



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

**ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO E DANO TECIDUAL
EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA APÓS A
RETIRADA DO TUMOR PRIMÁRIO**

ANA CRISTINA DA SILVA DO AMARAL HERRERA

LONDRINA, 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS PATOLÓGICAS

ANA CRISTINA DA SILVA DO AMARAL HERRERA

**ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO E DANO TECIDUAL EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA APÓS A RETIRADA DO
TUMOR PRIMÁRIO**

Defesa de Dissertação
apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Patologia
Experimental, da Universidade
Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini

LONDRINA-PARANÁ

2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alessandra Cecchini Armani

Prof. Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

Prof. Dr. Rubens Cecchini

APOIO FINANCEIRO

CAPES

SETI-PR

FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA

DEDICATÓRIA

Ao Paulo, meu marido e aos meus filhos, André e Sofia.

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial ao Paulo, meu esposo, pelo incentivo e apoio que sempre me deram, não medindo esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

À minha amiga Carolina Panis, que muito me ensinou durante a realização da minha pós-graduação.

Ao Professor Doutor Rubens Cecchini, meu orientador, um sincero agradecimento pela amizade e pela forma paciente e compreensiva com que me orientou na execução desta dissertação, e pela forma carinhosa como me recebeu no Laboratório de fisiopatologia de radicais livres e antioxidantes, Departamento de Ciências Biológicas(CCB) da Universidade Estadual de Londrina.

Á todos os professores da pós graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, especialmente à Prof. Dra. Maria Angélica Watanabe pela sua dedicação aos alunos.

Á todos os colegas do laboratório, que tanto me ajudaram e que eu não poderia nomear, pois todos foram muito importantes e seria injusto esquecer alguém.

Ao Prof. Dr. Décio, que gentilmente realizou os testes bioquímicos.

A todos os amigos e colegas que tive o prazer de conviver durante a pós-graduação.

Aos funcionários do setor de quimioterapia do Hospital de Câncer de Londrina, especialmente à Tamires, pelo apoio na execução deste projeto.

Aos técnicos do Laboratório CETEL, pela ajuda e paciência na coleta das amostras.

A todas as pacientes que concordaram em participar deste estudo mesmo em um momento difícil, visando diminuir o sofrimento da doença para as futuras gerações.

E finalmente aos membros desta banca por aceitar o convite.

RESUMO

Evidências do papel do estresse oxidativo na patogênese do câncer de mama têm sido acumulada ao longo dos anos, porém o dano tissular mantido pelo estresse oxidativo após a retirada do tumor primário não foi investigada. Este estudo permite uma nova discussão sobre o envolvimento de EROs na proliferação e progressão tumoral, resultando no aparecimento de novo tumor ou disseminação de metástases. Além disso, apesar do emprego de várias técnicas para investigar o perfil antioxidante, apenas os níveis de MDA foram avaliados como marcador pró-oxidante em pacientes com ressecção de tumor de mama. Para investigar a ocorrência de estresse oxidativo e dano tissular, este estudo avaliou o status pró-oxidante no sangue de pacientes após a retirada do tumor. A técnica de quimiluminescência de alta sensibilidade foi empregada para estimar os níveis de lipoperoxidação. Adicionalmente, a atividade da SOD e catalase, níveis de GSH e TRAP foram também avaliados. A técnica de Gree foi empregado para dosar níveis de óxido nítrico plasmático. Para analisar a função renal, hepática e cardíaca, foram utilizados kits comerciais. A caracterização das pacientes incluiu idade ao diagnóstico, classificação TNM, status hormonal e do oncogene Her-2/neu. Os grupos foram randomizados em grupo controle (n=14) e grupo câncer de mama (CA=14). Amostras de sangue foram coletadas, os eritrócitos separados e analisados no mesmo dia. Após a análise o plasma foi estocado a uma temperatura de -80° C. Nossos resultados revelaram alta emissão na quimiluminescência de eritrócitos e no plasma, indicando aumento do consumo antioxidante e elevados níveis de hidroperóxido comparados com o controle. Houve redução da SOD e GSH. A atividade da catalase, TRAP e óxido nítrico não apresentaram alterações significativas. A elevação plasmática nas taxas de ALT, AST e GGH

indicaram lesão hepática. O aumento de LDH acompanhado de diminuição das taxas de hemoglobina, contagem total de eritrócitos e do hematócrito, são característicos de dano na membrana eritrocitária. Estes achados indicam significativo aumento do estresse oxidativo acompanhado de lesão tissular, nas amostras de pacientes com câncer de mama, após a retirada do tumor.

ABSTRACT

Notwithstanding, evidence is accumulating for a role of the oxidative stress involvement in human breast cancer development, the experimental design that has been employed include only patients or animals bearing mammary tumor. The tissue toxicity and oxidative stress maintenance after tumor withdraw, were not investigated. These design open a new discussion related to oxidative stress as a mediator of proliferation and progression of initiated cells that in turn, may be responsible for new tumor appearance or metastatic disease development. Additionally, although antioxidant profile was investigated by different techniques, MDA levels have been the only pro oxidant marker employed in patients bearing breast tumor. To investigate the occurrence of oxidative stress and tissue damage, our study evaluated the pro-oxidant status in the blood of patients after tumor removal. The high sensitive chemiluminescence technique were employed to estimate the lipid hydroperoxide levels. Additionally, superoxide dismutase (SOD) and catalase activities, reduced glutathione levels (GSH) and plasma total antioxidant capacity (TRAP) were also evaluated. Gree's technique for plasma nitric oxide measurement was employed. Heart, liver and kidney damage were evaluated by commercial kits. Patients characterization included age at diagnosis, tumor-node-metastasis classification (TNM) and hormonal status. Groups were randomized in control group (n=14) and breast cancer group (BRCA, n=14). Blood samples were collected, erythrocytes separated and analysed in the same day. Plasma was sctocked in – 80°C until analysis. Our results revealed higher erythrocytes and plasma chemiluminescence emission indicating increased antioxidant consumption and elevated hydroperoxides levels related to control. Reduced GSH levels and SOD activity were observed. Catalase activity,

TRAP and nitrite concentration were not altered. The elevated plasma levels of ALT, AST and GGT indicated liver damage. The increased levels of LDH together low hemoglobin, erythrocytes and hematocrit indicated damage on erythrocytes membrane. These findings indicated significant increase in oxidative stress accompanied by tissue damage in samples from patients after tumor removal.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAP – 2,2' azobis

ALT – Alanina aminotransferase

AST - Aspartate aminotransferase

CA – Grupo câncer

CAT – Catalase

CK – Creatina quinase total

CKMB - Creatina quinase fração MB

CTR – Grupo controle

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

eNOS – NO endotelial

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FOE – Fragilidade osmótica eritrocitária

GGT – Gama glutamil transferase

GPx – Glutathiona peroxidase

GSH – Glutathiona reduzida

GSSG – Glutathiona oxidada

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HNO₂ – Ácido nitroso

HOCl – Ácido hipocloroso

IHC – Imunohistoquímica

iNOS - Óxido sintase induzível

LDH – Lactato desidrogenase

MDA - Malonildialdeído

NaCl – Cloreto de sódio

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida

NO* - Óxido nítrico

NO₂⁻ - Nitritos

NO₃ - Nitratos

N₂O₃ - Óxido Nitroso

OMS - Organização Mundial de Saúde

O₂ – Oxigênio

O₂⁻ - Radical superóxido

OH* - Hidroxila

ONOO⁻ - Peroxinitritos

RE – Receptor de estrógeno

RO* - Alcoxila

ROO* - Peroxila

RP – Receptor de progesterona

SOD – Superóxido dismutase

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TNM – Tumor, Nodes, Metastasis classification

TRAP – Capacidade antioxidante total plasmática

URL – Unidades relativas de luz

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Marcadores de lesão renal no plasma de pacientes dos grupos CTR e CA.....	30
Figura 2 – Marcadores de lesão hepática no plasma de pacientes dos grupos CTR e CA.....	31
Figura 3 - Marcadores de lesão cardíaca no plasma dos grupos CTR e CA.....	32
Figura 4 – Perfil hematológico dos grupos CTR e CA.....	34
Figura 5 – Lipoperoxidação de eritrócitos	35
Figura 6 – Avaliação de marcadores de estresse oxidativo no plasma dos grupos CTR e CA.....	36
Figura 7 – Níveis Nitrito.....	37
Figura 8 – Lipoperoxidação plasmática.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização clinicopatológica de pacientes portadoras de cancer de mama do Instituto do Cancer de Londrina avaliadas no período de janeiro a setembro de 2009.....	29
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	10
2.2 Objetivo Geral.....	10
2.3 Objetivo Específicos.....	10
3. Materiais e Métodos.....	11
3.1 Caracterização clínico patológica e delineamento da pesquisa.....	11
3.2 Obtenção das amostras.....	12
3.3 Análises bioquímicas: perfis renal, hepático e muscular.....	13
3.4 Avaliação da capacidade antioxidante total – TRAP.....	14
3.5 Determinação da atividade da catalase.....	15
3.6 Determinação da atividade da superóxido dismutase – SOD.....	16
3.7 Determinação da fragilidade osmótica eritrocitária.....	19
3.8 Determinação dos níveis de nitrito como estimativa das concentrações plasmáticas de óxido nítrico.....	21
3.9 Quantificação dos níveis de GSH plasmáticos.....	24
3.10 Avaliação da lipoperoxidação das hemácias e do plasma por quimiluminescência de alta sensibilidade induzida por tert-butil hidroperóxido	25
3.11 Análise estatística.....	27

4. Resultados.....	28
5. Discussão.....	39
6. Conclusões.....	47
7. Referências.....	48

1.INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa nos países ocidentais uma das principais causas de morte em mulheres. As estatísticas indicam o aumento de sua frequência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas décadas de 60 e 70 registrou-se um aumento de 10 vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional de diversos continentes. Representa o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo, e o primeiro entre mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2008). A cada ano mais de 1,3 milhões de mulheres serão diagnosticadas com câncer de mama, e aproximadamente 500 000 morrerão, mesmo sendo uma doença potencialmente curável se diagnosticada em estágios iniciais (HENEGHAN, 2009).

Em países desenvolvidos, 75% dos tumores são encontrados em mulheres na pós menopausa (WILIAMS et al., 2008).

O câncer de mama é uma doença heterogênea, com uma complexa interação entre sua capacidade de agressão e as defesas do organismo hospedeiro, a qual determina o planejamento terapêutico e a evolução das pacientes após o tratamento. Em 1942 foi criado o sistema TNM (Tumour, Nodes, Metastasis classification), o qual se baseava em atribuir um prognóstico ao câncer, de acordo com o tamanho do tumor primário, presença e extensão da doença para linfonodos regionais, e na presença de metástases à distância. A atualização realizada em 2009 reflete o avanço nas novas tecnologias e assim permite a realização do tratamento mais apropriado para cada tumor (VAN ZEE et al. 2003; SINGLETARU E CONNOLLY, 2006).

