

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
CURSO DE MEDICINA**

**KARLLA RACKELL FIALHO CUNHA
NÁGILLA MOREIRA CORDEIRO**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES COM CÂNCER DE
MAMA**

**CHAPECÓ
2022**

KARLLA RACKELL FIALHO CUNHA
NÁGILLA MOREIRA CORDEIRO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES COM CÂNCER DE
MAMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como parte dos requisitos para obtenção do grau de Médico(a).

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

Coorientador: Prof^ª. Dr^ª. Débora Tavares de Resende e Silva

CHAPECÓ

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS

Cunha, Karlla Rackell Fialho; Cordeiro, Nágilla Moreira
AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES COM CÂNCER
DE MAMA / Karlla Rackell Fialho Cunha, Nágilla Moreira
Cordeiro, Daiane Manica, Debora Tavares de Resende e
Silva, Marcelo Moreno, Sarah Franco Vieira de Oliveira
Maciel. -- 2022.
30 f.:il.

Orientadora: Doutora Sarah Franco Vieira de Oliveira
Maciel

Coorientadores: Doutora Debora Tavares de Resende e
Silva, Mestranda Daiane Manica

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina, Chapecó, SC, 2022.

1. Estresse oxidativo; Câncer de mama; Antioxidantes
enzimáticos; Antioxidantes não enzimáticos; Espécies
reativas de oxigênio.. I. Manica, Daiane II. Silva,
Debora Tavares de Resende e III. Moreno, Marcelo IV.

Maciel, Sarah Franco Vieira de Oliveira V. Maciel,
Sarah Franco Vieira de Oliveira, orient. VI. Silva,
Debora Tavares de Resende e, co-orient. VII. Manica,
Daiane, co-orient. VIII. Universidade Federal da
Fronteira Sul. IX. Título.

KARLLA RACKELL FIALHO CUNHA

NÁGILLA MOREIRA CORDEIRO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES COM CÂNCER DE
MAMA**

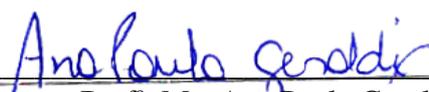
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de bacharel em medicina.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 23 / 08 / 2022.

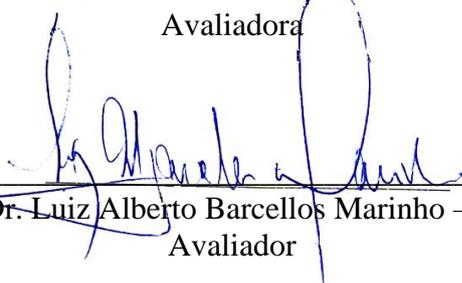
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel – UFFS
Orientadora



Prof.^a Ms. Ana Paula Geraldi
Avaliadora



Prof. Dr. Luiz Alberto Barcellos Marinho – UFFS
Avaliador

AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Karlla Rackell Fialho Cunha*
Nágilla Moreira Cordeiro**
Daiane Manica***
Debora Tavares de Resende e Silva****
Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel*****

RESUMO

Introdução: O câncer de mama (CM) é uma doença com elevada incidência mundial. Diante desse cenário, conhecer mecanismos associados à gênese e evolução das neoplasias malignas de mama, no intuito de trazer novas ferramentas que possam permitir a detecção precoce ou terapêuticas mais eficientes, é extremamente relevante. Evidências têm destacado o papel do estresse oxidativo na gênese, invasão e metastatização do câncer. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes, a favor do primeiro. Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (EROs) são agentes oxidantes que podem ocasionar danos em nível celular, a proteínas, lipídeos e ao DNA. Os agentes antioxidantes, ao contrário, atuam reparando os danos oriundos dos compostos oxidantes. **Objetivo:** Avaliar o perfil oxidativo de pacientes diagnosticadas com CM previamente ao tratamento cirúrgico e/ou farmacológico. **Métodos:** Trata-se de estudo transversal, de análise quantitativa, observacional, em que foram avaliadas amostras de sangue de 24 de pacientes com diagnóstico de CM, não submetidas a qualquer tratamento no momento da coleta, e de 35 indivíduos controles pareados por sexo e por idade. O perfil antioxidante enzimático foi analisado por meio da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD); já o perfil antioxidante não enzimático através da dosagem de ácido ascórbico e da determinação dos grupamentos tióis (SH) proteicos (PSH) e não proteicos (NPSH). Por sua vez, os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da mieloperoxidase (MPO) foram utilizados como marcadores oxidativos. Informações referentes ao histórico patológico e progresso foram coletadas nos prontuários dos pacientes. Os dados obtidos foram analisados pelos métodos estatísticos do teste T de Student e através da correlação de Pearson. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. **Resultados:** Verificou-se que a atividade não enzimática antioxidante, no que tange os níveis de ácido ascórbico e de NPSH, foi maior entre as mulheres sem câncer em comparação às pacientes com CM. Todavia, em relação ao nível de PSH, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos analisados. Ademais, observou-se um aumento significativo da atividade da enzima MPO entre as pacientes com diagnóstico de CM em relação aos controles. De maneira similar, os níveis de TBARS também foram

*Graduanda do Curso de Medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul. karlla.cunha@estudante.uffs.edu.br.

**Graduanda do Curso de Medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul. E-mail: nagilla.cordeiro@estudante.uffs.edu.br.

***Mestranda – Universidade Federal da Fronteira Sul. E-mail: daianemanica2011@gmail.com

****Docente do Curso de Medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul. Doutora. E-mail: debora.silva@uffs.edu.br.

*****Docente do Curso de Medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul. Doutora. E-mail: sarah.maciel@uffs.edu.br.

significativamente maiores entre as pacientes com CM. As análises da atividade oxidativa entre os subtipos moleculares luminal A e luminal B do CM não revelaram diferença estatisticamente significativa na maioria dos marcadores utilizados, excetuando para a atividade enzimática antioxidante da SOD, que se apresentou maior entre mulheres com tumores luminais B. Por fim, a avaliação do perfil oxidativo das pacientes que apresentavam metástase em linfonodos em relação àquelas que não apresentavam metástase linfonodal não revelaram diferença estatisticamente significativa para os antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos, bem como para os níveis de TBARS. A análise da MPO mostrou-se significativamente mais elevadas entre o grupo de pacientes com CM que apresentavam metástases em linfonodos. Conclusão: Os dados levantados apontam para níveis antioxidantes reduzidos em detrimento do aumento dos marcadores oxidativos nas pacientes com CM, demonstrando que a carcinogênese e a proliferação tumoral influenciam no aumento da produção de EROs, o que torna um ambiente propício para progressão celular e crescimento tumoral. Todavia, trabalhos com parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em uma amostra maior de pacientes, no intuito de explorar a associação com a neoplasia maligna de mama, são necessários. Somado a isso, as divergências encontradas na literatura no que tange a correlação do estado antioxidante e oxidante com o surgimento e progressão do câncer, também apontam para necessidade de outras investigações, sobretudo quando consideramos a heterogeneidade das neoplasias de mama.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Câncer de mama; Antioxidantes enzimáticos; Antioxidantes não enzimáticos; Espécies reativas de oxigênio.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) ocupa o primeiro lugar na incidência dos tipos de câncer mais diagnosticados no mundo e o segundo lugar no índice de morte. Trata-se da neoplasia maligna que mais acomete a população feminina, sendo também a segunda causa de morte por câncer nessa população. No ano de 2020 correspondeu a 11,7% de todos os carcinomas diagnosticados no mundo, com 2.261.419 milhões de novos casos estimados e com 684.996 mortes nesse mesmo ano (SUNG *et al.*, 2021). Apesar da elevada mortalidade e prevalência, o CM é o terceiro tipo de câncer com maior índice de sobrevivência mundial (SIEGEL *et al.*, 2021).

No contexto atual, os cânceres de mama podem ser classificados de acordo com sua histopatologia e estrutura molecular. Em relação à histopatologia são divididos em carcinoma *in situ*, ou seja, aqueles que não ultrapassam as estruturas ductais e lobulares das mamas; e em carcinomas invasivos, que são aqueles que ocupam outros tecidos e órgãos (ZUBAIR; WANG; ALI, 2021). No que diz respeito à análise molecular, as neoplasias malignas de mama são classificadas segundo a presença ou ausência de determinados marcadores tumorais (ANDERSON; SCHWAB; MARTINEZ, 2014).

