



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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

BRUNA VICTORASSO JARDIM

**AVALIAÇÃO DA GLUTATIONA E SUAS ENZIMAS COMO MARCADORES
PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS DO CÂNCER DE MAMA**

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

São José do Rio Preto - SP

Bruna Victorasso Jardim

**Avaliação da glutatona e suas enzimas como marcadores prognósticos e
preditivos do câncer de mama**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências, Letras e Ciências
Exatas (IBILCE/UNESP) – São
José do Rio Preto para obtenção do
Título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

São José do Rio Preto – SP
2011

BRUNA VICTORASSO JARDIM

**Avaliação da glutatona e suas enzimas como marcadores prognósticos e
preditivos do câncer de mama**

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

Prof^ª. Dr^ª. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari
Professora Adjunta
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Doroteia Rossi Silva
Professora Adjunta
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
Professora Adjunta
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 18 de fevereiro de 2011

Este trabalho foi realizado no Centro de Estudos no Prognóstico do Câncer (CEPC) e na Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM) ambos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. Ainda no Laboratório de Imunomorfologia e Genoma do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP. Apoio financeiro na forma de bolsa de estudos fornecida pela CAPES e recursos para o desenvolvimento do projeto na forma de Auxílio à Pesquisa da FAPESP.

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha mãe. Essa conquista também é sua, pois, apesar de todas as dificuldades, você sempre acreditou na minha vitória. Sem seu apoio e sua força durante esse trajeto eu jamais teria conseguido chegar até aqui.

Agradecimentos

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas, as quais devo meu eterno agradecimento...

Ao meu noivo, Fábio, pelo imenso apoio, dedicação e carinho. Jamais teria alcançado essa conquista se não fosse pelo companheirismo e fé inabalável na minha vitória.

A minha mãe, Marlene, que nunca mediu esforços para que alcançasse meus sonhos. Agradeço imensamente por tudo que você fez e faz por mim.

Ao meu irmão, Lucas, pelos conselhos e apoio que sempre me ajudaram muito.

As minhas tias Malu e Marta e as minhas primas e primos. Obrigada por estarem sempre presentes na minha vida e desejarem o meu sucesso.

Ao meu pai, Sérgio. Não poderia deixar de agradecer quem sempre está no meu pensamento.

Aos meus sogros, Valéria e Marco pelo carinho e preocupação sempre demonstrados.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Debora Zuccari, pela oportunidade de ser sua primeira aluna de Mestrado. Agradeço pela paciência, apoio e pela confiança depositada em mim, que me fizeram aprender e crescer muito ao longo desses dois anos.

A todos do “Biotério” da Famerp, em especial as minhas amigas Gabi, Camila, Livia e Juliana. Agradeço pelos momentos de risos compartilhados e conforto durante minhas angústias. Agradeço especialmente a Marina por ter sido meu braço direito na execução desse projeto.

A todos os médicos, residentes e enfermeiros do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Base, onde coletei as amostras do estudo prospectivo deste trabalho. Obrigada por permitirem que eu acompanhasse seu trabalho e ensinamentos.

Ao Departamento de Patologia do Hospital de Base por ter cedido os fragmentos tumorais para a realização do estudo retrospectivo. Agradeço a todos os funcionários do Departamento, em especial ao Dr. Dalisio de Santi Neto, patologista, que tão gentilmente me ensinou histologia e me ajudou a escolher as fotos da imuno-histoquímica.

A Prof^a Dr^a Claudia Bonini, pela oportunidade da realização de estágio em seu laboratório. A convivência e aprendizado adquirido nesse período foram de extrema importância para que eu optasse pela carreira acadêmica e de pesquisa. Agradeço também pelo apoio durante o primeiro ano do meu mestrado e a todos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética de Doenças Hematológicas que sempre me ajudaram e compartilharam bons momentos comigo.

A Prof^a Dr^a Sonia Oliani por permitir que eu utilizasse seu laboratório para a realização da densitometria óptica. Agradeço a todos do Laboratório de Imunomorfologia e Genoma, especialmente a Ana Paula Girol pela paciência e bondade sempre demonstradas.

A banca examinadora do meu exame geral de qualificação. Agradeço a Prof^a Dr^a Paula Rahal pelas sugestões que me permitiram melhorar meu trabalho. A Prof^a Dr^a Dorotéia Rossi da Silva Souza, sempre tão atenciosa. Obrigada pela dedicação em me ajudar e principalmente por abrir minhas portas para a tão temida estatística.

Ao Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy que tão pacientemente me ensinou estatística e me ajudou a analisar meus resultados.

A Prof^a Dr^a Maria Tercilia V. de Azeredo Oliveira por ter sido minha orientadora no estágio de docência, me dando a oportunidade de crescer profissionalmente e pessoalmente. Agradeço também por aceitar participar da banca da minha defesa, mesmo estando tão ocupada.

A Prof^a Dr^a Eny Maria Goloni Bertollo por ter permitido que eu usufruísse de seu laboratório para realizar meus experimentos. Obrigada também por aceitar compor a banca da minha defesa, tenho certeza que todas as sugestões contribuirão muito para meu crescimento.

A todos os alunos e funcionários da Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM) da Famerp que me acolheram e compartilharam comigo tantos momentos durante meu mestrado.

Aos alunos da Pós-Graduação em Genética, pelos momentos maravilhosos compartilhados nas disciplinas, na organização do Simpósio de Genética e tantos outros momentos que pude conhecer cada um de vocês.

Agradeço aos meus amigos, Marcela, Leandro, Larissa e Gustavo que estiveram sempre presentes me proporcionando momentos muito divertidos.

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

A FAPESP pelo auxílio financeiro concedido para a compra de materiais e equipamentos de Laboratório.

Ao IBILCE e a FAMERP pela infra-estrutura e profissionais que possibilitaram a realização de mais essa etapa da minha vida.

Muito obrigada a todos aqueles que estiveram comigo nesta jornada...

Resumo

Resumo

O estudo de marcadores prognósticos e preditivos no câncer tem se mostrado efetivo na pesquisa e rotina diagnóstica. A glutathiona (GSH) e as enzimas glutathiona peroxidase (GPX) e glutathiona S transferase pi (GSTpi) exercem papel fundamental na defesa antioxidante das células e na detoxificação de quimioterápicos. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão das proteínas GSH, GPX e GSTpi em pacientes com câncer de mama, além de avaliar a expressão gênica dessas proteínas em amostras tumorais *in vitro* após o tratamento com quimioterápico. As proteínas foram detectadas no tecido tumoral de 63 pacientes por imuno-histoquímica e quantificadas pela técnica de densitometria óptica. A expressão dos genes que sintetizam GSH, glutamato cisteína ligase (GCLC) e glutathiona sintetase (GSS) e dos genes codificadores da GPX e GSTpi foi analisada por PCR em tempo real em células cultivadas provenientes de 12 amostras tumorais de mama. As células foram submetidas *in vitro* ao quimioterápico doxorrubicina, e a expressão gênica foi analisada antes e após o tratamento. A expressão da GSH relacionou-se com tumor receptor de estrógeno (RE) negativo ($p < 0,05$). A expressão da GPX foi maior em tumor receptor de progesterona (RP) negativo e em pacientes que vieram a óbito ($p < 0,05$). Alta expressão da GSTpi relacionou-se com características tumorais de prognóstico desfavorável como positividade para p53, grau histológico III, maior tamanho tumoral e óbito ($p < 0,05$). Além disso, as pacientes foram divididas em subgrupos de acordo com o tratamento recebido. Assim, a alta expressão da GSH relacionou-se com a ocorrência de metástase no grupo de pacientes tratadas apenas com quimioterapia adjuvante ($p < 0,05$). Nas pacientes que receberam quimioterapia e radioterapia adjuvantes, a alta expressão da GPX foi relacionada com óbito e a alta expressão da GSTpi foi relacionada com recorrência tumoral local, ocorrência de metástase e óbito ($p < 0,05$). Além disso, ambas relacionaram-se com o menor tempo de sobrevivência das pacientes ($p < 0,05$). O tratamento com doxorrubicina foi eficaz em eliminar as células tumorais, sem alterar a expressão do gene GSS, mas acarretou na subexpressão dos genes GCLC, GPX e GSTP1. Os resultados permitem concluir que altas concentrações das enzimas GPX e GSTpi podem influenciar na resposta ao tratamento e evolução clínica no câncer de mama, podendo ser candidatos marcadores de mau prognóstico nessas pacientes.