Dentre todos os fatores já pesquisados, o estado da axila seguido do tamanho do tumor segue sendo as variáveis de maior impacto prognóstico. Outras variáveis anatomopatológicas clássicas contribuem para melhorar a classificação dos casos. São estas: tipo e grau histológico, grau nuclear, contagem mitótica, comprometimento vascular, além da expressão de receptores de estrogênio e progesterona e superexpressão do oncogene c-erbB2 ou HER-2/neu (FITZIBBONS et al., 1999; CHAQPAP, et al., 2005; CHENG et al. 2010).

O tratamento cirúrgico conservador ou mastectomia radical, de acordo com o estadiamento inicial, associado a dissecação axilar, deve ser considerado tratamento padrão. A pesquisa de linfonodo sentinela para avaliação de comprometimento linfonodal axilar, pode substituir a dissecação axilar clássica, quando realizada em centros de referência no tratamento do câncer de mama. Pacientes com linfonodo sentinela positivo devem ter a axila dissecada, até que estudos em andamento comprovem a eficácia ou não do procedimento (BARROS E BUZAID,2007).

Quimioterapia é a utilização de drogas para bloquear o crescimento tumoral e eliminar células tumorais no local do tumor de origem, além de sítios à distância (EL-SAYYAD et al., 2009). A indicação de quimioterapia e a escolha de drogas dependem dos fatores prognósticos que determinam o risco de recorrência e de morte. O tratamento quimioterápico pode ser classificado como neoadjuvante, ou seja, para diminuição das dimensões tumorais permitindo assim a realização de cirurgia mais conservadora, adjuvante, com a finalidade de erradicar micrometástases após o tratamento cirúrgico e paliativo para alívio de sintomas na doença avançada (HICKEY et al.,2009).

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, com contribuições de fatores genéticos e ambientais. Apesar da dificuldade de entender completamente o câncer de mama,

evidências sugerem a participação do estresse oxidativo na carcinogênese (ROHAN et al., 2010).

Os radicais livres são formados constantemente no organismo em estados fisiológicos e patológicos. Quando os mecanismos de defesa antioxidante endógena não são suficientes para neutralizá-los, instala-se a condição de estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio são intáveis e podem causar danos no DNA mitocondrial. Adicionalmente podem alterar a expressão de genes que estimulam a proliferação e diferenciação celular e causar a peroxidação de lipídeos e proteínas.(BARREIROS *et al.*, 2006; ROHAN et al., 2010).

Radicais livres são definidos como moléculas orgânicas, inorgânicas e átomos os quais possuem um ou mais elétrons não pareados, com existência independente. Quando o elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados ERO (espécie reativa do oxigênio) ou ERN (espécie reativa do nitrogênio), respectivamente. A instabilidade dos radicais livres é atribuída à sua configuração, a qual leva a uma meia-vida curta e confere alta reatividade (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1999; BARREIROS *et al.*, 2006).

Os EROs são classificadas em dois grupos: os radicalares, compreendendo, por exemplo, a hidroxila (OH^*), superóxido ($\text{O}_2^{*\cdot}$), peroxila (ROO^*) e alcoxila (RO^*); e não-radicalares, como o oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl). As ERNs incluem o óxido nítrico (NO^*), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (BARREIROS; DAVID, 2006). De acordo com Bianchi *et al.* (1999) a formação de radicais livres, *in vivo*, ocorre por ação catalítica de enzimas, por fontes endógenas como a respiração aeróbia, processos

inflamatórios, peroxissomos e enzimas do citocromo P450 ou por fontes exógenas como o ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta e cigarro.

Algumas propriedades biológicas da ERN, óxido nítrico (NO) sobre tumores são descritas, como sua capacidade de inibir a proliferação celular, induzir a apoptose, participar como mediador central dos efeitos citotóxicos e citostáticos exercidos por macrófagos e regular o padrão de expressão de receptores hormonais de progesterona (RENEVEAU et al, 1999).

A expressão e localização das NOS pode ser observada em diversos cânceres humanos, incluindo tumores de mama, ovário, estômago e cérvix. Em tumores de mama, a expressão da iNOS pode ser observada predominantemente nas células do estroma tecidual onde é descrito que esta enzima apresenta baixa atividade. A correlação entre a atividade da iNOS e o estadiamento do câncer de mama sugere que o NO deva funcionar como um sinal positivo para o crescimento celular dentro do microambiente tumoral. Dados *in vivo* demonstram que a administração de inibidores seletivos de iNOS limita a capacidade de crescimento e invasão tumoral em murinos, sugerindo que o bloqueio na geração de NO no ambiente microtumoral seja capaz de prevenir a angiogênese e o processo metastático (THOMSEN & MILLES, 1998).

Os tumores de mama são fortemente influenciados pela presença de hormônios, cujo padrão de receptores determina a agressividade do tumor e sensibilidade à quimioterapia. Estudos recentes mostram que o mecanismo molecular de ação dos esteróides está intimamente ligado ao NO, já que estrógeno e progesterona regulam as NO sintases constitucional e induzível, respectivamente, resultando em conseqüências para a homeostase tumoral determinadas pelos níveis de NO produzidos (PANCE, 2006; BENZ, 2008).

Para neutralização dos efeitos deletérios dos radicais livres, as células são dotadas de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os mecanismos de defesa antioxidantes do corpo incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase, e homólogos não enzimáticos como a glutatona, ácido ascórbico e α -tocoferol (SANTOS & CRUZ, 2001). Estes antioxidantes combatem o excesso de radicais livres no organismo, os quais podem causar danos, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS *et al.*, 2006; ROHAN *et al.*, 2010).

A metaloenzima SOD converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e a catalase converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. Assim, a ação dessas duas enzimas protege as células aeróbias da ação oxidante do superóxido e do peróxido de hidrogênio. Outra importante enzima envolvida no controle da formação de peróxidos é a glutatona peroxidase, que tem como substrato a glutatona, um tripeptídeo que apresenta cisteína (LEITE & SARNI, 2003).

O aumento nos níveis de estresse oxidativo pode estar relacionado a carcinogênese, com mutação nuclear ou mitocondrial do DNA, ou levando a dano estrutural intracelular de lipídeos e proteínas. O crescimento tumoral pode ainda produzir aumento do estresse oxidativo intra e extracelular transitório ou permanente, e assim alterar aspectos de malignidade do tumor (BENZ, 2008).

Acredita-se que o estresse oxidativo pode agravar os sintomas de uma série de doenças, incluindo anemia hemolítica (GALARIS *et al.*, 2008; BENZ, 2008).

Eritrócitos circulantes estão entre as células mais abundantes do organismo, e contribuem para aproximadamente 10% do volume celular de um indivíduo adulto. Por este motivo, constituem-se em modelos ideais para estudo da lesão por radicais livres em

biomembranas e também para avaliar o efeito protetor de alguns compostos, pois são susceptíveis ao estresse oxidativo quando íntegros ou utilizando-se apenas de suas membranas (eritrócitos “ghost”) (ROSS et al., 1999; LENFANT et al., 2000; SATO et al., 1995; SATO et al., 1998; ZOU et al., 2001).

O eritrócito humano é uma célula anucleada e possui tempo de sobrevivência de cerca de 120 dias. É dotado de extrema maleabilidade e flexibilidade fisiológica, o que permite o seu livre trânsito pela microvascularização do organismo. Sua principal função é o transporte de O₂ para os tecidos através da molécula de hemoglobina (DACIE & LEWIS, 1995). Têm-se utilizado os eritrócitos como modelo para estudos de estresse oxidativo por causa da alta tensão relativa de oxigênio, presença de hemoglobina e à membrana plasmática rica em lipídeos poliinsaturados.

Em razão da pré-disposição ao ataque de substâncias oxidantes, os eritrócitos possuem um sistema antioxidante eficiente e capaz de estabelecer um balanço adequado entre o efeito pró-oxidante e antioxidante, onde radicais estão sendo continuamente gerados pela auto-oxidação da hemoglobina (REPETTO et al., 1996). A ação dos radicais livres em membranas eritrocitárias pode levar a uma série de alterações como formação de lipoperóxidos, redução da deformidade, mudanças na morfologia, alteração da permeabilidade, alteração na bomba Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺/ATPase, ligação cruzada e fragmentação de proteínas, hemólise e alterações no metabolismo intracelular (BEGUM & TERAQ, 2002; SATO et al., 1995; SANDHU et al., 1992).

O papel do eritrócito como transportador de oxigênio, o expõe repetidamente ao risco de dano oxidativo. Além disso, os produtos intermediários da desnaturação oxidativa da hemoglobina, os hemicromos, interagem com o peróxido de hidrogênio para gerar radical hidroxila e, assim, criar outra fonte de dano oxidativo à célula. Níveis aumentados de metahemoglobina, hemicromo e hemoglobina desnaturada (corpúsculos de Heinz),

diminuição de grupos sulfidrila e o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, um indicador de peroxidação lipídica, têm sido relatados como causadores de dano oxidativo em hemácias (LEE et al., 1998).

Quando a extensão deste processo é acentuada, pode ocorrer hemólise e, conseqüentemente, anemia. Dessa forma, conclui-se que os eritrócitos podem ser sensíveis indicadores de estresse oxidativo causado pela geração de radicais livres. Silva e colaboradores (2000) demonstraram que a lipoperoxidação da membrana do eritrócito e mudanças na viabilidade celular mediadas por radicais livres promoveram hemólise.

As hemácias possuem no seu interior um eficiente sistema de defesa antioxidante, constituído por enzimas como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase e glutatona peroxidase (GPx), além de vitamina E presente na membrana, cuja redução na concentração favorece a hemólise (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A vitamina E (α -Tocoferol) é o maior componente antioxidante lipofílico nos sistemas biológicos e confere proteção à membrana celular por atuar como inibidor de oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação. Nas hemácias, a vitamina E inibe a lipoperoxidação das membranas de eritrócitos e evita a hemólise induzida por radicais livres de oxigênio (SILVA et al., 2000).

Glutationa, um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (JUNIOR et al., 2001). Em condições fisiológicas a forma reduzida é 10 a 100 vezes maior que a forma oxidada (FILOMENI et al., 2002). Mudanças na concentração deste tripeptídeo podem ser um indicador útil em certas desordens fisiológicas, como anemias

causadas por infecção ou seguidas pela administração de algumas drogas oxidantes (JUNIOR et al., 2001).

O grupamento tiol da cisteína na molécula de GSH confere a proteção antioxidante em resposta aos xenobióticos, o qual é o primeiro agente celular consumido na reações para remoção dos compostos oxidantes (DICKINSON et al., 2002). Os grupos sulfidril da hemoglobina têm sido associados aos mecanismos de proteção celular contra agentes oxidantes, podendo formar pontes dissulfeto, servir como reservatórios do poder redutor e como fonte de GSH (TORSONI & OGO, 2000).

De fato, proteínas com grupos tiol (proteína-SH) podem reagir com GSSG para formar pontes dissulfeto mistas (um processo chamado proteína-S-tioação) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH. A razão de glutatona reduzida e oxidada em células normais é geralmente alta (em eritrócitos é $> 10/1$), evidenciando a presença de um mecanismo eficiente de redução do GSSG a GSH. A enzima responsável por catalisar esta reação é glutatona redutase. O NADPH requerido nesta reação é originário do metabolismo da glicose pela via da pentose-fosfato, a qual também fornece NADPH para metahemoglobina redutase, enzima que converte metahemoglobina a hemoglobina ligada a Fe^{+++} para permitir o contínuo transporte de O_2 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os mecanismos de destruição das hemácias são ainda obscuros. Quatro mecanismos têm sido postulados: (1) lise osmótica, (2) eritrofagocitose, (3) citólise induzida por complemento, e (4) fragmentação. A importância relativa de cada um desses mecanismos na destruição de células normais ainda não foi estabelecida (LEE et al., 1998).

