



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

---

**Camila Leonel da Silva**

**Avaliação da glutathiona e suas enzimas, e do estresse oxidativo como  
marcadores prognósticos e preditivos de neoplasia mamária em cadelas**

**Dissertação apresentada para  
obtenção do Título de Mestre  
em Genética**

---

**São José do Rio Preto – SP**

**2012**

**Camila Leonel da Silva**

**Avaliação da glutathiona e suas enzimas, e do estresse oxidativo, como marcadores prognósticos e preditivos de neoplasia mamária em cadelas**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

São José do Rio Preto – SP  
2012

**CAMILA LEONEL DA SILVA**

**Avaliação da glutatona e suas enzimas, e do estresse oxidativo, como marcadores prognósticos e preditivos de neoplasia mamária em cadelas**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari  
Professora Adjunta  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientadora

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida  
Professor Assistente  
UNESP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza  
Professora Adjunta  
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 08 de fevereiro de 2012

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC) e na Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM) ambos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. Apoio financeiro na forma de bolsa de estudos financiada pela FAPESP e CAPES e recursos para o desenvolvimento do projeto na forma de Auxílio à Pesquisa da FAPESP.

## *Dedicatória*

---

*Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio nos momentos difíceis, dedicação e amor incondicional que me foram dados durante toda minha vida. Sem eles jamais teria chegado onde cheguei. Agradeço pela educação que tive e pela pessoa que me tornei hoje. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida. Amo vocês!*

*"Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor".*

*Johann Wolfgang von Goethe*

## *Agradecimientos*

---



## **Agradecimentos**

*A Deus, pela minha vida, por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho e por me dar força, serenidade e saúde para completar essa trajetória.*

*A minha mãe Tereza Baldissera e ao meu pai Nilson Leonel, pois não mediram esforços para que meus sonhos se tornassem realidade, sem vocês nada disso seria possível.*

*Ao meu irmão, Rogério Leonel, pela convivência e por cuidar tão bem de mim desde pequenininha com muito amor e carinho.*

*A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Debora Zuccari, pela oportunidade que me foi dada, pela confiança, pela amizade, por ter acreditado na minha capacidade e por todo ensinamento transmitido ao longo desses anos.*

*A minha amiga Dr<sup>a</sup> Vera Lúcia de Faria Ferreira, pois foi ela quem me apresentou a minha orientadora, foi graças a ela que iniciou-se esse estágio na minha vida.*

*As minhas grandes amigas Paula S. M. da Cruz e Jaqueline Garcia, que por muitos anos estiveram ao meu lado e devido ao acaso seguimos caminhos diferentes, mas que nem a distância e nem o tempo foram capazes de nos separar. Obrigada pela amizade sincera e eterna, por desejarem meu sucesso e pelos momentos maravilhosos que passamos juntas que me fizeram ter motivos para sempre seguir em frente.*

*A minha amiga Larissa C. Silva, por toda trajetória desde a faculdade até aqui, onde com ela pude desabafar cada momento difícil e compartilhar os momentos de alegria.*

*Ao meu amigo Fernando P. Pinheiro, pois sempre pude contar com ele em todos os momentos, onde foram me dados grandes conselhos, palavras de força e coragem, além de acreditar em mim e me valorizar como pessoa.*

*Aos grandes amigos do laboratório, Bruna V. Jardim, Gabriela B. Gelaleti, Marina G. Moschetta, Lívia C. Ferreira, Juliana R. Lopes, Juliana G. Oliveira, Larissa B. Maschio, Glaucia M. M. Fernandes, Vitor R. Regiani, Naiane do N. Gonçalves, Thaiz F. Borin e Rodrigo Castro pela amizade, companheirismo e pelos momentos de distração. Cada um de*

*vocês contribuiu de alguma forma neste trabalho, só tenho a agradecer-los por isso, pois sozinha esta etapa da minha vida não teria sido concluída.*

*As amigas Bruna L. Zampieri, Ana Livia S. Galbiatti, Cristiani C Mendes e Lídia M. Rebolho, que durante todo meu mestrado me acolheram e fizeram meus dias no laboratório e fora dele mais felizes.*

*Aos amigos da Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM) da Famerp que compartilharam comigo tantos momentos bons e também a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eny M. Goloni-Bertollo e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Erika C. Pavarino pela parceria com nosso laboratório.*

*A Camila Mazeti, por me ajudar com a parte bioquímica deste trabalho.*

*A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sonia M. Oliani e Nathália Sonehara pela ajuda durante o desenvolvimento do projeto.*

*Ao Prof. Domingos Zanchetta Netto e ao Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali pelo auxílio com a histotecnologia e patologia clínica.*

*A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Regina Domingos Bonini por ter feito parte da minha banca do Exame Geral de Qualificação e pelas sugestões que me permitiram melhorar meu trabalho.*

*A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dorotéia Rossi Silva Souza por ter participado da minha banca do Exame Geral de Qualificação, pela dedicação em me ajudar e por ter aceitado fazer parte da minha banca de Defesa.*

*Ao Prof. Eduardo Alves de Almeida por aceitar fazer parte da minha banca de defesa.*

*A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia S. L. Vilamaior por ter sido minha orientadora no Estágio de Docência me dando a oportunidade de crescer profissionalmente.*

*Aos médicos veterinários de São José do Rio Preto e Região pela parceria durante o projeto, e por permitir o contato com os proprietários: a ajuda de vocês foi fundamental e de grande aprendizado. E em especial, a todos os proprietários que prontamente permitiram o contato com seus animais tornando possível a pesquisa.*

*A FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos e Auxílio Financeiro concedido, indispensáveis para a realização deste projeto.*

*A Capes, pela concessão da bolsa de estudos que me acompanhou durante o segundo ano de mestrado.*

*Ao IBILCE e a FAMERP pela infra-estrutura e profissionais que possibilitaram a realização do projeto.*

*Muito obrigada!!!*

## *Resumo*

---

## Resumo

Os tumores mamários da espécie canina prestam-se como modelos apropriados, e válidos, ao estudo da biologia do câncer. O estudo de marcadores prognósticos e preditivos no câncer tem se mostrado efetivo na pesquisa e rotina diagnóstica. Dentre esses marcadores, destacam-se os envolvidos no estresse oxidativo e alterações na capacidade antioxidante celular, que desempenham papel fundamental na patogênese do câncer. A glutatona (GSH) é um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, pois em conjugação com as enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px) e glutatona S transferase pi (GSTpi) desempenha um papel central na biotransformação e detoxificação de drogas quimioterápicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da proteína GSH e das enzimas GSTpi e GSH-Px por imunohistoquímica em tumores de mama em cadelas, a fim de inferir o seu valor prognóstico, e validar por análise molecular, verificando a resistência das células neoplásicas ao quimioterápico, bem como o nível de estresse oxidativo avaliado bioquimicamente pelo malondialdeído (MDA), e a avaliação da atividade antioxidante total em equivalência ao Trolox (TEAC). As proteínas foram detectadas no tecido tumoral de 30 cadelas por imunohistoquímica e quantificadas pela técnica de densitometria óptica. As médias relacionadas à expressão das proteínas foram estatisticamente comparadas com as características clínico-patológicas das cadelas. A expressão dos genes glutamato cisteína ligase (*GCLC*) e glutatona sintetase (*GSS*) que sintetizam a GSH e do gene *GSH-Px* foi verificada por qPCR em células neoplásicas de mama cultivadas e submetidas ao tratamento com doxorrubicina. A dosagem sérica do MDA e TEAC foi realizada em cadelas no momento da cirurgia, um, seis e 18 meses após a cirurgia e comparada com cadelas do grupo controle. Os resultados mostraram que a alta expressão da GSH pela técnica de imunohistoquímica relacionou-se com ausência de ulceração tumoral em cadelas ( $p < 0,05$ ) e que não apresentaram metástase ( $p < 0,05$ ). Além disso, houve relação significativa da maior sobrevivência com o aumento da GSH ( $p < 0,05$ ). No cultivo celular, houve diminuição na expressão da *GCLC* e *GSS* em células tratadas com doxorrubicina quando comparada com células não tratadas com o quimioterápico ( $p < 0,05$ ). No procedimento bioquímico houve aumento significativo no nível de peroxidação lipídica dosada pelo MDA entre a primeira e a segunda coleta e entre a segunda coleta e o grupo controle ( $p < 0,05$ ). A alta expressão da proteína GSH no estudo imunohistoquímico associou-se com características de prognóstico favorável nas cadelas com neoplasia mamária, relacionando-se inclusive ao maior tempo de sobrevivência global. Assim, a alta expressão dessa proteína parece exercer um papel importante na proteção contra células tumorais e sugere-se sua utilização como possível marcador prognóstico de cadelas com neoplasia mamária. O tratamento *in vitro* com o quimioterápico doxorrubicina reduz significativamente a expressão dos genes *GCLC* e *GSS*, responsáveis pela síntese da *GSH*, assim, podem ser considerados candidatos marcadores preditivos da resposta terapêutica ao câncer de mama. O alto nível de estresse oxidativo um mês após a cirurgia parece estar relacionado ao processo de cicatrização com o envolvimento das espécies reativas de oxigênio (ROS).

**Palavras-chave:** neoplasia mamária, glutatona, marcadores prognósticos, estresse oxidativo

## *Abstract*

---

## Abstract

The mammary tumors of canine species lend themselves as models appropriate, and valid, to study of cancer biology. The study of prognostic and predictive markers in cancer have been proven effective in research and diagnostic routine. Among these markers include those involved in oxidative stress and changes in antioxidant capacity, which play a fundamental role in the pathogenesis of cancer. Glutathione (GSH) is one of the most important agents of the antioxidant defense system of the cell because in conjunction with glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione S transferase pi (GSTpi) plays a central role in the biotransformation and detoxification of drugs chemotherapy. The objective of this study was to evaluate the protein expression of GSH and the enzymes GSH-Px and GSTpi by immunohistochemistry in breast tumors of dogs in order to infer its prognostic value, and prospective study to evaluate them by molecular analysis, verifying the resistance of cancer cells to chemotherapy, as well as the level of oxidative stress assessed biochemically by malondealdehyde (MDA), and the evaluating the total antioxidant activity equivalent to Trolox (TEAC). The proteins were detected in tumor tissue of 30 female dogs by immunohistochemistry and quantified by optical densitometry technique. The mean expression of related proteins were statistically compared with the clinical- pathologic of the bitches. The expression of genes glutamate cysteine ligase (*GCLC*) and glutathione synthetase (*GSS*) that synthesize GSH and of *GSH-Px* gene was verified by qPCR in breast cancer cells grown and subjected to treatment with doxorubicin. The serum dosage of MDA and TEAC was performed in bitches at the time of surgery, one, 6 and 18 months after surgery and compared with dogs in the control group. The results showed that high expression of GSH by immunohistochemical technique was related to the absence of tumor ulceration in bitches ( $p < 0.05$ ) and showed no metastasis ( $p < 0.05$ ). In addition, there was a significant relationship of increased survival with increased GSH ( $p < 0.05$ ). In the cell culture study, there was a decrease in the expression of *GCLC* and *GSS* in cells treated with doxorubicin compared with cells not treated with chemotherapy ( $p < 0.05$ ). In biochemical procedure was a significant increase in the level of lipid peroxidation measured by MDA between the first and second sample collection and between the second and the control group ( $p < 0.05$ ). The high protein expression GSH in immunohistochemical study was associated with favorable prognostic features in bitches with mammary neoplasia, relating even to longer overall survival. Thus, high expression of this protein seems to play an important role in protecting against tumor cells and suggest its use as a possible prognostic marker in canine mammary neoplasia. The in vitro treatment with doxorubicin chemotherapy significantly reduces the expression of *GCLC* and *GSS*, genes responsible for synthesis of GSH, thus can be considered candidates for predictive markers of therapeutic response to breast cancer. The high level of oxidative stress one month after surgery seems to be related to the healing process with the involvement of reactive oxygen species (ROS).

**Keywords:** mammary neoplasia, glutathione, prognostic markers, oxidative stress

## *Lista de abreviaturas e símbolos*

---



## Lista de abreviaturas e símbolos

<b>µg</b>	micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>ABTS</b>	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio
<b>AFIP</b>	do inglês Armed Forces Institute of Pathology
<b>BP</b>	do inglês base pare
<b>BSA</b>	do inglês Bovine Serum Albumin
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>Ct</b>	do inglês Cycle Threshold
<b>CO<sub>2</sub></b>	Fórmula química do gás carbônico
<b>DAB</b>	Diamino Benzidina
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid
<b>FAMERP</b>	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
<b>G</b>	Gramma
<b>Glu</b>	Glutamina
<b>GCLC</b>	Glutamato cisteína ligase
<b>GSH</b>	Glutathiona
<b>GSS</b>	Glutathiona sintetase
<b>GSSG</b>	Glutathiona dissulfeto
<b>GST</b>	Glutathiona S tranferase
<b>GSTpi</b>	Glutathiona S tranferase Pi
<b>GO</b>	Glutathiona oxidase
<b>GSH-Px</b>	Glutathiona peroxidase
<b>GR</b>	Glutathiona redutase
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Fórmula química do peróxido de hidrogênio
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>kDa</b>	do inglês kilodalton

<b>L</b>	Litro
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MDR</b>	do inglês Multiple Drug Resistance
<b>mg</b>	Miligrama
<b>M.O.D</b>	do inglês Mean Optical Density
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nm</b>	Nanometro
<b>nmol</b>	Nanomol
<b>mL</b>	Mililitro
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OR</b>	odds ratio
<b>OH<sup>·</sup></b>	Fórmula química do radical hidroxila
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Fórmula química do ânion superóxido
<b>PBS</b>	do inglês phosphate buffer solution
<b>PCR</b>	do inglês polimerase chain reaction
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>ROC</b>	do inglês receiver operating characteristic
<b>ROS</b>	do inglês Reactive Oxygen Species
<b>RPL8</b>	Proteína Ribossomal L8
<b>RPS19</b>	Proteína Ribossomal S19
<b>S.E.M.</b>	Desvio Padrão
<b>SH</b>	Grupo Sulfidrila
<b>SOD</b>	Superóxido dimutase
<b>TEAC</b>	do inglês trolox equivalente antioxidant capacity
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TNM</b>	Sistema de estadiamento clínico, T= tumor, N=linfonodo (do inglês node), M= metástase
<b>u.a.</b>	Unidades arbitrárias

## *Sumário*

---

## Sumário

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	25
1. Estresse oxidativo .....	27
1.1. Glutathiona (GSH) .....	28
1.2. Glutathiona Peroxidase (GSH-Px) .....	29
1.3. Glutathiona S Transferase Pi (GSTPi) .....	31
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	37
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
1. Considerações éticas .....	39
2. Caracterização das amostras .....	39
3. Processamento das amostras .....	42
4. Estudo imunohistoquímico .....	42
4.1 Preparação dos fragmentos tumorais e confecção das lâminas .....	42
4.2 Procedimento imunohistoquímico .....	43
4.2.1 Quantificação da marcação imunohistoquímica .....	44
4.3 Análise estatística .....	44
5. Cultivo celular .....	44
5.1. Preparação do material coletado .....	44
5.2. Manutenção das células <i>in vitro</i> .....	45
5.3. Tripsinização .....	45
5.4. Imunocitoquímica da cultura celular .....	45
5.5. Preparação das placas para agressão com quimioterápico e curva de crescimento.....	46
5.6. Extração total de RNA .....	47
5.7. Obtenção do cDNA .....	48
6. Técnica de PCR quantitativa: análise da expressão gênica .....	49
7. Procedimento bioquímico .....	49
7.1. Caracterização das amostras.....	51
7.2. Dosagem do malondialdeído (MDA) .....	51
7.3. Capacidade antioxidante total em equivalência ao Trolox (TEAC) .....	52
8. Análise estatística .....	52
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	54

1. Expressão protéica pela imonohistoquímica .....	54
2. Expressão gênica da cultura celular .....	61
2.1. Imunocitoquímica .....	61
2.2. Curva de crescimento das células <i>in vitro</i> .....	61
2.3. PCR em Tempo Real (qPCR) .....	62
3. Procedimento bioquímico .....	66
3.1. Malondialdeído (MDA) .....	66
3.2. Capacidade antioxidante total em equivalência ao Trolox (TEAC) .....	67
<b>V. DISCUSSÃO</b> .....	69
<b>VI. CONCLUSÕES</b> .....	74
<b>VII. REFERÊNCIAS</b> .....	76
<b>VIII. APÊNDICES</b> .....	86
<b>IX. ANEXOS</b> .....	88
Anexo A .....	88
Anexo B .....	90

## *Introdução*

---

## I. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma preocupação mundial, sendo esta, a neoplasia mais comum entre as mulheres e a quinta maior causa de morte relacionada ao câncer. A Organização Mundial da Saúde estima que, por ano, ocorram mais de 1.050.000 casos novos de câncer de mama em todo o mundo. Dados do Instituto Nacional do Câncer - INCA (2010) estimaram a ocorrência de 49.240 novos casos desse tipo tumoral para o ano de 2011.

As taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, pois a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. No Brasil, dados desde 1979 demonstraram que o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres (INCA, 2003). Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos de acompanhamento é de 61% e, apesar do progresso nos últimos 30 anos no diagnóstico e tratamento, essa doença ainda é responsável por quase meio milhão de mortes por ano no mundo (SNOUSSI et al., 2010).

As neoplasias mamárias são ainda mais frequentes na espécie canina, sendo responsáveis por aproximadamente 52% de todas as neoplasias nestes animais (KLOPFLEISCH et al., 2010, AL-DISSI, et al., 2011) e 70% de todos os cânceres na fêmea canina, variando de 41 a 53%, o caráter maligno. A espécie canina, de fato, é a que apresenta espontaneamente, a maior incidência de neoplasias mamárias dentre todos os mamíferos e, quando comparada à mulher, apresenta três vezes mais tumores mamários (BRODEY et al., 1983).