Palavras-chaves: Câncer de mama, Glutathiona, Imuno-histoquímica, PCR em tempo real, Cultura celular.

Abstract

Abstract

The study of prognostic and predictive markers in cancer has been proven effective in research and diagnostic routine. Glutathione (GSH) and glutathione peroxidase (GPX) and glutathione S transferase pi (GSTpi) play a crucial role in antioxidant defense of cells and detoxification of chemotherapeutic agents. In this context, the objective of this study was to evaluate the protein expression of GSH, GPX and GSTpi in patients with invasive ductal carcinoma, and to evaluate the expression of genes encoding these proteins in tumor samples *in vitro* before and after treatment with chemotherapy. The proteins were detected in tumor tissue of 63 patients by immunohistochemistry and quantified by optical densitometry technique. The expression of genes that synthesize GSH, glutamate cysteine ligase (GCLC) and glutathione synthetase (GSS) and the genes encoding GPX and GSTpi were analyzed by real time PCR in cultured cells from 12 tumor samples from patients with breast cancer. The cells were treated *in vitro* to doxorubicin chemotherapy, and gene expression was analyzed before and after treatment. The expression of GSH was related to tumor estrogen receptor (ER) negative ($p < 0.05$). The expression of GPX was higher in tumor progesterone receptor (PR) negative and patients who died ($p < 0.05$). High expression of GSTpi was related to tumor characteristics of poor prognosis such as p53 positivity, histologic grade III, larger tumor size and death ($p < 0.05$). In addition, patients were divided into subgroups according to treatment received. Thus, high expression of GSH was related to the occurrence of metastasis in patients treated only with adjuvant chemotherapy ($p < 0.05$). In patients who received adjuvant chemotherapy and radiotherapy, high expression of GPX was associated with death and high expression of GSTpi was correlated to local tumor recurrence, metastasis and death ($p < 0.05$). Moreover, both were related to the shorter survival of patients ($p < 0.05$). Treatment with the doxorubicin was effective in eliminating tumor cells without affecting gene expression GSS, but resulted in subexpression GCLC, GPX, and GSTP1 genes. The results suggest that high concentrations of enzymes GPX and GSTpi may influence response to treatment and clinical outcome in breast cancer and may be candidate markers for poor prognosis in these patients.

Keywords: Breast cancer, Glutathione, Immunohistochemistry, Real-time PCR, Cell culture.

lista de abreviaturas e símbolos

Lista de abreviaturas e símbolos

µg	micro-grama
µl	micro-litro
µm	Micrômetros
°C	Graus Celsius
bp	do inglês base pare
BSA	do inglês Bovine Serum Albumin
cDNA	DNA complementar
CO₂	Fórmula química do gás carbônico
Ct	do inglês Cycle Threshold
DAB	Diamino Benzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DEPC	do inglês di-etil pirocarbonato
D.O.M.	Densidade Óptica Média
EDTA	do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FEC	regime terapêutico contendo os quimioterápicos 5-Fluorouracil, Epirubicina e Ciclofosfamida
GCLC	Glutamato cisteína ligase
GSH	Glutathione
GSS	Glutathione sintetase
GSSG	Glutathione Dissulfeto
GST	Glutathione S Transferase
GSTpi	Glutathione S Transferase Pi
GO	Glutathione Oxidase
GPX	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
HER-2/neu	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal 2
H₂O	Fórmula química da água
H₂O₂	Fórmula química do peróxido de hidrogênio

INCA	Instituto Nacional do Câncer
IC	Intervalo de confiança
Ki-67	do inglês antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
Log3	Logaritmo na base 3
MCF7	Linhagem de células de carcinoma mamário humano
MDR	Resistência Celular a Múltiplos Fármacos
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
ng	Nanograma
OR	odds ratio
OH[·]	Fórmula química do radical hidroxila
O₂⁻	Fórmula química do ânion superóxido
pmol	Picomol
p53	do inglês tumor protein p53
PBS	do inglês phosphate buffer solution
PCR	do inglês polimerase chain reaction
pH	Potencial Hidrogeniônico
RE	Receptor de Estrógeno
RNA	Ácido ribonucléico
RNA^r	RNA ribossômico
RP	Receptor de Progesterona
ROC	do inglês receiver operating characteristic
SAME	Serviço de Arquivo Médico
S.E.M.	Desvio Padrão
SH	Grupo Sulfidril
SOD	Superóxido dismutase
TNM	Sistema de estadiamento clínico, T= tumor, N=linfonodo (do inglês node), M= metástase
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
u.a.	unidade arbitrária
UICC	União Internacional Contra o Câncer

Sumário

Sumário

I. INTRODUÇÃO	01
1.1. Aspectos gerais e epidemiológicos.....	01
1.2. Impacto do estresse oxidativo e agentes antioxidantes no câncer de mama.....	04
1.2.1. Glutationa.....	05
1.2.2. Glutationa Peroxidase	06
1.2.3. Glutationa S Transferase.....	08
II. OBJETIVOS	12
III. MATERIAL E MÉTODOS	14
1. Considerações éticas.....	14
2. Estudo retrospectivo.....	14
2.1. Caracterização das amostras.....	14
2.2. Procedimento imuno-histoquímico.....	15
2.3. Quantificação da marcação imuno-histoquímica.....	16
2.4. Análise Estatística.....	17
3. Estudo prospectivo.....	17
3.1. Caracterização das amostras.....	17
3.2. Cultivo celular.....	18
3.2.1. Preparação do material coletado.....	18
3.2.2. Manutenção das células <i>in vitro</i>	18
3.2.3. Tripsinização.....	19
3.3. Imunocitoquímica da cultura celular.....	19
3.4. Preparação das placas para exposição ao quimioterápico e curva de crescimento..	20
3.5. Extração do RNA total.....	21
3.6. Obtenção do cDNA.....	22
3.7. Técnica de PCR quantitativa: Análise da expressão gênica.....	23
IV. RESULTADOS	27
1. Estudo retrospectivo.....	27
1.1. Dados clínicos.....	27
1.2. Expressão protéica pela imuno-histoquímica.....	27
2. Estudo prospectivo.....	41
2.1. Imunocitoquímica.....	41

2.2. Curvas de crescimento das células <i>in vitro</i>	41
2.3. Integridade do RNA.....	43
2.4. Técnica de PCR quantitativa: Análise da expressão gênica.....	43
V. DISCUSSÃO	47
VI. CONCLUSÕES	55
VII. REFERÊNCIAS	57
VIII. APÊNDICES	68
IX. ANEXOS	70
Anexo A.....	70
Anexo B	71

Introdução

I. Introdução

1.1. Aspectos Gerais e Epidemiológicos

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo (PARKIN et al. 2005). A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (INCA 2010). Nos Estados Unidos e Europa Ocidental há a expectativa do surgimento de 500 mil casos diagnosticados a cada ano (HICKS & KULKARNI, 2008). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer - INCA (2010) estimam a ocorrência de 49.240 novos casos desse tipo tumoral para o ano de 2010, e o mesmo é válido para 2011, destacando-se entre as causas de morte desde 1979 (INCA, 2003).

A prevenção primária dessa neoplasia não é possível devido à variação dos fatores de risco e as características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia (SNOUSSI et al., 2006). No entanto, os fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher tais como menarca precoce, nuliparidade, primeira gestação acima dos 30 anos, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal, estão bem estabelecidos em relação ao desenvolvimento do câncer de mama (INCA 2010). Além desses, a idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. A taxa de incidência aumenta rapidamente até os 50 anos, e posteriormente o mesmo se dá de forma mais lenta. Essa mudança no comportamento da taxa é conhecida na literatura como *Clemmesen's hook* (gancho de Clemmesen), e tem sido atribuída à menopausa (INCA, 2010).

As pesquisas em câncer têm avançado rapidamente nas últimas décadas, e identificado alterações genéticas associadas à tumorigênese, as quais conduzem ao processo de transformação de uma célula normal em maligna (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Assim, os fatores genéticos estão cada vez mais sendo reconhecidos como contribuidores ao risco de desenvolvimento do câncer de mama (SNOUSSI et al., 2006).

Um dos maiores desafios ao estudo e tratamento do câncer de mama é a heterogeneidade tumoral característica destes carcinomas (PAGE et al., 1998; SORLIE, 2004). Aproximadamente 80% de todos os cânceres iniciam nas células de revestimento dos ductos mamários, caracterizando-os como carcinomas ductais. A doença que está contida dentro dos ductos é chamada *in situ* (CIANFROCCA & LORI, 2004).