Além de relacionado com o processo de carcinogênese, o estresse oxidativo tem sido atribuído como mediador de metástases, a principal causa de morte nas doenças neoplásicas.

Metástase, um processo que envolve invasão celular no sítio do tumor primário, acesso à circulação, e colonização em órgãos distantes. Embora altos níveis de EROs induzam morte celular, baixos níveis funcionam como moléculas sinalizadoras para mediar crescimento, migração e invasão celular. Alguns relatos são conflitantes quanto aos níveis de EROs aumentarem ou diminuírem a migração celular (USHIO-FUKAI,2008). De acordo com Zhang et al, EROs tem um papel positivo na motilidade celular e interação com a actina do citoesqueleto, a principal rota para migração celular. Outra maneira de explicar o envolvimento do estresse oxidativo na progressão tumoral é a angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos à partir de vasos pré-existentes. Fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e receptores de VEGF podem ser mediados através de EROs nas células endoteliais (USHIO-FUKAI, 2008).

Embora existam diversos estudos sobre o papel do estresse oxidativo como mediador da carcinogênese, até o momento não existem evidências se após a retirada do tumor primário existe persistência do estresse, e se essa persistência pode ou não levar a lesões sistêmicas e piora do prognóstico. Desta forma este trabalho teve por objetivo avaliar os níveis de estresse oxidativo e investigar a ocorrência de lesões teciduais após a retirada do tumor primário em pacientes portadoras de câncer de mama.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto do estresse oxidativo em pacientes portadoras de câncer de mama, após a retirada do tumor primário.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar clinicamente as pacientes com base nos dados anatomopatológicos, imunohistoquímica.

- Avaliar o dano sistêmico, através de indicadores plasmáticos de lesão renal, hepática e cardíaca;

Á Investigar o impacto do estresse oxidativo, mesmo após a retirada do tumor primário sobre o tecido hematológico através da análise do hemograma e lipoperoxidação da membrana eritrocítica como medida de lesão pré-hemolítica;

Á Analisar os níveis de estresse oxidativo por meio da quantificação de nitrito, lipoperoxidação plasmática e medida dos níveis de defesas antioxidantes através da quantificação das defesas enzimáticas (atividade da catalase e superóxido dismutase) e não enzimáticas (medida da capacidade antioxidante total plasmática e glutathione reduzida).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1. Caracterização clinicopatológica e delineamento da pesquisa

Este projeto foi aprovado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CAAE 0009.0.268.000-07). Durante o desenvolvimento deste estudo, 28 mulheres foram classificadas em dois grupos distintos. O grupo controle (CTR) foi composto de 14 mulheres saudáveis, com idade entre 18 e 64 anos, que não faziam utilização de medicação hormonal. Foram critérios de exclusão: história prévia de câncer de mama, uso de quimioterapia, tabagismo, alcoolismo e uso de vitaminas ou substâncias antioxidantes.

O grupo câncer (CA) foi composto de 14 mulheres com idade entre 37 e 68 anos, diagnóstico de neoplasia maligna de mama em estágios iniciais (I e IIA) da doença e que não apresentaram fatores de mal prognóstico, como positividade para o proto-oncogene HER-2 e não expressão de receptores hormonais (ER e PR), sem indicação de quimioterapia antineoplásica. Em todas as amostras tumorais foram realizados testes anatomopatológicos e de imunohistoquímica (IHC).

3. 2. Obtenção das amostras

A coleta de sangue de mulheres do grupo controle (CTR) foi realizada no Laboratório de Radicais Livres do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, Paraná. O sangue das mulheres portadoras de câncer de mama foi coletado no Instituto de Câncer de Londrina, em um período que variou de 32 a 56 dias após tratamento cirúrgico para retirada do tumor primário.

Foram coletados 10 mL de sangue de cada paciente em tubos heparinizados, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, Anexo I), seguindo os cuidados de higiene e assepsia. Logo após a coleta, o sangue centrifugado por 5 minutos à 4000 xg, 4°C (Centrífuga BR 4i Multifunction, Thermo®), para separação do plasma e hemácias.

As hemácias foram lavadas três vezes com solução tampão NaCl 0,9% a 4°C (para remoção dos resquícios de plasma, leucócitos e plaquetas) e utilizadas para testes dentro de 8 horas. Para realização do hemograma, foi coletado um tubo com 5 mL de sangue contendo EDTA. O plasma obtido foi aliquoteado e armazenado em Ultra Freezer -86°C (Indrel®), em tubos tipo eppendorf, até a realização das análises.

3.3. Análises bioquímicas: marcadores de função renal, hepática e muscular

Foram realizadas medidas de parâmetros bioquímicos de toxicidade sistêmica, relacionados ao perfil renal (níveis de uréia, creatinina e ácido úrico plasmáticos), perfil hepático (níveis de bilirrubinas totais, aspartato aminotransferase-AST, alanina aminotransferase-ALT e gama glutamil transferase-GGT plasmáticos) e músculo cardíaco (níveis de creatina quinase total- CK total, creatina quinase fração MB – CKMB e lactato desidrogenase-LDH plasmáticos). Foram selecionados estes parâmetros em particular por consistirem em marcadores específicos da lesão tecidual de cada um destes órgãos.

As análises bioquímicas foram gentilmente processadas pelo Prof. Dr. Décio Sabatini Barbosa (Laboratório de Urgências do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina), utilizando o sistema colorimétrico automatizado para análises bioquímicas Dimension RxL® (Dade-Behring - Siemens Corp.), com gerenciamento de

reagentes automático, empregando 12µL de plasma. O hemograma foi realizado pelo Laboratório CETEL, Londrina-PR utilizando Coulter automatizado.

3.4. Avaliação da capacidade antioxidante total plasmática – TRAP (REPPETO et al., 1996)

O composto 2,2'azobis (ABAP) reage com lipídeos presentes no plasma formando lipoperóxidos. Esta reação emite fótons em baixas quantidades, não detectáveis por espectrofotometria. Para amplificar esta reação, adiciona-se luminol, um composto mais instável que os lipoperóxidos, capaz de captar os elétrons desemparelhados destes lipoperóxidos, amplificando a emissão de luz e emissão de sinal ao luminômetro. Quanto maior a quantidade de antioxidantes presentes na amostra, maior será o retardo na subida da curva do ABAP, que corresponde ao impedimento na formação de lipoperóxidos devido ao nível de antioxidantes de baixo peso molecular. A amostra de plasma foi descongelada em banho de gelo, diluída 1:50 (20 uL de plasma + 980 uL de tampão) e processada.

Os resultados foram analisados no software OriginLab 7.5® e expressos em nM de trolox, com base no perfil de inibição da curva do ABAP da solução do análogo hidrossolúvel de vitamina E (Trolox).

3.5. Determinação da atividade da catalase (AEBI, 1984)

A enzima catalase degrada o peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio molecular:



A molécula do peróxido de hidrogênio é capaz de absorver no ultravioleta. Assim, quando se adiciona este composto na amostra, pode-se medir a atividade da catalase através da redução na absorbância a 240 nm devida à decomposição do H_2O_2 a 25^0 C .

Para calibrar o perfil de leitura obtido, seguir o esquema abaixo:

Reagente	Controle	Amostra
H_2O destilada	200 uL	200 uL
TRIS	1700 uL	1800 uL
Zerar o aparelho		
H_2O_2	100 uL	----

O valor de absorbância da solução de H_2O_2 deve ser ajustado entre 0,450 e 0,500.

A papa de hemácias foi diluída na proporção de 1:80 (10 uL da papa de hemácias em 790 uL de água) e a reação foi processada em cubetas de quartzo conforme descrito abaixo:

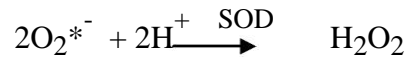
Reagente	Controle	Amostra
H_2O destilada	200 uL	200 uL
TRIS	1690 uL	1800 uL
Amostra 1:80	10 uL	----
Zerar o aparelho		
H_2O_2	100 uL	----

REAGENTES: Água destilada, Tampão TRIS 1M HCl, Solução de H_2O_2 200 mM (220 uL de TRIS 1M+ 2 mL de água + 63 uL de H_2O_2 30 v).

Os dados foram analisados no software OriginLab 7.5® e expressos em valores de absorbância por minuto por mL de amostra.

3.6. Determinação da atividade da superóxido dismutase- SOD (MARKLUND & MARKLUND, 1974)

A metaloenzima SOD converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio:



Pirgalol é um composto que apresenta propriedade auto-oxidante em soluções aquosas alcalinas a 37⁰ C, promovendo alteração na coloração da solução de incolor para amarelo, correspondente a forma oxidada, detectada a 420 nm em espectrofotômetro. A enzima SOD, devido suas propriedades antioxidantes, exibe capacidade de inibir a auto-oxidação do composto pirogalol, sendo assim possível determinar sua atividade neste sistema.

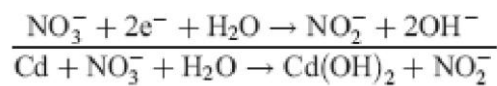
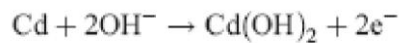
Para as amostras, a papa de hemácias foi hemolisada na proporção de 1:20 (10 µL papa+190 µL de água) e o teste realizado em 3 volumes distintos, para obtenção da curva de inibição da auto-oxidação do pirogalol.

Os resultados foram analisados no software OriginLab 7.5 ® e expressos em USOD/nL de papa.

3.7. Determinação dos níveis de nitrito como estimativa das concentrações plasmática de óxido nítrico (NO) (PANIS, 2009, NAVARRO - GONZÁLVEZ et al . , 1998).

A estimativa da concentração de NO nas amostras foi realizada pela técnica descrita por Navarro -Gonzálvez e colaboradores (1998) adaptada.

O método baseia -se na redução de nitrato a nitrito mediada por reações de óxi - redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio -cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess a 550 nm (GR IESS, 1879), conforme mostra a equação abaixo:



Desproteínização

Para uso no ensaio, as amostras previamente coletadas foram descongeladas em banho de gelo. Em um eppendorf, adicionou-se 60µL de amostra, 50µL de ZnSO₄ 75mM (2,156g em 100mL H₂O deionizada) e, após homogeneização em vórtex (30 segundos), as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 10000 xg a 4⁰C. Em seguida, foram adicionados 70µL de 55mmol/L NaOH (220mg em 100mL H₂O destilada) e novamente homogeneizado em vórtex por 30 segundos. As amostras foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 10000 xg a 4⁰C, com posterior recuperação de 250 µL do sobrenadante, adicionando-se 50µL de tampão glicina-NaOH 45g/L pH 9,7 (4,5g em 100mL H₂O destilada).

