alterando a permeabilidade das células, exercendo, portanto, ação direta ou indireta no processo carcinogênico. As reduzidas concentrações séricas de zinco aumentam as concentrações de peroxidação lipídica em membranas mitocondriais e microsossomais, e ainda a fragilidade osmótica de membranas de eritrócitos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar parâmetros bioquímicos de zinco e atividade da enzima superóxido dismutase e relacioná-los com marcadores do estresse oxidativo em pacientes com câncer de mama.

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portela
Bairro: Ininga SQ10 CEP: 64.049-550
UF: PI Município: TERESINA
Telefone: (85)3215-5734 Fax: (85)3215-5880 E-mail: csp.ufpi@ufpi.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAUÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 534.747

Objetivo Secundário: Verificar o consumo alimentar e a adequação da alimentação em relação à macronutrientes e ao mineral zinco; Determinar o Índice de massa corporal (IMC). Determinar a concentração de zinco plasmático e eritrocitário em pacientes com câncer de mama e comparar com o grupo controle; Determinar a atividade da enzima superóxido dismutase eritrocitária e a concentração do malondialdeído plasmático; Investigar a existência de relação entre a zincemia, atividade da enzima superóxido dismutase e o malondialdeído em mulheres com câncer de mama.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Poderá ocorrer desconforto em alguns questionamentos relacionados à sua alimentação e sobre a história clínica, e dor na coleta de sangue devido à picada da agulha. No TCLE consta que poderá formar hematoma.

Benefícios: Não haverá benefício direto para as pacientes, no entanto o estudo oferecerá maiores informações sobre o tema, buscando-se conhecer fatores que possam influenciar o prognóstico das pacientes com a doença, bem como a melhora da sua qualidade de vida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo será de natureza transversal, envolvendo 86 mulheres pré-menopáusicas na faixa etária de 25 a 50 anos. As pacientes serão distribuídas em 2 grupos: experimental (com câncer de mama, n= 43) e controle (sem câncer de mama, n= 43) que serão submetidas a uma entrevista, objetivando o esclarecimento do protocolo da pesquisa e consentimento para participar do projeto. A definição da amostra representativa das mulheres com câncer de mama que participarão do estudo foi baseada nos critérios de seleção e no número médio de pacientes atendidos anualmente no Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas (HGV)-Teresina/PI. O total de pacientes com câncer de mama atendido por ano nesse serviço é de 70 casos. Portanto, considerando as perdas da amostra pelos critérios de inclusão, aplicando-se uma margem de erro de 5%, Índice de confiança de 95% e prevalência de 7,5% da patologia em estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A proposta apresenta a documentação exigida pelo CEP. A coordenadora é docente da UFPI com experiência na temática evidenciada e se compromete cumprir os termos da resolução. No entanto, na Carta de Encaminhamento e na Declaração do Pesquisador consta a resolução antiga. A metodologia apresentada é consistente e descreve os procedimentos para realização da coleta e análise dos dados.

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portela
 Bairro: Ininga S/G10 CEP: 64.049-550
 UF: PI Município: TERESINA
 Telefone: (853)215-5734 Fax: (853)215-5880 E-mail: cep.ufpi@ufpi.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAUÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 534.747

Recomendações:

Como recomendações, solicita-se atualizar a Carta de Encaminhamento (colocando o nome do coordenador do CEP/UFPI, Prof. Dr. Aiclone Correa Alves) e a Declaração do Pesquisador, onde consta a resolução antiga e, nesta data, já existia a resolução nova, 466/2012.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendência

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

TERESINA, 19 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
Aiclone Corrêa Alves
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portela
Bairro: Ininga S/G10 CEP: 64.049-550
UF: PI Município: TERESINA
Telefone: (853)215-5734 Fax: (853)215-5880 E-mail: cep.ufpi@ufpi.br