À medida que a lesão progride, estendendo-se através da membrana basal e invadindo o estroma, passa a ser chamado de carcinoma ductal invasivo (CIANFROCCA & LORI, 2004). Este tipo de carcinoma é definido como um grupo de tumores epiteliais malignos

caracterizados por invadir o tecido adjacente e ter marcada tendência a desencadear metástases à distância (TAVASSOLI & DEVILLE, 2003), representando 80% a 90% dos carcinomas da mama (FITZGIBBONS et al. 2000).

Histologicamente são caracterizados pela proliferação de células epiteliais com atipias nucleares relativamente acentuadas, com tendência a formar estruturas pseudoglandulares ou semelhantes aos ductos, e com atividade mitótica variável. A avaliação histológica destas características é utilizada para graduar o carcinoma ductal invasivo em bem diferenciado (Grau histológico I), médio grau de diferenciação (Grau histológico II) e pouco diferenciado (Grau histológico III) (RAKHA et al., 2010).

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, ou seja, no tamanho do tumor, na presença de metástase em linfonodos regionais e de metástase à distância (PEDERSEN et al., 2004). Aproximadamente 95% da drenagem linfática da mama se dirige para os linfonodos axilares e apenas 5% para os linfonodos das regiões supra-clavicular, cervical e mamária interna (CIANFROCCA & LORI, 2004). Tumores de mama com linfonodo axilar positivo, por exemplo, estão associados ao pior prognóstico (PUGLIESE et al., 2010).

Todos os fatores utilizados como marcadores prognósticos para a sobrevida global são capazes de gerar informações importantes relacionadas ao comportamento clínico dos tumores de mama (RAKHA et al., 2010). No entanto, muitas vezes não conseguem prever o desenvolvimento da doença nem tampouco a resposta ao tratamento quimioterápico. De acordo com Van T Veer e colaboradores (2005), os maiores fatores preditivos para metástase, como comprometimento de linfonodo ou grau histológico do tumor, falharam em classificar os tumores mamários de acordo com seu comportamento clínico. Além disso, as mulheres com câncer de mama no mesmo estágio da doença podem ter respostas totalmente diferentes ao mesmo tratamento empregado (VAN T VEER et al. 2005).

O tratamento sistêmico do câncer de mama inclui agentes citotóxicos, hormonais e imunoterápicos. Em geral, esses agentes são ativos no início do tratamento em 90% dos tumores de mama primários e 50% dos metastáticos. No entanto, após um período de tempo variável, a progressão pode ocorrer (GONZALEZ-ÂNGULO et al. 2007). Menos de 20% das pacientes com câncer de mama metastático apresentam sobrevida de cinco anos, devido ao desenvolvimento de resistência aos medicamentos, condição que permite a recidiva tumoral (MECHETNER et al. 1998; MARTINEZ et al., 2008). Não se sabe exatamente a razão pela

qual isso ocorre, supõe-se que seja devido a características intrínsecas do tumor (COLLEONI et al., 2001). Assim, a resistência à terapia não é apenas comum, mas esperada, e, portanto, a busca por marcadores preditivos se torna cada vez mais importante (DUFFY et al. 2010).

Pesquisas recentes demonstram crescente variedade de marcadores moleculares que podem ser utilizados em conjunto com os marcadores morfológicos e histopatológicos presentes nos tumores. Isso reflete em avaliação mais precisa do prognóstico, além de ampliar as estratégias futuras no tratamento do carcinoma mamário (GONZALEZ-ÂNGULO et al. 2007; HICKS & KULKARNI 2008; GRALOW et al., 2008; DUFFY et al. 2010).

Atualmente, o estudo da expressão imuno-histoquímica de marcadores prognósticos e preditivos do câncer de mama tem se revelado importante ferramenta de trabalho na rotina diagnóstica e de pesquisa. Neste campo, a disponibilidade de anticorpos monoclonais que reagem com antígenos associados aos tumores de mama está se expandindo progressivamente e, dessa forma, vem permitindo que se conheça melhor a biologia da referida neoplasia (BODEY, 2002; HUANG et al., 2009). Muitos estudos buscam individualizar o comportamento dos carcinomas de mama pelas características próprias do tumor, tentando assim prever se a neoplasia responderá ou não ao tratamento quimioterápico proposto (HAMILTON & HORTOBAGYI, 2005; GRALOW et al., 2008).

O status do receptor do fator de crescimento epidermal 2 (HER-2/neu) e dos receptores hormonais, receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP), são fatores prognósticos e preditivos que foram incorporados à rotina clínica e permitem que se estabeleça um tratamento individualizado (HSIAO et al. 2010). O alvo da terapia adjuvante para o câncer de mama é guiado em grande parte, pelo status dos RE, RP e HER-2/neu. De acordo com o padrão imuno-histoquímico desses marcadores, os carcinomas da mama podem ser subdivididos em 3 grupos principais. O subtipo basal ou triplo-negativo [(RE-) (RP-) (HER-2/neu-)] é um pequeno subgrupo destas neoplasias, biologicamente mais agressivos e não possui alvo terapêutico definido. Chekhun e colaboradores (2009) afirmam que esse subtipo é caracterizado por pior curso da doença, devido a relação positiva com metástase e com menor sobrevivência das pacientes. Carcinomas luminais [(RE+) (RP+) (HER-2/neu-)] estão associados com melhor prognóstico e respondem à terapêutica com antiestrogênicos, e carcinomas que superexpressam o HER-2/neu, apresentam boas respostas a drogas que bloqueiam a atividade dessa proteína, como é o caso do anticorpo monoclonal trastuzumab (BASU et al., 2008). Esses dados mostram a importância da expressão de um ou mais imunomarcadores como uma informação útil, e muitas vezes conclusiva, na prática clínica (THOMAS & BERNER, 2000), permitindo que estratégias de tratamento sejam definidas de

maneira mais eficaz e com menor toxicidade (GONZALEZ-ÂNGULO et al., 2007; HICKS & KULKARNI 2008; DUFFY et al., 2010).

No entanto, trabalhos discutindo fatores prognósticos clássicos ou novos frequentemente apresentam resultados conflitantes na literatura, tornando necessário buscar outros fatores que possam prever de forma mais acurada o prognóstico dos carcinomas da mama (BARGINEAR et al., 2008). Além disso, não há grande identificação de marcadores que possam ser preditivos de resposta e resistência à quimioterapia (HUANG et al., 2009). Nesse contexto a expressão de proteínas antioxidantes pelas células tumorais vem sendo avaliada como fator prognóstico, e como fator preditivo de resposta a tratamentos citotóxicos (PASTORE et al., 2003; TOWNSEND & TEW, 2003).

1.2. Impacto do Estresse Oxidativo e Antioxidantes no Câncer de Mama

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 espécies reativas de oxigênio (ERO) e nas defesas antioxidantes (KASAPOVIĆ et al., 2008). Quando a produção excessiva de ERO 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). Alguns fatores de risco associados ao câncer de mama podem exercer seus efeitos pela geração de ERO, como no caso do álcool e seu metabolismo e fatores endógenos e hormonais (AMBROSONE, 2000). A produção de ERO, como o ânion superóxido (O_2^-) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot), são consequência natural da respiração aeróbica no organismo (HUBER et al., 2008; BARREIROS et al., 2006).

O radical OH^\cdot é o mais deletério ao organismo, frequentemente ataca as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. Ele é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de H_2O_2 com metais de transição, e hemólise da água (H_2O) por exposição à radiação ionizante. O ataque intensivo e frequente deste radical pode originar mutações no DNA e, conseqüentemente, o desenvolvimento de câncer em seres humanos 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 ERO, que podem ser intensificados por

tratamentos citotóxicos. Muitos fármacos podem produzir ERO como produtos diretos ou indiretos de sua biotransformação no organismo (TOWNSEND & TEW, 2003).

Os agentes antioxidantes exercem papel fundamental na proteção ao estresse oxidativo e na detoxificação de agentes oxidantes. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem não-enzimaticamente, a exemplo de glutathiona (GSH) ou enzimaticamente, a exemplo da glutathiona peroxidase (GPX) e glutathiona S transferases (GSTs) (BARREIROS et al., 2006). Estudos mostram elevação significativa de GSH, GPX e GSTs em células de câncer de mama em relação ao tecido sadio (KASAPOVIĆ et al., 2008).