Dentre os biomarcadores tumorais, a expressão do receptor de estrogênio (RE), do receptor de progesterona (RP) e do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) configuram-se entre os principais (ANDERSON; SCHWAB; MARTINEZ, 2014). Desse modo, os biomarcadores categorizam o CM em quatro subtipos moleculares: Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER2 e Triplo Negativo (ZUBAIR; WANG; ALI, 2021). Os tumores do subtipo luminal A são todos aqueles que possuem positividade para RE e RP, ou ao menos um deles, negatividade para o HER2 e baixa fração proliferativa. Esses tumores cursam com um prognóstico mais favorável que os outros e índice de replicação celular lento. Já os tumores luminais B também expressam receptores hormonais, porém apresentam graus variáveis de expressão RE/RP e podem ou não expressar o HER2. Quanto ao prognóstico, são

mais agressivos que o primeiro e possuem altas taxas de proliferação celular. O terceiro subtipo, os de superexpressão do receptor HER2, são negativos para RE/RP e caracterizam-se pela sua agressividade e alta taxa proliferativa. Por último, os tumores de mama triplo negativos não expressam nenhum receptor hormonal ou o HER2, usualmente acometem mulheres jovens, são altamente mitóticos e possuem prognóstico ruim (HUNTER *et al.*, 1993; ZUBAIR; WANG; ALI, 2021).

Diante da elevada incidência, morbimortalidade, bem como da heterogeneidade clínica, biológica e morfológica, o CM configura-se como uma doença complexa. Assim, conhecer mecanismos associados à origem e evolução das neoplasias malignas de mama, no intuito de se levantar ferramentas que possam permitir a detecção precoce ou terapêuticas mais eficientes é extremamente relevante. Crawford (2014) em relação a isso destaca que mutações genéticas que interferem na proliferação celular provavelmente não são os únicos determinantes da progressão do câncer, sendo a oxidação-redução desregulada também essencial nesse processo.

Em condições fisiológicas do metabolismo aeróbio 95-99% do oxigênio (O_2) passa por uma redução tetravalente, com a recepção de quatro elétrons, formando água (H_2O). Porém, o restante do O_2 inspirado, cerca de 2-5%, gera intermediários reativos dentre os quais radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxil (HOO), hidroxil (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), denominados de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (FRIDOVICH, 1999). Tais radicais medeiam várias reações bioquímicas, possibilitando, por exemplo, a geração de adenosina trifosfato (ATP), a fertilização do óvulo, a ativação gênica, além de contribuírem na defesa diante de uma infecção. Porém, quando em excesso podem ocasionar danos oxidativos aos tecidos. Diante disso, mecanismos antioxidantes atuam limitando os níveis intracelulares de tais espécies reativas (BARBOSA *et al.*, 2010).

Nessa conjuntura, o estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes, a favor do aumento de radicais livres, especialmente das EROs (BARBOSA *et al.*, 2010). Em relação às EROs, sabe-se que constituem um subproduto do metabolismo do oxigênio, formado em decorrência da redução incompleta do oxigênio. Tais espécies são produzidas intracelularmente, principalmente pelas mitocôndrias, um processo que é aumentado pelo envelhecimento, bem como pela exposição a carcinógenos, a radiação e a outras toxinas ambientais (KOVACIC, OSUNA, 2000; WARDMAN, 2001). Ademais, o estresse oxidativo também pode ser proveniente da redução da atividade antioxidante enzimática (FRANKEL, 2005).

O desequilíbrio oxidativo pode ocasionar a oxidação e conseqüentes modificações no DNA, em moléculas proteicas, lipídicas e em carboidratos, o que tem potencial para promover lesão tecidual e perda das funções biológicas (FRANKEL, 2005). Posto isso, Ferrari (2004) descreve que a produção elevada de radicais livres está associada a modificações patológicas implicadas em processos cardiovasculares, carcinogênicos e neurodegenerativos.

Em relação ao potencial carcinogênico, Klaunig e Kamendulis (2004) descrevem que o estresse oxidativo encontra-se associado à ativação das vias de sinalização celular, incluindo aquelas relacionadas à proliferação celular tumoral, ao aumento da migração de células tumorais, bem como envolvidas na elevação dos fatores pró-angiogênicos. Ainda, os autores dizem que os mecanismos do estresse oxidativo podem influenciar tanto a progressão quanto a metástase do câncer. Em consonância, Gorrini, Harris e Mak (2013) enfatizam que o aumento das EROs e o alto estresse oxidativo resultante constituem as principais características dos tumores malignos.

Remetendo-se aos tumores de mama, levanta-se que a própria constituição da mama propicia a existência de um ambiente pró-oxidante (PANIS *et al.*, 2015). O tecido adiposo da mama possibilita a existência de uma síntese elevada de EROs, esses, por sua vez, atuam sobre

o tecido circundante afetando as funções celulares e produzindo metabólitos ativos que participam da progressão tumoral (MENCALHA *et al.*, 2014).

A associação entre o excedente de EROs e o prognóstico no CM é descrita vastamente na literatura. De Sá Junior *et al.* (2017) dissertam que os radicais livres em excesso podem favorecer a interação dessas moléculas com o DNA, promovendo *crosslinking* inter e intracadeia, o que criaria um microambiente favorável ao surgimento de metástases à distância. Corroborando com isso, Panis *et al.* (2012) em seu estudo, apontam que o aumento do estresse oxidativo pode ser crucial para a progressão do câncer a estágios mais avançados. Ainda, os elevados níveis de peroxidação lipídica aparentemente associam-se com a recorrência da doença (HERRERA *et al.*, 2014).

Desse modo, uma maneira de se observar a oxidação tumoral é a identificação e quantificação de marcadores provenientes de reações secundárias à superprodução oxidativa. O TBARS, é o mais expressivo biomarcador proveniente da peroxidação lipídica (MAYNE, 2003), enquanto a mieloperoxidase (MPO) é utilizada para avaliar os níveis de oxidação por sua produção pelos leucócitos (LAZAREVIC-PASTI; LESKOVAC; VASIC, 2015).

Já em relação aos agentes antioxidantes, esses correspondem a substâncias enzimáticas ou não enzimáticas capazes de inibir a oxidação. Dentre os compostos enzimáticos sabe-se que o sistema formado pela atividade de enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) é o mais eficiente (BONNEFOY; DRAI; KOSTKA, 2002). No que tange os agentes não enzimáticos temos, dentre outros, os tióis e as vitaminas C, D e E (MASELLA *et al.*, 2005). Ressalta-se que as defesas antioxidantes enzimáticas ou não-enzimáticas são importantes visto que protegem o organismo e, conseqüentemente, previnem o desenvolvimento do câncer e de outras doenças (MASUTANI, 2000).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar o perfil oxidativo de pacientes diagnosticadas com CM previamente ao tratamento cirúrgico e/ou farmacológico.

2 METODOLOGIA

2.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, de análise quantitativa, do tipo observacional. Para Stake (1982), a pesquisa quantitativa decodifica em números as opiniões e informações para serem classificadas e analisadas, utilizando para isso técnicas estatísticas. Por sua vez, o estudo transversal caracteriza-se por contemplar uma situação ou fenômeno em um momento não definido, assim, envolve a presença de uma doença, por exemplo, e constitui-se como um corte instantâneo (HADDAD, 2004). Por fim, o fato de ser observacional relaciona-se à ausência de intervenção do pesquisador, que atua apenas observando o paciente, o transtorno ou a doença (CAMPANA *et al.*, 2001).

2.2 SELEÇÃO DO LOCAL E DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

O estudo compreendeu mulheres com diagnóstico de CM, previamente o início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico, admitidas no período da pesquisa para tratamento cirúrgico no serviço público de referência em tratamento oncológico da região oeste de Santa Catarina (SC), Associação Hospitalar Lenoir Vargas Ferreira - Hospital Regional do Oeste (HRO), com sede na cidade de Chapecó - SC. O grupo controle abrangeu mulheres com a

mesma idade das pacientes, ou no máximo, três anos a mais ou a menos, sem histórico de neoplasias malignas.

Dessa maneira, foram incluídos no grupo de pacientes do estudo: mulheres; procedentes do oeste de Santa Catarina; diagnosticadas por médico especialista com carcinoma mamário invasor; que não haviam sido submetidos a procedimentos cirúrgicos para retirada do tumor ou a terapia neoadjuvante (quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, imunoterapia, terapia de precisão); e que concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). No que concerne aos indivíduos controles, esses foram incluídos com base no pareamento por idade (três anos a mais ou a menos) e sexo em relação ao grupo de pacientes. Os demais critérios de inclusão compreenderam: não ter história, suspeita ou diagnóstico de câncer de qualquer tipo e assinatura do TCLE.