Os tumores mamários em cadelas prestam-se como modelos apropriados, e válidos, ao estudo da biologia do câncer (SCHNEIDER et al., 1970; MOTTOLESE et al., 1994), assim como para testes de agentes terapêuticos, já que animais de estimação têm tumores com apresentação histopatológica e comportamento biológico similares àqueles que acometem os seres humanos, além de semelhantes características epidemiológicas (MacEWEN, 1990; PELETEIRO, 1994; ANDRADE et al., 2010). Além disso, os tumores de mama em cadelas constituem um desafio para clínicos e, principalmente, para patologistas, uma vez que a nomenclatura e classificação desses tumores têm se revelado muito difíceis e controversas, impossibilitando há muito tempo, estudos comparativos entre os resultados de investigação reportados por diferentes pesquisadores (BRODEY et al., 1983; QUEIROGA; LOPES, 2002).

Devido às muitas semelhanças compartilhadas por seres humanos e cães, é comum utilizar cães e suas neoplasias para compreender melhor a patogênese dessa doença. Seres humanos e cães também compartilham uma resposta semelhante à cirurgia e a esquemas de quimioterapia (PHILLIPS; LEMBCKE; CHAMBERLIN, 2010).

As condutas preventivas, apesar de válidas tem valor questionável na mulher devido à variabilidade dos fatores de risco e às características genéticas relacionadas à sua etiologia (SNOUSSI et al., 2006). Na cadela, alguns aspectos já estão bem estabelecidos no desenvolvimento da neoplasia mamária: cães de raça têm duas vezes mais chances de desenvolverem tumores mamários, a ausência de receptores de estrógeno e progesterona e o uso de contraceptivos, além de dieta imprópria e idade avançada aumentam as chances de desenvolver a neoplasia. Por outro lado, sabe-se que a castração antes do primeiro cio reduz o risco em até 90%; no entanto, o problema maior é a negligência dos proprietários, que só levam o animal ao especialista quando o nódulo já tem grande diâmetro, diminuindo as chances de tratamento e cura (QUEIROGA; LOPES, 2002).

As pesquisas em câncer têm avançado rapidamente nas últimas décadas, sendo identificadas alterações genéticas associadas à tumorigênese, as quais conduzem ao processo de transformação de uma célula normal em uma célula maligna (HAHN; WEINBERG, 2002). Assim, os fatores genéticos estão cada vez mais sendo reconhecidos como contribuidores ao risco de desenvolvimento do câncer de mama (SNOUSSI et al., 2006) e são fundamentais para a melhoria da prevenção, diagnóstico e tratamento destes tumores.

O câncer é um processo complexo que se desenvolve em várias etapas controladas por perturbações genéticas como a ativação de oncogenes ou silenciamento de genes supressores tumorais e descontrole de eventos epigenéticos que ocorrem dentro da célula. Além disso, tem importância crescente na atualidade, as influências do microambiente tumoral que relacionam os fatores pró e anti-inflamatórios presentes (HAHN; WEINBERG, 2002; BAYLIN, 2005; BARTEL, 2009; PIERCE et al., 2009). O padrão de combinação dos genes mutados pode revelar relações funcionais entre genes e cascatas que levam à tumorigênese, e até auxiliar na identificação de alvos para o desenvolvimento de tratamentos clínicos mais efetivos.

A utilização de parâmetros clínicos e patológicos com significado prognóstico e/ou terapêutico nesses neoplasmas, é um valioso campo para estudo na medicina veterinária. A alta incidência e a difícil resposta ao tratamento de cadelas com tumores mamários têm estimulado a busca de novos marcadores para detecção precoce de metástases e melhor prognóstico (DERIN et al., 2007).

O estabelecimento do prognóstico e do planejamento terapêutico dos carcinomas de mama baseiam-se no tipo e grau histológico do tumor, bem como em outros parâmetros clínicos e histopatológicos, os quais consistem no sistema de estadiamento TNM (tamanho, envolvimento linfonodal, metástase), ou seja, no tamanho do tumor, no comprometimento de linfonodos regionais e nas metástases à distância (PEDERSEN et al., 2004).



Esses fatores podem ser utilizados sozinhos ou em combinação como marcadores prognósticos para a verificação da sobrevida global, sendo capazes de gerar informações importantes relacionadas ao comportamento clínico dos tumores de mama (RAKHA et al., 2010). No entanto, muitas vezes não conseguem prever a evolução da doença nem tampouco a resposta ao tratamento quimioterápico. De acordo com Van't Veer et al. (2005), os maiores fatores preditivos para metástase, como comprometimento de linfonodo ou grau histológico, falharam em classificar os tumores mamários em relação ao seu comportamento clínico.

O uso de marcadores prognósticos no câncer de mama é importante para a rotina de diagnóstico e pesquisa (ZUCCARI et al., 2011). Dessa forma, embora se trate de um procedimento mais complexo, a avaliação da expressão de um ou mais imunomarcadores de prognóstico apresenta-se como uma ferramenta mais útil e conclusiva (THOMAS; BERNER, 2000).

### **1. Estresse oxidativo**

O estresse oxidativo tem importância na fisiopatologia de diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama, e ocorre em consequência a um distúrbio no equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nas defesas antioxidantes (KASAPOVIĆ et al., 2008). Quando a produção excessiva de ROS sobrecarrega o sistema de defesa antioxidante o estresse oxidativo é desencadeado. A consequência da instalação desse processo é a perda das funções celulares que podem, em última instância, ocasionar a morte celular. Além disso, o estresse oxidativo é conhecido por causar danos ao DNA e mutações em genes supressores tumorais, eventos importantes para o início da carcinogênese (KANG, 2002).

Múltiplas fontes endógenas e exógenas geram ROS em células de mamíferos. Os exógenos incluem fontes de radiação, poluição atmosférica e uma ampla faixa de produtos químicos, enquanto fontes endógenas incluem respiração mitocondrial, inflamação e biotransformação metabólica provocando a redução incompleta do  $O_2$  (GUYTON et al., 1993; LOFT et al., 2008).

Alguns fatores de risco associados ao câncer de mama podem exercer seus efeitos através da geração de ROS, como o álcool e seu metabolismo e fatores endógenos e hormonais (AMBROSONE, 2000). A produção de ROS, como o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ) peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ), são consequência natural da respiração aeróbica no organismo (HUBER et al., 2008; BARREIROS et al., 2006).

O radical  $\text{OH}^\bullet$  é o mais deletério ao organismo, sendo formado por dois mecanismos principais: reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com metais de transição e hemólise da água por exposição à radiação ionizante. O ataque intensivo e frequente deste radical pode originar mutações no DNA e, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento de câncer no homem no período de 15 a 20 anos (BARREIROS et al., 2006; BERRA et al., 2006).

Mudanças no metabolismo oxidativo são comuns em células neoplásicas (HADZIC et al., 2010). Normalmente, elas apresentam altos níveis de ROS, que podem ser intensificados por tratamentos citotóxicos. Muitos fármacos podem produzir ROS como produtos diretos ou indiretos de sua biotransformação no organismo (TOWNSEND e TEW, 2003).

A membrana celular é uma das mais atingidas pois a peroxidação lipídica acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade. A fluidez da membrana relaciona-se à presença de cadeias insaturadas de fosfolipídios e colesterol e, danos desta camada lipídica, provocam perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e também a formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído) resultando em morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; MAFRA et al., 1999).

Os agentes antioxidantes exercem papel fundamental na proteção ao estresse oxidativo e na detoxificação de drogas. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem não-enzimaticamente a exemplo de glutathione (GSH) ou enzimaticamente, a exemplo da glutathione peroxidase (GSH-Px) e glutathione S transferases (GSTs) (BARREIROS et al., 2006). Estudos revelaram que há aumento significativo de GSH, GSH-Px e GSTs em células de câncer de mama em relação ao tecido sadio (KASAPOVIĆ et al., 2008).

### **1.1. Glutathione (GSH)**

A GSH é um tripeptídeo constituído por resíduos de glicina, cisteína e ácido glutâmico e encontrado intracelularmente em altas concentrações, sendo o mais abundante tiol celular de baixa massa molecular (HUBER et al., 2008). A síntese da GSH requer a ação consecutiva de duas enzimas: primeiramente a enzima glutamato cisteína ligase (GCLC) que conjuga o ácido glutâmico e a cisteína formando a gama glutamil cisteína. Esse composto contendo a cisteína com o grupo sulfidila (SH) é o responsável pela atividade antioxidante da GSH. O segundo passo consiste na ligação da gama glutamil cisteinil com a glicina pela enzima glutathione sintetase (GSS) originando o tripeptídeo gama-glutamil-cisteinil-glicina, conhecido como glutathione (CARNICER et al. 2005; UCHIDA et al. 2010).

Esse tripeptídeo é considerado um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, pois em conjugação com as enzimas GSH-Px e GSTs desempenha papel central na biotransformação e eliminação de diversos agentes xenobióticos e cancerígenos (KUMARAGURUPARAN et al., 2005; RAJNEESH et al., 2008).

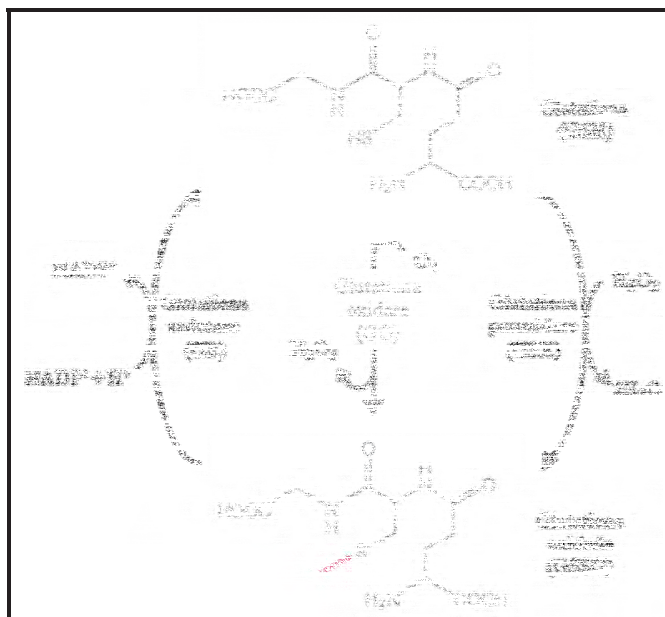
O grupo SH da GSH é altamente polarizável caracterizando-a como um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos gerados por processos oxidativos. Assim, exerce um importante papel em processos celulares como diferenciação, proliferação e apoptose, e como resultado, distúrbios na homeostase dessa proteína estão envolvidos na etiologia e/ou progressão de muitas doenças humanas, incluindo o câncer (BALLATORI et al., 2009).

### 1.2. Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

A GSH-Px possui selênio no seu sítio catalítico e utiliza a GSH como doador de elétrons para redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  (VALKO et al., 2007; BALLATORI et al., 2009). A inativação de um agente oxidante como o  $\text{O}_2^-$  é inicialmente catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) formando  $\text{H}_2\text{O}_2$  o qual é convertido em  $\text{H}_2\text{O}$  pela GSH-Px. Esse processo resulta na conversão da GSH a sua forma oxidada, glutathione dissulfeto (GSSG) e é catalisado pela enzima glutathione oxidase (GO). As reações abaixo mostram o mecanismo antioxidante com participação da GSH-Px.



Para que a atividade antioxidante da GSH seja mantida, a GSSG reconvertida a GSH pela ação da Glutathione reductase (GR). Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH, entretanto, quando há excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG ocorrendo o estresse oxidativo (Figura 1) (PASTORE et al., 2003; VALKO et al., 2006, HADZIC et al., 2010).



**Figura 1:** Conversão da glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px), glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR). Adaptado de LEHNINGER, 2006.

A GSH-Px é uma proteína de 80kDa que é composta por quatro subunidades idênticas. Cinco isoformas da GSH-Px são bem caracterizadas em mamíferos, e apresentam distribuição tecido-específicas. Alterações nos níveis dessa enzima estão associadas com algumas doenças, como hepatite e HIV e diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de pele, rim, intestino e de mama (TOWNSEND et al. 2003).

O alto nível de GSH e/ou de GSH-Px aumenta a capacidade antioxidante, e essa situação é observada em muitas células tumorais. Embora o mecanismo e a implicação dessa mudança não estejam bem definidos (BALLATORI et al., 2009), trabalhos recentes demonstram que o aumento de antioxidantes no tecido mamário neoplásico confere a essas células vantagens sobre as células do tecido sadio. Kumaraguruparan et al. (2005) sugerem que o aumento dos antioxidantes no tecido mamário neoplásico é induzido pelo estresse oxidativo. Resultado semelhante foi encontrado por Rajneesh et al. (2008), que demonstraram níveis de ROS e antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos aumentados no plasma de mulheres com câncer de mama em comparação com mulheres controle.

Quando há diminuição das concentrações intracelulares da GSH e/ou GSH-Px em sistemas experimentais, observa-se o aumento da sensibilidade das células neoplásicas à

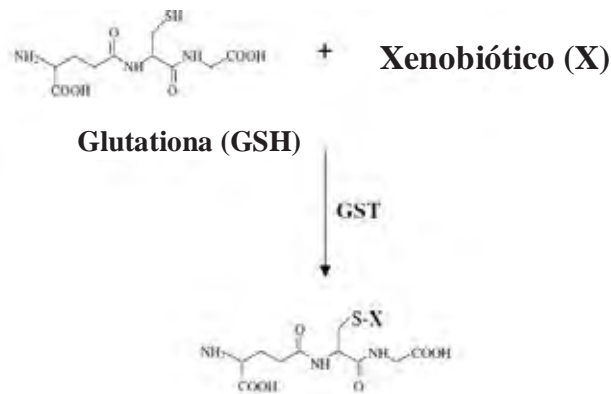
radiação ionizante e a certas drogas quimioterápicas (HUBER et al., 2008). Portanto, a presença dessas proteínas em células neoplásicas pode caracterizar a baixa resposta a tratamentos citotóxicos (VALKO et al., 2007). Além disso, essa sensibilidade está sendo explorada para uso clínico na terapia contra o câncer (HUBER et al., 2008).

Em contraste, alguns estudos demonstram que pacientes com câncer de mama apresentam baixa atividade de antioxidantes endógenos provavelmente pela grande quantidade de ROS gerados em processos neoplásicos (KASAPOVIC et al., 2008, KASAPOVIC et al., 2010). Embora, os tumores mamários caninos tem sido um objeto de extensa pesquisa em todo o mundo, o status redox celular em carcinogênese mamária canina não tem sido documentado (KUMARAGURUPARAN et al. 2005).

### **1.3. Glutathione S Transferase Pi (GSTpi)**

A detoxificação enzimática de xenobióticos pode ser classificada em três fases distintas, porém estritamente relacionadas: fase I, II e III. Nas fases I e II, geralmente se observa a transformação do xenobiótico em uma espécie que apresenta maior solubilidade em água e menor toxicidade. Na fase III, estes metabólitos são transportados para o exterior da célula e então excretados (SHEWEITA e TILMISANY 2003).

As GSTs são uma família de enzimas intracelulares da fase II de detoxificação que catalisam a conjugação de diversos compostos eletrofílicos à GSH (Figura 2), promovendo a formação, na maioria das vezes, de metabólitos menos reativos e mais solúveis em água, o que faz com que sejam prontamente excretados pela urina, impedindo mutações no DNA das células (MORAIS et al., 2008). Tais enzimas, geralmente se encontram no meio biológico como homo ou heterodímeros, apresentando dois sítios ativos: um para a GSH que é muito específico para este tripeptídeo, e outro com menor especificidade para os compostos eletrofílicos (HUBER et al., 2008).



**Figura 2:** Esquema da reação enzimática catalisada pela Glutathione S Transferase. Adaptado de TOWNSEND e TEW, 2003

As GSTs podem ser divididas em três grandes famílias: GST citossólica, GST mitocondrial e GST microsomal. Baseada na similaridade da sequência de aminoácidos, seis principais classes (designadas pelas letras do alfabeto grego) de GSTs citossólicas de mamíferos são descritas: Alpha, Mu, Omega, Pi, Theta e Zeta (Tabela 1) (MORAIS et al., 2008).

**Tabela 1:** Variação alélica das GSTs e correspondente localização cromossômica em humanos.

Classe	Gene	Localização cromossômica
Alfa ( $\alpha$ )	GSTA1-5	6
Mu ( $\mu$ )	GSTM1-5	1
Omega ( $\omega$ )	GSTO1-2	10
Pi ( $\pi$ )	GSTP1	11
Theta ( $\theta$ )	GSTT1-2	22
Zeta ( $\zeta$ )	GSTZ1	14

A expressão dessas isoenzimas está diretamente relacionada com o potencial individual de metabolizar substâncias endógenas e exógenas, podendo influenciar no desenvolvimento e progressão do câncer de mama (HAAS et al., 2006). Diversos estudos têm demonstrado que a expressão dos genes que codificam as GSTs é usualmente maior em células tumorais que em não-tumorais (IWAO-KOIZUMI et al. 2005; BAYET-ROBERT et

al. 2009). De acordo com Chekhun et al. (2009) a expressão das GSTs em células neoplásicas de mama caracteriza a baixa capacidade de resposta a alguns agentes alquilantes.