Ativação dos grânulos de cádmio

Os grânulos estocados em H₂SO₄ 100mM foram lavados com H₂O destilada três vezes e, após, deixados em contato com tampão CuSO₄ 5mM (124,84mg em 100mL tampão

glicina-NaOH 15g/L pH 9,7) por 5 min (os grânulos ativos foram utilizados dentro de 10 min e os grânulos que ficaram pretos após serem lavados com H₂SO₄ foram descartados).

Redução de nitrato a nitrito

Foram adicionados 400 mg de grânulos de cádmio ativados ao sobrenadante recuperado em tampão, deixando a mistura sob agitação contínua por 10 min em Corning® contínuos velocidade 1. Após este tempo, as amostras foram transferidas para outro tubo, para determinação de nitrito por meio da reação de Griess.

Preparo da curva padrão

Solução estoque de 250 µM de NaNO₂ 100mM (69mg em 10mL H₂O destilada) foram preparadas no momento do uso e diluídas seriadamente até 7,8 até µM na microplaca.

Reação de Griess

Para cada poço da microplaca, adicionou-se 50 µL de amostra + 50 µL de Reagente de Griess (Sulfanilamida: 0,4 g sulfanilamida em 20mL Ácido Fosfórico 5% - proteger da luz; NEED: 40mg em 20mL H₂O destilada – protegido da luz).Em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos, e medida sua absorbância a 550 nm em leitor de microplaca.Os resultados foram expresso em µM de nitrito.

3.8 - Quantificação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) plasmáticos (SEDLAK & LINDSAY, 1968)

Embora o tripeptídeo GSH possa existir sob 2 formas, a oxidada (dissulfeto) e a reduzida (sulfidril), *in vivo* o organismo mantém predominantemente a forma reduzida pela ação da enzima glutathiona redutase. Como a maior parte dos grupos sulfidril não-protéicos estão presentes na glutathiona, a quantificação de tióis solúveis em ácido pode ser empregada na quantificação dos níveis de GSH.

Papa de hemácias foi hemolisada na proporção de 1:10 (100 µL de papa+900 uL de água). Adicionou-se 1,25 mL de EDTA e 250 µL de ácido tricloroacético 50% (TCA). Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, por 15 minutos. Transferiu-se 1 mL de sobrenadante para outro tubo contendo 2 mL de Tris. Adicionou-se 50 µL de DTNB e a absorbância do composto amarelo formado foi lida a 412 nm.

Os resultados foram expressos em nM de GSH, a partir da regressão linear dos pontos da curva padrão.

3.9 Avaliação da lipoperoxidação das hemácias e do plasma por quimiluminescência de alta sensibilidade induzida por tert-butil hidroperóxido (FLECHA, LLESUY, BOVERIS, 1991)

O composto tert-butil hidroperóxido é um potente formador de radicais peroxil. Nas membranas biológicas, estes radicais atacam os lipídeos gerando lipoperóxidos que podem reagir com outros lipídeos, oxidando-os. Desta forma, o tert-butil inicia uma reação de lipoperoxidação em cadeia com outros lipídeos que pode ser detectada através da emissão de

fótons ocorrida durante a formação dos lipoperóxidos. Além disso, quanto mais antioxidantes a amostra testada tiver, maior será o tempo para que esta reação seja iniciada.

Diluiu-se 30 uL de papa de hemácias lavadas em 2970 uL de tampão fosfato monobásico 10 mM pH 7,4 (NaCl 0,9%) a 37^o C e 1 mL desta suspensão foi adicionada a mais 11,3 mL de tampão. Aliquotou-se 1 mL desta última diluição em um tubo eppendorf e incubou-se a 37^o C por 5 minutos. Pipetou-se 10 uL de solução de t-butil 3 mM (19,3 uL de t-butil em 1 mL de água). Para avaliação do plasma adicionou-se 125 uL de amostra + 865 uL de tampão fosfato monobásico 10 mM pH 7,4 em NaCl 0,9% a 37^o C e incubou-se a 37^o C por 5 minutos. Adicionou-se 10 uL da solução de t-butil.

A leitura da reação foi realizada em luminômetro TD 20/20 Turner Designers®) no protocolo de 1 leitura por segundo, durante 60 minutos, onde avaliou-se a emissão de fótons medida em unidades relativas de luz (URL).

3.10 - Análise Estatística

Foi utilizado o teste *t* de Student não pareado para as comparações entre condições controles e câncer de mama utilizando o software GraphPad Prism 5.0. As curvas de quimiluminescência foram analisadas através de Two-way ANOVA. Todos os resultados forem representados como dispersão de valores em cada grupo e * indica diferença estatística ($p < 0.05$ teste T de Student).

4. RESULTADOS

A caracterização clinicopatológica das pacientes portadoras de câncer de mama encontra-se descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização clinico-patológica das pacientes do grupo CA

Características	Número
Numero de pacientes	
Grupo CA	N=14
Idade	53.2 anos
Média	37 - 68 anos
<40 anos	4%
>40 anos	96%
Tipo de tumor	
<i>Carcinoma ductal infiltrante</i>	96%
<i>Carcinoma ductal in situ</i>	4%
RE	Positivo - 100%
RP	Positivo - 100%
HER-2/neu	Negativo - 100%

Foram randomizadas 28 mulheres, sendo 14 mulheres saudáveis, com idades entre 18 e 64 anos, sem história prévia de neoplasia ou de infusão de quimioterapia, e 14 pacientes com diagnóstico de câncer de mama, com idades entre 37 e 68 anos, em estágios iniciais da doença, e com análise IHC do tumor primário demonstrando positividade para receptores de estrógeno e progesterona, e negatividade para o proto-oncogene Her-2.

Os efeitos sistêmicos do câncer foram analisados através de parâmetros hematológicos e bioquímicos, incluindo biomarcadores renais, cardíacos e hepáticos, além de marcadores de estresse oxidativo.

A Figura 1 mostra o perfil plasmático de biomarcadores renais, avaliado através dos níveis de ácido úrico, uréia e creatinina. Observou-se no grupo CTR níveis mais homogêneos de ácido úrico (Figura 1A), enquanto que o grupo CA mostrou níveis variando entre 2mg/dL a 11mg/dL. Os níveis de uréia e creatinina não apresentaram diferenças significantes entre os grupos (Figuras 1B e 1C).

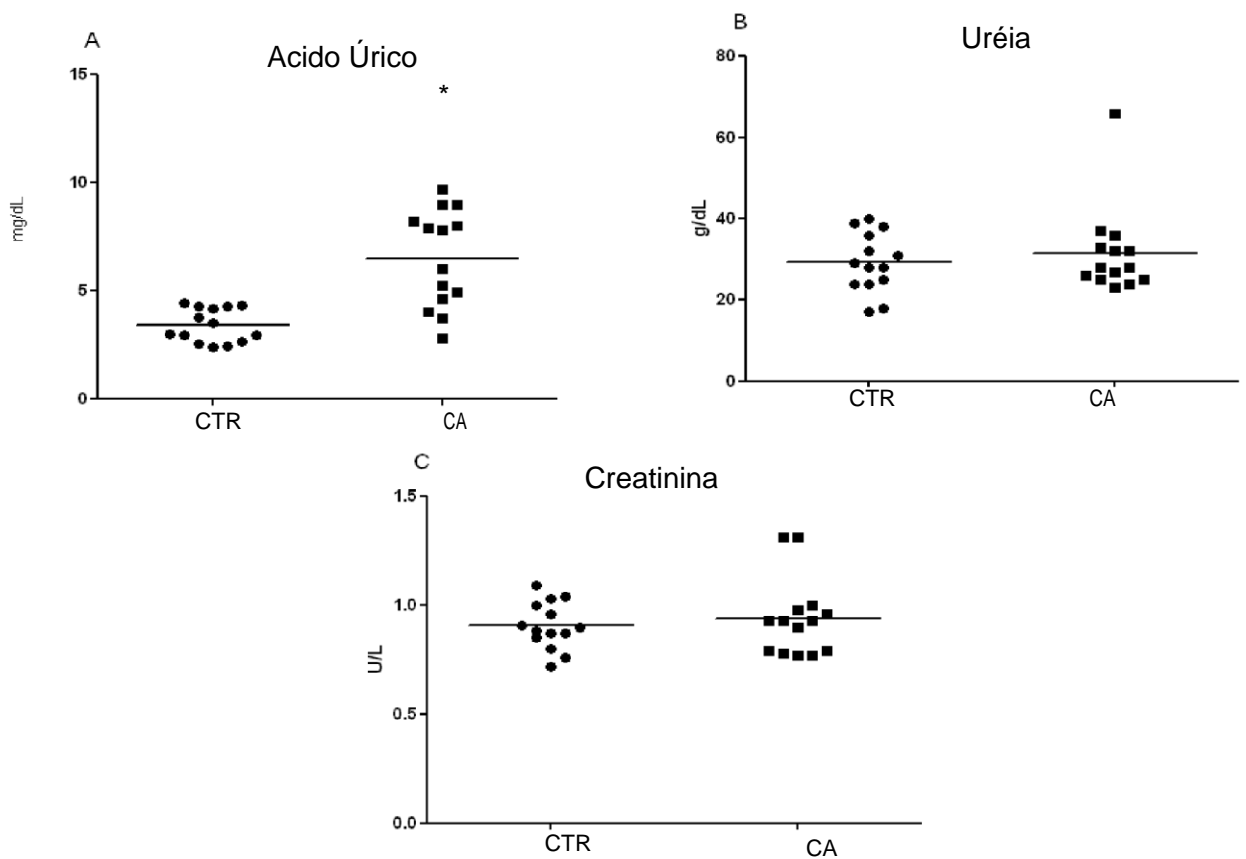


Figura 1 – Marcadores de lesão renal no plasma de pacientes dos grupos CTR e CA

O perfil plasmático de biomarcadores hepáticos representado na Figura 2 foi avaliado através das aminotransferases AST e ALT, gama glutamil transferase (GGT) e níveis de bilirrubina. Foi observado aumento nos níveis de ALT, AST e GGT (Figura 2A, 2B e 2C). Não houve variações significativas nos níveis de bilirrubinas nos grupos avaliados (figura 2D).