2.3 COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Na pesquisa foram coletadas amostras de sangue de ambos os grupos, paciente e controle, e dados clínicos em prontuário das pacientes. As pacientes foram convidadas a participar do estudo e esclarecidas quanto ao teor da pesquisa e possíveis riscos no dia do procedimento cirúrgico, em horário antecedente àquele em que a cirurgia estava agendada. O contato ocorreu em sala reservada do setor de oncologia ou do bloco cirúrgico do HRO. As coletas das amostras de tecido sanguíneo foram realizadas previamente ao ato operatório, no centro cirúrgico do referido hospital, por enfermeiros, técnicos de enfermagem e/ou anestesistas da equipe hospitalar, no momento da punção venosa periférica.

Por sua vez, para abordagem dos indivíduos do grupo controle os pesquisadores envolvidos realizaram buscas ativas de participantes, utilizando para isso as mídias eletrônicas. As intervenções foram agendadas e aconteceram nas respectivas residências dos voluntários, em igrejas e em centros comunitários; com a coleta das amostras sanguíneas realizadas por uma profissional da enfermagem. Dados relativos à idade e história médica foram levantados pelos pesquisadores, através de uma breve entrevista antes da coleta do sangue, para observância dos critérios de exclusão.

O material, 20 ml de sangue total, foi coletado em tubos *vacutainer* com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), em tubos contendo citrato e em tubos com gel ativador de coágulo; e transportadas, sob refrigeração, ao laboratório de pesquisa da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), onde foram processados para separação de sangue total, plasma e soro. Assim, do tubo com ativador de coágulo foi obtido o soro, para isso a amostra foi centrifugada a 3500 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos. Já a partir dos tubos com EDTA foi separado o plasma, para tal o material coletado foi também centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos. Por fim, das amostras de sangue coletadas com citrato foram obtidos, após homogeneizar os tubos, 500 µl de sangue total. Seguindo-se o processamento, as amostras foram congeladas em freezer a -80 °C para posteriores análises bioquímicas.

No que tange às informações clinicopatológicas obtidas através da consulta aos prontuários das pacientes com CM, essas abrangeram a busca de dados sobre idade, subtipo histológico e molecular do tumor, grau do tumor e presença de metástases. As coletas das amostras de tecido sanguíneo e dos dados dos prontuários médicos das pacientes ocorreram de julho de 2019 a março de 2022.

2.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

2.4.1 Análise da atividade enzimática antioxidante

2.4.1.1 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

Para quantificar a atividade da enzima SOD utilizou-se amostras de sangue total. Inicialmente, para chegar a uma concentração de 2 mg/ml de proteínas no sangue demandado na técnica, foi necessário realizar a determinação das proteínas totais de acordo com o método de Bradford (1976). Para tal, empregou-se o corante de Coomassie azul brilhante BG-250 e albumina de soro bovino como padrão.

Por sua vez, a atividade da SOD foi determinada de acordo com a técnica de McCord e Fridovich (1969), adaptada para microplacas. Essa técnica prevê a formação de adrenocromo, em um meio de reação contendo tampão glicina e adrenalina, pela oxidação da adrenalina, estando pautado no princípio de que quanto maior a atividade da SOD menos adrenocromo é formado. No estudo, as amostras foram aliqüotadas e normatizadas para 2 mg/ml com tampão fosfato-salino (10 mM; pH 7,2). Volumes distintos de glicina (50 mM; pH 10,5) foram pipetados nos poços (190 µL, com redução de 5 µL a cada poço); além desse, foi adicionado 5 a 25 µL de proteínas, com aumento de 5 µL a cada poço, exceto naquele destinado a mensurar o branco. Feito isso, procedeu-se com a leitura da absorbância inicial a 480 nanômetros (nm) modo *endpoint*. Após, seguiu-se com a pipetagem de 5 a 10 µL de adrenalina e leitura da absorbância final no modo cinético a 480 nm por 10 minutos com intervalos de 30 segundos. Os testes foram feitos em triplicatas e os resultados foram expressos em unidades de SOD por miligrama (SOD/mg) de proteína.

2.4.2 Análise da atividade não enzimática antioxidante

2.4.2.1 Dosagem dos grupamentos tíóis proteicos (PSH) e não proteicos (NPSH)

Os PSH e NPSH foram mensurados a partir de amostras de soro pela reação espontânea dos tíóis com 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoato (DTNB), de acordo com a técnica de Ellman (1959). Para análise dos NPSH adicionou-se 150 µL de soro a 150 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, que em seguida foi agitado em vórtex e centrifugado a 2.000 rpm por dez minutos. Desse processo, retirou-se o conteúdo desproteínizado incolor com NPSH livres, sendo que 40 µL desse conteúdo foram adicionados a microplaca juntamente com 200 µL de tampão fosfato de potássio (TFK) (1 M; pH 6,8) e com 20 µL de DTNB (10 mM). Já para definir os PSH foi pipetado na microplaca 30 µL de soro não desproteínizado, 260 µL de TFK e 15 µL de DTNB. A coloração formada pelas reações foram medidas pelo espectrofotômetro a 412 nm. Os testes foram feitos em triplicatas e os resultados relatados em µmol/L de soro.

2.4.2.2 Dosagem do ácido ascórbico

A determinação quantitativa de ácido ascórbico foi feita a partir do soro, de acordo com a metodologia descrita por Roe e Kuerther (1943), adaptada para microplaca. As proteínas foram precipitadas com TCA, para isso, a 500 µl de amostra de soro foram adicionados 500 µl de TCA a 10%, seguido de agitação em vórtex e centrifugação a 3500 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, foi aliqüotado em microplaca 100 µl de sobrenadante livre de proteína, 20 µl de reagente dinitrofenilhidrazina (DNPH) em ácido sulfúrico contendo tiouréia e sulfato de

cobre e 25 µl de água destilada. Procedeu-se com a incubação à 37 °C por 120 minutos. Os testes foram feitos em triplicatas e a quantidade de ácido ascórbico foi determinada através do espectrofotômetro em 520 nm e os resultados relatados em µmol/L de soro.

2.4.3 Determinação dos danos oxidativos

2.4.3.1 Dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As concentrações de TBARS foram dosadas a partir do soro e determinadas de acordo com a técnica de Jentzsch *et al.* (1996) modificada. As amostras de 20 µL de soro foram tratadas quimicamente com solução de 100 µL de ácido ortofosfórico a 0,2 M; com solução alcalina de 25 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,1 M e com 55 µL de água destilada, aquecidas por 45 minutos a 95 °C. Esse método baseia-se na mensuração de subprodutos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), resultante do estresse oxidativo sobre as membranas lipídicas celulares. A absorbância do cromógeno, formado como resultado da reação do MDA com o TBA, foi mensurada espectrofotometricamente a 532 nm, e os resultados relatados em µmol/L de soro.

2.4.3.2 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO foi medida a partir do plasma com EDTA, conforme técnica de Suzuki *et al.* (1983), modificada para microplaca. Assim, foi adicionado na microplaca, em triplicata, 12 µl de plasma, 170 µl de H₂O₂ 1,7 mM, e 148 µl de aminoantipirina (AAP) 2,5 mM com fenol 20 mM. No branco, o plasma foi substituído por água destilada. A solução foi colocada em banho-maria por trinta minutos a 37 °C e lidas pelo espectrofotômetro a 492 nm. Na presença de H₂O₂ como agente oxidante, a MPO catalisa o acoplamento oxidativo de fenol e AAP, produzindo a quinoneimina, um produto de coloração rósea e absorbância máxima de 500 nm. O cálculo da atividade foi realizado multiplicando-se a absorbância pelo fator de correção da técnica de Suzuki *et al.* (1983), estabelecido como 14.

2.5 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os dados obtidos foram primeiramente testados quanto a sua normalidade, e em seguida analisados pelos métodos estatísticos do teste T de Student e através da correlação de Pearson para avaliação de associações entre as variáveis pesquisadas. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$. Para o estudo foram eliminados os *outliers*.