O aumento da GSTpi encontra-se geralmente presente em células tumorais (cólon, pulmão, ovário, mama, estômago, bexiga, rim, testículo) e em altas concentrações (2-4 vezes maior), quando comparada àquelas encontradas em células sadias de mesma origem. Essa isoenzima é a principal classe das GSTs presente nos cânceres de mama. Seu papel no crescimento e progressão tumoral é pouco conhecido, mas é relatada associação com o nível de RE expresso pelo tumor (BELLAMY e HARRISON, 1994; HUANG et al., 2003). Além disso, a superexpressão da GSTpi em tumores de mama tem sido relacionada com um mau prognóstico e parece estar diretamente relacionada ao desenvolvimento da resistência celular a múltiplos fármacos (MDR) (TOWNSEND e TEW, 2003; SU et al., 2003; HUANG et al., 2003; CHEKHUM et al., 2009). Um estudo realizado por Huang et al. (2009) sugeriu que a análise imunohistoquímica da GSTpi pode prever a resposta à quimioterapia em diversos tipos de câncer.

MDR é o termo utilizado para descrever um fenômeno caracterizado pela capacidade de células tumorais apresentarem resistência simultânea a diferentes agentes quimioterápicos estruturalmente e funcionalmente não-relacionados (SU et al., 2003).

O desenvolvimento de resistência às drogas é um elemento chave no fracasso do tratamento quimioterápico (TOWNSEND e TEW, 2003). De maneira geral, a MDR pode ser classificada em duas categorias: resistência intrínseca manifestada no primeiro ciclo de tratamento e vinculada ao processo original de transformação maligna da célula e, resistência adquirida, encontrada após exposição a agentes citotóxicos, possivelmente como um resultado da seleção de populações celulares tolerantes (HURBER et al., 2008).

O sistema enzimático glutationa/glutationa S transferases (GSH/GSTs) é apontado como um dos mais importantes para a MDR. Os mecanismos de resistência relacionados a esse sistema envolvem principalmente: alterações nos níveis de GSH e/ou na expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas na sua síntese; alterações na expressão dos genes que codificam as GSTs; e/ou alterações do transporte dos conjugados de GSH e compostos reativos (HUBER et al., 2008). No último caso, o aumento da eficiência do transporte dos conjugados de GSH, ocorre como uma consequência do aumento de GSH e/ou do aumento da expressão dos genes que codificam os transportadores destes conjugados (TOWNSEND e TEW, 2003).

Embora os estudos indiquem a possibilidade de elevar a eficácia da terapia anti-tumoral com base no padrão de expressão de proteínas associadas a resistência, o papel dos

antioxidantes como a GSH, e das enzimas GSH-Px e GSTpi nos variados mecanismos associados à MDR ainda não é totalmente conhecido. Além disso, o valor prognóstico dessas proteínas em pacientes com câncer de mama e em cadelas com neoplasia mamária apresenta resultados controversos na literatura.

O reconhecimento da importância do dano oxidativo ao DNA tem gerado grande interesse no estudo das possibilidades e problemas relacionados à sua formação, avaliação, prevenção, reparação e consequências (LOFT et al., 2008) Além disso, a mensuração da intensidade de dano oxidativo é essencial para o melhor entendimento dos mecanismos etiopatogênicos do estresse oxidativo e seus efeitos moleculares (RIBEIRO et al., 2007).

O malondialdeído (MDA) é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e sua concentração têm sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos.

A peroxidação lipídica inicia-se com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado da membrana celular. Tal sequestro pode ser realizado pelo  $\text{OH}^{\bullet}$  ou pelo  $\text{LO}^{\bullet}$  (radical alcóxila), com consequente formação do  $\text{L}^{\bullet}$  (radical lipídico). Na primeira etapa de propagação, o  $\text{L}^{\bullet}$  reage rapidamente com o  $\text{O}_2$ , resultando em  $\text{LOO}^{\bullet}$  (radical peróxila), que, por sua vez, sequestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o  $\text{L}^{\bullet}$  na segunda etapa de propagação. O término da peroxidação lipídica ocorre quando os radicais ( $\text{L}^{\bullet}$  e  $\text{LOO}^{\bullet}$ ) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se a si próprios. Esse processo pode ser catalisado por íons ferro (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Entre os ensaios por meio dos quais se afere a capacidade antioxidante total de fluidos biológicos, destaca-se o TEAC, empregado para avaliar, *in vitro*, a capacidade antioxidante total do soro ou plasma, medindo-se a capacidade dos antioxidantes presentes na amostra de interesse em inibir a oxidação do composto ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) (MILLER e RICE-EVANS, 1997). A quantidade de ABTS oxidado ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) é monitorada por leitura espectrofotométrica. A capacidade antioxidante da amostra de interesse é expressa em relação a um composto solúvel em água, análogo ao tocoferol (trolox), amostra de referência. O resultado é expresso como equivalente de *trolox* por litro de amostra (MILLER e RICE-EVANS, 1997).

Conforme literatura consultada, observa-se que a classificação das neoplasias mamárias em cadelas é complexa e detalhada, mas não consegue prever a evolução da doença e o tempo de sobrevivência do paciente com câncer, nem tampouco a resposta ao tratamento quimioterápico e/ou hormonal. Atualmente, com a possibilidade do diagnóstico



imunohistoquímico e molecular dos tumores, por meio da utilização de marcadores, o prognóstico pode ser melhor avaliado e o valor preditivo deste diagnóstico pode também direcionar para possíveis marcadores genéticos dos tumores. Além disso, os marcadores biológicos que aparentemente não têm um valor prognóstico independente, em conjunto com os parâmetros clínico-patológicos, podem auxiliar na avaliação da resposta à evolução clínica do paciente.

## *Objetivos*

---

## II. OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivo verificar o valor prognóstico da proteína glutatona (GSH) e das enzimas glutatona peroxidase e glutatona S transferase Pi, relacionando-as com os parâmetros clínico-patológicos, evolução clínica e sobrevida das cadelas. Além disso, avaliar o valor preditivo desses marcadores em resposta ao tratamento em cultivo primário de células tumorais mamárias.

Especificamente:

- Avaliar por imunohistoquímica, a expressão da proteína glutatona e enzimas relacionadas em tumores de mama de cadelas, a fim de inferir o seu valor prognóstico;
- Validar os resultados alcançados em cultivo celular verificando a expressão dos genes que sintetizam estas proteínas após agressão com o quimioterápico doxorrubicina.
- Correlacionar bioquimicamente os resultados obtidos avaliando o nível de estresse oxidativo pela mensuração do malondialdeído (MDA) e a capacidade total antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) em diferentes momentos após a retirada do tumor.

## *Material e Métodos*

---

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Considerações éticas

O presente estudo não acarretou riscos físicos às cadelas selecionadas, uma vez que foram utilizados fragmentos tumorais de descarte do exame histopatológico. Os proprietários foram informados dos objetivos da pesquisa, bem como das coletas sanguíneas subsequentes e assinaram o termo de consentimento informado (Anexo A). O médico veterinário responsável preencheu a ficha clínica do animal (Anexo B) e os dados foram plotados em tabela para posterior correlação. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP (Protocolo nº 3945/2009).

#### 2. Caracterização das amostras

Foram coletadas 10 mL de sangue periférico de 30 cadelas com neoplasia mamária (grupo teste) e 33 cadelas híginas (grupo controle), atendidas nas clínicas veterinárias de São José do Rio Preto e região durante os anos de 2009 e 2010 para realização do teste bioquímico. As coletas de sangue foram realizadas no momento da excisão cirúrgica do tumor, um mês, seis meses e um ano após a cirurgia. Destas mesmas cadelas foram colhidos fragmentos tumorais para realização da técnica de imunohistoquímica, cultivo celular e diagnóstico histopatológico, e estes foram classificados de acordo com Misdorp et al. (1999) pela AFIP (*Armed Forces Institute of Pathology*). Os parâmetros usados para estadiamento clínico estão de acordo com o sistema TNM (tamanho, envolvimento linfonodal, metástase) estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para tumores mamários caninos (CASSALI et al., 2010, modificado). Os critérios de exclusão para as cadelas do grupo controle foram rigorosamente seguidos, tendo sido incluídas no grupo apenas cadelas em anestro e diestro, sem histórico de doença/inflamação e procedimento cirúrgico em período próximo.

As cadelas do grupo teste foram avaliadas com relação às características clínicas (raça e idade), patológicas (tempo de evolução tumoral – período relacionado ao aparecimento tumoral até a excisão cirúrgica, número de nódulos, tamanho tumoral, grau histológico, status linfonodal, estadiamento clínico, ulceração e vascularização) e com a evolução clínica (ocorrência de metástase, recidiva local e óbito). Com relação ao estadiamento clínico (TNM)

(OWEN, 1980) foi estabelecido o tamanho tumoral (T) - T1: < 3cm - T2: entre 3 e 5cm - T3: > 5cm; o envolvimento linfonodal (N) - N0: sem envolvimento aparente - N1: envolvimento unilateral - N2: envolvimento bilateral e presença de metástase à distância (M) - M0: sem metástases evidentes - M1: metástase à distância incluindo linfonodos não regionais, sendo classificados como I, II, III ou IV de acordo com a extensão tumoral e estabelecimento do prognóstico.

A ocorrência de metástase foi descrita, assim como a data e causa da morte, sendo que neste grupo, apenas cadelas que morreram pela doença foram incluídas.

Das 30 cadelas com idade variando de seis a 16 anos (média dez anos), 16 (53%) tinham mais que dez anos de idade. Treze cadelas (50%) tiveram tempo de evolução de até seis meses. Nesse estudo, 11 (37%) tumores apresentaram estadiamento clínico I, e cinco (17%) tumores apresentaram estadiamento clínico IV. Quanto ao número de nódulos, 21 (70%) foram tumores de cadeia única. Quanto à vascularização tumoral, 50% dos tumores tiveram vascularização abundante. Houve predomínio de tumores malignos, sendo 14 (54%) carcinomas em tumor misto, três (11,5%) carcinomas papilares, dois (7,5%) carcinossarcomas, dois (7,5%) carcinomas túbulo-papilares, duas (7,5%) lesões de aspecto sarcomatóide, um (4%) comedocarcinoma, um (4%) carcinoma sólido e um (4%) carcinoma inflamatório (Tabela 5). Dos tumores benignos, três (75%) foram classificados como tumores mistos benignos e um (25%) como papiloma (Tabela 5).

Tabela 5: Características clínicas e patológicas das cadelas teste

Idade (anos)	Tempo de evolução (meses)	Histopatológico	Nº de nódulos	Estadiamento		Ulceração	Vascularização	Censura	Dias	Metástase	
				TNM	clínico						
C1	12	até 6 meses	Carcinoma inflamatório	Múltiplos	T4/N1b/M1	IV	Ulceração	abundante	óbito	30	sim
C2	14	até 6 meses	Carcinoma em tumor misto	Múltiplos	T3/N0/M2	IV	Ulceração	moderada	óbito	150	sim
C3	12	entre 6 e 18 meses	Carcinoma em tumor misto	Único	T2/N1a/M0	II	Necrose	abundante	óbito	240	sim
C4	8	mais de 18 meses	Tumor misto benigno	Único	T3/N2/M0	III	Ulceração	abundante	viva	540	não
C5	12	entre 6 e 18 meses	Carcinoma em tumor misto	Único	T1/N0/M0	I	Ulceração	abundante	óbito	330	sim
C6	6	até 6 meses	Carcinoma papilar	Único	T2/N0/M0	II	Ausente	moderada	viva	540	não
C7	15	mais de 18 meses	Carcinoma em tumor misto	Único	T1/N0/M0	I	Ausente	moderada	viva	540	não
C8	9	entre 6 e 18 meses	Carcinoma em tumor misto	Único	T1 /N0/M0	I	Ausente	moderada	viva	540	não
C9	6	até 6 meses	Carcinoma papilar	Único	T1/N2a/M0	I	Ausente	moderada	viva	540	não
C10	7	até 6 meses	Carcinoma em tumor misto	Único	T1/N0/M0	I	Ausente	moderada	viva	540	não
C11	10	Indeterminado	Tumor misto benigno	Múltiplos	T1/N1/M0	I	Ausente	moderada	viva	540	não
C12	15	Indeterminado	Carcinoma em tumor misto	Único	T1/N0/M0	I	Ausente	abundante	viva	540	não
C13	9	mais de 18 meses	Carcinossarcoma	Múltiplos	T3/N0/M1	IV	Ausente	moderada	óbito	300	sim
C14	11	até 6 meses	Carcinoma em tumor misto	Múltiplos	T1/N2/M0	I	Ausente	moderada	viva	540	não
C15	12	mais de 18 meses	Carcinoma túbulo-papilar	Único	T1/ N0/M1	IV	Ausente	moderada	viva	540	não
C16	7	até 6 meses	Comedocarcinoma	Único	T2/N1b/M0	II	Ulceração	abundante	viva	540	não
C17	10	mais de 18 meses	Carcinoma em tumor misto	Único	T3/N2a/M0	III	Ausente	abundante	viva	540	não
C18	8	até 6 meses	Carcinossarcoma	Único	T3/N0/M0	III	Ausente	abundante	viva	540	não
C19	16	Indeterminado	Carcinoma papilar	Único	T3/N0/M0	III	Ulceração	moderada	óbito	120	sim
C20	11	até 6 meses	Papiloma	Múltiplos	T2/N0/M0	II	Ausente	moderada	viva	540	não
C21	7	Indeterminado	Tumor misto benigno	Único	T1/N0/M0	I	Ausente	moderada	viva	540	não
C22	11	entre 6 e 18 meses	Carcinoma em tumor misto	Único	T3/N0/M0	III	Ausente	moderada	viva	540	não
C23	8	até 6 meses	Carcinoma em tumor misto	Único	T3N0/M0	III	Ulceração	abundante	viva	540	não
C24	8	até 6 meses	Carcinoma em tumor misto	Único	T1/N0/M0	I	Necrose	abundante	viva	540	não
C25	14	mais de 18 meses	Lesão de aspecto sarcomatóide	Único	T3/N0/M0	III	Ulceração	moderada	viva	540	não
C26	8	até 6 meses	Carcinoma em tumor misto	Único	T3/N0/M1	IV	Ausente	abundante	viva	540	não
C27	7	entre 6 e 18 meses	Carcinoma em tumor misto	Múltiplos	T1/N0/M0	I	Ausente	abundante	viva	540	não
C28	9	entre 6 e 18 meses	Carcinoma tubulo-papilar	Único	T3/N1a/M0	III	Ulceração	abundante	óbito	90	sim
C29	10	até 6 meses	Lesão de aspecto sarcomatóide	Múltiplos	T3/N0/M0	III	Ulceração	abundante	óbito	300	sim
C30	13	mais de 6 meses	Carcinoma sólido	Múltiplos	T3/N1b/M0	III	ausente	Abundante	viva	540	não

### 3. Processamento das amostras

No momento da cirurgia foram coletados 3 mL de sangue em tubo (Vacutainer) contendo gel separador (filtro 13-mm) e fragmentos tumorais, que foram armazenados em tubos estéreis tipo Falcon: um contendo formol 10%, para posterior preparação histopatológica, visibilização pela Hematoxilina-Eosina (HE) e outro contendo meio nutritivo para cultivo celular.

As amostras de sangue foram transportadas ao laboratório, incubadas em banho maria a 37°C por 20 minutos e em seguida centrifugadas por 25 minutos a 1000g. O soro foi aliquoteado e estocado à -80 °C.

### 4. Estudo imunohistoquímico

#### 4.1. Preparação dos fragmentos tumorais e confecção das lâminas

Inicialmente, o material foi incluído em parafina, procedimento que oferece resistência permitindo seu corte em espessura de 3 µm. Após a retirada do tumor a fresco, o preparo das lâminas permanentes envolveu as etapas de: Fixação: formol 10% seguido de álcool 70%; inclusão: pela desidratação em etanol com aumento progressivo da concentração, diafanização: xilol por 1 hora cada e impregnação: mergulhado em parafina.

O bloco foi preso ao micrótomo, a espessura do corte foi regulada para 3 µm e os cortes colocados em lâmina identificada e deixados na estufa a 60° C por 24 horas.

As lâminas passaram pelo processo de desparafinização em xilol, seguida por hidratação em álcool absoluto I, II e III finalizando com seis mergulhos em água corrente. Para a coloração de núcleo as lâminas permaneceram em um corante básico denominado Hematoxilina por 4 a 6 minutos e foram lavadas em água corrente (seis mergulhos). Em seguida as lâminas foram mergulhadas rapidamente em álcool 70%, lavadas com água corrente por 10 minutos e submetidas a seis mergulhos em álcool 80%. Para a coloração de citoplasma as lâminas permaneceram 30 segundos em um corante ácido denominado Eosina. Em seguida o tecido foi desidratado em álcool 95% (seis mergulhos) e álcool absoluto I e II (seis mergulhos em cada) e clarificados em Xilol I, II e III (seis mergulhos em cada) finalizando com a montagem das lâminas.

Ao final da coloração as estruturas basófilas do tecido foram coradas em tonalidade azul, roxa ou violeta, enquanto as estruturas acidófilas apresentaram tonalidade rósea.



#### 4.2. Procedimento imunohistoquímico

Para o desenvolvimento da técnica os fragmentos tumorais de 30 cadelas foram emblocados em parafina e cortados em 3 $\mu$ m. Os tecidos foram preparados em lâminas silanizadas e em seguida desparafinizados em xilol, rehidratados em álcool em grau decrescente e incubados com 3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena.

A recuperação antigênica foi realizada na panela a vapor com tampão específico para cada anticorpo por 35 minutos (Tabela 2), em seguida as lâminas foram encobertas com solução contendo soro fetal bovino (BSA)<sup>1</sup> e incubadas com o anticorpo primário (Tabela 2).