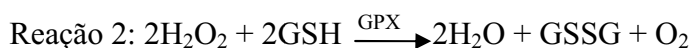
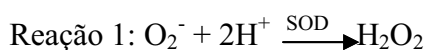
1.2.1. Glutathiona (GSH)

A GSH é um tripeptídeo constituído por resíduos de glicina, cisteína e ácido glutâmico, 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 sulfrídila (SH) é o responsável pela atividade antioxidante da GSH. O segundo passo consiste na ligação da gama glutamil cisteína com a glicina pela enzima glutathiona sintetase (GSS), originando o tripeptídeo gama glutamil cisteína glicina conhecido como GSH (CARNICER et al. 2005; UCHIDA et al. 2010). Essa proteína é considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, pois em conjugação com as enzimas GPX 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 importante papel em processos celulares como diferenciação, proliferação e apoptose. Desse modo, distúrbios na homeostase dessa proteína são implicados na etiologia e/ou progressão de muitas doenças humanas, incluindo o câncer (BALLATORI et al., 2009).

1.2.2. Glutationa Peroxidase (GPX)

A GPX 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). A inativação de um agente oxidante como o O_2^- é inicialmente catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) formando H_2O_2 , o qual é convertido em H_2O pela GPX. Esse processo resulta na conversão da GSH a sua forma oxidada, glutatona dissulfeto (GSSG) e é catalisado pela enzima glutatona oxidase (GO). As reações abaixo mostram o mecanismo antioxidante com participação da GPX.



Para que a atividade antioxidante da GSH seja mantida, a GSSG precisa ser regenerada pela ação da glutatona redutase (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).

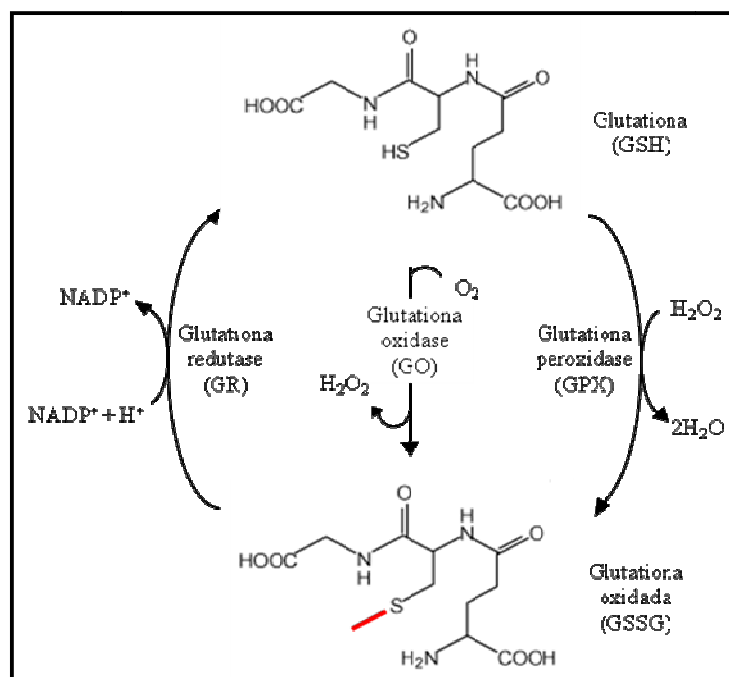


Figura 1: Conversão da glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GPX), glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR). Adaptado de LEHNINGER, 2006.

A GPX é uma proteína de 80kDa que é composta por quatro subunidades idênticas. Cinco isoformas da GPX 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 GPX 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 e colaboradores (2005) sugerem que o aumento dos antioxidantes no tecido mamário neoplásico é induzido pelo estresse oxidativo. Resultado semelhante foi encontrado por Rajneesh e colaboradores (2008), em que os níveis de ERO e antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos estavam aumentados no plasma de mulheres com câncer de mama em comparação com mulheres controle.

Quando há diminuição das concentrações intracelulares da GSH e/ou GPX em sistemas experimentais, observa-se 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 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 ERO gerados em processos neoplásicos (KASAPOVIC et al., 2008, KASAPOVIC et al., 2010). Além disso, trabalhos que relacionam a expressão desses antioxidantes com o prognóstico de pacientes com câncer de mama são escassos na literatura (KASAPOVIC et al., 2008; RAJNEESH et al., 2008; KASAPOVIC et al., 2010).

1.2.3. 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 & TILMISANY 2008).

As GSTs são uma família de enzimas intracelulares da fase II de detoxificação, que catalisam a conjugação de diversos compostos eletrofílicos à GSH. Isso promove 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 (Figura 2) (HUBER et al., 2008).

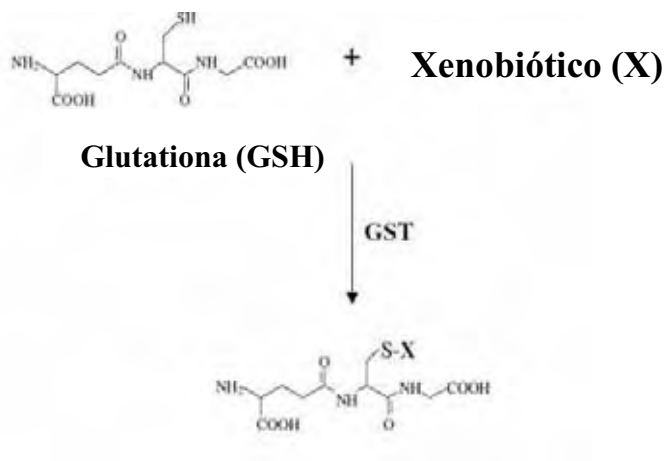


Figura 2: Esquema da reação enzimática catalisada pela glutathione S transferase. Adaptado de TOWNSEND & TEW, 2003.

As GSTs podem ser divididas em três grandes famílias: GST citossólica, GST mitocondrial e GST microssomal. 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). 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 e colaboradores (2009) a expressão das GSTs em células neoplásicas de mama caracteriza a baixa capacidade de resposta a alguns agentes quimioterápicos.

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

Classe	Gene	Cromossomo humano
Alfa (α)	GSTA1-5	6
Mu (μ)	GSTM1-5	1
Omega (ω)	GSTO1-2	10
Pi (π)	GSTP1	11
Theta (θ)	GSTT1-2	22
Zeta (ζ)	GSTZ1	14

A GSTpi parece ser constante em células tumorais (côlon, pulmão, ovário, mama, estômago, bexiga, rim, testículo), apresentando-se em altas concentrações (2-4 vezes maior) quando comparadas 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 & HARRISON, 1994; HUANG et al., 2003). Além disso, a superexpressão da GSTpi em tumores de mama tem sido relacionada com mau prognóstico, e parece diretamente relacionada ao desenvolvimento da resistência celular a múltiplos fármacos (MDR) (TOWNSEND & TEW, 2003; SU et al., 2003; HUANG et al., 2003; CHEKHUM et al., 2009). Um estudo realizado por Huang e colaboradores (2009), sugeriu que a análise imuno-histoquímica 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 a fármacos é um elemento chave no fracasso do tratamento quimioterápico

(TOWNSEND & 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 resultado da seleção de populações celulares tolerantes (HURBER et al., 2008).

O sistema enzimático GSH/GSTs é apontado como um dos mais importantes para 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 consequência do aumento de GSH e/ou do aumento da expressão dos genes que codificam os transportadores destes conjugados (TOWNSEND & 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 GPX e GSTpi nos variados mecanismos associados a MDR ainda não é totalmente conhecido. Além disso, o valor prognóstico dessas proteínas em pacientes com câncer de mama apresenta resultados controversos na literatura.

Objetivos

II. Objetivos

Este estudo teve por objetivo verificar o valor prognóstico da expressão da proteína glutatona (GSH) e das enzimas glutatona peroxidase (GPX) e glutatona S transferase Pi (GSTpi), relacionando-as com os parâmetros clínico-patológicos, a evolução clínica e sobrevida das pacientes. Além disso, avaliar o valor preditivo desses marcadores em resposta ao tratamento do câncer de mama. Desse modo, este estudo dividiu-se em retrospectivo e prospectivo e os objetivos específicos foram:

1. No estudo retrospectivo selecionar fragmentos tumorais de pacientes com câncer de mama e quantificar a expressão protéica de GSH, GPX e GSTpi pela técnica de imuno-histoquímica, para relacionar com as características clínico-patológicas das pacientes;
2. No estudo prospectivo, avaliar a expressão quantitativa do RNAm dos genes precursores da GSH, glutamato cisteína ligase (GCLC) e glutatona sintetase (GSS), GPX e GSTpi em células mamárias neoplásicas *in vitro*, tratadas e não tratadas com quimioterápico de rotina (doxorrubicina).