2.6 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Fronteira Sul, tendo sido aprovado sob parecer nº 3.421.380, na data 27 de junho de 2019, e está de acordo com as normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

3 RESULTADOS

No estudo participaram 59 mulheres, sendo 24 pacientes e 35 controles. A média de idade das participantes com CM foi de $59,29 \pm 13,57$ anos, e dos controles sem câncer $59,11 \pm 12,79$ anos, com $p=0,2372$. A caracterização histológica e imunohistoquímica dos tumores nas pacientes com CM, bem como a distribuição quanto a presença de metástase, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição das pacientes com CM segundo características histológicas e imunohistoquímicas dos tumores e presença de metástase.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	PACIENTES CÂNCER DE MAMA (n=24)
Características gerais:	
Idade média (DP)	59,29 ± 13,57
Tipo histológico do tumor [n (%):	
Carcinoma ductal invasivo	13 (54,17%)
Carcinoma invasivo não especificado	8 (33,33%)
Carcinoma mucinoso	2 (8,33%)
Carcinoma lobular invasivo	1 (4,17%)
Grau histológico [n (%):	
Grau 1	3 (12,5%)
Grau 2	16 (66,67%)
Grau 3	4 (16,67%)
Sem informação no prontuário	1 (4,16%)
Metástase nos linfonodos [n (%):	
Não	15 (62,5%)
Sim	7 (29,16%)
Sem informação no prontuário	2 (8,33%)
Metástase à distância [n (%):	
Não	17 (70,83%)
Sim	2 (8,33%)
Sem informação no prontuário	4 (16,66%)
Não avaliado	1 (4,16%)
Imuno-histoquímica	
Receptor Hormonal [n (%):	
Negativo	2 (8,33%)
Positivo	22 (91,67%)
HER-2 [n (%):	
Negativo	19 (79,16%)
Positivo	4 (16,67%)
Sem informação no prontuário	1 (4,17%)
Tipo de tumor [n (%):	
Luminal A	10 (41,66%)
Luminal B	12 (50%)
Superexpressão de HER-2	1 (4,16%)
Triplo Negativo	1 (4,16%)

Fonte: elaborado pelos autores (2022).

Em relação aos subtipos histológicos dos tumores, 13 pacientes apresentavam Carcinoma Ductal Invasor (54,17%), duas possuíam Carcinoma Mucinoso (8,33%), uma Carcinoma Lobular Invasor (4,17%) e oito (33,33%) não tiveram o subtipo histológico descrito em prontuário. A grande maioria, 16 pacientes (66,67%), tinham tumores classificados como

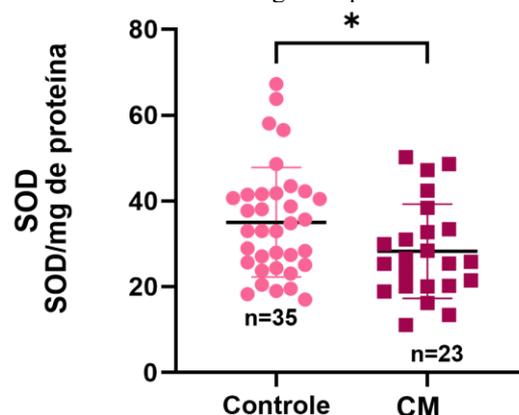
de grau 2; três (12,5%) como grau 1; quatro (16,67%) como grau 3; e uma (4,16%) não tinha especificado em prontuário o grau tumoral. Já no que concerne a estratificação molecular, 10 das participantes do estudo possuíam tumores do subtipo luminal A (41,66%); nove luminal B-HER2 negativo e três luminal B-HER2 positivo, totalizando 12 pacientes (50%) com subtipo luminal B; uma (4,16%) com tumor designado como de superexpressão de HER-2; e uma (4,16%) apresentava o subtipo triplo negativo. A positividade para o RE e/ou RP foi descrita no prontuário de 22 pacientes (91,67%), enquanto duas (8,33%) não possuíam descrição de tais receptores hormonais. Os receptores HER-2 foram positivos em quatro pacientes (16,67%), negativos em 19 (79,16%) e uma paciente não possuía informação em prontuário.

Ressalta-se que apenas duas mulheres (8,33%) apresentavam especificado em prontuário a presença de metástase à distância, existindo ainda uma outra cuja metástase a distância não pode ser avaliada; todas essas três possuíam tumores do subtipo luminal A de grau 2. Porém, em quatro pacientes (16,66%) não foram encontradas informações referentes à presença ou ausência de metástase à distância. Já no que tange a presença de metástase linfonodal, 7 pacientes (27,16%) possuíam metástases para linfonodos descritas, enquanto em 15 (62,5%) tal quadro não foi registrado. Informações quanto à presença ou não de metástase linfonodal não foi possível para duas voluntárias com CM (8,33%), uma vez que não foi encontrado nenhum registro referente a isso no prontuário.

3.1 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE DA SOD

No gráfico 1 é apresentado o nível da enzima SOD nas pacientes com CM ($n=23$; $28,29 \pm 10,99$ SOD/mg de proteína) e no grupo controle ($n=35$; $35,05 \pm 12,77$ SOD/mg de proteína), segundo a média e o desvio padrão da média. A partir da análise estatística, constatou-se que havia um aumento significativo ($p=0,0419$) da atividade da SOD no grupo controle, quando comparado com o grupo das pacientes com CM.

Gráfico 1 – Atividade da SOD no sangue de pacientes com CM e no grupo controle

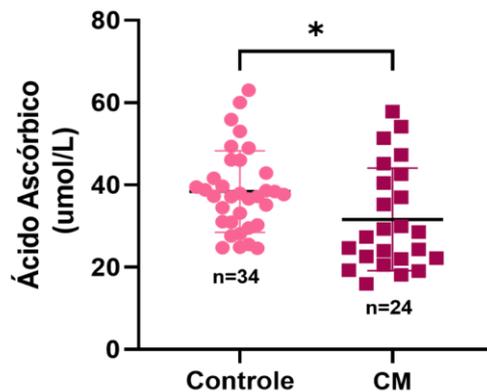


Fonte: elaborado pelos autores (2022).
CM= câncer de mama; * $p=0,0419$; grupo controle $35,05 \pm 12,77$ SOD/mg de proteína; grupo CM $28,29 \pm 10,99$ SOD/mg de proteína.

3.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE NÃO ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE

Através dos gráficos 2 e 3 que apresentam, respectivamente, os níveis de ácido ascórbico e de NPSH, verificou-se que a atividade não enzimática antioxidante em relação a esses dois marcadores foi maior entre as mulheres sem câncer em comparação às pacientes com CM. Assim, os níveis de ácido ascórbico no grupo controle (n=34) foi de $38,43 \pm 9,89 \mu\text{mol/L}$, e nas mulheres com câncer (n=24) foi de $31,65 \pm 12,46 \mu\text{mol/L}$, com $p=0,0247$. Por sua vez, o nível de NPSH foi de $0,74 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$ nas pacientes com CM (n=24), e de $0,79 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$ naquelas sem câncer relatado (n=33), com $p=0,0428$. Já no que tange o nível de PSH, visualizado através do gráfico 4, não foi verificada diferenças significativas entre os grupos analisados, tendo sido de $5,35 \pm 1,14 \mu\text{mol/L}$ nas pacientes com CM (n=20), e de $4,93 \pm 0,58 \mu\text{mol/L}$ no grupo controle (n=29), com $p=0,980$.

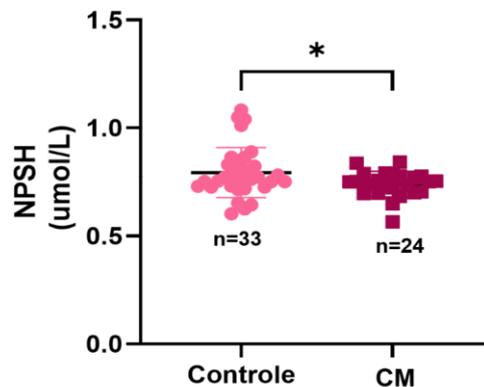
Gráfico 2 – Concentração de ácido ascórbico no soro de pacientes com CM e no grupo controle



Fonte: elaborado pelos autores (2022).

CM=câncer de mama; * $p=0,0247$; grupo controle $38,43 \pm 9,89 \mu\text{mol/L}$; grupo CM $31,65 \pm 12,46 \mu\text{mol/L}$.

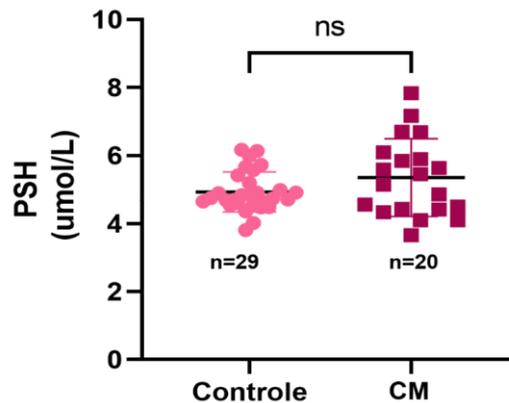
Gráfico 3 – Concentração de NPSH no soro de pacientes com CM e no grupo controle



Fonte: elaborado pelos autores (2022).