Depois dessa etapa as lâminas foram lavadas em solução PBS<sup>2</sup> por 15 minutos e incubadas com kit Easy Path (Erviagas®), que consistiu no anticorpo secundário biotinilado por 1 hora e no complexo estreptavidina peroxidase por 30 minutos, seguido de lavagem com PBS por 15 minutos. A revelação foi feita com substrato cromógeno DAB (Signet Laboratories®) de 2 a 5 minutos e a contra-coloração com Hematoxilina de Harrys por 40 segundos. Os tecidos foram desidratados em álcool em grau crescente e banhados no xilol antes da montagem das lâminas em meio ERV-MOUNT (Erviagas®).

Os controles negativos das reações foram obtidos pela omissão do anticorpo primário e os tecidos de fígado e próstata foram utilizados como controle positivo das reações de acordo com os fabricantes dos anticorpos primários.

**Tabela 2** Especificações dos anticorpos primários utilizados no procedimento imunohistoquímico.

Item	Especificidade	Diluição	Tampão	Marca
anti-GSH	Monoclonal	1:100	Citrato pH6 <sup>3</sup>	Millipore
anti-GSTpi	Monoclonal	1:4000	Citrato pH6	Abcam
anti-GSH-Px	Policlonal	1:1200	Citrato pH6	Abcam

<sup>1,2,3</sup> Os protocolos de preparo das soluções estão descritos no Apêndice A.

#### 4.2.1 Quantificação da marcação imunohistoquímica

As lâminas foram fotografadas e as enzimas quantificadas pelo *software* AxioVision no aumento de 40X do microscópio AXIOSKOP2 Zeiss. Para cada amostra, foram selecionadas três regiões do tecido tumoral e 20 pontos das células tumorais foram marcados em cada região. Assim foram analisados 60 pontos diferentes de cada amostra, obtendo a média da intensidade relativa de imunorreatividade. Os valores foram obtidos em unidades arbitrárias (u.a.) e a densidade óptica média (M.O.D. *Mean Optical Density*) mostrou a intensidade da imunocoloração especificamente nas áreas imunorreativas.

#### 4.3. Análise estatística

As cadelas foram agrupadas de acordo com as variáveis clínico - patológicas. A média das análises referindo-se a densitometria e a quantificação para os diferentes grupos de tumores mamários foi comparada pelo teste *t* de Student ou ANOVA, seguida pelo teste Bonferroni. Os valores foram expressos como média± S.E.M.

O ponto de corte para o risco de morte foi determinado pela curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Esta análise representa graficamente a comparação entre a distribuição de sensibilidade e especificidade para cada fator, ou taxa de verdadeiro positivo vs. taxa de falso positivo. Quanto mais próximo a curva ROC for localizada do quadrante superior esquerdo do gráfico, mais precisa é a variável teste, pois a taxa de verdadeiro positivo (sensibilidade) estará mais próxima de 1,0 e falso positivo (especificidade) mais próximo de zero. As curvas de sobrevida foram plotadas pelo método de Kaplan-Meier e as diferenças entre as curvas foram avaliadas pelo teste *log-rank* e *hazard function*.

A regressão logística multivariada foi realizada para avaliar os fatores que influenciaram a morte. Valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Todas as análises foram realizadas com auxílio do *software* GraphPad Prism4 e StatsDirect.

### 5. Cultivo celular

#### 5.1.Preparação do material coletado

Dez dos 30 fragmentos tumorais maiores que 2 cm coletados após o procedimento cirúrgico nas cadelas acometidas por tumor mamário, foram utilizados no cultivo celular.

Inicialmente, todas as soluções foram retiradas da geladeira e colocadas em banho-maria até atingirem a temperatura de 37°C. Para toda a rotina foram seguidos criteriosamente os procedimentos de antissepsia da capela e das pipetas com álcool 70% e luz ultravioleta.

Em placa de petri, os fragmentos tumorais foram lavados em PBS contendo 1% de Penicilina/Estreptomicina, três vezes por 10 minutos cada. Em seguida, foram cortados em microfragmentos com bisturi e colocados em garrafas de poliestireno com filtro contendo 1mL de meio de cultivo RPMI 1640 (Cultilab®) e incubados em estufa a 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48 horas, período em que as células se fixam no fundo da garrafa, foram adicionados 3mL de RPMI 1640. Todo meio de cultura utilizado foi enriquecido com 20% de BSA, 1% de Penicilina/Estreptomicina e 1% de L-Glutamina.

### **5.2. Manutenção das células *in vitro***

A cada dois dias o meio RPMI 1640 era trocado para estimular o crescimento das células oferecendo meio nutritivo e evitando o crescimento de contaminantes. As células foram cultivadas por aproximadamente um mês ou até atingirem 80% de confluência.

### **5.3. Tripsinização**

A tripsinização é uma etapa necessária para a passagem das células para as placas “six wells” e para outras garrafas para a realização dos procedimentos posteriores.

O meio de cultura das garrafas foi descartado e o tapete celular lavado com 5 mL de PBS. Em seguida as células foram encobertas com 2 mL de tripsina e mantidas em estufa a 37° C não excedendo o tempo limite de 10 minutos. Durante esse período, as monocamadas foram monitoradas ao microscópio óptico invertido para verificar o desprendimento das células. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de RPMI 1640 em cada garrafa e após homogeneização, a suspensão foi transferida para outros frascos de cultivo específicos. Finalmente, o meio RPMI 1640 foi adicionado e as células retornaram para estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **5.4. Imunocitoquímica da cultura celular**

As células foram submetidas à imunocitoquímica para confirmação da origem epitelial, com anticorpos específicos. Inicialmente as células em cultivo foram transferidas

para uma lâmina com garrafa acoplada, onde foi adicionado o meio RPMI 1640 e incubadas em estufa a 37° C durante 24 horas.

As células foram lavadas com 1 mL de PBS e incubadas com 600mL de fixador formaldeído a 4% por 20 minutos. Em seguida a lâmina foi desacoplada da garrafa, lavada com 1 mL de PBS e colocada na posição vertical para secagem.

As células foram então incubadas em solução contendo BSA por 30 minutos e com os anticorpos primários anti-citoqueratina para marcação de células epiteliais, anti-calponina para marcação das células mioepiteliais e anti-vimentina para células mesenquimais (Tabela 3), mantidas a 4°C por 24 horas. Após essa etapa seguiram-se as mesmas etapas descritas anteriormente no procedimento imunohistoquímico (página 18).

**Tabela 3:** Especificações dos anticorpos primários utilizados para o procedimento citoquímico.

Anticorpo	Especificidade	Diluição	Tampão	Marca
Anti-Citoqueratina	Monoclonal (mouse)	1:150	Citrato pH6	Dako
Anti-Calponina	Monoclonal (mouse)	1:100	Citrato pH 6	Dako
Anti-Vimentina	Monoclonal (mouse)	1:100	Citrato pH6	Dako

### 5.5. Preparação das placas para agressão com quimioterápico e curva de crescimento

As células da cultura de cada cadela foram separadas em duas garrafas, sendo uma utilizada como controle (sem tratamento) e a outra tratada com 0,2mg do quimioterápico de rotina (cloridrato de doxorrubicina, Adriamicina<sup>®</sup>) por 24 horas. A doxorrubicina foi escolhida porque além de estar presente na maior parte dos protocolos para carcinoma mamário, tem meia vida plasmática de 24 horas e não precisa ser ativada por enzimas hepáticas.

As curvas de crescimento foram realizadas pela contagem do número de células dos poços da placa “six wells”, utilizada como controle, e da placa-teste, onde foi aplicado o quimioterápico. Inicialmente, as células retiradas da garrafa por tripsinização foram colocadas em tubos de polipropileno de 15 mL. Seguiu-se a centrifugação, a fim de separar o meio

contendo tripsina das células, e o sobrenadante foi retirado, adicionado meio de cultura fresco e feita a homogeneização. As células foram separadas em tubo tipo eppendorf juntamente com o corante Azul de Tripán para verificação da viabilidade celular. O conteúdo foi colocado na câmara de Neubauer e a contagem das células foi realizada com auxílio do microscópio óptico invertido. Na câmara de Neubauer, foram contadas as células nos quatro quadrantes laterais com 16 campos cada, dividindo o número por quatro. Ao final as células foram desprezadas e o resultado da contagem foi colocado na fórmula:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Onde, C1 equivale ao número de células contadas na câmara e V1, o valor em que se quer chegar; C2 equivale a constante  $5 \times 10^4$  e V2 à quantidade em mL a ser colocada de meio RPMI 1640 em cada pocinho da placa de “six-wells” (2 mL).

No valor encontrado em  $\mu\text{L}$  de células, foram preparadas as placas para confecção da curva de crescimento das células utilizadas como controle e das células agredidas com quimioterápico. Adicionou-se 2 mL de meio RPMI 1640 em cada pocinho e em seguida as células. As placas foram colocadas na estufa a  $37^\circ\text{C}$  e no dia seguinte (dia 0), foram adicionados 0,04mg do quimioterápico Doxorrubicina em cada pocinho. No dia 1, as células do pocinho foram tripsinizadas, colocadas na câmara de Neubauer, contadas e o conteúdo desprezado. Ao final, o conteúdo era descartado. O procedimento foi repetido sucessivamente até o dia 7, ou até o dia de maior variação entre a placa em que o quimioterápico foi adicionado e a placa controle, ou seja, a leitura das duas placas por matriz terminava sempre que havia o menor número de células na placa em que foi adicionado o quimioterápico, e o maior número de células na placa controle.

O cálculo da dose de quimioterápico foi estabelecido de acordo com a dosagem preconizada para pacientes, calculando-se proporcionalmente a área das garrafas e poços das placas.

### **5.6. Extração de RNA Total**

Após 24 horas da aplicação do quimioterápico, o RNA total foi extraído das células utilizadas como controle e das células expostas ao quimioterápico. A extração dos ácidos nucléicos foi realizada de acordo com o protocolo que acompanha o reagente Trizol (Invitrogen®).

Inicialmente, o meio RPMI1640 foi desprezado das garrafas e acrescentou-se 3 mL de Trizol. Em seguida, foi transferido 1 mL do conteúdo para tubos de polipropileno de 15 mL

deixando descansar por 5 minutos à temperatura ambiente. Em cada tubo adicionou-se 200 µL de clorofórmio, homogeneizando por inversão e mantendo a temperatura ambiente por 3 minutos.

Os tubos foram centrifugados a 12.000 rcf por 15 minutos a 4° C, resultando em uma fase vermelha inferior – fase fenol-clorofórmio – uma interfase, e uma fase aquosa superior, na qual o RNA se concentra. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 400 µL de álcool isopropílico para precipitação do RNA, seguido de incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Após, centrifugou-se a 12.000 rcf por 15 minutos à 4° C formando um pellet de RNA, que foi lavado com 1mL de etanol 75% e centrifugado a 7500 rcf por 5 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados sobre papel para escorrer até secar o *pellet*. Após esta etapa, adicionou-se água DEPC (dietil pirocarbonato) (Amersham Biosciences®) em quantidade suficiente para diluir o *pellet*. A concentração dos RNAs foi determinada utilizando-se o aparelho NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific®) e as soluções de RNAs foram armazenadas a -80° C.

Para testar a integridade e qualidade do RNA extraído, uma alíquota de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% para análise das bandas específicas das subunidades 18S e 28S, representativas do RNAr. O RNA total foi então utilizado para síntese de DNA complementar (cDNA) com a enzima transcriptase reversa.

### 5.7. Obtenção do cDNA

A síntese de cDNA, foi realizada a partir de 2 µg de RNA total seguindo as especificações dos fabricantes do Kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems®). Anteriormente ao uso do Kit as amostras foram tratadas com DNase para eliminar qualquer possível resquício de DNA. Em cada tubo acrescentou-se 2 µL de DNase, 2 µL de *Buffer* 10X, levando ao termociclador a 25°C por 15 minutos. Acrescentou-se 2µL de EDTA (*stop solution*) e levando ao termociclador novamente a 65°C por 10 minutos.

Após, seguiu-se o uso do kit High Capacity cDNA, calculando a quantidade dos reagentes conforme o número de amostras, sempre incluindo o volume referente à perdas que podem ocorrer durante a transferência dos reagentes.

O mix foi preparado no volume final de 20 µL por amostra de RNA. Foram misturadas 0,8 µL de dNTP, 2 µL de Random Primer, 1 µL da enzima Multicribe Reverse Transcriptase e 4,2 µL de água DEPC e 10 µL de amostra de RNA. Em seguida, a solução final foi colocada no termociclador e em seguida armazenada em freezer a -20° C.

## 6. Técnica de PCR quantitativa: análise da expressão gênica

A técnica de PCR quantitativa (qPCR) foi realizada de acordo com Bustin et al. 2009.

A reação de qPCR foi realizada pelo método SYBR Green (Applied Biosystems®), utilizando-se os iniciadores específicos para os genes responsáveis pela síntese da GSH (GCLC e GSS) e da GSH-Px, o gene GST-Pi não foi utilizado neste estudo por não possuir sua sequência disponível para a espécie canina. Os genes normalizadores RPS19 e RPL8 foram utilizados como controles endógenos da reação, pois mostraram variação mais baixa de amplificação entre amostras de tecido mamário neoplásico em estudo prévio, no qual foram testados também os genes HPRT1, RPS15 e GUSB.

A tabela 4 mostra as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores.

**Tabela 4:** Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na técnica de PCR quantitativo para avaliar a expressão gênica relativa.

Gene	Sequência
<b>GCLC</b>	Sense 5' - CCA AGT CCC TCT TCT TTC CTG - 3' Antisense 5' - CGG AGA CGG TGT ATT CTT GTC - 3'
<b>GSS</b>	Sense 5' - AGC CAA TGC TCT GGT GCT AC - 3' Antisense 5' - ACC TTC GAC GGA TTA CAT GG - 3'
<b>GSH-Px</b>	Sense 5' - GGC ATC AGG AAA ACG CTA AG - 3' Antisense 5' - CCT CGC ACT TCT CAA AAA GC - 3'
<b>RPS19</b>	Sense 5' - CCT TCC TCA AAA AGT CTG GG - 3' Antisense 5' - GTT CTC ATC GTA GGG AGC AAG - 3'
<b>RPL8</b>	Sense 5' - CCA TGA ATC CTG TGG AGC - 3' Antisense 5' - GTA GAG GGT TTG CCG ATG - 3'

Um fator importante a ser considerado em experimentos de PCR quantitativo é a eficiência de amplificação do gene de interesse e dos genes normalizadores, em função da concentração de RNA utilizado. Dessa forma, é possível extrair a expressão relativa do gene de interesse a partir dos resultados obtidos. Para esta verificação, foram realizadas diluições seriadas do *pool* de cDNA, sendo testadas as concentrações 100 pmols/ $\mu$ g, 10 pmols/ $\mu$ g, 1 pmols/ $\mu$ g, 0,1 pmols/ $\mu$ g e 0,01 pmols/ $\mu$ g, sendo estabelecida a concentração de 10 pmol/ $\mu$ L.

As amostras de cDNA nas concentrações citadas foram submetidas à amplificação por PCR quantitativo, sendo o teste realizado para cada gene.

O resultado da validação da eficiência é dado por um valor chamado *slope*, que corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do  $C_t$  (*Cycle threshold*) dos genes de interesse e dos genes normalizadores em função do Log de diferentes quantidades de cDNA. O  $C_t$  é o momento no qual o sistema de amplificação começa a detectar um aumento no sinal associado ao aumento exponencial do produto de PCR na fase linear da reação. As comparações de quantidades são feitas a partir dos valores dos  $C_t$ .

Os valores do *slope* foram padronizados refletindo uma eficiência de amplificação entre 100% e 115%. A eficiência de amplificação dos iniciadores específicos para os genes de interesse e normalizadores foram calculadas de acordo com a equação:  $E=10^{(-1/slope)}$ .

Após a etapa de padronização, foram realizadas as análises para verificar a expressão diferencial dos genes GCLC, GSS e GSH-Px. O valor da expressão relativa dos genes de interesse foi determinado pelo método de quantificação em relação à média dos genes normalizadores (RPS19 e RPL8) utilizados como controle endógeno. As amostras foram testadas em triplicatas e, em todos os experimentos houve controle negativo (sem adição do primer) e um *pool* de amostras foi escolhido para calibração da reação. O *pool* de células é obtido a partir de uma mesma quantidade de células de cada amostra, onde, para expressão gênica das células não tratadas foi utilizado um *pool* de amostras das células tratadas, e um *pool* de células não tratadas foi utilizado para as amostras tratadas.

As reações foram realizadas no equipamento Real-Time PCR System Step One Plus (Applied Biosystems) e compreenderam uma etapa inicial de 2 minutos a 50° C, seguida por desnaturação inicial de 10 minutos a 95° C. Em seguida, o programa continuou com 40 ciclos de 15 segundos a 95° C, 1 minuto a 60° C para anelamento dos iniciadores e extensão das cadeias, seguidos de 35 segundos a 65° C para coleta do sinal.

Dessa forma, a partir dos valores do  $C_t$  de cada amostra, foram calculadas as médias das triplicatas. Posteriormente, foi calculado o  $\Delta C_t$  a partir da subtração da média obtida para a sequência de interesse por aquela do controle endógeno. Para o cálculo do  $\Delta-\Delta C_t$ , foi escolhido as células neoplásicas sem adição do quimioterápico (controle) como calibrador, sendo atribuído a mesma o valor de zero como resultado da subtração com seu próprio  $\Delta C_t$ .