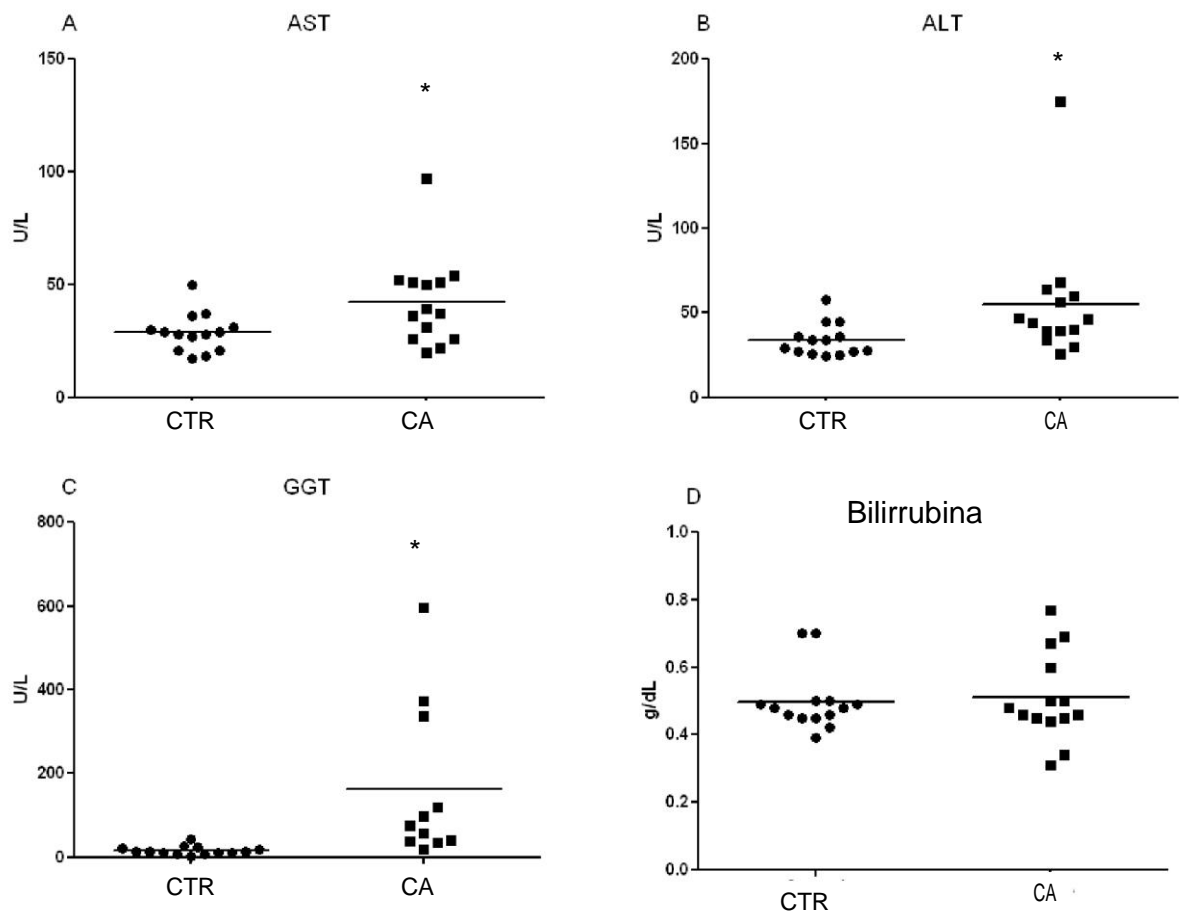


Figura 2 – Marcadores de lesão hepática no plasma de pacientes dos grupos CTR e CA

Biomarcadores específicos de lesão cardíaca como CK e CKMB não apresentaram aumento significativo no grupo CA, conforme demonstrado na Figura 3. Houve aumento significativo nos níveis de LDH no grupo CA, porém esta enzima pode representar lesão a em outros tecidos, não sendo específica para músculo cardíaco.

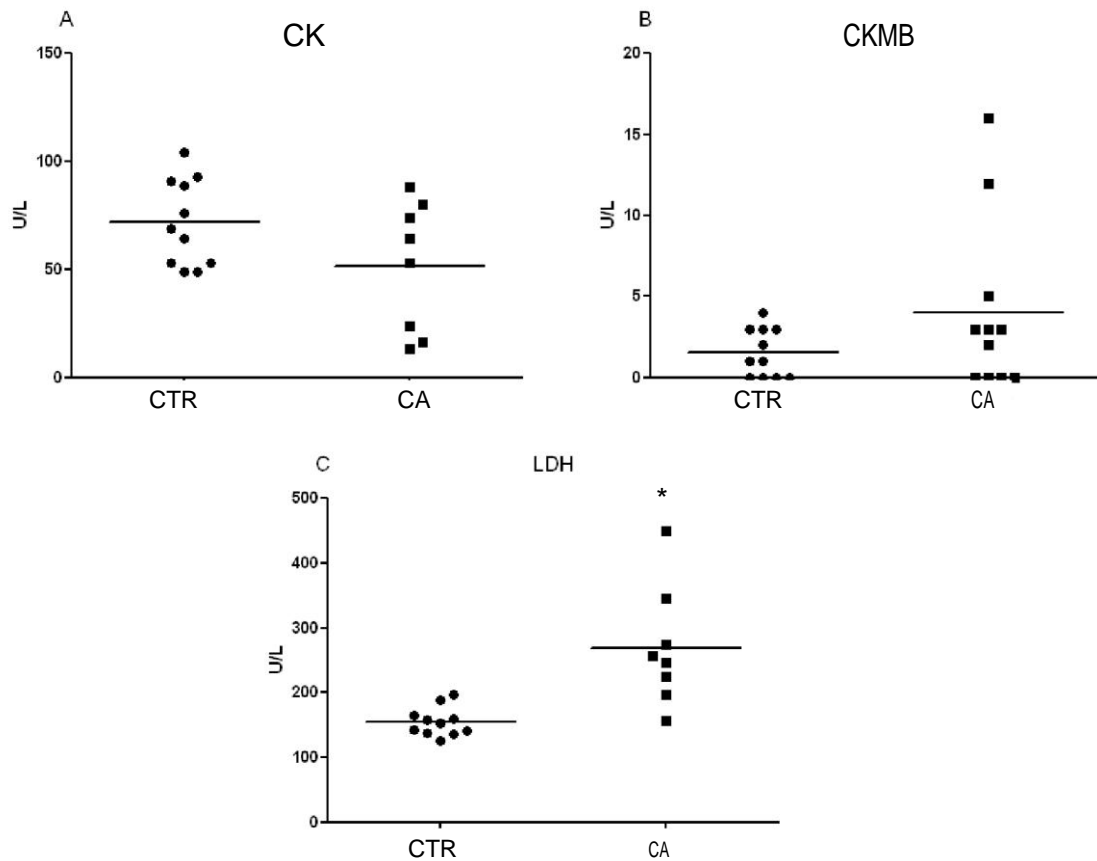


Figura 3 – Marcadores de lesão cardíaca no plasma de pacientes dos grupos CTR e CA

Também foram realizados testes para análise do tecido hematológico através da contagem de hemácias, níveis de hemoglobina, cálculo de índices hematimétricos, contagem total e diferencial de leucócitos (Figura 4), lipoperoxidação de membranas de eritrócitos medida por quimiluminescência de alta sensibilidade (Figura 5).

A Figura 4 mostra uma acentuada diminuição no número de eritrócitos circulantes (Figura 4A), diminuição significativa nos níveis de hemoglobina (Figura 4B) e hematócrito (Figura 4C). Estes dados caracterizam severa anemia nos pacientes analisados.

Houve aumento na contagem de leucócitos totais no grupo CA quando comparado ao controle (Figura 4D), o que pareceu ser reflexo do processo inflamatório gerado pela doença.

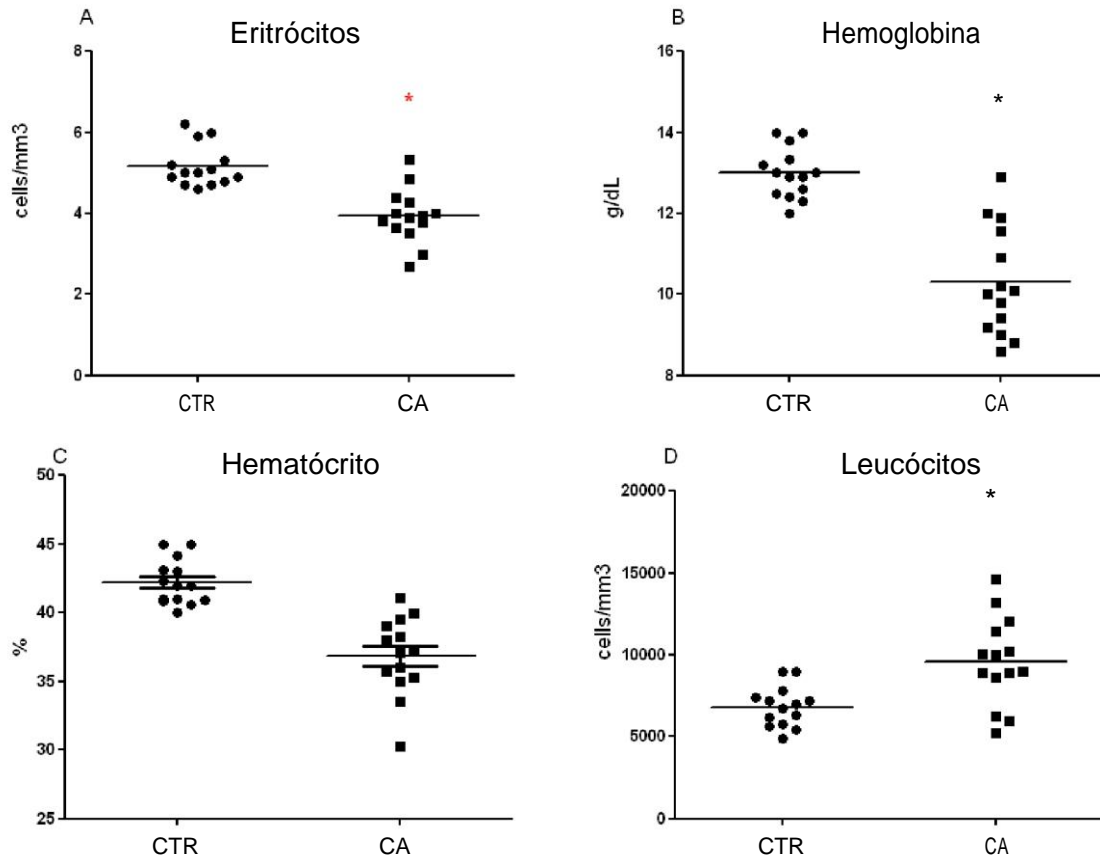


Figura 4 – Perfil hematológico dos grupos controle e CA.

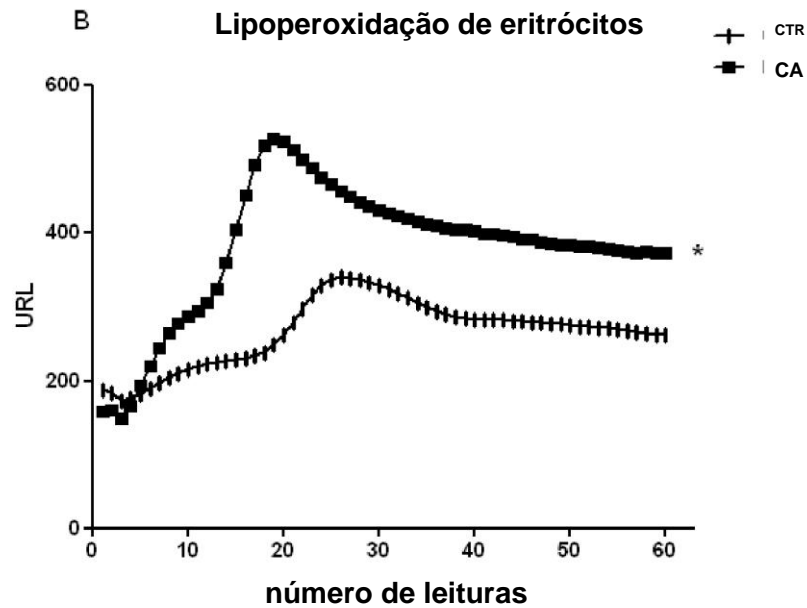


Figura 5 - Lipoperoxidação de eritrócitos

Os níveis de estresse oxidativo como possível mediador de lesão hemolítica como causa de anemia, foram avaliados através da medida dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase, medida da capacidade antioxidante total plasmática (TRAP) (Figura 6), níveis de nitrito como estimativa da concentração de óxido nítrico (NO) plasmática (Figura 7) e medida da lipoperoxidação lipídica plasmática por quimiluminescência de alta sensibilidade (Figura 8).