CM= câncer de mama; * $p=0,0428$; grupo controle $0,79 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$; grupo CM $0,74 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$.

Gráfico 4 – Concentração de PSH no soro de pacientes com CM e no grupo controle



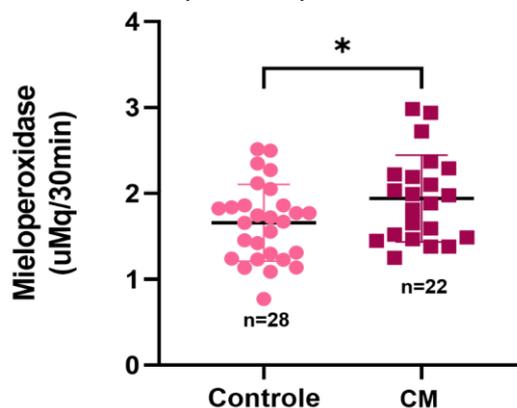
Fonte: elaborado pelos autores (2022).
 CM= câncer de mama; ns=não significativo; grupo controle $4,93 \pm 0,58$ $\mu\text{mol/L}$; grupo CM $5,35 \pm 1,14$ $\mu\text{mol/L}$.

3.3 ANÁLISE DOS MARCADORES OXIDATIVOS

A análise do gráfico 5, que apresenta a atividade da MPO, permitiu inferir que havia um aumento significativo ($p=0,0405$) da atividade da enzima MPO entre as pacientes com diagnóstico de CM ($1,94 \pm 0,5047$ $\mu\text{Mq}/30$ min, $n=22$) em relação ao controle, composto pelas mulheres sem câncer ($1,65 \pm 0,44$ $\mu\text{Mq}/30$ min, $n=28$).

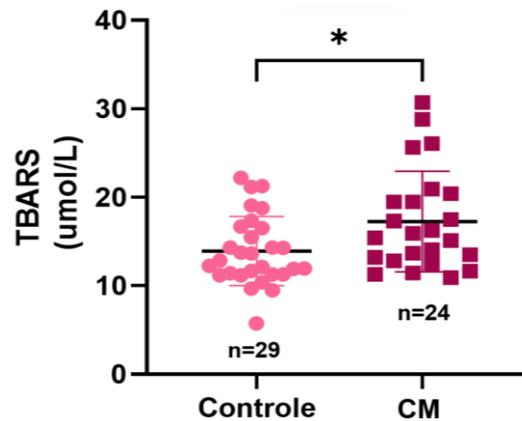
De maneira similar, os níveis de TBARS também foram significativamente maiores entre as pacientes com CM (grupo CM $17,26 \pm 5,69$ $\mu\text{mol/L}$, $n=24$; grupo controle $13,91 \pm 3,90$ $\mu\text{mol/L}$, $n=29$; $p=0,0143$), conforme pode-se observar no gráfico 6.

Gráfico 5 – Atividade da MPO no plasma de pacientes com CM e no grupo controle.



Fonte: elaborado pelos autores (2022).
 CM= câncer de mama; * $p=0,0405$; grupo controle $1,65 \pm 0,44$ $\mu\text{Mq}/30$ min; grupo CM $1,94 \pm 0,5047$ $\mu\text{Mq}/30$ min.

Gráfico 6 – Concentração de TBARS no soro de pacientes com CM e no grupo controle.



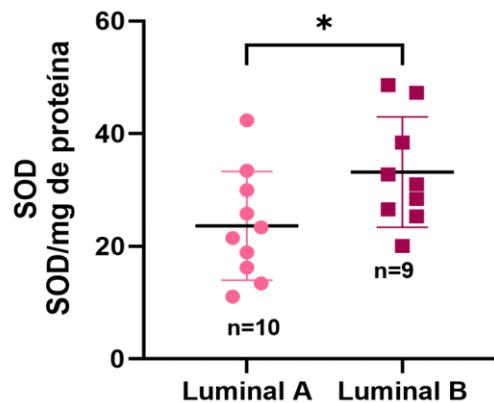
Fonte: elaborado pelos autores (2022).

CM= câncer de mama; * $p=0,0143$; grupo controle $13,91 \pm 3,90$ $\mu\text{mol/L}$; grupo CM $17,26 \pm 5,69$ $\mu\text{mol/L}$.

3.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE OXIDATIVA NOS SUBTIPOS DE CM

As análises da atividade oxidativa entre as paciente com tumores dos subtipos moleculares luminal A e luminal B, com esse último englobando os tumores descritos como luminal B-HER2 negativo e os luminal B-HER2 positivo, não revelaram diferença estatisticamente significativa na maioria dos marcadores utilizados, excetuando para a atividade enzimática antioxidante da SOD, que apresentou-se significativamente maior ($p=0,0471$) entre as pacientes com tumores categorizados como luminal B ($33,17 \pm 9,80$ SOD/mg de proteína, $n=9$) em relação ao grupo formado pelas pacientes com tumores do tipo luminal A ($23,62 \pm 9,63$ SOD/mg de proteína, $n=10$), conforme apresentado no gráfico 7. Análises dos demais subtipos moleculares não foram possíveis em decorrência da baixa amostragem.

Gráfico 7 – Atividade da SOD no sangue pacientes com tumores luminal A e luminal B



Fonte: elaborado pelos autores (2022).

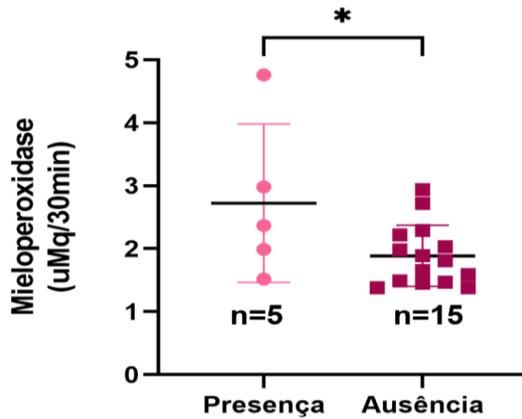
* $p=0,0471$; Luminal A $23,62 \pm 9,63$ SOD/mg de proteína; Luminal B $33,17 \pm 9,80$ SOD/mg de proteína.

3.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE OXIDATIVA NA METÁSTASE LINFONODAL

A avaliação do perfil oxidativo das pacientes que apresentavam metástase em linfonodos em relação àquelas que não apresentavam metástase linfonodal não revelaram diferença estatística significativa para os antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos, bem como para os níveis

TBARS. Porém, as análises da MPO mostraram-se significativamente mais elevadas ($p=0,0395$) entre o grupo de pacientes com câncer de mama que apresentavam metástases em linfonodos (mulheres com câncer e metástase em linfonodos $2,72 \pm 1,25 \mu\text{Mq}/30 \text{ min}$, $n=5$; e mulheres com câncer sem metástase em linfonodos $1,88 \pm 0,48 \mu\text{Mq}/30 \text{ min}$, $n=15$), conforme pode-se observar no gráfico 8.

Gráfico 8 – Atividade da MPO no plasma de pacientes que apresentavam metástase em linfonodos e de pacientes que não apresentavam metástase linfonodal

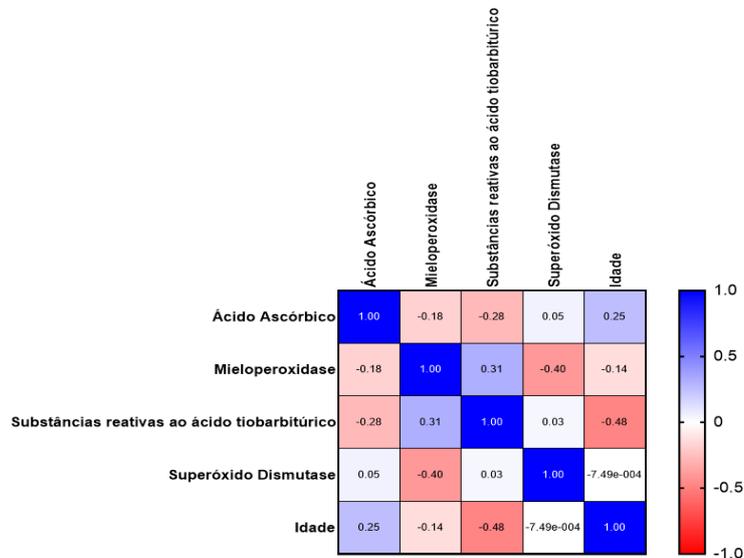


Fonte: elaborado pelos autores (2022).
 $*p=0,0395$; Presença $2,72 \pm 1,25 \mu\text{Mq}/30 \text{ min}$; Ausência $1,88 \pm 0,48 \mu\text{Mq}/30 \text{ min}$.