Nas células tumorais em que foi aplicado o quimioterápico, o resultado do  $\Delta-\Delta C_t$  foi calculado a partir das diferenças dos valores de  $\Delta C_t$  de cada um deles em relação ao calibrador. Em seguida, foi calculado o  $2^{-\Delta-\Delta C_t}$ , ou seja, o  $(\Delta-\Delta C_t)^2$ . Finalmente, para uma melhor representação gráfica, os resultados foram apresentados em uma escala logarítmica de



base 3 ( $\text{Log}_3$ ). Considerou-se que houve aumento da expressão gênica quando o valor da expressão foi maior que 1, abaixo desse valor a expressão foi considerada não significativa.

## **7. Procedimento bioquímico**

### **7.1. Caracterização das amostras**

Primeiramente a dosagem sérica foi realizada em 33 cadelas do grupo controle, 30 cadelas do grupo I (coleta no momento da cirurgia), 28 cadelas do grupo II (coleta um mês após a cirurgia), 19 cadelas do grupo III (seis meses após a cirurgia) e 16 cadelas do grupo IV (18 meses após a cirurgia). O grupo total de 30 cadelas não foi o mesmo nas coletas do grupo II, grupo III e grupo IV devido à morte de algumas cadelas ao longo do acompanhamento e devido à desistência de alguns proprietários em colaborar com a pesquisa ao longo do estudo.

### **7.2. Dosagem de malondialdeído (MDA)**

A dosagem do MDA, produto da lipoperoxidação, foi realizada segundo o método de Kohn e Liversedge (1994), modificado por Percário et al.(1993). A técnica se baseia na reação do ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo. As amostras foram preparadas com soro compreendendo a reação de duas moléculas do TBA que reagem com uma molécula de MDA, formando um complexo TBA-MDA-TBA de cor rósea, com absorvância de 535 nm.

O protocolo de dosagem para MDA inclui o preparo da amostra identificada como “branco” com a função de zerar o espectrofotômetro com 500  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em água à 10 mM, em pH 2,5. A solução padrão constitui-se de 0,1 mL de 1-1-3-3 tetraetoxipropano dissolvido em 1,0 L de água destilada. O chamado padrão do teste, utilizado nos cálculos da dosagem das amostras, origina-se da mistura de 500  $\mu\text{L}$  da solução padrão com 1,0 mL de reagente TBA. A 500  $\mu\text{L}$  de amostra de soro foi acrescentado 1,0mL de reagente TBA. O procedimento para análise seguiu-se com homogeneização de todos os tubos, ou seja, branco, padrão e amostra; incubação a 95° C por 1 hora; resfriamento em água corrente; adição de 4,0 mL de álcool butílico (CAAL; 11413); homogeneização em vórtex (Phoenix, AP56); centrifugação a 2500 rpm por 15 minutos e coleta de 3,0mL do sobrenadante para leitura espectrofotométrica (CELM; E225D) em 535 nm, sendo as cubetas mantidas a 25°C. Os valores do MDA são expressos em nmol/mL, sendo obtidos após leitura do valor de absorvância e aplicado na fórmula apresentada a seguir.

$$\text{MDA} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times 440,6 \times f}{0,0237} \quad \text{onde } f = \frac{0,237}{\text{Absorbância do padrão}}$$

### 7.3. Capacidade antioxidante total em equivalência ao Trolox (TEAC)

O potencial antioxidante foi determinado segundo a sua equivalência a um potente anti-oxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxílico; Aldrich Chemical Co 23881-3), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Foi realizado o método proposto por Miller et al. (1993), modificado por Re et al. (1999), em condições adaptadas de temperatura, proporções relativas dos reagentes e tempo de mensuração.

Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), produzindo diretamente o radical cátion ABTS, cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815nm. A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação (Miller, 1996). Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorvância lida a 734 nm durante um determinado intervalo de tempo.

Assim, a extensão da descoloração como índice de inibição do radical cátion ABTS é determinada como a atividade antioxidante total da amostra (Miller, 1993), sendo então calculada a sua relação com a reatividade do trolox como padrão, sob as mesmas condições. Os resultados finais foram expressos em milimol por litro (mMol/L) correspondente a concentração do TROLOX.

## 8. Análise estatística

No qPCR, para determinar a possível associação entre a diferença relativa da expressão gênica entre os grupos foi utilizado o teste não paramétrico U de *Man-Whitney*.

No procedimento bioquímico, para determinar o nível de peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante entre os quatro diferentes períodos das coletas, foi realizado o teste t de *student*.

O nível de probabilidade (p) menor que 0,05 foi adotado como critério de significância. Todas as análises foram realizadas com auxílio do *software* GraphPad Prism4 e StatsDirect.

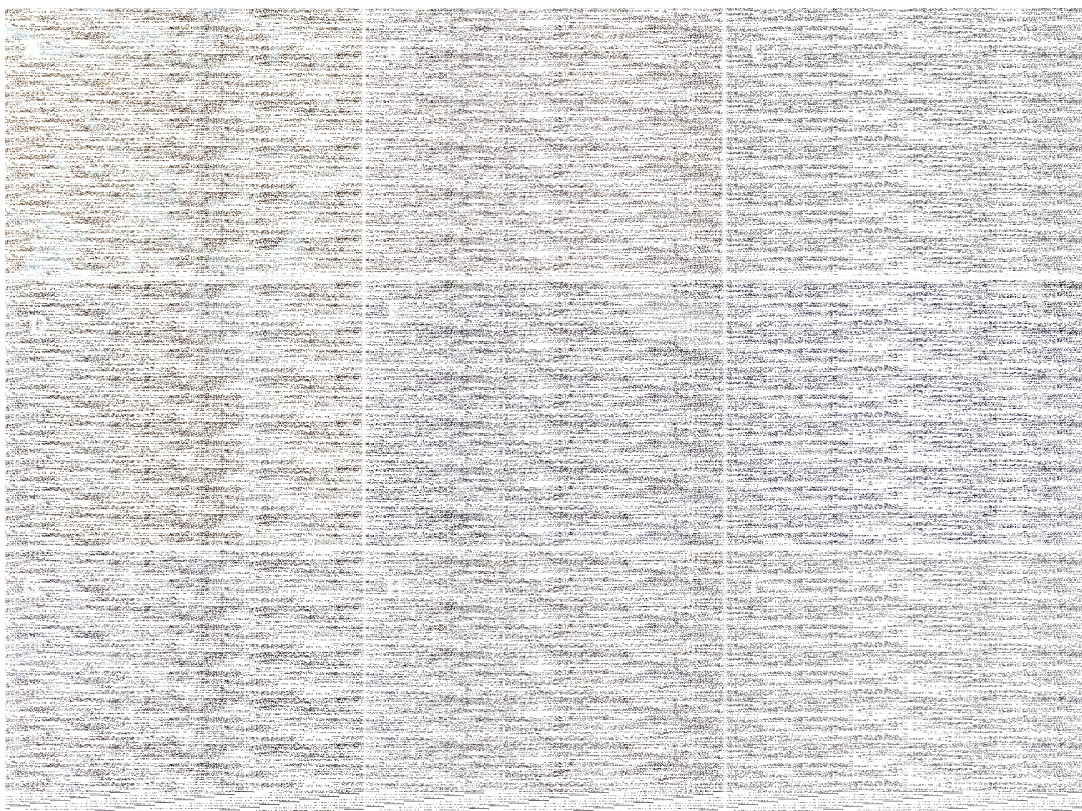
## *Resultados*

---

## IV. RESULTADOS

### 1. Expressão protéica pela imunohistoquímica

A imunomarcção da GSH foi evidente no citoplasma das células neoplásicas, enquanto a GSTpi e GSH-Px foi evidente no citoplasma e focalmente nos núcleos das células neoplásicas. Ambos os anticorpos apresentaram reatividade no estroma (Figura 3).



**Figura 3.** Fotomicrografia do procedimento imunohistoquímico demonstrando a marcação dos anticorpos em carcinoma mamário de cadela. AXIOSKOP2, 40X. **A.** Imuno-coloração da GSH (alta intensidade). **B.** Imuno-coloração da GSH (média intensidade marcação). **C.** Imuno-coloração da GSH (baixa intensidade). **D.** Imuno-coloração da GSTpi (alta intensidade). **E.** Imuno-coloração da GSTpi (média intensidade). **F.** Imuno-coloração da GSTpi (baixa intensidade). **G.** Imuno-coloração da GSH-Px (baixa intensidade). **H.** Imuno-coloração da GSH-Px (média intensidade). **I.** Imuno-coloração da GSH-Px (alta intensidade).

A expressão imunohistoquímica da GSH, GSTpi e GSH-Px foi comparada com as características clínicas e patológicas e com a evolução clínica das cadelas, incluindo metástase e óbito.

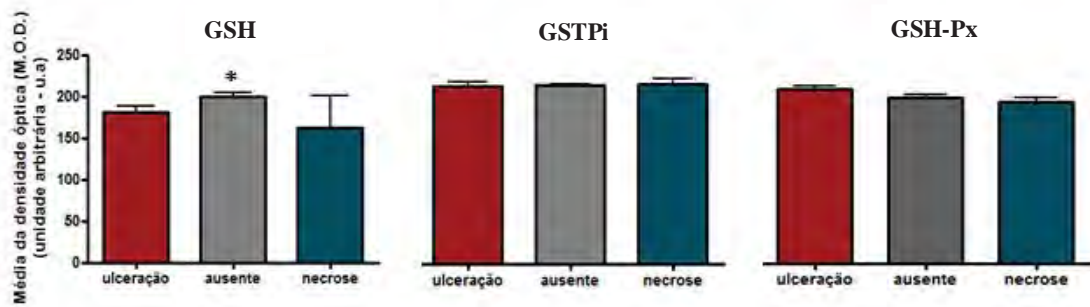
Não houve correlação entre expressão da GSH e as características clínicas e patológicas, como idade, tempo de evolução, tipo histológico, estadiamento clínico ou número de nódulos e vascularização ( $p > 0,05$ ; Tabela 5). Entretanto, a alta expressão da GSH teve correlação estatística com tumores não ulcerados ( $p = 0,03$ ; Figura 4).

A taxa de metástase foi de 26,7% e o mesmo foi encontrado para óbito (Tabela 5). O aumento da expressão da GSH estava presente em cadelas com maior sobrevida e que continuavam vivas até o final do seguimento ( $p = 0,0003$ ; Figura 5) e também naquelas que não apresentaram metástase ( $p = 0,0003$ ; Figura 6).

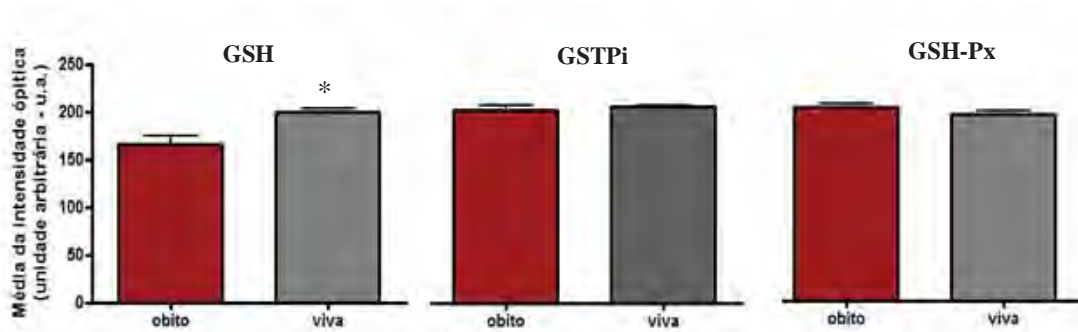
Quanto a expressão das enzimas GSTpi e GSH-Px não houve relação estatisticamente significativa com as variáveis analisadas ( $p > 0,05$ ; Tabela 5).

**Tabela 5** – Correlação entre a marcação dos três anticorpos com os fatores clínicos e patológicos das cadelas selecionadas para o estudo.

Fatores Clínicos e Patológicos	Número de cadelas	GSH	GSTpi	GSH-Px
<b>Idade</b>				
≥ 10 anos	16 (53,3%)	185,3 ± 6,532	202,8 ± 2,537	194,4 ± 3,838
< 10 anos	14 (46,7%)	196,9 ± 6,170	206,5 ± 1,842	202,3 ± 2,936
P		> 0,05	> 0,05	> 0,05
<b>Tempo de Evolução</b>				
Até 6 meses	13 (50%)	196,5 ± 21,82	204,6 ± 6,172	202,9 ± 13,81
Entre 6 e 18 meses	7 (27%)	182,3 ± 31,20	205,5 ± 9,397	192,5 ± 13,55
Mais que 18 meses	6 (23%)	180,0 ± 24,07	202,5 ± 14,49	190,8 ± 14,18
P		> 0,05#	> 0,05#	> 0,05#
<b>Grau Histológico</b>				
Tumores malignos	26 (87%)	189,9 ± 4,829	204,0 ± 1,757	198,3 ± 2,869
Tumores benignos	4 (13%)	196,3 ± 15,69	209,3 ± 3,860	203,5 ± 4,173
P		> 0,05	> 0,05	> 0,05
<b>Estadiamento Clínico</b>				
I	11 (37%)	202,3 ± 15,36	204,7 ± 5,746	199,4 ± 11,83
II	4 (13%)	190,0 ± 45,03	208,0 ± 4,243	198,3 ± 19,57
III	10 (33%)	183,3 ± 24,50	202,2 ± 12,75	196,4 ± 13,09
IV	5 (17%)	180,6 ± 21,13	206,0 ± 8,689	198,4 ± 18,94
P		> 0,05#	> 0,05#	> 0,05#
<b>Número de nódulos</b>				
Múltiplos	9 (30%)	177,9 ± 7,181	204,6 ± 2,844	200,8 ± 5,112
Únicos	21 (70%)	196,2 ± 5,314	204,5 ± 2,001	197,4 ± 3,044
P		> 0,05	> 0,05	0,55
<b>Ulceração</b>				
Ulceração	10 (34%)	180,8 ± 22,75	203,5 ± 13,53	205,0 ± 9,129
Necrose	2 (7%)	162,0 ± 55,15	204,9 ± 5,557	189,5 ± 6,364
Ausente	17 (59%)	199,4 ± 19,52	206,0 ± 8,485	195,2 ± 15,34
P		0,03* #	> 0,05#	> 0,05#
<b>Irrigação</b>				
Abundante	15 (50%)	184,1 ± 7,164	205,7 ± 2,080	197,9 ± 3,349
Moderada	15 (50%)	197,3 ± 5,374	203,3 ± 2,499	198,2 ± 3,914
P		> 0,05	> 0,05	> 0,05
<b>Censura</b>				
Óbito	8 (26,7%)	165,5 ± 8,592	204,1 ± 1,869	203,0 ± 3,937
Viva	22 (73,3%)	199,9 ± 3,921	205,9 ± 1,191	196,3 ± 3,099
P		0,0003*	> 0,05	> 0,05
<b>Metástase</b>				
Sim	8 (26,7%)	165,5 ± 8,592	204,1 ± 1,869	203,0 ± 3,937
Não	22 (73,3%)	199,9 ± 3,921	205,9 ± 1,191	196,3 ± 3,099
P		0,0003*	> 0,05	> 0,05



**Figura 4:** Níveis de concentração de GSH, GSTpi e GSH-Px respectivamente nas células tumorais de mama de cadelas em relação a presença de ulceração, ausência de ulceração e necrose. \*valor significativo no teste ANOVA.



**Figura 5:** Níveis de concentração de GSH, GSTpi e GSH-Px nas células tumorais de mama de cadelas em relação ao óbito e as cadelas que continuaram vivas. \*valor significativo no teste t de *student*.

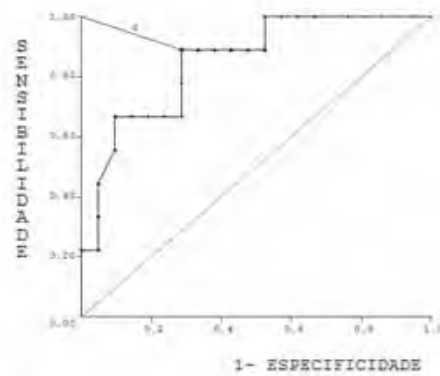


**Figura 6:** Níveis de concentração de GSH, GSTpi e GSH-Px nas células tumorais de mama de cadelas em relação a cadelas que tiveram metástase e as cadelas que não tiveram metástase. \*valor significativo no teste t de *student*.

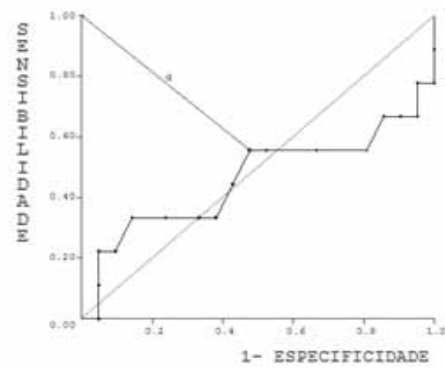
Para realizar a curva ROC, a expressão protéica da GSH, GSTpi e GSH-Px das cadelas que morreram foi comparada com as cadelas que continuaram vivas até a data final de acompanhamento. As curvas ROC foram calculadas para demonstrar o desempenho e os valores limite para expressão da GSH, GSTpi e GSH-Px para prever o risco de morte em cadelas com neoplasia mamária. O gráfico da curva ROC mostrou o cálculo da sensibilidade/especificidade, estabelecendo o melhor ponto de corte para discriminar alto risco de morte em cadelas, o qual para expressão da GSH foi: M.D.O. = 197 u.a. (sensibilidade= 89% e especificidade = 71%), para expressão da GSTpi foi: M.D.O.= 206 u.a. (sensibilidade = 56% e especificidade = 52%) e para expressão da GSH-Px foi: M.D.O.= 197 u.a. (sensibilidade = 78% e especificidade = 52%). Os gráficos da curva ROC e a especificidade e sensibilidade para cada proteína estão apresentados na figura 7.