Material e Métodos

III. Material e Métodos

1. Considerações éticas

O presente estudo não acarretou riscos físicos às mulheres selecionadas, uma vez que foram utilizados fragmentos tumorais de descarte do exame histopatológico. No estudo prospectivo, as mulheres que preencheram os critérios de inclusão foram informadas sobre os objetivos da pesquisa, e assinaram o consentimento informado (Anexo A). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) (Anexo B).

2. Estudo retrospectivo

2.1. Caracterização das amostras

Os fragmentos tumorais utilizados no estudo foram obtidos no “Arquivo de blocos e lâminas” do Setor de Anatomia e Patologia do Hospital de Base da FAMERP e as informações clínico-patológicas das pacientes no Serviço de Arquivo Médico (SAME).

No presente protocolo experimental foram selecionados fragmentos de neoplasia mamária de 63 (sessenta e três) mulheres atendidas no Hospital de Base da FAMERP nos anos de 2000 a 2005 com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo e estadiamento clínico variando de I a IV. A faixa etária das pacientes foi de 30 a 99 anos (média 58 anos e mediana 57 anos) e os parâmetros usados para a avaliação histopatológica estão de acordo com a União Internacional contra o Câncer (UICC), pela classificação TNM recomendada desde 1989. Os critérios de elegibilidade estabelecidos para inclusão no grupo foram rigorosamente respeitados. Apenas pacientes que realizaram cirurgia (mastectomia/quadrantectomia) e sem quimioterapia e/ou radioterapia neoadjuvantes foram incluídas no estudo.

O painel de marcadores prognósticos clássicos, analisado pela expressão imuno-histoquímica do receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), HER-2 neu, p53 e o marcador de proliferação celular, Ki-67, foi previamente realizado para todas as pacientes. As mulheres foram submetidas à avaliação clínica a cada 3-4 meses, o que incluiu exame radiográfico do tórax. A ocorrência de recidiva tumoral local e metástase foram descritas, assim como a data e causa da morte, sendo que apenas pacientes que morreram pela doença foram incluídas no estudo.

Além disso, as mulheres foram agrupadas em três subgrupos estabelecidos pelo tratamento que receberam. O grupo I incluiu 37 pacientes que realizaram cirurgia, quimioterapia adjuvante e radioterapia pós-operatória (regime FEC, contendo os quimioterápicos 5-fluorouracil, epirubicina e ciclofosfamida), o grupo II foi composto de 19 pacientes que fizeram somente quimioterapia adjuvante e o grupo III incluiu sete pacientes que não receberam tratamento após a cirurgia.

2.2. Procedimento imuno-histoquímico

Para o desenvolvimento da técnica os fragmentos tumorais emblocados em parafina foram cortados em 3µm. Os tecidos foram preparados em lâminas silanizadas e em seguida desparafinizados em xilol, reidratados 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)¹ e incubadas com o anticorpo primário (Tabela 2).

Depois dessa etapa as lâminas foram lavadas em solução PBS² por 15 minutos e incubadas com kit Easy Path (Erviagas), que consistiu no anticorpo secundário biotilado 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 com 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.

^{1,2} Os protocolos de preparo das soluções estão descritos no Apêndice A.

Tabela 2: Especificações dos anticorpos primários utilizados para o procedimento imunohistoquímico.

Anticorpo	Especificidade	Diluição	Tampão	Marca
RE	Monoclonal (mouse)	1:100	TRIS EDTA pH9 ³	Dako
RP	Monoclonal (rabbit)	1:100	TRIS EDTA pH9	Biocare Medical
HER-2/neu	Policlonal (rabbit)	1:200	TRIS EDTA pH9	Dako
p53	Monoclonal (mouse)	1:500	TRIS EDTA pH9	Zymed
Ki-67	Monoclonal (mouse)	1:100	TRIS EDTA pH9	Spring
GSH	Monoclonal (mouse)	1:100	Citrato pH6 ⁴	Millipore
GPX	Policlonal (rabbit)	1:1200	Citrato pH 6	Abcam
GSTpi	Monoclonal (mouse)	1:4000	Citrato pH6	Abcam

RE (receptor de estrogênio); RP (receptor de progesterona); HER-2/neu (fator de crescimento epidermal); GSH (glutaciona); GPX (glutaciona peroxidase); GSTpi (glutaciona S tranferase pi).

2.3. Quantificação da marcação imuno-histoquímica

A análise densitométrica foi conduzida em objetiva de 40X com o microscópio ZEISS – AXIOSKOP2 para a quantificação de GSH, GPX e GSTpi. Para cada lâmina foram selecionados 60 diferentes pontos das células tumorais para obter uma média relacionada com a intensidade de imunorreatividade. Os valores foram obtidos como unidades arbitrárias (u.a.) e a densidade óptica média (D.O.M.) mostrou a intensidade de imunomarcção apenas nas áreas imunorreativas.

Quanto ao painel de marcadores prognósticos clássicos, os casos foram considerados positivos para os receptores hormonais e HER-2/neu quando mais de 10% das células tumorais apresentaram marcação nuclear (LI et al. 2010). Para o p53, os casos foram considerados positivos quando pelo menos 10% das células tumorais apresentaram marcação nuclear (MALAMOU-MITSI et al. 2006). Os tumores foram divididos em dois grupos quanto ao índice de proliferação celular: quando a marcação do Ki-67 estava presente em mais de

^{3,4} Os protocolos de preparo das soluções estão descritos no Apêndice A.

20% das células, o tumor foi considerado com alta atividade proliferativa e abaixo disso, com baixa atividade proliferativa (LI et al. 2010).

2.4. Análise Estatística

Para avaliar o valor prognóstico e preditivo da expressão das proteínas, as pacientes foram separadas em grupos de acordo com as características clínico-patológicas e o tratamento empregado.

Os resultados foram submetidos previamente à análise descritiva para determinação da normalidade e foram considerados com distribuição normal. Assim, as médias das análises referentes às quantificações para cada grupo foram comparadas pelo teste t de student ou ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Todos os valores obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão (S.E.M.).

A curva de sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan Meier. Os pontos de corte para a expressão de cada proteína foram estabelecidos através das curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC). Foram calculadas a sensibilidade e especificidade entre a expressão protéica e a ocorrência de óbito nas pacientes do grupo total (n=63) e nas pacientes do grupo I (n=37). Os valores indicados por meio da curva ROC constituem o ponto de corte que podem promover um equilíbrio mais adequado de sensibilidade e especificidade para o índice de expressão protéica como discriminador do risco de óbito nas pacientes com câncer de mama. Para avaliar a influência simultânea dos fatores prognósticos sobre a mortalidade foi realizada a análise de regressão logística multivariada.

Valores para p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism4 e Stats Direct.

3. Estudo prospectivo

3.1. Caracterização das amostras

Foram coletados fragmentos tumorais retirados em cirurgia ou por *core biopsy* (biópsia percutânea com agulha grossa guiada por ultra-sonografia) de mulheres atendidas no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Base da FAMERP. De cada paciente obteve-se fragmentos inteiros de 50 mm de diâmetro que foram armazenados em tubo falcon

contendo o meio próprio para transporte⁵. Quando os fragmentos tumorais foram obtidos por *core biopsy* outros fragmentos da mesma paciente foram encaminhados para o Setor de Anatomia e Patologia para confirmação do diagnóstico histopatológico. Posteriormente as informações necessárias foram obtidas no prontuário de cada paciente no Serviço de Arquivo Médico (SAME). Assim, foram selecionadas 12 pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal maiores que 2 cm, e que não tinham sido submetidas a quimioterapia e/ou radioterapia até o momento da coleta.

3.2. Cultivo celular

3.2.1. Preparação do material coletado

Inicialmente, todas as soluções foram retiradas do refrigerador 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, das garrafas e das pipetas com álcool 70%.

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 CO₂. Após 48 horas, período em que as células se fixam no fundo da garrafa, foram adicionados 3 mL de RPMI 1640. Todo meio de cultura utilizado foi enriquecido com 20% de BSA, 1% de Penicilina/Estreptomicina e 1% de L-Glutamina.

3.2.2. 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 Os protocolos de preparo das soluções estão descritos no Apêndice A.

3.2.3. Tripsinização

A tripsinização foi feita para 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 5mL de PBS. Em seguida as células foram encobertas com 2mL 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 2mL 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 CO₂.