3.6 CORRELAÇÃO ENTRE IDADE E OS BIOMARCADORES ANALISADOS

Não foram observadas correlações significativas ($p < 0,05$) entre a idade das pacientes e os biomarcadores analisados (ácido ascórbico; MPO; TBARS, SOD), assim como entre os biomarcadores, conforme apresentado no gráfico 9.

Gráfico 9 – Correlação entre os biomarcadores para o estresse oxidativo e a idade em pacientes com CM



Fonte: elaborado pelos autores (2022).
 Vermelho= correlação negativa; Azul= correlação positiva

4 DISCUSSÃO

Em diversos tipos de câncer há uma elevação persistente do estresse oxidativo em decorrência da redução da ação do sistema antioxidante ou do aumento da produção de EROs (KUNDAKTEPE *et al.*, 2021). No tangente a isso, no presente trabalho observou-se que no grupo de pacientes com CM, tanto a atividade enzimática quanto a não enzimática antioxidante, excetuando neste último os níveis de PSH, encontravam-se reduzidas em relação ao grupo controle, composto por mulheres sem câncer referido. Ainda em consonância ao descrito por Kundaktepe *et al.* (2021), os danos causados por EROs, verificados através dos níveis de TBARS e da MPO, foram mais expressivos entre as mulheres com neoplasias malignas de mama.

No que concerne a atividade antioxidante enzimática no CM, Gupta *et al.* (2012) em seu estudo que avaliou a atividade da SOD em amostras de 30 pacientes com CM e 100 indivíduos saudáveis, descreveram uma atividade reduzida dessa enzima nas pacientes com câncer em comparação aos controles sem a doença. Símile a tais achados Seraj *et al.* (2015) também relataram uma redução, porém não significativa, da SOD nos casos de CM (n=30) em relação aos controles (n=30). O presente estudo está em consonância com os trabalhos acima descritos, visto que foi observado um aumento significativo ($p=0,0419$) da atividade da SOD no grupo controle, quando comparado com o grupo das pacientes com CM. Todavia, Kilic *et al.* (2014), Araújo *et al.* (2015), bem como Hussain e Ashafaq (2018), ao avaliarem a atividade da SOD, constataram que essa foi significativamente maior em pacientes com CM do que nos indivíduos saudáveis; sendo que os primeiros autores analisaram 23 pacientes com CM e 13 controles; Araújo *et al.* (2015) avaliaram 34 mulheres com CM e 32 saudáveis, e Hussain e Ashafaq (2018) analisaram 50 pacientes com CM e de 50 controles.

A SOD é uma enzima antioxidante que atua regulando os níveis de EROs, para isso catalisa as reações que convertem o superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (KATERJI; FILIPPOVA; DUERKSEN-HUGHES, 2019). O aumento da atividade da SOD, segundo Jelic *et al.* (2021), provavelmente envolve um mecanismo compensatório que visa proteger o organismo contra os danos promovidos pelo estresse oxidativo. Já os resultados da menor atividade de SOD estariam de acordo com esses autores, sugestivos de um maior consumo das enzimas antioxidantes em decorrência do estresse oxidativo.

Em relação às defesas antioxidantes não enzimáticas, levanta-se que a ação protetora na redução de danos oxidativos pelo ácido ascórbico (vitamina C) advém da capacidade desse composto de reagir com EROs (BIRBEN *et al.*; 2012). Corroborando com os achados deste estudo que mostram níveis de ácido ascórbico maiores no grupo controle do que nas mulheres com câncer ($p=0,0247$), Badid *et al.* (2009) descreveram que os níveis de vitamina C foram menores em 38 mulheres diagnosticadas com CM quando comparadas a 50 controles saudáveis. Ray e Husain (2001), ao avaliarem pacientes com CM (n=54) não tratadas de diferentes estágios clínicos, e controles (n=42) pareados por idade e sexo, também observaram uma redução significativa do ácido ascórbico entre aquelas com câncer. Ainda, Khanzode *et al.* (2004) em seu estudo constataram que não apenas o ácido ascórbico foi significativamente reduzido nas pacientes com CM, como também descreveram que os níveis diminuíram com a progressão da doença, tendo o trabalho abrangido 96 pacientes recém-diagnosticadas com CM em diferentes estágios clínicos e 80 controles saudáveis.

Os baixos níveis de vitamina C observados são apontados por Badid *et al.* (2009) como decorrentes provavelmente da elevada taxa de utilização dessa vitamina na redução do estresse oxidativo em pacientes com CM. Ademais, as concentrações reduzidas de ácido ascórbico,

segundo esses autores, podem ainda ser consequência da baixa ingestão desse composto, o que ocasionaria uma diminuição de defesa antioxidante em pacientes com CM.

Ainda entre os antioxidantes não enzimáticos, os tióis, compostos que apresentam grupo sulfidrila (-SH), também possuem importância nos processos redox devido a capacidade do átomo de enxofre de acomodar a perda de elétrons (MASELLA *et al.*, 2005). Nesse contexto, Gao *et al.* (2020) citam que os tióis desempenham um papel central na limpeza de radicais livres excessivos, mantendo estável o estado redox no corpo humano. Os tióis podem ser divididos em dois grupos: PSH e NPSH. Dentro dos NPSH estão incluídos a glutatona, a homocisteína, a cisteína e outros peptídeos de baixo peso molecular. Já os PSH abrangem, por exemplo, a albumina (YANG; GUAN, 2015). Ressalta-se que os NPSH são os principais responsáveis pela contagem total de tióis; e nesse grupo a glutatona corresponde a forma mais abundante (YANG; GUAN *et al.*, 2017).

Diante disso, Yeh *et al.* (2006) em seu estudo observaram que os níveis de glutatona foram significativamente diminuídos no sangue das pacientes com CM. De maneira similar, avaliando que a glutatona é o composto mais abundante entre os NPSH, podemos inferir que nosso estudo também apontou para uma redução deste composto, vide os níveis mais baixos de NPSH entre as pacientes com CM ($p=0,0428$). No que tange os PSH, em um estudo que avaliou 627 casos de CM e que buscou verificar a associação entre a albumina do soro e os riscos de alguns tipos de câncer, levantou-se que os níveis de albumina foram inversamente associados ao risco de CM, sendo que em pacientes com CM os níveis de albumina eram mais baixos (Kühn *et al.*, 2017). No presente trabalho não foi observado diferença estatisticamente significativa nos níveis de PSH entre os grupos analisados ($p=0,980$).

Em relação aos danos advindos das EROs, os estudos mostram que os processos patológicos relacionados ao tecido mamário estão intimamente ligados às reações pró-oxidativas envolvidas com a peroxidação lipídica, pois a unidade funcional mamária é circundada por grande quantidade de tecido adiposo (JABLONSKA *et al.*, 2015), e este produz citocinas inflamatórias que aumentam a proporção de EROs (REITZ *et al.*, 2021). Nesse contexto, as TBARS são utilizadas como biomarcadores de estresse oxidativo por serem marcadores de peroxidação lipídica, uma reação produzida pela oxidação de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares induzidas por radicais (DIAKOWSKA, *et al.*, 2008). Um dos principais subprodutos produzidos dessa reação é o MDA, um aldeído que possui alta citotoxicidade e ação inibitória sobre enzimas protetoras celulares (ATUKEREN, *et al.*, 2010). Assim, a lipoperoxidação é uma reação mutagênica, indica toxicidade celular endotelial e possui papel importante na iniciação e progressão do CM (DIAKOWSKA, *et al.*, 2008; RAMÍREZ-EXPOSITO *et al.*, 2014).