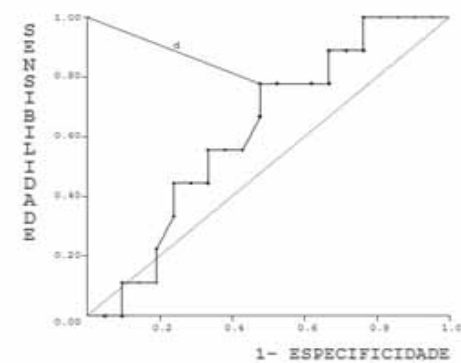
A



B

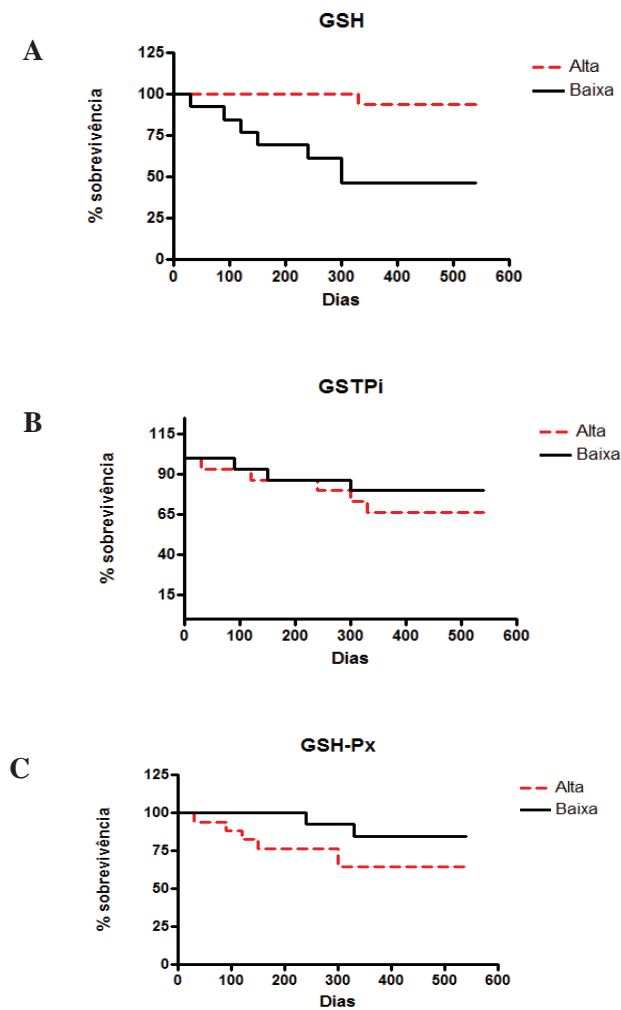


C



**Figura 7.** Curva ROC mostrando o ponto máximo da sensibilidade e especificidade da expressão proteica e correlação do óbito em cadelas com neoplasia mamária. **(A)** Proteína GSH. Sensibilidade = 89% (95% CI) e especificidade = 71% (95% CI). **(B)** Proteína GSTPi. Sensibilidade = 56% (95% CI) e especificidade = 52% (95% CI). **(C)** Proteína GSH-Px. Sensibilidade = 78% (95% CI) e especificidade = 52% (95% CI). IC = Intervalo de confiança.

As cadelas foram acompanhadas de 30 a 540 dias com média de 448 dias. Para análise da curva de sobrevida, as cadelas foram divididas em grupos de alta e baixa expressão da enzima usando o valor de corte estabelecido pela curva ROC. A baixa expressão da GSH no tumor foi relacionada com alta taxa de mortalidade no grupo ( $p=0,002$ ) (Figura 8A). Não houve correlação entre a expressão da GSTPi (Figura 8B) e GSH-Px (Figura 8C) e a sobrevida global no grupo ( $p>0,05$ ).



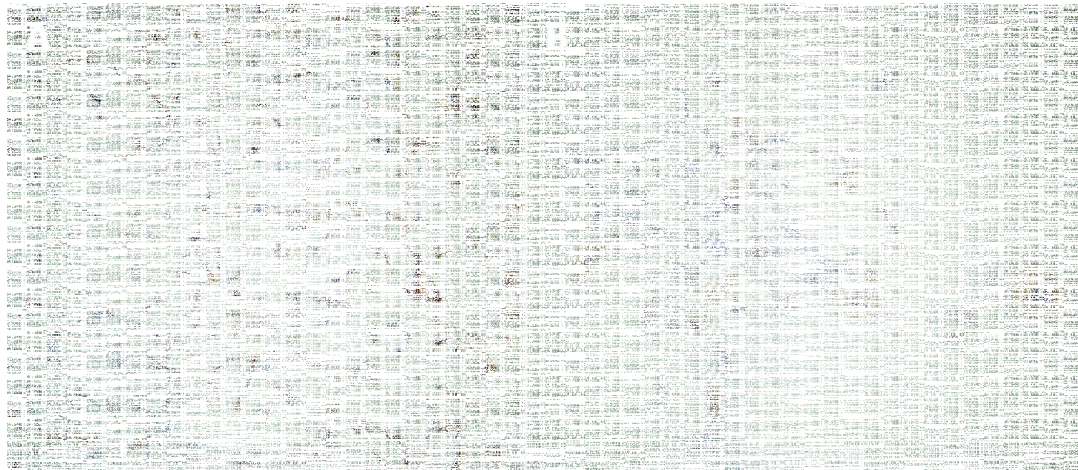
**Figura 8.** Sobrevida global das cadelas do grupo total ( $n=30$ ) com alta e baixa expressão das proteínas. **(A)** Sobrevida das cadelas com relação a expressão da GSH (ponto de corte selecionado = M.O.D. = 197 a.u.) ( $p=0,002$  / OR. 0.07 / I.C. 95%: 0.02 to 0.43). **(B)** Sobrevida das cadelas com relação à expressão da GSTPi (ponto de corte selecionado = M.O.D. = 206 a.u.) ( $p>0,05$  / OR. 1.75 / I.C. 95%: 0.43 to 7.02). **(C)** Sobrevida das cadelas com relação a expressão da GSH-Px (ponto de corte selecionado = M.O.D. = 197 a.u.) ( $p>0,05$  / OR. 2.72 / I.C. 95%: 0.62 to 10.13). OR= odds ratio; I.C. = Intervalo de confiança.

## 2. Expressão gênica da cultura celular

A análise da expressão relativa dos genes responsáveis pela síntese da GSH e da GSH-Px pela técnica de PCR quantitativo foi realizada a partir das células cultivadas, provenientes de fragmentos tumorais de 10 cadelas com neoplasia mamária. A expressão gênica foi verificada em células tratadas e em células não tratadas com quimioterápico de rotina (doxorrubicina).

### 2.1. Imunocitoquímica

Os resultados da imunocitoquímica das células tumorais *in vitro* mostraram que a maioria era de células epiteliais (positivo para citoqueratina), assim como as mioepiteliais (positivo para calponina) e eventualmente alguns fibroblastos teciduais (positivo para vimentina) (Figura 9).

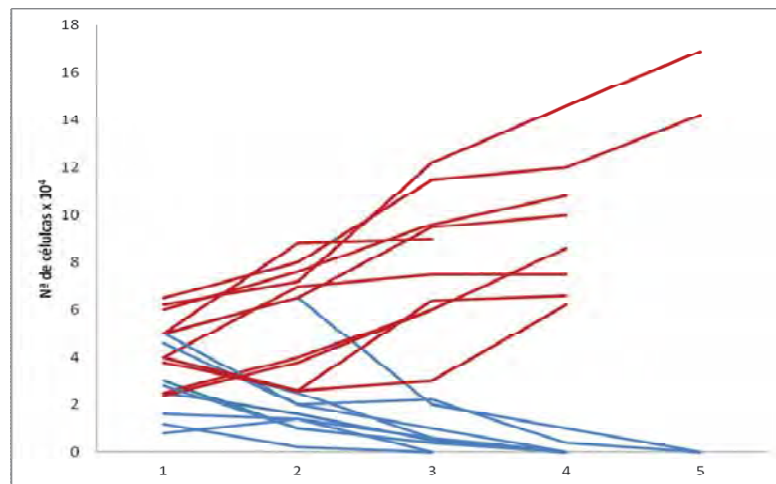


**Figura 9:** Fotomicrografia de cultivo celular de células de neoplasia mamária de cadelas. **(A).** Imunomarcaç o positiva para calponina. **(B).** Imunomarcaç o positiva para vimentina.

### 2.2. Curva de crescimento das c elulas *in vitro*

Nas curvas de crescimento das 10 amostras tumorais cultivadas foi observada uma diferen a significativa entre as placas controle (sem a aplica o do quimioter pico) e as placas com a aplica o da Doxorrubicina.

Nas placas controle as células se mantinham em crescimento a cada dia observado, enquanto nas placas com células tratadas com a doxorubicina houve diminuição do número de células a cada dia chegando à zero entre o quarto e sexto dia de observação, confirmando assim a eficácia do fármaco (Figura 10).



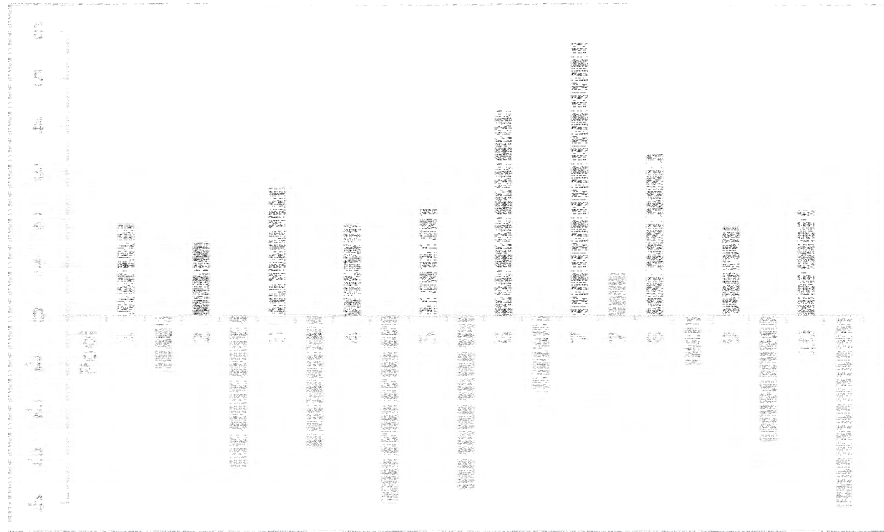
**Figura 10:** Curva de crescimento das 10 amostras da cultura celular mostrando o crescimento das células não tratadas com a doxorubicina (linha vermelha) e das células tratadas com a doxorubicina (linha azul).

### 2.3. PCR em Tempo Real (qPCR)

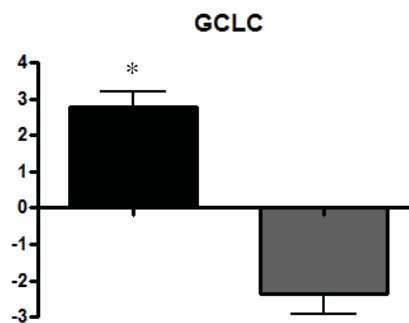
Os resultados de expressão gênica realizados no material extraído das culturas de células tumorais controle e tratadas com doxorubicina mostraram diferenças nas expressões para cada gene estudado conforme descrição individual que se segue:

### Glutamato cisteína ligase (GCLC)

Houve diminuição da expressão do gene *GCLC* (apresentado graficamente na Figura 11) após a aplicação do quimioterápico em 100% das (p=0,0001) (apresentado estatisticamente na Figura 12).



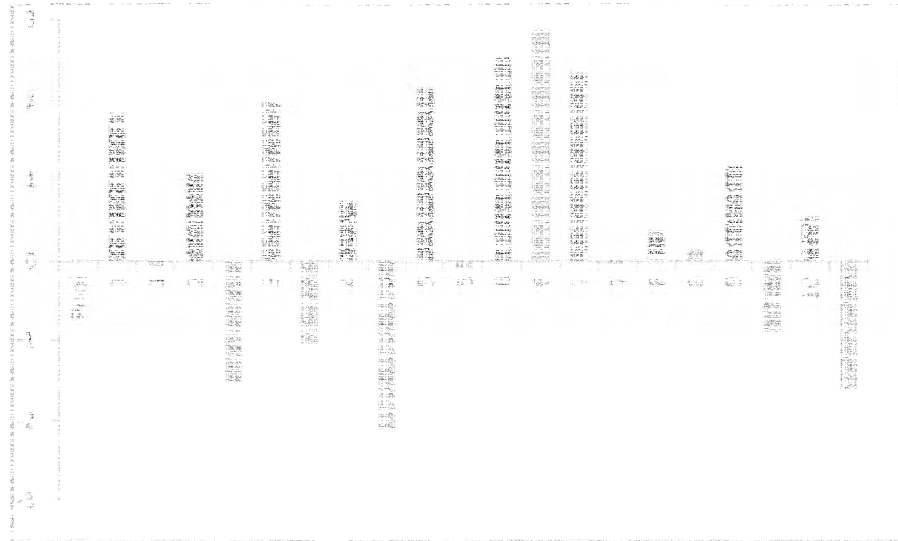
**Figura 11.** Expressão quantitativa do gene *GCLC* em células de tumores mamários, não tratadas com doxorrubicina [controle (barras pretas)] e expostas ao quimioterápico (barras cinzas). Valores da expressão gênica em  $\text{Log}_3$ . *Pool* – vide pág. 43



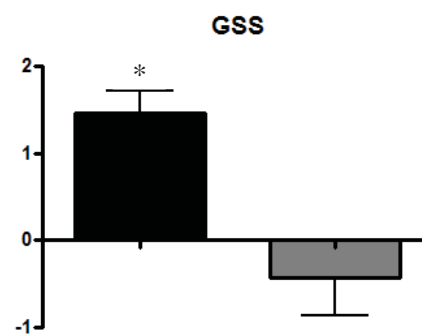
**Figura 12.** Expressão quantitativa dos gene *GCLC* em células de tumores mamários tratadas com a doxorrubicina (barra vermelha) e não expostas ao quimioterápico (barra cinza). \* nível de significância para o teste não paramétrico U de *Mann-Whitney* (p=0,0001).

### Glutathiona sintetase (GSS)

O gene *GSS* também apresentou menor expressão (apresentado graficamente na Figura 13) após o tratamento com o fármaco em 90% das amostras ( $p=0,001$ ) (apresentado estatisticamente na Figura 14).



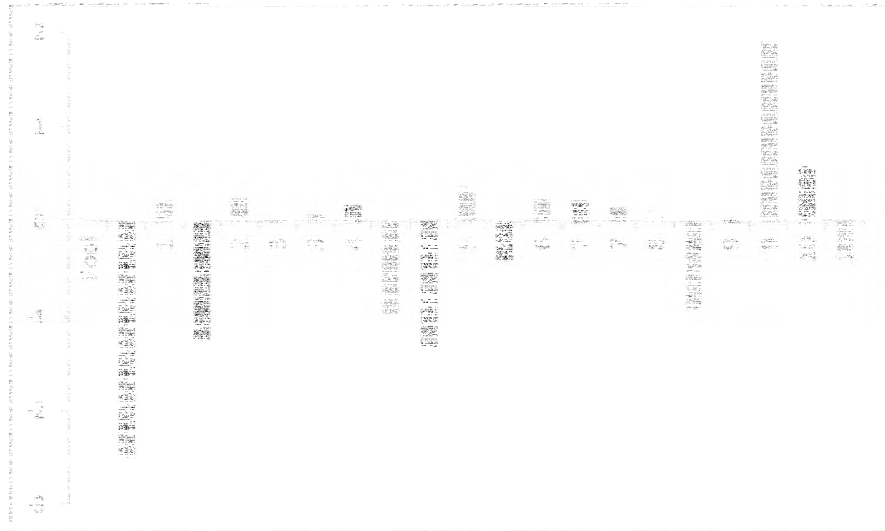
**Figura 13.** Expressão quantitativa dos gene *GSS* em células de tumores mamários não tratadas com a doxorrubicina [controle (barras pretas)] e expostas ao quimioterápico (barras cinzas). Valores da expressão gênica em  $\text{Log}_3$ . *Pool* – vide pág. 43



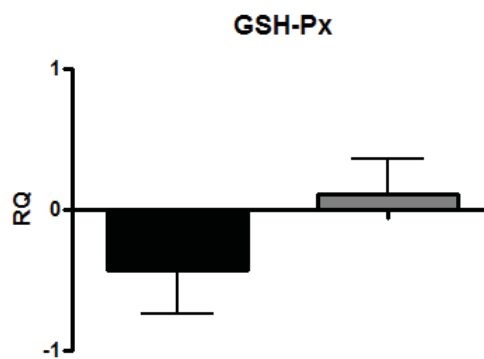
**Figura 14.** Expressão quantitativa dos gene *GSS* em células de tumores mamários tratadas com a doxorrubicina (barra vermelha) e não expostas ao quimioterápico (barra cinza). \* nível de significância para o teste não paramétrico U de *Mann-Whitney* ( $p=0,001$ ).

### Glutationa Peroxidase (GSH-Px)

Não houve diferença estatisticamente significativa da expressão do gene *GSH-Px* (apresentado graficamente na Figura 15) em relação ao grupo controle e o grupo tratado com a doxorrubicina ( $p > 0,05$ ) (apresentado estatisticamente na Figura 16).