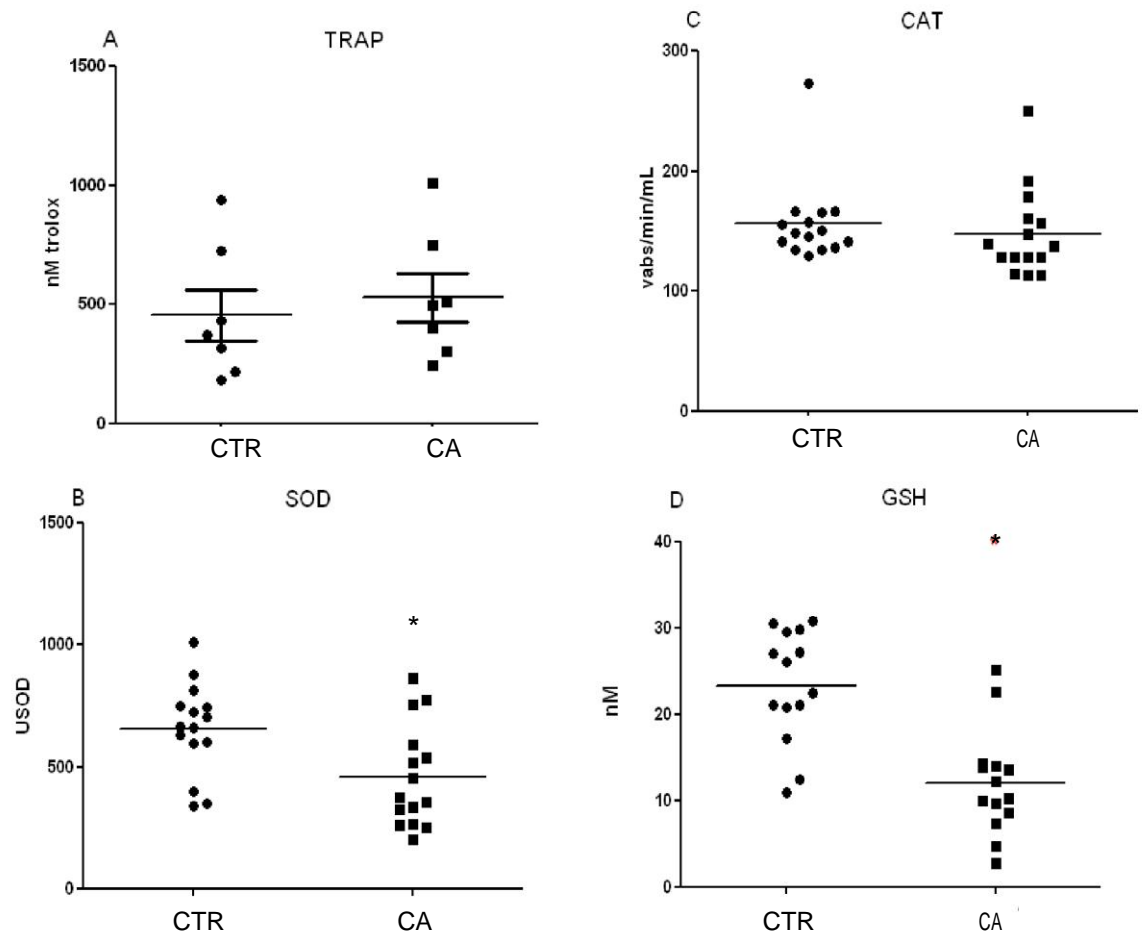


Figura 6 –Avaliação de marcadores de estresse oxidativo no plasma dos grupos controle e CA

Em relação às defesas antioxidantes enzimáticas avaliadas, houve redução da atividade da SOD nas pacientes do grupo CA (Figura 6C)), refletindo o papel do câncer nestes pacientes. Em nosso estudo não foi verificada mudanças nos níveis de catalase (Figura 6C).

Os níveis de GSH apresentaram-se reduzidos no plasma de pacientes do grupo CA (Figura 6D), enquanto a medida da capacidade antioxidante total não apresentou alterações significativas (Figura 6A).

A Figura 7 mostra os níveis plasmáticos de nitrito, onde não foram observadas alterações significativas. O perfil de lipoperoxidação plasmática (Figura 8) revelou aumento significativo no grupo CA.

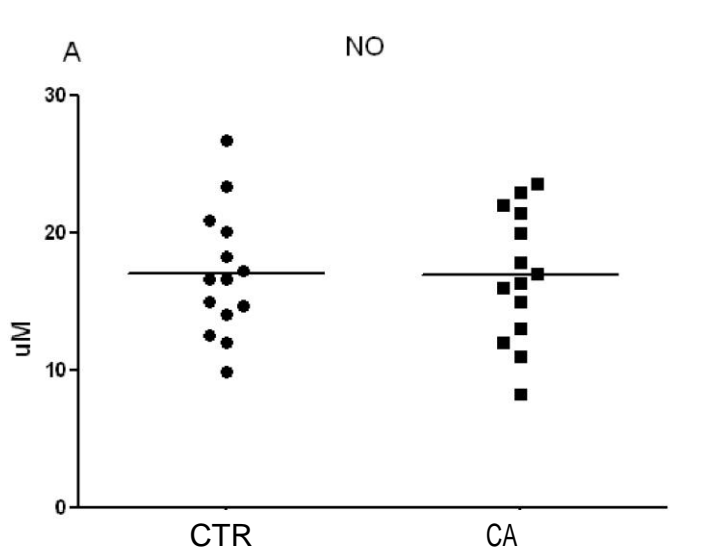


Figura 7 – Níveis de Nitrito nos grupos controle e CA

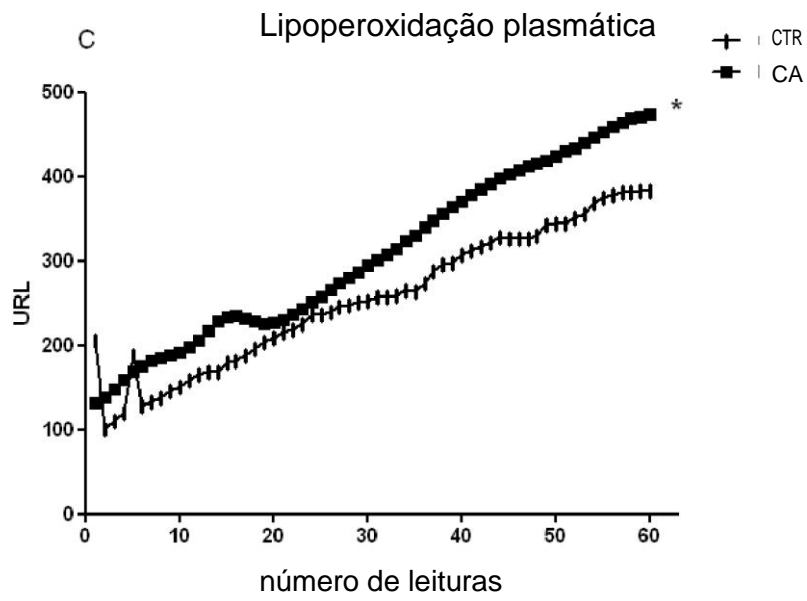


Figura 8 – Lipoperoxidação plasmática

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho caracterizam pela primeira vez o impacto sistêmico e lesão tecidual em pacientes portadoras de câncer de mama, após retirada do tumor primário. Embora tenham sido observadas alterações importantes nos parâmetros renais e hepáticos, o principal alvo do estresse oxidativo mediado pelo câncer em especial foi hematológico, paralelamente à redução das defesas antioxidantes. Na literatura, existem poucos relatos a respeito do efeito do câncer, mesmo após a retirada do tumor sobre os parâmetros avaliados neste estudo.

Para avaliação da toxicidade renal, foram medidos os níveis plasmáticos de ácido úrico, uréia e creatinina (Figura 1). O ácido úrico, cujo valor de referencia plasmático normal varia entre 2 a 6 mg/dL, representa o produto final do metabolismo das purinas e seus níveis plasmáticos são influenciados por fatores renais e extra-renais.

Os maiores níveis de ácido úrico observados no grupo CA comparado ao grupo CTR (Figura 1A), sugerem um aumento no metabolismo das purinas como mecanismo compensatório para controle do estresse oxidativo, devido as propriedades antioxidantes desta molécula.

Durante muito tempo discutiu-se a ação pró-oxidante ou antioxidante do ácido úrico. Hoje, sabe-se que as propriedades pró versus antioxidante dependem de fatores como disponibilidade de oxigênio e outras enzimas pró e antioxidantes. Em situações de altos níveis de estresse oxidativo, o balanço entre propriedades pro e antioxidantes do ácido úrico agem em favor da proteção do tecido (PROCTOR, 2008).

O ácido úrico, nos tecidos, encontra-se na forma de ânion urato e, sozinho, não é capaz de inativar o oxigênio singlet. Em meio biológico ele causa indiretamente a inativação do oxigênio singlet através da desativação de outras espécies excitadas (BARREIROS; DAVID, 2006).

Bozkir e colaboradores (1999) trabalharam com o soro de pacientes com câncer de pulmão e mostraram que os níveis de ácido úrico foram menores nos portadores desta doença, diferentemente dos achados deste trabalho em portadoras de câncer de mama. No mesmo laboratório, Gönenç e colaboradores (2001) analisaram o plasma de pacientes portadoras de câncer de mama os quais observaram um aumento significativo no nível de ácido úrico nessas mulheres, sugerindo então como mecanismo de compensação ao estresse oxidativo instalado sistemicamente. Estes achados estão de acordo com os dados obtidos no nosso estudo, indicando que as variações observadas neste parâmetro são resultado da doença, mesmo após a retirada do tumor primário, podendo estar relacionadas à atividade antioxidante desta molécula.

Os níveis de uréia e creatinina observados neste estudo não apresentaram variações significativas entre os grupos. (Figura 1 B). A uréia é a principal forma de eliminação do nitrogênio oriundo do catabolismo das proteínas, formada no fígado a partir dos grupos NH_2 liberados pelos aminoácidos no ciclo da ornitina (MILLER & GONÇALVES, 1999). Seu valor de referência plasmático varia de 20 a 40 mg/dL. Para avaliação do estado de funcionamento renal, este parâmetro é avaliado juntamente com os níveis de creatinina. Normalmente, a creatinina possui velocidade de depuração mais elevada que a da uréia, apresentando assim taxas de elevação sanguíneas mais tardias (MILLER & GONÇALVES, 1999). Os dois parâmetros associados indicam que não existe evidência de lesão renal como consequência da resposta ao tumor, e o aumento do ácido úrico reflete apenas a atividade do metabolismo das purinas (Figura 1A e 1C).