Este trabalho, ao avaliar parâmetros oxidativos plasmáticos em mulheres com CM, chegou a resultados significativos ($p=0,0143$) de aumento nos níveis de TBARS nas mulheres com neoplasias malignas de mama, quando comparado com o grupo controle. Corroborando com tal resultado, diversos trabalhos também descreveram um estado pró-oxidativo elevado nas mulheres com neoplasia maligna de mama, constatado através dos níveis significativamente elevados de TBARS (GOMES JÚNIOR *et al.*, 2015; ATUKEREN *et al.*, 2010; GOSWAMI *et al.*, 2010; JABLONSKA *et al.*, 2015). Outrossim, Pande e colaboradores (2011) encontraram resultados de maior peroxidação lipídica pela mensuração do MDA nas pacientes com CM, bem como Panis *et al.* (2012), Carioca, *et al.* (2015), Reitz *et al.* (2021) e Ramírez-Expósito *et al.* (2014). Ressalta-se ainda que o aumento de TBARS nas pacientes com CM prevalece mesmo na vigência de mulheres em pré-menopausa, pós-menopausa, obesidade (CARIOCA *et al.*, 2015) e independente do estadiamento (PANIS *et al.*, 2012). Entretanto, outros estudos contrapõem com esses resultados ao avaliarem que a concentração de MDA proveniente da

peroxidação lipídica foi menor em pacientes com CM quando comparado com o grupo controle (ALAGÖL *et al.*, 1999).

A MPO é uma enzima que faz parte da superfamília da heme peroxidase-ciclooxigenase, expressa pelos leucócitos, principalmente os polimorfonucleados, alguns macrófagos microgliais (LAZAREVIC-PASTI; LESKOVAC; VASIC, 2015), e atua na catalização de diversas moléculas biológicas, como a conversão de H₂O₂ em ácido hipocloroso (HOCl), um potente agente oxidante que reage com outras moléculas biológicas para gerar radicais oxidativos secundários (AMBROSONE, 2005), ou com a produção do H₂O₂ induz a peroxidação lipídica em sítios de inflamação (OSAWA *et al.*, 2018). Dessa forma, essa enzima constitui-se como importante agente formador de EROs. No que diz respeito ao processo de carcinogênese mamária, estudos apontam que a MPO está envolvida e presente em grande concentração em tecidos de mama com câncer (ZAPF *et al.*, 2015; AHN *et al.*, 2004).

No presente trabalho, ao avaliar a concentração de MPO no plasma sanguíneo, foi visto um aumento significativo ($p=0,0143$) dessa enzima em mulheres com CM em relação às mulheres sem a doença. Um estudo prospectivo realizado com 40 mulheres com CM comparou os níveis de concentração da MPO com mulheres saudáveis, e constatou elevação significativa desta enzima nas pacientes doentes, com aumento progressivo na medida que a doença avançava no estadiamento (ZAPF *et al.*, 2015).

Em relação a correlação entre estresse oxidativo e metástase, alguns trabalhos levantam que a redução do estresse oxidativo, pela elevação de sistemas antioxidantes, por exemplo, é fundamental para a progressão tumoral e consequente metástase (HARRIS *et al.*, 2015). Nesse contexto, sugere-se que o estresse oxidativo, através de mecanismos diversos, induz a apoptose das células cancerígenas durante a metástase, interrompendo o processo (GILL; PISKOUNOVA; MORRISON, 2016). Porém, outros estudos destacaram que as EROs podem promover a metástase, enquanto que alguns antioxidantes promovem a inibição desse processo (FERRARO *et al.*, 2006; ISHIKAWA *et al.*, 2008; PORPORATO *et al.*, 2014). No presente estudo, não foi observada diferença significativa nos níveis de antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos entre as pacientes que apresentavam metástase em linfonodos, em relação àquelas que não apresentavam metástase.

Já no que tange os níveis dos marcadores oxidativos considerando a metástase linfonodal em pacientes com CM, foi observado um aumento na concentração de MPO, quando comparado com o grupo com câncer isento dessa condição ($p=0,0395$). Em conformidade com Zapf e colaboradores (2015) que também encontraram resultados semelhantes, esse dado pode ser explicado porque com o aumento a progressão tumoral e maior agressividade da doença, mais EROs são liberadas pelas células cancerosas, o que influencia em danos moleculares e celulares, e isso desencadeia menor aporte de mecanismos antioxidantes, ao passo que há um aumento considerado de mecanismo oxidativos.

Por fim, ressalta-se que a associação entre estresse oxidativo e envelhecimento é descrita desde 1956 por Harman, que postulou a teoria do radical livre do envelhecimento. Segundo tal teoria, o acúmulo de EROs seria o fator causal da oxidação biomolecular, dos danos celulares e consequentemente das alterações celulares no envelhecimento (HARMAN, 1956). Nesse contexto, Cencioni *et al.* (2013) citam que o acúmulo de EROs, o desequilíbrio redox e por conseguinte o estresse oxidativo aumentam exponencialmente com a idade (CENCIONI *et al.*, 2013). No presente trabalho, dentre os marcadores analisados, houve uma associação positiva da idade apenas com o ácido ascórbico, porém não significativa ($p=0,2353$). Contrapondo tal achado, Pande *et al.* (2016) descreveram em seu estudo que os níveis de vitaminas antioxidantes foram menores entre pacientes com CM e em estágios mais avançados da doença.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados levantados no presente estudo apontam para níveis antioxidantes reduzidos em detrimento do aumento dos marcadores oxidativos nas pacientes com CM. Os marcadores pró-oxidativos MPO e TBARS se apresentaram aumentados significativamente nas pacientes com CM, em comparação com o grupo controle. Isso demonstra que a carcinogênese e a proliferação tumoral influenciam no aumento da produção de EROs, o que torna um ambiente propício para progressão celular e crescimento tumoral. Já os marcadores antioxidantes SOD, ácido ascórbico e NPSH foram significativamente maiores entre as mulheres que não apresentavam câncer. Com esses dados, o trabalho fornece evidências para a presença do desequilíbrio dos sistemas oxidante e antioxidante, com consequente estado de estresse oxidativo nas pacientes com diagnóstico de CM. Todavia, trabalhos com mais pacientes e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, no intuito de explorar a associação com a neoplasia maligna de mama, são necessários. Somado a isso, os conflitos encontrados na literatura no que tange a correlação do estado antioxidante e oxidante com a instalação e progressão do câncer, também apontam para necessidade de maiores investigações, sobretudo, quando consideramos a heterogeneidade do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- AHN, J. *et al.* Myeloperoxidase Genotype, Fruit and Vegetable Consumption, and Breast Cancer Risk. **Cancer Research**, v. 64, n. 20, p. 7634–7639, 15 out. 2004.
- ALAGÖL, H. *et al.* Nitric oxide biosynthesis and malondialdehyde levels in advanced breast cancer. **The Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 69, n. 9, p. 647–650, set. 1999.
- AMBROSONE, C. B. *et al.* Polymorphisms in genes related to oxidative stress (MPO, MnSOD, CAT) and survival after treatment for breast cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 3, p. 1105–1111, 1 fev. 2005.
- ANDERSON, K. N.; SCHWAB, R. B.; MARTINEZ, M. E. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 144, n. 1, p. 1–10, fev. 2014.
- ARAÚJO, Camila *et al.* Relationship between zincemia, superoxide dismutase activity and marker of oxidative stress in women with breast cancer. **Nutrición Hospitalaria**, v.32, n.2, p.785-791, 2015.
- ATUKEREN, P. *et al.* Variations in systemic biomarkers of oxidative/nitrosative stress and DNA damage before and during the consequent two cycles of chemotherapy in breast cancer patients. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 48, n. 10, p. 1487–1495, out. 2010.
- BADID, Naima *et al.* Oxidant/Antioxidant Status, Lipids and Hormonal Profile in Overweight Women with Breast Cancer. **Pathology & Oncology Research**, v. 16, n. 2, p. 159–167, 2009.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.
- BIRBEN, Esra *et al.* Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.
- BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse Medicale (Paris, France: 1983)**, v. 31, n. 25, p. 1174–1184, 27 jul. 2002.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 7, n.72, p. 248-54, 1976.
- CARIOCA, A. *et al.* Association of oxidative stress biomarkers with adiposity and clinical staging in women with breast cancer. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 11, p. 1256–1261, nov. 2015.
- CAMPANA, A. *et al.* **Investigação científica na área médica**. 1.ed. São Paulo: Manole, 2001.
- CENCIONI, Chiara *et al.* Oxidative Stress and Epigenetic Regulation in Ageing and Age-Related Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 9, p. 17643–

17663, 2013.

CRAWFORD, S. Anti-inflammatory/antioxidant use in long-term maintenance cancer therapy: a new therapeutic approach to disease progression and recurrence. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 6, n. 2, p. 52–68, mar. 2014.

DIAKOWSKA, D. *et al.* Evaluation of 8-hydroxydeoxyguanosine, thiobarbituric acid-reactive substances and total antioxidant status as possible disease markers in oesophageal malignancies. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 10–11, p. 796–803, jul. 2008.