**Figura 15.** Expressão quantitativa dos gene *GSH-Px* em células de tumores mamários não tratadas com a doxorrubicina [controle (barras pretas)] e expostas ao quimioterápico (barras cinzas). Valores da expressão gênica em  $\text{Log}_3$ . Pool – vide pág. 43



**Figura 16.** Expressão quantitativa dos gene *GSH-Px* em células de tumores mamários tratadas com a doxorrubicina (barra vermelha) e não expostas ao quimioterápico (barra cinza).

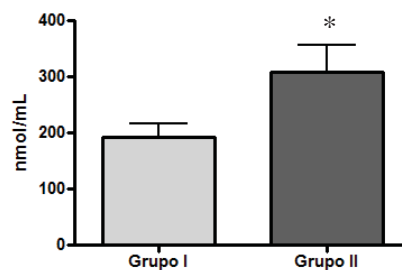
### 3. Procedimento bioquímico

O estudo foi realizado de forma a estabelecer a intensidade do estresse oxidativo, através da quantificação da peroxidação lipídica pela dosagem do MDA e do potencial antioxidante mensurado pelo TEAC no sangue de cadelas com neoplasias mamárias.

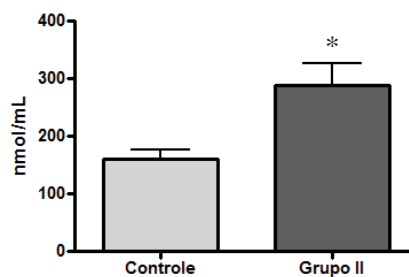
#### 3.1 Malondialdeído (MDA)

Houve aumento significativo no nível de peroxidação lipídica dosada pelo MDA na segunda coleta comparada com a primeira coleta ( $p=0,03$ ) (Figura 17) e entre a segunda coleta e o grupo controle ( $p= 0,002$ ) (Figura 18). Não houve resultado significativo em relação às outras coletas ( $p>0,05$ ).

Em relação aos níveis de MDA um mês após a retirada do tumor, houve aumento significativo nas cadelas que vieram a óbito em relação as cadelas que continuaram vivas ( $p=0,01$ ) (Figura 19).

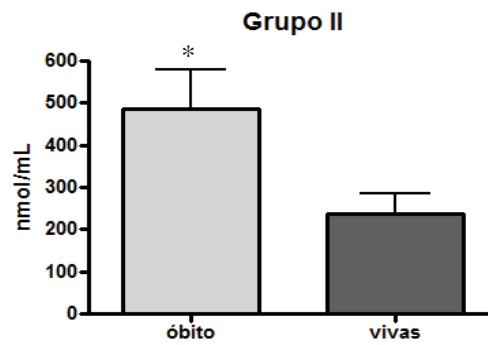


**Figura 17.** Níveis de malondialdeído no grupo I e grupo II ( $p=0.03$  / I.C. 95%: -226.6 to -6.015) I.C. = Intervalo de confiança. \*valor significativo no teste t de *student*.



**Figura 18.** Níveis de malondialdeído entre no grupo controle e grupo II ( $p=0.002$  / I.C. 95%: -240.2 to -55.85) I.C. = Intervalo de confiança. \*valor significativo no teste t de *student*.

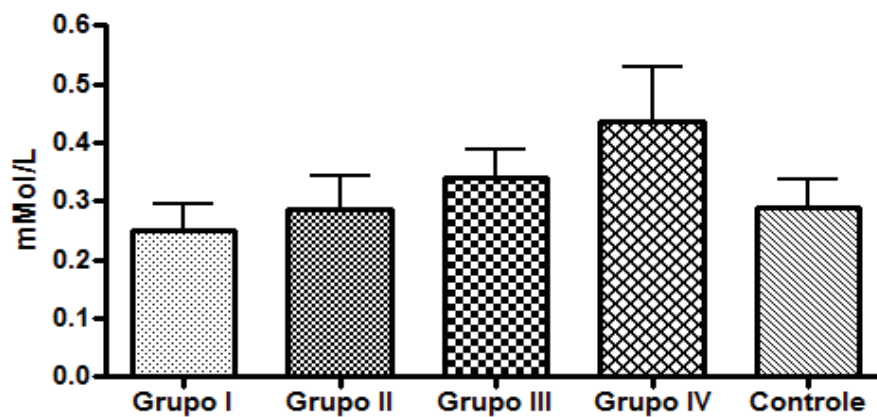




**Figura 19.** Níveis de malondialdeído entre as cadelas que vieram a óbito e as cadelas que continuaram vivas ( $p=0.01$  / I.C. 95%: 54.33 to 439.7) I.C. = Intervalo de confiança. \*valor significativo no teste t de *student*.

### 3.2. Capacidade antioxidante total em equivalência ao Trolox (TEAC)

Na dosagem do TEAC não houve correlação significativa entre os quatro períodos das coletas e entre o grupo controle ( $p>0,05$ ) (Figura 20).



**Figura 20.** Mensuração do TEAC entre os quatro períodos de coletas e entre o grupo controle ( $p>0.05$ ).

## *Discussão*

---

## V. DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada a expressão das proteínas glutathiona, glutathiona S transferase pi e glutathiona peroxidase em cadelas com neoplasia mamária em um estudo imunohistoquímico e bioquímico validado pela expressão gênica verificada no cultivo celular primário. A expressão da GSH e das enzimas GSTpi e GSH-Px foi avaliada correlacionando-as com os dados clínicos e patológicos das cadelas. Neste contexto, quando relacionada à expressão imunohistoquímica da GSH e das enzimas GSTpi e GSH-Px com o fator idade, tempo de evolução, grau histológico, estadiamento clínico, número de nódulos e irrigação tumoral não foram obtidas relações estatisticamente significantes. O mesmo ocorreu em estudos de Kasapović et al. (2010) que verificaram a atividade da GSH e GSH-Px no sangue de mulheres com câncer de mama como resposta à quimioterapia, sem correlação com a idade.

No período de um ano e seis meses de acompanhamento das cadelas, não foram observados resultados significantes quando comparada a expressão da GSTpi e GSH-Px com metástase e óbito, diferente do encontrado por Buser et al. (1997) que detectaram atividade maior de GST em tumores de mama com presença de metástase.

Houve aumento da expressão da GSH em tumores com ausência de ulceração, sem metástase e com baixa taxa de mortalidade até o final do seguimento. Ao contrário, em pacientes com câncer de mama, Ballatori et al. (2009) demonstraram que o alto nível de GSH aumenta a capacidade antioxidante das células neoplásicas, tornando-as resistentes à quimioterapia. Assim, a alta expressão da GSH pode ter caracterizado a baixa resposta a quimioterapia nas pacientes analisadas nesse estudo, contribuindo para o desenvolvimento de metástases (BALLATORE et al., 2009).

Conforme descrito anteriormente, a GSH em conjugação com a GST-pi e GSHPx tem um papel importante na defesa antioxidante das células tumorais, dando a elas vantagem sobre as células saudáveis. Assim, os resultados obtidos pela técnica de imunohistoquímica demonstram que a alta ação da GSH teve relação com melhor prognóstico em cadelas com neoplasia mamária, devido provavelmente, a menor intensidade da atividade das enzimas GSTPi e GSH-Px, que atuam em conjugação a ela.

Apesar dos reconhecidos avanços na identificação de genes envolvidos no crescimento, progressão e resistência de tumores a fármacos, o modo como esses genes participam, interagem e são regulados nesses processos, ainda não está esclarecido. A compreensão de como marcadores moleculares estão associados com resposta terapêutica é

indispensável para a escolha do tratamento adequado. A capacidade para o estabelecimento de culturas primárias de células tumorais é um importante pré-requisito na pesquisa do câncer, permitindo o estudo de fatores prognósticos e agentes terapêuticos. Além disso, esta é a melhor forma de avaliação do valor preditivo de um tratamento adjuvante, que pode ser aplicado prontamente para o paciente com câncer (HOOD e PARHAM, 1998).

A possibilidade de serem testados fármacos quimioterápicos antes do uso em pacientes e a utilização conjunta com fatores de crescimento e agentes que desencadeiam apoptose demonstram a potencialidade desse modelo experimental (OLIVEIRA et al., 2005) que poderia ser incluído na rotina de hospitais especializados. Culturas de células primárias tem sido usadas com sucesso, no intuito de obter resposta à exposição a quimioterápicos e apoiar o desenvolvimento de novos fármacos anti-câncer (CREE et al., 2010).

No experimento *in vitro* realizado neste estudo para validar os dados obtidos pela imunohistoquímica, foi verificada a influência do quimioterápico doxorrubicina na expressão dos genes que sintetizam as enzimas precursoras da GSH e do gene que expressa a proteína GSH-Px. De acordo com as curvas de crescimento da cultura celular, a doxorrubicina se mostrou eficaz em causar a morte das células tumorais. Além disso, após a exposição a este fármaco, o gene GCLC, que sintetiza a enzima glutamato cisteína ligase que catalisa o primeiro passo da síntese da GSH, apresentou-se subexpresso em 100% das amostras, e a expressão do gene GSS que sintetiza a enzima glutationa sintetase que catalisa o segundo e último passo da síntese da GSH, apresentou também subexpressão em 90% das amostras analisadas. No entanto, a expressão do gene GSH-Px não foi alterada.

Diversos estudos demonstram que após a exposição *in vitro* com a doxorrubicina ou fármacos semelhantes, alterações na expressão dos genes responsáveis pela síntese dessas proteínas normalmente ocorrem. Os resultados aqui encontrados estão de acordo com o estudo de Ozkan e Fiskin (2006), no qual, a aplicação do quimioterápico epirrubicina, um análogo estrutural da doxorrubicina, em células neoplásicas da mama, diminuiu a atividade da GSH após 24 horas de exposição *in vitro*.

Estudos sugerem que a grande produção de ROS no tratamento com doxorrubicina é responsável pela citotoxicidade nas células neoplásicas e, em consequência disso, essas células superexpressam genes responsáveis pela síntese de antioxidantes como a GSH e GSH-Px tornando-se resistentes aos danos oxidativos (GAUDIANO et al., 2000). Han et al. (2007), utilizando linhagem celular de carcinoma mamário (MCF-7), observaram que há maior sensibilidade a doxorrubicina à medida que os níveis de GSH diminuem. Ao contrário, Di et al. (2009) demonstraram que a superexpressão da GSH não impediu a apoptose em células

tumorais quando tratadas com doxorubicina, sugerindo que a citotoxicidade desse fármaco não está diretamente relacionada à produção de ROS.

Provavelmente, a relação entre altas concentrações de GSTpi e a resistência a quimioterápicos está associada a capacidade celular em promover a conjugação desses fármacos com a GSH reduzindo a entrada da droga no núcleo. Alguns autores sugerem que a inibição da GSH leva ao acúmulo dos quimioterápicos no núcleo das células tumorais (BENDERRA et al., 2000; LAPENSEE et al., 2009) enquanto outros, que a resistência à doxorubicina ou outros fármacos semelhantes não está diretamente relacionada com a conjugação do quimioterápico com a GSH (GAUDIANO et al. 2000).

A resistência ao agente antineoplásico cisplatina, por exemplo, tem sido associada com a alta expressão da enzima gama glutamil transpeptidase localizada na membrana celular, responsável pela degradação da GSH em seus aminoácidos constituintes. Assim, apesar dos tratamentos citotóxicos levarem a diminuição das concentrações intracelulares de GSH, a enzima gama glutamil transpeptidase hidrolisa a GSH sérica, dando para as células os aminoácidos necessários para a reposição da GSH intracelular (HANING e PILOT 1985). A gama glutamil transpeptidase é principalmente encontrada nas células do fígado e rim, no entanto, a resistência a quimioterápicos associada a altas concentrações dessa enzima foi relatada em diversos tipos de câncer incluindo alguns tumores de mama (HANING e PILOT 1985).

Nesse contexto, diversas pesquisas dedicam-se a identificar agentes terapêuticos que possam aumentar a eficácia dos quimioterápicos convencionais e/ou reverter o fenótipo de MDR nas células neoplásicas (ZHU et al., 2002; LI et al., 2000). Não se sabe exatamente quais alterações intracelulares são responsáveis por essa resistência. Sugere-se que altas concentrações de GSH, GSH-Px e GSTpi, independente de outras alterações intracelulares, não contribuem de modo decisivo para a MDR (LORUSSO et al., 2009; PEZZOLA et al., 2010). Apesar da relação entre a alta expressão desses genes e a MDR, alguns estudos sugerem que o uso de agentes que levam ao aumento das concentrações de GSH, GSH-Px e GSTs durante o tratamento quimioterápico é um caminho promissor para reduzir os efeitos colaterais da quimioterapia em pacientes com câncer de mama (ATUKEREN et al., 2010; MURALIKRISHNAN et al., 2010; SUHAIL et al., 2011).

Assim, no experimento *in vitro*, em que as células tratadas apresentaram baixa expressão da GSH nas cadelas estudadas, também não ocorreu alteração significativa na expressão gênica da GSH-Px. Isso pode ser explicado com base na atuação conjunta da GSH e da GSH-Px. A GSH-Px possui selênio no seu sítio catalítico e utiliza a GSH como doador

de elétrons para redução de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  (VALKO et al., 2007; BALLATORI et al., 2009). Portanto, a baixa expressão dos genes que aumentam a produção da GSH e a não alteração da GSH-Px neste estudo, sugerem que elas não estão garantindo a defesa oxidante às células neoplásicas tornando-as sensíveis ao quimioterápico.

Com relação ao nível de estresse oxidativo foi realizado neste estudo análise sérica de MDA, um produto da peroxidação lipídica produzido durante o ataque dos radicais livres às lipoproteínas da membrana e ácidos graxos poliinsaturados (YANG et al., 2006).

Alguns autores tem demonstrado aumento da peroxidação lipídica e aumento dos níveis de MDA detectados em tecidos mamários de pacientes com câncer de mama (NATH et al. 1995; WANG et al. 1996; HUANG et al. 1999). Os produtos das reações de peroxidação lipídica no soro de pacientes com câncer de mama foram analisados por Punnonen, et al. 1994 que descobriram que os níveis séricos de MDA estavam elevados em pacientes com câncer de mama. Neste estudo, entretanto, não foram encontrados níveis elevados de MDA no soro das cadelas com neoplasia mamária comparado com as cadelas do grupo controle. Porém, observou-se alto nível de MDA no soro das cadelas da segunda coleta (um mês após a cirurgia) em relação ao soro coletado no momento cirúrgico e em relação ao soro das cadelas do grupo controle. Esse resultado pode ser explicado pelo fato do estresse oxidativo estar fortemente associado às fases da cicatrização, período em que foi realizada a segunda coleta. ROS têm um papel significativo potencializando a fase inflamatória, com efeito direto sobre o recrutamento e ativação de plaquetas, além de quimiotaxia de neutrófilos. ROS também podem ajudar na epitelização de feridas por ativar a expressão de colagenase e mediar a sinalização do fator de crescimento epidérmico (SEN et al., 2003, PARK et al., 2011).

Nesse contexto, nota-se que é necessário esclarecer o mecanismo de ação dos agentes antioxidantes e do estresse oxidativo na resistência celular e seu real valor prognóstico. (HUANG et al., 2003; HAAS et al., 2006). O conhecimento da ação da GSH e suas enzimas, bem como dos ROS nos diversos processos biológicos relacionados tende a se expandir. O avanço das técnicas de análise e localização dos agentes oxidantes e antioxidantes revelará muitas oportunidades para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas para o tratamento do câncer e muitas outras doenças relacionadas aos níveis de estresse oxidativo (HUBER et al., 2008).

## *Conclusões*

---

## VI. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

- A alta expressão da proteína GSH nas células neoplásicas mamárias de cadelas está associada a melhor evolução clínica, inclusive ao maior tempo de sobrevivência global dessas cadelas. Portanto, a alta expressão dessa proteína demonstra exercer um papel importante na proteção contra células tumorais, e sugere-se sua utilização como marcador prognóstico em cadelas com neoplasia mamária.
- A validação dos resultados através da aplicação do quimioterápico doxorrubicina nas células neoplásicas mamárias *in vitro* mostrou-se eficaz em induzir a morte celular, reduzindo a expressão dos genes *GCLC* e *GSS*, responsáveis pela síntese do importante antioxidante endógeno, o GSH. Assim, estes genes podem ser indicados como candidatos marcadores preditivos da resposta terapêutica ao câncer de mama e mais estudos devem ser realizados para corroborar o envolvimento desses genes na progressão das neoplasias mamárias em cadelas.
- Os testes bioquímicos não trouxeram resultados significativos neste trabalho. O aumento dos níveis de MDA, indicativo de peroxidação lipídica, parece estar relacionado com a fase de cicatrização da cirurgia na retirada do tumor de mama em cadelas, sem aparente relação com a atividade tumoral.



## *Referências bibliográficas*

---

**VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AL-DISSI, A. N. et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. **Can. Vet. J.**, v.51, p.1109-14, 2010.

AMBROSONE, C. B. Oxidants and antioxidants in breast cancer. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 2, n. 4, p. 903-17, 2000.

ANDRADE, F. H. E. et al. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. **Diagn. Pathol.**, 2010.

ATUKEREN, P.; YAVUZ, B.; SOYDINC, H. O. 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. **Clin. Chem. Lab. Med.** v.48, p.1487-95, 2010.

BALLATORI, N.; KRANCE, S. M.; NOTENBOOM, S. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol. Chem.** v.390, p.191-214, 2009.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v.136, p.215-233, 2009.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI-MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, p.113-23, 2006.