3.3. 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 1mL de PBS e incubadas com 600mL de fixador formaldeído a 4% por 20 minutos. Em seguida a lâmina foi desacoplada da garrafa, lavada com 1mL 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 imuno-histoquímico.

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

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

3.4. Preparação das placas para exposição ao quimioterápico e curva de crescimento

As células da cultura de cada paciente foram separadas em duas garrafas, sendo uma utilizada como controle (sem nenhum tratamento) e a outra tratada com 0,2 mg do quimioterápico de rotina (cloridrato de doxorubicina, Adriamicina[®]) por 24 horas. A doxorubicina 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 na qual foi aplicado o quimioterápico. Inicialmente, as células retiradas da garrafa por tripsinização foram colocadas em tubos de polipropileno de 15mL. 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 contados o número de células nos 4 quadrantes laterais com 16 campos cada, dividindo o número por 4. 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 5×10^4 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 μL 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°C e no dia seguinte (dia 0), foram adicionados 0,04 mg 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.

As quantidades de quimioterápico foram estabelecidas de acordo com a dosagem administrada em pacientes contidas na bula do medicamento, calculando-se a área das garrafas e poços das placas.

3.5. 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 nucleicos foi realizada de acordo com o protocolo que acompanha o reagente Trizol (Invitrogen).

Inicialmente, o meio RPMI1640 foi desprezado das garrafas e acrescentou-se 3mL de Trizol. Em seguida, foram transferidos 1mL do conteúdo para tubos de polipropileno de 15mL 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 12.000g 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 12.000g por 15 minutos à 4°C formando um pellet de RNA, que foi lavado com 1mL de etanol 75% e centrifugado a 7500g 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.

3.6. Obtenção do cDNA

A síntese de cDNA, foi realizada a partir de $2\mu\text{g}$ 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 $2\mu\text{L}$ de DNase, $2\mu\text{L}$ de *Buffer* 10X, levando ao termociclador a 25°C por 15 minutos. Acrescentou-se $2\mu\text{L}$ 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 $50\mu\text{L}$ por amostra de RNA. Foram misturadas $10\mu\text{L}$ de dNTP, $10\mu\text{L}$ de Random Primer, $5\mu\text{L}$ da enzima Multicribe Reverse Transcriptase e $21\mu\text{L}$ de água DEPC. Em seguida, $50\mu\text{L}$ da solução final foi pipetada em cada poço de uma placa de 96 poços e adicionou-se $50\mu\text{L}$ da amostra de RNA nos poços devidamente identificados, homogeneizando a solução. A placa foi coberta com um adesivo próprio e centrifugada para concentrar o conteúdo no fundo do poço e eliminar as bolhas de ar. As placas foram colocadas no termociclador e a reação apresentou uma etapa inicial a 25°C por 10 minutos e foi finalizada a 37°C por 120 minutos.

3.7. Técnica de PCR quantitativa: análise da expressão gênica

A reação de PCR quantitativa foi realizada pelo método SYBR Green (Applied Biosystems), utilizando-se os iniciadores específicos para os genes responsáveis pela síntese da GSH (GCLC e GSS), GPX e GSTP1. Os genes normalizadores HPRT1 (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) e RPS5 (*ribosomal protein S5*) foram utilizados como controle endógeno 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 ACTB (*actin beta*), GAPD (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), GUSB (*glucuronidase beta*), PPIA (*peptidylprolyl isomerase A*) frequentemente utilizando em estudos de câncer.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores foram desenhadas com auxílio do software Primer3 considerando o tamanho do produto esperado (aproximadamente 130pb a 150pb), o conteúdo em dinucleotídeos GC (~60%), a temperatura de anelamento ($T_m = 60^\circ\text{C}$) e a ausência de homologia com seqüências repetidas no genoma.

Foi realizada uma etapa de otimização para determinar a melhor concentração dos oligonucleotídeos iniciadores para cada gene. Essa etapa garante a saturação dos iniciadores para que não sejam fatores limitantes na velocidade de amplificação. As concentrações de iniciadores testados foram 2,5pmols/ μg , 5pmols/ μg e 10pmols/ μg . Para esta etapa, as reações foram processadas em 20 μL contendo 25ng/ μL de cDNA, 10 μL de Master Mix SybrTM Green (Applied Biosystems) e os oligonucleotídeos iniciadores nas concentrações descritas acima.

Para melhor análise dos resultados, os ensaios de otimização de concentração de iniciadores foram realizados em triplicata para cada gene analisado. Como controle de qualidade, as reações para amostras com valores de desvio significativos (> 2%) foram repetidas utilizando sempre o mesmo cDNA mãe e em todos os experimentos havia controles negativos da reação.

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 $^\circ\text{C}$, seguida por desnaturação inicial de 10 minutos a 95 $^\circ\text{C}$. Em seguida, o programa continuou com 40 ciclos de 15 segundos a 95 $^\circ\text{C}$, 1 minuto a 60 $^\circ\text{C}$ para anelamento dos iniciadores e extensão das cadeias, seguidos de 35 segundos a 65 $^\circ\text{C}$ para coleta do sinal. A curva de dissociação foi gerada após amplificação e compreendeu um passo de 15 segundos a 95 $^\circ\text{C}$ seguido de 1 minuto a 60 $^\circ\text{C}$.

A tabela 4 mostra as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e a melhor concentração para cada gene.

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

Gene	Sequência	Concentração ótima
GSS	Right 5' - TGC TAA AGC CCC AGA GAG AG - 3' Left 5' - AGC AGG CAA TTC TCA AAA GG - 3'	5 pmol/ μ L
GCLC	Right 5' - GCA CAA CGT TCT CAA GTG - 3' Left 5' - TGG TTT GGG TTT GTC CTT TC - 3'	5 pmol/ μ L
GPX	Right 5' - ATG GCG CAA TTG TCC AAG - 3' Left 5' - CTG GCC TCC CCT TAC AGT G - 3'	10 pmol/ μ L
GSTP1	Right 5' - ATG TAT TTG CAG CGG AGG TC - 3' Left 5' - ATA CCA TGC GCT ACC TG - 3'	10 pmol/ μ L
HPRT1	Right 5' - TTATAGTCAAGGGCATATCC - 3' Left 5' - AGC TTG CTGGTGAAAAGGAC - 3'	10 pmol/ μ L
RPS5	Right 5' - TCACTGGTGAGAACCCCCT - 3' Left 5' - CCTGATTCACACGGCGTAG - 3'	10 pmol/ μ L

Outro 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 50ng, 25ng, 12,5ng, 6,25ng e 3,12ng.

As amostras de cDNA nas concentrações citadas foram submetidas à amplificação por PCR quantitativo. O teste foi realizado para cada gene, utilizando a concentração de iniciadores otimizada na etapa anterior.

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 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: $E=10^{(-1/\text{slope})}$.

Após a etapa de padronização, foram realizadas as análises para verificar a expressão diferencial dos genes GCLC, GSS, GPX e GSTP1. O valor da expressão relativa dos genes de interesse foi determinado pelo método de quantificação em relação à média dos genes normalizadores (HPRT1 e RPS5) utilizados como controle endógeno. As amostras foram testadas em triplicatas e, em todos os experimentos havia controle negativo.

Dessa forma, a partir dos valores do C_t de cada amostra, foram calculadas as médias das triplicatas. Posteriormente, foi calculado o ΔC_t a partir da subtração da média obtida para a sequência de interesse por aquela do controle endógeno. Para o cálculo do $\Delta-\Delta C_t$, foram escolhidas 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 ΔC_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 ΔC_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 melhor representação gráfica, os resultados foram apresentados em escala logarítmica de base 3 (Log_3). Considerou-se aumento da expressão gênica para valor da expressão maior que 1, abaixo desse valor a expressão foi considerada não significativa.