DE SÁ JUNIOR, P. *et al.* The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 2467940, 2017.

ELLMAN, L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.82, n.1, p.70-77,1959.

FERRARI, C. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. **Biogerontology**, v. 5, n. 5, p. 275–289, 2004.

FERRARO, D. *et al.* Pro-metastatic signaling by c-Met through RAC-1 and reactive oxygen species (ROS). **Oncogene**, v. 25, n. 26, p. 3689–3698, 2006.

FRANKEL, E. N. **Lipid Oxidation**. Cambridge: Elsevier Science, 2005.

FRIDOVICH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 893, p. 13-18, 1999.

GAO, Xin *et al.* Serum total thiol levels and the risk of lung, colorectal, breast and prostate cancer: A prospective case–cohort study. **International Journal of Cancer**, v. 146, n. 5, p. 1261–1267, 2020.

GILL, Jennifer G.; PISKOUNOVA, Elena; MORRISON, Sean J. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 81, p. 163–175, 2016.

GOMES JÚNIOR, A. L. *et al.* Serum Oxidative Stress Markers and Genotoxic Profile Induced by Chemotherapy in Patients with Breast Cancer: A Pilot Study. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 212964, 2015.

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

GOSWAMI, B. *et al.* Breast cancer: interaction between oxidant-antioxidant dynamics and inflammation in Indian females. **Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers**, v. 6, n. 2, p. 95–103, 2010.

GUPTA, Rakesh Kumar *et al.* Interactions between Oxidative Stress, Lipid Profile and Antioxidants in Breast Cancer: A Case Control Study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 12, p. 6295–6298, 2012.

HADDAD, N. **Metodologia de estudos em ciências da saúde**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2004.

HARMAN, D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. **Journal of Gerontology**, v. 11, n. 3, p. 298–300, 1956.

HARRIS, Isaac *et al.* Glutathione and Thioredoxin Antioxidant Pathways Synergize to Drive Cancer Initiation and Progression. **Cancer Cell**, v. 27, n. 2, p. 211–222, 2015.

HERRERA, A. *et al.* Impact of tumor removal on the systemic oxidative profile of patients with breast cancer discloses lipid peroxidation at diagnosis as a putative marker of disease recurrence. **Clinical Breast Cancer**, v. 14, n. 6, p. 451–459, dez. 2014.

HUNTER, C. P. *et al.* Breast cancer: factors associated with stage at diagnosis in black and white women. Black/White Cancer Survival Study Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 14, p. 1129–1137, 21 jul. 1993.

HUSSAIN, Sohail; ASHAFAQ, Mohammad. Oxidative stress and anti-oxidants in pre and post operative cases of breast carcinoma. **The Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.15, n.3, p.354, 2018.

ISHIKAWA, Kaori *et al.* ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 320, n. 5876, p. 661–664, 2008.

JABLONSKA, E. *et al.* Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity relationship in breast cancer depends on functional polymorphism of GPX1. **BMC cancer**, v. 15, p. 657, 7 out. 2015.

JELIC, Marija *et al.* Oxidative stress and its role in cancer. **Journal of cancer research and therapeutics**, v.17, n.1, p.22-28, 2021.

JENTZSCH, A.M.; BACHMANN, H.; FÜRST, P. *et al.* Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radic Biol Med**, v.20, p.251–256, 1996.

KATERJI, Meghri; FILIPPOVA, Maria; DUERKSEN-HUGHES, Penelope. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1279250, 2019.

KILIC, Nedret *et al.* An Investigation into the Serum Thioredoxin, Superoxide Dismutase, Malondialdehyde, and Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Breast Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 21, n. 13, p. 4139–4143, 2014.

KHANZODE, Shruti *et al.* Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Different Stages of Breast Cancer. **Free Radical Research**, v. 38, n. 1, p. 81–85, 2004.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 239–267, 2004.

KOVACIC, P.; OSUNA, J. A. Mechanisms of anti-cancer agents: emphasis on oxidative stress and electron transfer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 6, n. 3, p. 277–309, fev. 2000.

KÜHN, Tilman *et al.* Albumin, bilirubin, uric acid and cancer risk: results from a prospective population-based study. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 10, p. 1572–1579, 2017.

- KUNDAKTEPE, B. P. *et al.* The evaluation of oxidative stress parameters in breast and colon cancer. **Medicine**, v. 100, n. 11, p. e25104, 2021.
- LAZAREVIĆ-PASTI, T.; LESKOVAC, A.; VASIĆ, V. Myeloperoxidase Inhibitors as Potential Drugs. **Current Drug Metabolism**, v. 16, n. 3, p. 168–190, 2015.
- MCCORD, J.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem**, v.25, n. 244, p.6049-55, 1969.
- MASELLA, R. *et al.* Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577–586, out. 2005.
- MASUTANI, H. Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV infection. **International Journal of Hematology**, v. 71, n. 1, p. 25–32, jan. 2000.
- MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **The Journal of Nutrition**, v. 133 Suppl 3, p. 933S-940S, mar. 2003.
- MENCALHA, A. *et al.* Mapping oxidative changes in breast cancer: understanding the basic to reach the clinics. **Anticancer Research**, v. 34, n. 3, p. 1127–1140, mar. 2014.
- OSAWA, T. Development and application of oxidative stress biomarkers. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 82, n. 4, p. 564–572, abr. 2018.
- PANDE, D. *et al.* Vascular endothelial growth factor levels in relation to oxidative damage and antioxidant status in patients with breast cancer. **Journal of Breast Cancer**, v. 14, n. 3, p. 181–184, set. 2011.
- PANDE, D. *et al.* An assessment of oxidative damage and non-enzymatic antioxidants status alteration in relation to disease progression in breast diseases. **Medical Sciences**, v.4,n.4, p.17, 2016.
- PANIS, C. *et al.* Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 3, p. 881–888, jun. 2012.
- PANIS, C. *et al.* Can Breast Tumors Affect the Oxidative Status of the Surrounding Environment? A Comparative Analysis among Cancerous Breast, Mammary Adjacent Tissue, and Plasma. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 6429812, 2015.
- PORPORATO, Paolo *et al.* A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. **Cell Reports**, v. 8, n. 3, p. 754–766, 2014.
- RAY, Gibanananda; HUSAIN, Syed A. Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 71–76, 2001.
- RAMÍREZ-EXPÓSITO, M. J. *et al.* Circulating oxidative stress parameters in pre- and post-menopausal healthy women and in women suffering from breast cancer treated or not with neoadjuvant chemotherapy. **Experimental Gerontology**, v. 58, p. 34–42, out. 2014.

REITZ, L. K. *et al.* Dietary Antioxidant Capacity Promotes a Protective Effect against Exacerbated Oxidative Stress in Women Undergoing Adjuvant Treatment for Breast Cancer in a Prospective Study. **Nutrients**, v. 13, n. 12, p. 4324, 30 nov. 2021.

ROE, J.; KUETHER, C. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2, 4-dinitrophenyl hydrazine derivatives of dehydroascorbic acid. **J. Biol. Chem.**, v.147, p. 399-407, 1943.

SERAJ, A. K.; *et al.* Antioxidants and lipid peroxidation status in women with breast cancer. **Medical Journal Malaysia**, v. 14, n. 1, 2015.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7–33, jan. 2021.

STAKE, R. E. **Pesquisa quantitativa/naturalista – problemas epistemológicos.** Departamento de educação da Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 1982.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, mai. 2021.

SUZUKI, K. *et al.* Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 132, n. 2, p. 345–352, 1983

WARDMAN, P. Electron transfer and oxidative stress as key factors in the design of drugs selectively active in hypoxia. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 7, p. 739–761, jun. 2001.

YANG, Yang; GUAN, Xiangming. Rapid and Thiol-Specific High-Throughput Assay for Simultaneous Relative Quantification of Total Thiols, Protein Thiols, and Nonprotein Thiols in Cells. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 649–655, 2015.

YANG, Yang; GUAN, Xiangming. Non-protein thiol imaging and quantification in live cells with a novel benzofurazan sulfide triphenylphosphonium fluorogenic compound. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 13, p. 3417–3427, 2017.

YEH, Chih-Ching *et al.* A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. **Cell Biochemistry and Function**, v. 24, n. 6, p. 555–559, 2006.

ZAPF, I. *et al.* Influence of oxidative injury and monitoring of blood plasma by DSC on breast cancer patients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 3, p. 2029–2035, mar. 2015.

ZUBAIR, M.; WANG, S.; ALI, N. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 632079, 26 fev. 2021.