O aumento nos níveis de AST, ALT e GGT expressos na Figura 2, sugerem que o tecido hepático é um alvo do câncer de mama, mesmo após a retirada do tumor primário.

As transaminases constituem um grupo de enzimas que catalisam a conversão de aminoácidos e alfacetoácidos por transferência de grupos amino. Encontram-se amplamente distribuídas nos tecidos, sendo que as duas principais enzimas de interesse clínico são a AST (aspartato-aminotransferase) e a ALT (alanina amino-transferase). A AST predomina principalmente no coração, fígado, rins e pâncreas, com valores normais entre 5 a 40 U/L enquanto a ALT distribui-se preferencialmente no fígado, rins e coração, com níveis plasmáticos entre 5 a 35 U/L. (MILLER & GONÇALVES, 1999). As variações destas enzimas observadas neste estudo podem ser associadas à lesão hepática. Esses dados foram confirmados pela demonstração do aumento dos níveis de GGT plasmáticos no grupo câncer (Figura 2C), indicando que esta variação possa ocorrer como resposta à redução dos níveis intracelulares de GSH, já que a GGT atua como receptor deste peptídeo.

A gama-glutamil-transpeptidase ou gama-glutamil-transferase (GGT) é sintetizada principalmente nos hepatócitos e vias biliares, com valores plasmáticos normais entre 1 a 25 U/L. A elevação da GGT encontra-se aumentada nas lesões hepáticas inflamatórias e tóxicas e representa a alteração laboratorial mais freqüente indicadora de lesões hepáticas em 90% dos casos (MILLER & GONÇALVES, 1999).

A Figura 3 mostram que biomarcadores específicos de lesão cardíaca, CK e CKMB, não variaram no grupo CA, excluindo a possibilidade de lesão cardíaca associada ao câncer. Foi observado um aumento significativo nos níveis de LDH (Figura 3C) no grupo CA, que pode estar relacionado a um dano celular inespecífico principalmente no tecido hepático e hematopoiético.

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima presente em diversos tipos celulares que catalisa a oxidação do L-lactato a piruvato. Tem importante relevância clínica no infarto do miocárdio e nos estudos de hepatopatias (MILLER & GONÇALVES, 1999), associada a outros marcadores específicos devido à sua inespecificidade.

A creatino quinase (CK) é uma transfosforilase músculo específica que catalisa a reação na qual o fosfato de creatina cede sua ligação fosfórica ao ADP, gerando ATP. Está presente principalmente no tecido muscular estriado, tecido cerebral e músculo cardíaco, nas subunidades BB (cerebral), MB (tecido cardíaco) e MM (músculo esquelético). Os níveis de atividade da CK total, associados à avaliação da isoforma CK-MB, constituem marcadores específicos de lesão cardíaca aguda (MILLER & GONÇALVES, 1999). Para avaliação de dano tissular intenso, observam-se variações nos níveis de AST, ALT e LDH plasmáticos em níveis bastante elevados.

A anemia é um fenômeno freqüente observado em várias doenças e caracteriza-se por diminuição do número de hemácias no sangue circulante, diminuição do teor de hemoglobina ou ambos os fenômenos associados. Nas anemias hemolíticas observa-se a presença de alterações morfológicas nos eritrócitos, hiperbilirrubinemia e fragilidade osmótica aumentada. A AST e LDH também podem estar aumentadas como marcadores de hemólise (MILLER & GONÇALVES, 1999). A anemia observada em pacientes com câncer é considerada uma anemia de doença crônica, porque as células neoplásicas podem causar redução do número de células vermelhas do sangue através de vários mecanismos, como a supressão direta da hematopoiese pela infiltração da medula óssea, produção de citocinas, ou sangramento crônico no sítio tumoral (WEISS, 2005; BENNET et al. 2008). Pode também ser um preditor de pior prognóstico, pois a redução na contagem de eritrócitos diminui a oxigenação tissular, estabelecendo uma hipóxia sistêmica, com conseqüente sobrecarga cardíaca (CARO et al., 2001; CHAPLER, CAIN, 1983). Estudos clínicos tem demonstrado

que baixos níveis de hemoglobina também conferem aos pacientes com câncer de mama tratados um pior prognóstico, particularmente porque os baixos níveis de oxigênio beneficiam a progressão tumoral através de indução da angiogênese, aumento do potencial de crescimento tumoral e metástases (HOKEL et al.,1996). Desta maneira, o mecanismo e etiologia envolvidos neste processo devem ser investigados através de outros testes, como contagem de reticulócitos, avaliação da ferritina sérica, ferro sérico, concentração de transferrina, níveis de folato, vitamina B12 e testes de Coombs.

A avaliação do hemograma demonstrou redução do número de hemácias (Figura 4A), níveis de hemoglobina (Figura 4B) e uma tendência a diminuição do hematócrito no grupo CA (Figura 4C). A leucocitose evidenciada neste estudo pode ser resultado da ação do estresse agudo sistêmico ou da resposta inflamatória persistente mediada pelo tumor mesmo após sua retirada (Figura 4D).

Sabe-se que qualquer célula, inclusive as hemácias, quando imersas em solução hipotônica absorvem água e intumescem, podendo romper-se no caso de hipotonia excessiva. Desta forma, pode-se avaliar a fragilidade osmótica das hemácias como marcador em diversos tipos de anemias (MILLER & GONÇALVES, 1999).

Durante o estresse oxidativo, a lipoperoxidação é resultado da oxidação de diversos ácidos graxos pelos radicais livres, como os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e outras lipoproteínas plasmáticas (ZAMBURLINI et al., 1995). A lipoperoxidação é uma das principais consequências dos efeitos do estresse oxidativo sobre membranas biológicas, sendo um fenômeno descrito no câncer de mama. Estudos apontam para a lipoperoxidação como um futuro marcador prognóstico e preditivo do câncer de mama humano (GAGO-DOMINGUEZ et al., 2001).

Desta forma, a avaliação da lipoperoxidação plasmática nos fornece um retrato do *status* oxidativo sistêmico. O perfil de lipoperoxidação plasmático (Figura 8), e da membrana eritrocitária (Figura 5), avaliado por quimiluminescência de alta sensibilidade, revelou-se aumentado, indicando significativa elevação dos níveis de lipoperóxidos em pacientes com câncer de mama.

Os níveis de atividade da enzima SOD apresentaram redução estatisticamente significativa no grupo CA (Figura 6C), refletindo o impacto crônico do câncer nestes pacientes. Os estudos sobre a atividade de enzimas antioxidantes em tecido tumoral têm apresentado resultados conflitantes. Assim como nossos dados, Halliwell e Gutteridge (2007) relatam diminuição da atividade das enzimas MnSOD e CuZnSOD em biópsias de tumores de animais. Ray e colaboradores (2000) analisaram os níveis de SOD no tecido tumoral de mulheres portadoras do câncer de mama e demonstraram níveis de radical superóxido e da enzima SOD significativamente mais altos em mulheres portadoras de câncer, independentemente do seu estadiamento clínico. Também avaliando o tecido tumoral de mulheres, Tas et al. (2005) observaram aumento significativo de SOD.

Analisando o sangue de mulheres com câncer de mama, Yeh et al. (2005) mostrou aumento da atividade da enzima SOD como um provável mecanismo compensatório em resposta ao aumento do estresse oxidativo nestas pacientes. A atividade da enzima SOD em eritrócitos também foi avaliada por Abiaka et al. (2002) em pacientes com câncer de mama, câncer gastrointestinal e outros tipos de câncer e, diferentemente de Yeh et al. (2005), foi detectada diminuição significativa da atividade da enzima SOD nos pacientes portadores de câncer. O plasma de mulheres controles e com câncer de mama foi analisado por Agnoletto (2006), não encontrando diferença significativa nos níveis de SOD.

Os níveis de atividade da catalase não apresentaram alteração no grupo CA (Figura 6B). Dados da literatura revelam que ocorrem altos níveis de produção de peróxido de hidrogênio e conseqüente diminuição da enzima catalase no tumor de mulheres com câncer de mama, apontada como conseqüência do aumento de atividade da SOD (RAY et al., 2000).

Rajneesch e colaboradores (2008) relataram aumento da atividade da enzima catalase, assim como da SOD, em mulheres portadoras de cancer de mama.

Além da relação com antioxidantes enzimáticos, a resistência de células contra o estresse oxidativo está associada a altos níveis intracelulares de glutathiona reduzida. Mudanças no estado redox da glutathiona aumentando a liberação de glutathiona oxidada no organismo podem ser causadas pelo estresse oxidativo (ROVER JÚNIOR et al., 2001). Ao determinar os níveis de glutathiona reduzida sanguíneos em mulheres portadoras de câncer de mama, Yeh e colaboradores (2005) também observaram teores reduzidos.

Nossos resultados apontaram níveis reduzidos de GSH no grupo CA (Figura 6D). Estas evidências sugerem o efeito sistêmico do câncer em destruir o equilíbrio entre a produção de radicais livres e a neutralização dos mesmos através do sistema de defesa antioxidante, levando ao estresse oxidativo.

A medida da capacidade antioxidante total (TRAP) no plasma humano indica o equilíbrio entre os antioxidantes de baixo peso molecular e as espécies oxidantes, sendo determinada principalmente pelos níveis de urato, proteínas, ascorbato e vitamina E (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Nosso estudo não revelou diferença estatística entre os grupos (Figura 6A), embora os níveis de GSH apresentem uma significativa redução no grupo CA, indicando que a redução de GSH possa ser compensatório por outro antioxidante de baixo peso, como observado nos altos índices de ácido úrico neste grupo.

A avaliação do TRAP em portadoras de cancer de mama tem revelado resultados inconclusivos e dependentes do tecido analisado. Comparando-se o TRAP de tecido mamário benigno com tumor de mulheres com câncer de mama, Gönenç e colaboradores (2006) detectaram valores mais elevados no tecido cancerígeno, enquanto que no sangue Hietanen e colaboradores (1994) relataram valores significativamente reduzidos em pacientes portadoras de câncer de mama.

Estudos revelam que em parte, a homeostase tumoral é determinada pelos níveis de NO produzidos tanto pelo tumor quanto sistemicamente (PANCE, 2006). Assim, analisamos este parâmetro através da medida dos níveis plasmáticos de nitrito, com o objetivo de identificar a participação de espécies reativas de nitrogênio no estresse oxidativo. A Figura 7 mostra que não houve variação neste parâmetro no grupo CA, indicando assim que o estresse oxidativo observado nestas pacientes não se deve à participação do óxido nítrico, mas devido aos efeitos das EROs.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados revelam pela primeira vez o impacto do câncer no organismo, mesmo após a retirada do tumor primário, através de uma ampla caracterização de parâmetros de toxicidade sistêmica e alterações hematológicas.