Resultados

IV. Resultados

1. Estudo retrospectivo

1.1. Dados clínicos

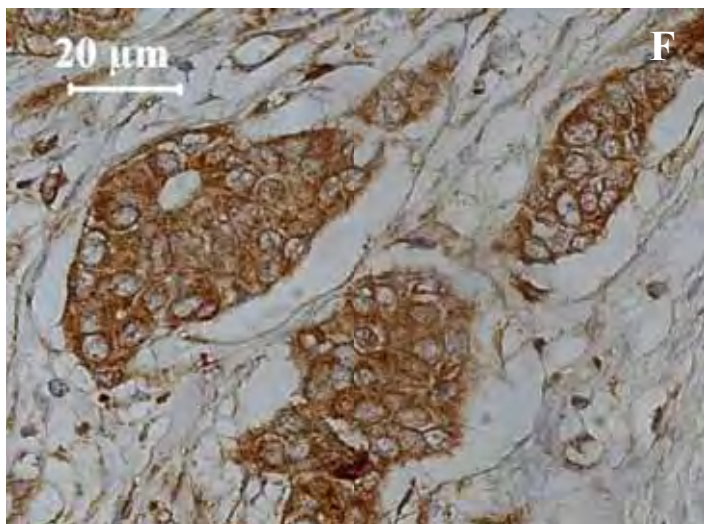
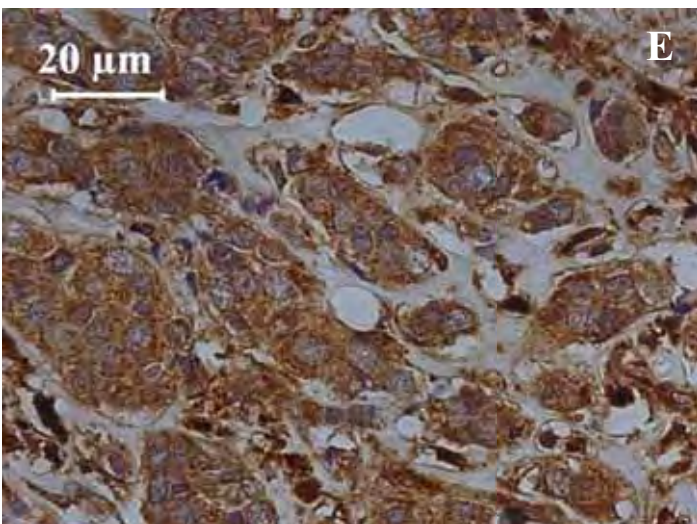
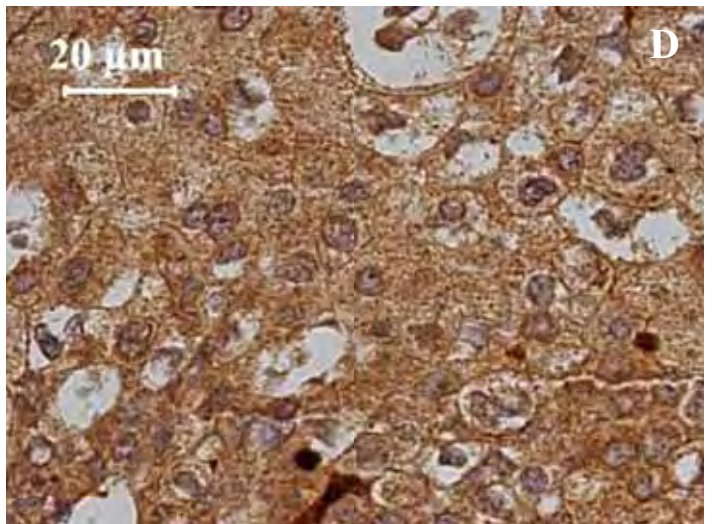
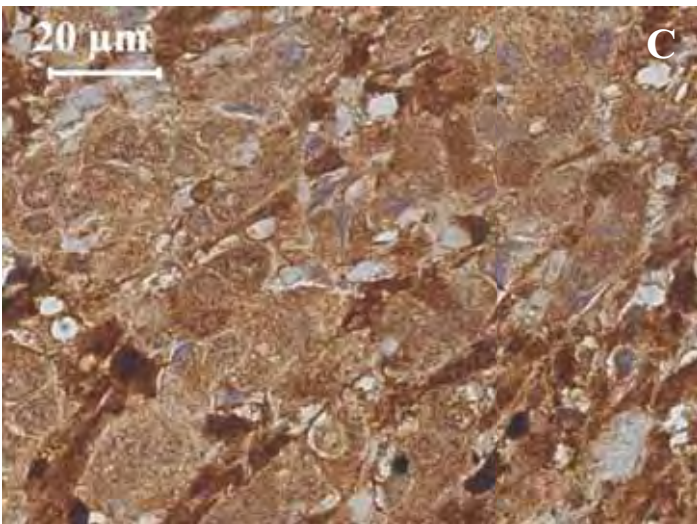
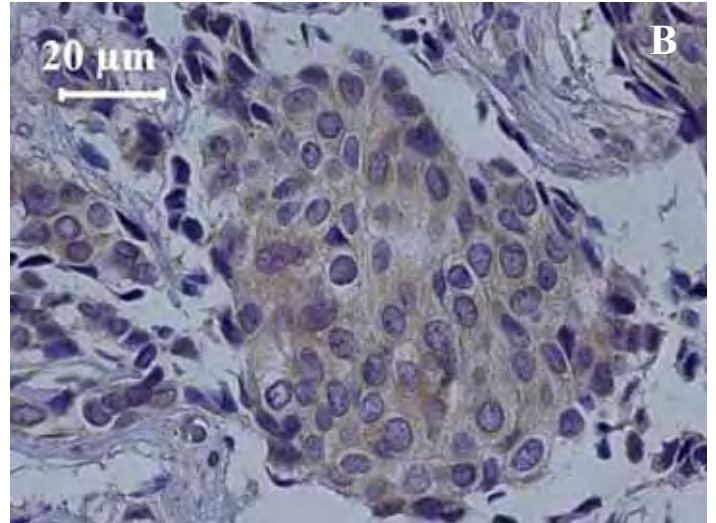
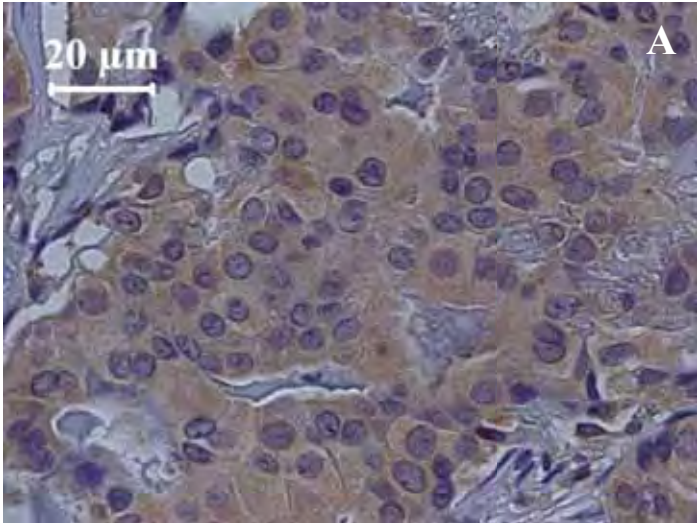
Todas as pacientes receberam diagnóstico de carcinoma ductal invasivo sendo predominante o grau histológico II (79%). Da mesma forma, houve prevalência de tumores com estadiamento clínico II (76%) segundo a classificação TNM. O resultado da análise dos parâmetros clínico-patológicos das 63 pacientes mostrou que 11 (17%) pacientes haviam feito terapia hormonal, 11 (17%) eram tabagistas, 13 (21%) apresentaram tumores maiores que 3 cm e 13 (21%) apresentaram linfonodo axilar positivo. Quanto ao painel de marcadores clássicos, 46 (73%) pacientes apresentaram positividade para o receptor de estrógeno (RE), 37 (59%) para o receptor de progesterona (RP) e 41 (65%) para o HER-2/neu. Apenas 19 (30%) tumores foram p53 negativos e 30 (48%) tiveram alta proliferação celular avaliada pela marcação imuno-histoquímica do Ki-67. Todas as características clínicas e patológicas das pacientes são apresentadas na Tabela 5. Neste estudo, 9 (14%) pacientes apresentaram padrão de expressão basal, 13 (21%) pacientes apresentaram padrão de expressão luminal e 41 (65%) pacientes apresentaram superexpressão do HER-2/neu (Tabela 6). As taxas de metástase e óbito para o grupo estudado foram de 37% e 32% respectivamente, e de 10% para recidiva local. O tempo de acompanhamento médio das pacientes foi de aproximadamente cinco anos. Os dados da evolução clínica das pacientes são apresentados na Tabela 7.

1.2. Expressão protéica pela imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica da proteína GSH e das enzimas GPX e GSTpi foram realizadas em 63 amostras de carcinoma mamário. A imunomarcação foi específica, pois não foi observada imunorreatividade nos controles da reação.