BAYET-ROBERT, M. et al. Pharmacometabolomics of docetaxel-treated human MCF7 breast cancer cells provides evidence of varying cellular responses at high and low doses. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 120, n. 3, p. 613-26, 2009.

BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **National Clinical Practice Oncology**, v.2(Suppl 1):S4-S11, 2005.

BELLAMY, C. O.; HARRISON, D. J. Evaluation of glutathione S-transferase Pi in non-invasive ductal carcinoma of breast. **Br. J. Cancer**, v. 69, n. 1, p.183-5, 1994.

BENDERRA, Z.; TRUSSARDI, A.; MORJANI, H, et al. Regulation of cellular glutathione modulates nuclear accumulation of daunorubicin in human MCF7 cells overexpressing multidrug resistance associated protein. **Eur. J. Cancer**, v.36, p.428-34, 2000.

BUSER, K.; JONCOURT, F.; ALTEMATT, H.J. et al. Breast cancer: pretreatment drug resistance parameters (GSH-system, ATase, P-glycoprotein) in tumor tissue and their correlation with clinical and prognostic characteristics. **Annals of Oncol.**, v.8, p.314-5, 1997.

BRODEY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ROSZEL, J. R. Canine mammary gland neoplasms. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.19, p.61-89, 1983.

CARNICER, M.J.; BERNARDINI, S.; BELLINCAMPI, L. et al. Role of  $\gamma$ -glutamyl cysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) gene expression as marker of drug sensitivity in acute myeloid leukemias. **Clinica. Chimica. Acta**, p.342-345,2005.

CASSALI, G. D. et al. Perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of mammary neoplasms in dogs. 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA 2009, 2009, São Paulo. **Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA 2009**, 2010.

CHEKHUN, V. F. et al. Expression of drug resistance proteins in triple-receptor-negative tumors as the basis of individualized therapy of the breast cancer patients. **Esp. Oncol.**, v. 31, n. 2, p. 123-4, 2009.

**CREE, I.A.; GLAYSHER, S.; HARVEY, A.L.** Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. **Current Opinion in Pharmacology**, v.10, p.375-79, 2010.

DERIN, D. et al. Serum IL-8 and IL-12 levels in breast cancer. **Medical Oncology**, v.24, n.2, p.163-168, 2007.

DI, X.; SHIU, R. P.; NEWSHAM, I. F. et al. Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen in the response of human breast tumor cells to adriamycin. **Biochem. Pharmacol.**; v.77, p.1139-50, 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v.43, n.1, p. 61-8, 1997.

GAUDIANO, G. et al. Lack of glutathione conjugation to adriamycin in human breast cancer MCF-7/DOX cells. Inhibition of glutathione S-transferase p1-1 by glutathione conjugates from anthracyclines. **Biochem. Pharmacol.**; v.60, p.1915-23, 2000.

GUYTON, K. Z.; KENSLER, T. W. Oxidative mechanism in carcinogenesis. **Br Med Bull.** v.49, n.3, p.523-44, 1993.

HAAS, S. et al. Expression of xenobiotic and steroid hormone metabolizing enzymes in human breast carcinomas. **Int. J. Cancer**, v.119, p.1785-91, 2006.

HADZIC, T. et al. Paclitaxel combined with inhibitors of glucose and hydroperoxide metabolism enhances breast cancer cell killing via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**, v. 48, p. 1024-33, 2010.

HAN, X.Q. et al. Effect of decreased GSH on sensitivity of breast cancer cells to ADM. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.**; v.36, p.770-4, 2007.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Rules for making human tumor cells. **National England Journal Medical**, v.347, p.1593-1603, 2002.

HANING, M. H.; PILOT, H. C. Gamma-glutamyl transpeptidase - its role in hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.16, p.165-72, 1985.

HOOD, C. J.; PARHAM, D. M. A simple method of tumour culture. **Pathol. Res. Pract.** v.194, p.177-81, 1998.

HUANG, J. X. et al. Expression of thymidylate synthase and glutathione-S-transferase pi in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **World J. Gastroenterol.**, v.15, p.4316-4321, 2009.

HUANG, Y. L.; SHEU, J. Y.; LIN, T. H. Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. **Clin Biochem.**, v. 32, p. 131–136, 1999.

HUANG, J. et al. Prognostic significance of glutathione S-transferase-pi in invasive breast cancer. **Mod. Pathol.** v.16, p.558-65, 2003.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quím. Nova**, v.31, p.1170-79, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativas 2010: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acessado em 10 de julho de 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativas sobre a Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil – 2002**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2003. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativas/2003/>>. Acessado em 12 de dezembro de 2010.

IWAO-KOIZUMI, K. et al. Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling. **J Clin Oncol.**, v. 23, n. 3, p. 422-31, 2005.

KANG, D. H. Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. **AACN Clin. Issues**, v.13, p.540-9, 2002.

KASAPOVIĆ, J. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages after chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. **Clin Biochem.**, v. 43, n. 16-17, p. 1287-93, 2010.

KASAPOVIĆ, J. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. **Cell Biochem Funct**, v.6, p.723–730, 2008.

KOHN HI, LIVERSEDGE M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**. v. 82, p.292-300, 1994.

KLOPFLEISCH, R. et al. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. **BMC Cancer**, v.10, 2010.

KUMARAGURUPARAN, R. et al. Altered oxidant-antioxidant profile in canine mammary tumours. **Vet. Res. Commun.** v.29, p.287-96, 2005.

LAPENSEE, E. W. et al. Prolactin confers resistance against cisplatin in breast cancer cells by activating glutathione-S-transferase. **Carcinogenesis**, v.30, p.1298-304, 2009.

LEHNINGER, Albert Lester. **Princípios de Bioquímica**. 4ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LI, S. et al. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. **Cancer Res**. v.60, p.3927-39, 2000.

LOFT, S. et al. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. **Biochem. Soc. Trans.**, v.36, n.5, p.1071-6, 2008.

LORUSSO, D. et al. Brostallicin (PNU-166196), a new minor groove DNA binder: preclinical and clinical activity. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, v.18, p.1939-46, 2009.

MacEWEN, E. G. Spontaneous tumors in dogs and cats: Models for the study of cancer biology and treatment. **Cancer and Metastases Review**, v.9, n.1, p.125-136, 1990.

MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 3, 1999.

MILLER, N.; RICE-EVANS, C. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. **Redox Rpt.** v. 2, p.161-171, 1996.

MILLER N.; RICE-EVANS C.; DAVIES M. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin. Sci.** v.84, n.4, p. 407-412, 1993.

MISDORP, W. et al. Definitions and explanatory notes. Who Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat. Washington: **Armed Forces Institute of Pathology**, p.18-27, 1999.

MORAIS, L. M. T. S. et al. Características mamográficas do câncer de mama associadas aos polimorfismos GSTM1 e GSTT1. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v.54, p.61-6, 2008.

MOTTOLESE, M. et al. Spontaneous Canine Mammary Tumors – A Model for Monoclonal Antibody Diagnosis and Treatment of Human Breast Cancer. **Laboratory Investigation**, v.71, n.2, p. 182, 1994.

MURALIKRISHNAN, G. et al. Effect of Vitamin C on Lipidperoxidation and Antioxidant Status in Tamoxifen-Treated Breast Cancer Patients. **Chemotherapy**, v.56, p.298-302, 2010.

NATH, R. G. et al. Detection of exocytic 1,N<sup>2</sup>-propanodeoxyguanosine adducts in mammary gland DNA of humans and rats. **Proc AM Assoc Cancer Res**, v. 36, p. 139–145, 1995.

OLIVEIRA, A. F. et al. Modelo experimental de cultura primária de melanoma metastático por punção aspirativa de agulha fina. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20, n. 5, p. 390-03, 2005.

OZKAN, A.; FISKIN, K. Protective effect of antioxidant enzymes against drug cytotoxicity in MCF-7 cells. **Exp. Oncol.**, v.28 ;p.38-8, 2006.

PARK, N. Y. et al. Short term supplementation of dietary antioxidants selectively regulates the inflammatory responses during early cutaneous wound healing in diabetic mice. **Nutr. Metab.** v.8, p.80, 2011.

PEDERSEN, L. et al. The prognostic influence of multifocality in breast cancer patients. **Breast**, v.13, p.188-93, 2004.

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. LXXXIX, n.509, p.10-29, 1994.

PERCARIO S. Dosagem das LDLs modificadas através da peroxidação lipídica: correlação com risco aterogênico. **AMHFCMSCSP**. v.13, n.49-52, p.7-9, 1993.

PEZZOLA, S. et al. Role of glutathione transferases in the mechanism of brostallicin activation. **Biochemistry**, v.49, p.226-35, 2010.

PHILLIPS, J. C.; LEMBCKE, L.; CHAMBERLIN, T. A novel locus for canine osteosarcoma (OSA1) maps to CFA34, the canine orthologue of human 3q26. **Genomics**, 2010.

PIERCE, B. L. et al. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. **Jornal Clinical Oncology**, v.27, p.3437-3444, 2009.

PUNNONEN, K. et al. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in human breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.120, p. 374–377, 1994.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.97, n.543, p.119-127, 2002.

RAJNEESH, C. P. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. **Singapore Med. J.**, v.49, p.640-3, 2008.

RAKHA, E. A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res.**, v.12, n.4, p.1-12, 2010.



RE R, PELLEGRINI R, PROTEGGENTE et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad Biol Med.**, v.26, p.1231-37, 1999.

RIBEIRO M. L. et al. Avaliação do dano oxidativo ao DNA de células normais e neoplásicas da mucosa cólica de doentes com câncer colorretal. **Rev. bras. Coloproct**, v.27, n. 4, p. 391-402, 2007.

SCHNEIDER, R. Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. **Cancer**, v.26, n.2, p.419-426, 1970.

SEN, C. K. The general case for redox control of wound repair. **Wound Repair Regen.**, v.11, p. 431-438, 2003.

SHEWEITA, S. A.; TILMISANY, A. K. Cancer and phase II drug-metabolizing enzymes. **Curr. Drug Metab.**, v. 4, n. 1, p. 45-58, 2003.

SNOUSSI, K. et al. Genetic Variation in IL-8 Associated with Increased Risk and Poor Prognosis of Breast Cancer. **Human Immunology**, v.67, p.13-21, 2006.

SNOUSSI, K. et al. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and Aggressiveness. **BMC Cancer**, v.10, n.283, 2010.

Bustin, S. A. et al. The MIQE Guidelines:Minimum Information for Publication of QuantitativeReal-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622 (2009).

SU, F. et al. Glutathione S transferase pi indicates chemotherapy resistance in breast cancer. **J. Surg. Res.** v.113, p.102-8, 2003.

SUHAIL, N. et al. Effect of vitamins C and E on antioxidant status of breast-cancer patients undergoing chemotherapy. **J. Clin. Pharm. Ther.** 2011.

THOMAS, E.; BERNER, G. Prognostic and Predictive Implications of HER2 Status for Breast Cancer Patients. **European Journal of Oncology Nursing**, v.4, p.10-17, 2000.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene** 2003;22:7369–7375.

UCHIDA, M. et al. Alternative RNA splicing in expression of the glutathione synthetase gene in human cells. **Mol. Biol. Rep.**; v.37, p.2105-9, 2010.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.39, p.44-84, 2007.

VAN'T VEER, L. J.; PAIK, S.; HAYES, D. F. Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker. **Journal Clinical Oncology**, v.23, n.8, p.1631-5, 2005.

WANG, M.Y. et al. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, 5 p. 705–710, 1996.

YANG, R. et al. Effect of antioxidant capacity on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of rats fed a high-fat diet. **Nutrition**, v. 22, p. 1185-1191, 2006.

ZHU, B. Reversal of nomegestrol acetate on multidrug resistance in drug-resistant human breast cancer cell line MCF7/ADR. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**, v.24, p.12, 2002.

## *Apêndice*

---

## VIII. APÊNDICE

**Apêndice A:** Protocolos de preparo das soluções.

<sup>1</sup> **BSA** PBS----- 12 mL

BSA----- 0,5 g

<sup>2</sup> **PBS** Cloreto de Sódio ----- 16,36 g

Fosfato de Sódio Dibásico ----- 2,1 g

Fosfato de Sódio Monobásico di-hidratado --- 0,6 g

Água Destilada ----- 2000 mL

<sup>3</sup> **Tampão citrato (pH 6,0)** Ácido Cítrico ----- 2,1g

Água Destilada ---- 1000mL

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) para regulação do pH do ácido cítrico

NaOH ----- 1,6g

Água Destilada --- 20 ml



## IX. ANEXOS

### ANEXO A - Modelo do Termo de Consentimento livre e esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na resolução nº 714/2002)

**Título da Pesquisa:** “Detecção de potenciais marcadores prognósticos e preditivos em neoplasia mamária de cadelas”

→ “Avaliação do CA 15-3, IL-8, IL-12 e DNA livre circulante como marcadores prognósticos no soro sanguíneo de cadelas com neoplasia mamária”

→ “Avaliação da glutatona e de suas enzimas, e do estresse oxidativo, como marcadores prognósticos e preditivos de neoplasia mamária em cadelas”

**Pesquisadores Responsáveis:** Profª. Dra. Debora A. P. C. Zuccari – Coordenadora / Gabriela Bottaro Gelaleti – Mestranda / Camila Leonel da Silva – Treinamento Técnico.

Para obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no câncer de mama em cadelas, os pesquisadores estão desenvolvendo uma pesquisa científica que poderá melhorar o nosso conhecimento sobre esse tumor e, portanto oferecer novas possibilidades de tratamento e de melhora na qualidade de vida dos nossos animais de estimação.

- A. O estudo tem como objetivo avaliar o papel das proteínas CA 15-3, IL-8 e IL-12 e do DNA livre circulante em cadelas em diferentes momentos, além de avaliar o papel da proteína glutatona e suas enzimas relacionadas; a fim de verificar a relação entre os valores e utilizá-los como marcadores de crescimento tumoral e no surgimento de metástases.
- B. Será coletada uma amostra sanguínea do animal (3 mL) no momento da cirurgia e posteriores coletas serão feitas: um mês após a cirurgia, seis meses após a cirurgia e 18 meses após a cirurgia.
- C. Após a cirurgia para retirada do tumor será cortado parte deste material, um pedacinho que será enviado ao laboratório para diagnóstico histopatológico. Não haverá mudança na técnica cirúrgica para esta coleta.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador sobre a utilização para estudo de amostra sanguínea e um fragmento da lesão tumoral (pedacinho de 1 cm do tumor) a ser retirado durante o procedimento cirúrgico, já estipulado no tratamento, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo e me comprometo a manter contato com o grupo para as 3 coletas subseqüentes em 1 mês, 6 meses e 18 meses após a cirurgia.

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão. E comprometo-me a conceder a coleta de amostras sanguíneas da minha cadela durante os quatro períodos da pesquisa e ainda, comprometo-me a manter o pesquisador informado no caso de mudança de endereço ou telefone.

Nome do(a) proprietário(a):

Nome da cadela:

Idade da cadela:

Data em que o tumor foi observado pelo proprietário:

Data em que o animal foi levado para consulta:

Data do diagnóstico do tumor pelo profissional:

Início do tratamento:

**Endereço residencial:**

**n°**

**Bairro:**

**Telefone residencial:**

**Celular:**

**Data:**...../...../...../ **Assinatura:**.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelos endereços abaixo indicados.

Nome do(a) pesquisador:

**Data:**...../...../...../ **Assinatura:**.....

**Inscrição no Conselho Regional:** .....

Profa. Dra. Debora A.P.C. Zuccari – Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular – UPGEM  
 Av. Brigadeiro Faria Lima, nº 5416 FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto  
 São José do Rio Preto. SP - CEP 15090-000  
 Fone: (17) 3201-5885  
 e-mail: [debora.zuccari@famerp.br](mailto:debora.zuccari@famerp.br)

## ANEXO B - Modelo da Ficha Clínica do animal

FICHA CLÍNICA nº \_\_\_\_\_

RGHospital: \_\_\_\_\_

Data de atendimento: \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Residente responsável: \_\_\_\_\_

Raça: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

Sexo: F ( ) M ( )

Tecido ou órgão afetado: \_\_\_\_\_

História clínica: recidiva? ( )

tempo de evolução: 1 mês ( ) até 6 meses ( ) mais de 6 meses ( )

metástase? ( )

Localização: \_\_\_\_\_

Dimensões do tumor (T): \_\_\_\_\_ x \_\_\_\_\_ x \_\_\_\_\_ (cm)

T0 - ausência do tumor primário evidente ou ausência de recidiva

T1 - &lt; 3cm

T2 - entre 3 e 5 cm

T3 - &gt;5cm

Envolvimento de linfonodos regionais: \_\_\_\_\_

N0 - sem envolvimento evidente

N1 - envolvimento unilateral

N2 - envolvimento bilateral

N1a - móveis

N1b - fixos

N2a - móveis

N2b - fixos

Quanto à confirmação histológica de envolvimento de linfonodos: (-) ou (+)

Metástase à distância: \_\_\_\_\_

M0 - sem metástases evidentes

M1 - metástases à distância incluindo linfonodos não regionais

Mx - impossível avaliar existência de metástases

Características do tumor:

forma: arredondada ( ) lobulada ( ) cística ( )

hemorragia: ulceração ( ) necrose ( ) odor ( )

secreção: tipo: \_\_\_\_\_

coloração: \_\_\_\_\_

sésil ( ) pedunculado ( ) encapsulado ( )

consistência: dura ( ) mole ( )

caráter infiltrativo: sim ( ) não ( )

superfície externa: lisa ( ) granular ( ) brilhante ( ) nodular ( )

irrigação: escassa ( ) abundante ( ) moderada ( )