O principal efeito da doença foi no tecido hematológico, identificando o estresse oxidativo produzido como um importante mediador de lesão pré-hemolítica nos eritrócitos e sua sustentação no organismo deveram-se tanto ao aumento de espécies reativas quanto à redução das defesas antioxidantes.

Desta forma, este estudo abre uma nova discussão relacionando a manutenção do estresse oxidativo após a retirada do tumor primário como mediador de proliferação e progressão celular e assim responsável pelo aparecimento de novo tumor e disseminação de metástases.

8. REFERENCIAS

1. ABIAKA, C. et al. Activities of erythrocyte antioxidant enzymes in cancer patients. J. Clin. Lab. Anal. 16:167-7, 2002.
2. AEBI H. Catalase *in Vitro*. Methods in Enzymology 105: 121-126, 1984.
3. AGNOLETTO, M. H. Estudo de lesões e reparo de DNA em pacientes com câncer de mama e em fibroblastos humanos. Dissertação de Mestrado do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
4. BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Quim. Nova, v.29, n.1, 113-123, 2006.
5. BARROS, A.C.S.D., BUZAID, A.C. CÂNCER DE MAMA-Tratamento multidisciplinar. São Paulo: Dendrix Edição e Design, 2007.
6. BEGUM, A. N.; TERAQ, J. Protective effects of alpha-tocotrienol against free radical-induced impairment of erythrocyte deformability. Bioscience, Biotechnology & Biochemistry, 66 (2): 398-403,2002.
7. BENZ C C, YAU C. Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax. Nat Rev Cancer, November; 8(11): 875-879,2008.
8. BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Revista de Nutrição, Campinas, 12(2): 123-130,1999.

9. BLOODSWORTH, A.; O'DONNELL, V. B.; FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20:1707-1715, 2000.
10. BOZKIR, A. et al. Ascorbic acid and uric levels in lung cancer patients. *Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics*. 24 (1): 43-47, 1999.
11. CARO JJ, SALAS M, WARD A, et al. Anemia as a independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. *Cancer*; 91: 2214-21, 2001.
12. CECCHINI, A. L.; IAMAMOTO, C. A.; PINGE-FILHO, P.; FERNANDES, P. B.; CECCHINI, R. A bioquímica do óxido nítrico. *In: WATANABE, M. A.; ONO, M, A.; CECCHINI, R.; ITANO, E. N. Tópicos em Patologia Experimental. Londrina: EDUEL, 95-114, 2008.*
13. CHAPLER CK, CAIN SM. Oxigen uptake and blood flow in canine skeletal muscle during moderate and severe anemia. *Can J Physiol Pharmacol*; 61: 178-82, 1983
14. CHAQPAP A, MIDDLETON LP, SAHINN AA, et al. Clinical outcome of patients with lymph node negative breast carcinoma who have sentil lymph node micrometastases detected by immunohistochemistry. *Cancer*; 103: 1581-6, 2005
15. CHENG G, KURITA S, TORIGIAN D A, ALAVI A. Current status of sentinel lymph-node biopsy in patients with breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Aug 11.(Epub ahead of print), 2010.
16. DACIE, J.; LEWIS, S. M.. *Practical Haematology*. 8° ed. Einburgh, Churchill Livingstone. 453p. 1995

17. DICKINSON D. A. FORMAN H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64: 1019-1026, 2002.
18. EBCTCG. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. *Lancet*;365:1687-717, 2005
19. EL-SAYYAD H., ISMAIL M.F., SHALABY F.M., ABOU-EL-MAGD R.F., GAUR, R.L., FERNANDO A., RAJ M.H.G., OUHTIT A. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil(5-FU) on the liver of male albino rats. *Int. J. Biol. Sci.* 5(5):466-473, 2009.
20. FILOMENI G.; ROTILIO G.; CIRIOLO M. R. Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochemical Pharmacology*, 64: 1057-1064., 2002.
21. FITZGIBBONS PL, PAGE DL, WEAVER D, ET AL. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Concensus Statement. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:966-78, 1999
22. FREDERIKSEN, LJ, SULIVAN, R., MAXWELL, L.R. et al. Chemosensitization of cancer in vitro and in vivo by nitric oxide signaling. *Clin Cancer Res.* Apr 1;13(7):2199-206, 2007
23. FURCHGOTT, R.; ZAWADZKI, J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288:373–6, 1980.
24. GAGO-DOMINGUEZ M, CASTELAO JE, PIKE MC, SEVANI A, HAILE RW. Role of lipid peroxidation in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:2829-39, 2005

25. GALARIS D, MANTZARIS M, AMORGIANIOTIS C. Oxidative stress and aging: the potential role of iron. *Hormones* . 7 (2): 114-122, 2008.
26. GHISELLI, A. et al. A Fluorescence-based Method for Measuring Total Plasma Antioxidant capability. *Free Radical Biology & Medicine* 18:29-36, 1995.
27. GONÇALVES T, BENVENIGNU DM, BONFANTI G, FREDIANI AV, ROCHA JBT. δ -ALA-D activity is a reliable marker for oxidative stress in bone marrow transplant patients. *BMC Cancer* 9:138, 2009.
28. GÖNENÇ, A. et al. Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. *Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics*. 26(2): 141-144, 2001.
29. HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: University Press. 3^o Edition. 1999.
30. HENEGHAN HN; MILLER N.; LOWERY AJ et al. Micro RNAs a novel biomarkers for breast cancer. *Journal of Oncology*; v 2010,:1-17, 2009
31. HICKEY,M. PEATE, SAUNDERS,C.M. FRIEDLANDER,M. M.Breast câncer in young women and its impact on reproductive function. *Human Reproduction Update*.v 1, n 1 ; 1-17, 2009.
32. HIETANEN, E. et al. Diet and oxidative stress in breast, colon and prostate cancer patients: a case-control study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 48 (8): 575-86, 1994.
33. HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. D. Glutathiona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química nova*. vol.31. no5. São Paulo, 2008.

34. INJAC R., BOSKOVIC M., PERSE M., KOPRIVEC-FURLAN E., CERAR A., DJORDJEVIC A., STRUKELJ B. *Pharmacological Reports* 60 742-749, 2008.
35. JUNIOR R. L., HÖEHR N. F.; VELLASCO A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, 24: 112-119, 2001.
36. LEE G. R.; BITHELL T.C.; FOERSTER J.; ATHENS J. W.; LUKENS J. N. *Wintrob – Hematologia Clínica*. Monolli Ltda, 1: 104-238, 1998.
37. LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, 18(2): 87-94, 2003.
38. LENFANT F.; LAHET J. J.; VERGELY C.; VOLOT F.; FREYSZ M.; ROCHETTE L. Lidocaine inhibits potassium efflux and hemolysis in erythrocytes during oxidative stress *in vitro*. *General Pharmacology*, 34: 193-199, 2000.
39. MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. N. *Laboratório para o clínico*. Atheneu: São Paulo, 8 edição, 1999.
40. MINISTÉRIO DA SAÚDE.. *Estimativa 2008: Incidência de câncer no Brasil*. Secretaria de atenção à Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Rio de Janeiro (RJ): INCA. p. 1-94, 2007.
41. MORI, M.; GOTOH, T. Arginine metabolism: enzymology, nutrition, and clinical significance. *J. Nutr.*, 134:2820S-2825S, 2004.
42. PANCE, A. Nitric oxide and hormones in breast cancer: allies or enemies?. **Future Oncol.** Apr;2(2):275-88, 2006.

43. PROCTOR, P. H. Uric Acid: neuroprotective or neurotoxic? *Journal of the American Heart Association. STROKEAHA* 107.513242, 2008.
44. RAJNEESCH, C. P. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. *Singapore Med J.* 79 (8): 640, 2008.
45. RAY, G et al. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Research Treatment* 59 (2): 163-170 ICID: 482927, 2000.
46. RENEVEAU, S.; ARNOULD, L., JOLIMOY, G. et al. Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors. *Lab Invest.* Oct;79(10):1215-25, 1999.
47. REPETTO M.; REIDES C.; CARRETERO M. L. G.; COSTA M.; GRIEMBERG G.; LLESUY S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinica Chimica Acta*, 225: 107-117, 1996.
48. ROHAN TE, WONG LJ, WANG T, HAINES J, KABAT GC. Do alterations in mitochondrial DNA play a role in breast carcinogenesis? *J Oncol.* 604304, 2010.
49. ROSS D.; MENDIRATTA S.; QU, Z. C.; COBB, C. E.; MAY, J. M. Ascorbate 6-palmitate protects human erythrocytes from oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 81-89, 1999.
50. ROVER JUNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím. Nova [online]*. vol.24, n.1, pp. 112-119. ISSN 0100-4042. 2001.

51. SANTOS, H. S.; CRUZ, W.M.S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 47 (3): 303-308, 2001.
52. SATO Y.; KAMO S.; TAKAHASHI T.; SUZUKI Y. Mechanism of Free Radical-Induced Hemolysis of Human Erythrocytes: Hemolysis by Water-Soluble Radical Initiator. *Biochemistry*. 34: 8940-8949, 1995.
53. SATO Y.; KANAZAWA S.; SATO K.; SUZUKI Y. Mechanism of Free Radical-Induced Hemolysis of Human Erythrocytes. II. Hemolysis by Lipid-Soluble Radical Initiator. *Biol. Pharm. Bull.* 21 (3): 250-256, 1998.
54. SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25: 192-205, 1968.
55. SILVA M. M. C.; MADEIRA V. M. C.; ALMEIDA L. M.; CUSTODIO J. B. A. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1464: 49-61, 2000.
56. SINGLETON SE, CONNOLLY JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* 56:37-47, 2006.
57. SOUZA M.V.N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Quim. Nova*, vol.27, 2, 308-312, 2004.
58. TAS, F. et al. Oxidative stress in breast cancer. *Medical Oncology*. 22:11-15, 2005.
59. THOMSEN, L.L., MILLES, D. W. Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer Metastasis Rev.* Mar;17(1):107-18, 1998

60. TORSONI M. A.; OGO S.H. Hemoglobin-sulfhydryls from tortoise (*Geochelone carbonaria*) can reduce oxidative damage induced by organic hydroperoxide I erithrocyte membrane. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.* 126: 571-577 2000.
61. USHIO-FUKAI M., NAKAMURA Y. Reactive Oxygen Species and Angiogenesis: NADPH Oxidase as Target for Cancer Therapy. *Cancer Lett.* July 18; 266(1): 37–52, 2008.
62. VAN ZEE KJ, MANASSEH DM, BEVILACQUA JL, ET AL. A nomogram for predicting the likelihood of additional nodal metastases in breast cancer patients with a positive sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol* 2003;10:1140-51.
63. YEH, C. et al. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clinica Chimica Acta* 361: 104-111, 2005.
64. ZHANG J, RUBIO V., ZHENG S., SHI Z. Knockdown of OLA1, a regulator of oxidative stress response, inhibits motility and invasion of breast cancer cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 2009 10(11):796-804
65. ZWART LL, MEERMAN JHN, COMMANDEUR JNM, VERMEULEN NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radicals & Biology Medicine* 1999;26(1/2):202-26.
66. ZOU, C. G.; AGAR, N. S.; JONES, G. L.. 2001. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. *Life Science.* 69: 75-86.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)