Os resultados obtidos nas reações mostraram imunomarcação positiva para GSH, GPX e GSTpi nas células tumorais, com marcação evidente no citoplasma, enquanto o estroma não apresentou imunorreatividade (Figura 3).

A comparação entre as reações imuno-histoquímicas para as proteínas analisadas demonstrou variação entre a intensidade da imunomarcação para as proteínas GSH ($185,0 \pm 2,54$) e GPX ($193,0 \pm 1,96$) ($p < 0,05$), enquanto a imunomarcação para GSH ($185,0 \pm 2,54$) e GSTpi ($191,8 \pm 2,43$), GPX ($193,0 \pm 1,96$) e GSTpi ($191,8 \pm 2,43$) apresentaram intensidade semelhante ($p > 0,05$) (Figura 4).



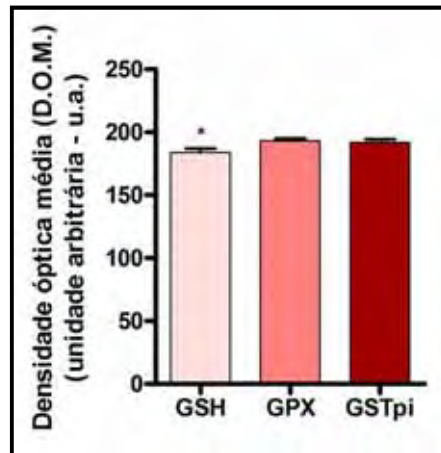


Figura 4: Média da expressão protéica das proteínas GSH, GPX e GSTpi nas células tumorais de mama. *valor significativo no teste ANOVA entre a expressão da GSH e GPX ($p < 0,05$).

Os resultados da densitometria óptica foram comparados com as características clínico-patológicas das pacientes (idade, tabagismo, terapia hormonal, *status* dos linfonodos, grau histológico, estadiamento clínico e tamanho tumoral), com a marcação imuno-histoquímica do painel de marcadores prognósticos clássicos (RE, RP, HER-2/neu, p53 e Ki-67) e com a evolução clínica (ocorrência de recidiva tumoral local, metástase e óbito).

A expressão imuno-histoquímica da GSH apresentou relação estatisticamente significativa apenas com o *status* do receptor de estrógeno, na qual tumores RE positivos apresentaram maior expressão da GSH ($p=0,03$). Não foi encontrada relação com as demais características clínico-patológicas para essa proteína ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Para a expressão da GPX foi encontrada relação estatisticamente significativa apenas com o *status* do receptor de progesterona ($p=0,03$), na qual tumores RP negativos apresentaram maior expressão da GPX (Tabela 5).

A expressão da GSTpi foi significativamente maior em tumores com grau histológico III ($p=0,04$), tumores maiores que 3cm ($p=0,04$) e imunomarcção positiva para p53 ($p=0,003$) (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição das pacientes de acordo com as características clínico-patológicas e comparação da média da densitometria óptica referente à expressão protéica de GSH, GPX e GSTpi entre os grupos estabelecidos.

Parâmetros Clínicos – Patológicos	Números de pacientes	GSH	GPX	GSTpi
Idade das pacientes				
≥ 50 anos	16 (25%)	187,8 ± 3,517	192,6 ± 2,234	190,3 ± 5,343
< 50 anos	47 (75%)	184,3 ± 3,253	194,1 ± 4,240	192,4 ± 2,736
p		0,54	0,74	0,70
Tabagismo				
Sim	11 (17%)	188,0 ± 5,177	196,7 ± 5,951	200,5 ± 7,097
Não	52 (83%)	184,3 ± 2,887	192,2 ± 2,041	190,0 ± 2,497
p		0,58	0,38	0,09
Terapia Hormonal				
Sim	11 (17%)	179,7 ± 4,918	195,9 ± 4,863	197,0 ± 7,371
Não	52 (83%)	186,3 ± 2,842	192,3 ± 2,164	190,7 ± 2,513
p		0,32	0,49	0,33
Status dos Linfonodos				
Positivo	13 (21%)	186,2 ± 4,546	193,7 ± 4,464	188,0 ± 4,845
Negativo	50 (79%)	184,7 ± 2,992	192,5 ± 2,249	192,8 ± 2,798
p		0,81	0,80	0,42
Grau Histológico				
I	3 (5%)	-----	-----	-----
II	50 (79%)	183,7 ± 2,798	192,2 ± 2,301	189,2 ± 2,800
III	10 (16%)	190,9 ± 5,360	194,9 ± 3,650	202,4 ± 4,124
p		0,32	0,62	0,04*
Estadiamento Clínico				
I	4 (6%)	-----	-----	-----
II	48 (76%)	184,8 ± 2,976	192,6 ± 2,207	192,1 ± 2,598
III	9 (14%)	187,3 ± 4,517	188,9 ± 5,832	195,7 ± 7,311
IV	2 (3%)	-----	-----	-----
p		0,71	0,51	0,60
Tamanho tumoral (cm)				
> 3 cm	13 (21%)	186,9 ± 4,190	196,8 ± 3,211	201,5 ± 3,930
≤ 3 cm	50 (79%)	184,5 ± 3,022	192,0 ± 2,329	189,3 ± 2,796
p		0,69	0,32	0,04*
Receptor de estrógeno				
Positivo	46 (73%)	188,1 ± 2,089	191,4 ± 2,484	189,7 ± 3,002
Negativo	17 (27%)	176,4 ± 7,285	197,2 ± 2,671	197,6 ± 3,660
p		0,03*	0,19	0,14

Parâmetros Clínicos – Patológicos	Números de pacientes	GSH	GPX	GSTpi
Receptor de progesterona	37 (59%)	188,3 ± 2,330	189,4 ± 2,870	189,9 ± 3,409
Positivo	26 (41%)	1802 ± 5,106	198,0 ± 2,160	194,5 ± 3,349
Negativo		0,11	0,03*	0,36
p				
HER-2 /neu				
Positivo	41 (65%)	188,1 ± 2,199	193,1 ± 2,447	189,7 ± 3,064
Negativo	22 (35%)	178,8 ± 6,180	192,6 ± 3,389	195,9 ± 3,930
p		0,08	0,90	0,22
p 53				
Positivo	44 (70%)	184,4 ± 3,353	194,8 ± 2,322	196,3 ± 2,850
Negativo	19 (30%)	186,4 ± 3,747	188,7 ± 3,606	181,4 ± 3,722
p		0,73	0,16	0,003*
Proliferação celular				
Alta	30 (48%)	185,3 ± 4,526	194,2 ± 2,878	195,6 ± 2,836
Baixa	33 (52%)	183,9 ± 2,680	191,8 ± 2,724	189,1 ± 3,717
p		0,78	0,54	0,17

Valores apresentados em unidade arbitrária (u.a.) referentes à densidade óptica média (D.O.M.); GSH (glutaciona); GPX (glutaciona peroxidase); GSTpi (glutaciona S transferase pi) * valor de p significante para o teste t de student

Além disso, não houve relação entre a expressão das proteínas analisadas e os tumores com padrão de expressão basal, luminal e HER-2/neu positivo ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6: Classificação das pacientes de acordo com a expressão dos receptores hormonais e da proteína HER-2/neu e comparação da média da densidade óptica referente à expressão protéica de GSH, GPX e GSTpi entre os grupos estabelecidos.

Padrão de expressão	Número de pacientes	GSH	GPX	GSTpi
Basal	9 (14%)	189,3 ± 4,643	198,2 ± 3,992	200,2 ± 6,166
Luminal	13 (21%)	185,5 ± 4,629	188,8 ± 4,860	192,8 ± 5,131
HER-2/neu (+)	41 (65%)	188,1 ± 2,199	193,1 ± 2,447	189,7 ± 3,064
*p		0,80	0,38	0,32

Valores apresentados em unidades arbitrárias (u.a.) referentes à densidade óptica média (D.O.M.); *ANOVA

Quanto à evolução clínica, não houve relação significativa entre a expressão da GSH com a ocorrência de recidiva tumoral local, metástase ou óbito ($p > 0,05$) (Tabela 7). Da mesma forma, a expressão da GPX e GSTpi não foi relacionada com recidiva tumoral local e metástase, porém a expressão de ambas enzimas foi significativamente maior em pacientes que vieram a óbito ($p = 0,03$ – GPX), ($p = 0,04$ – GSTpi) (Tabela 7).

Para avaliar o valor preditivo da expressão imuno-histoquímica das proteínas GSH, GPX e GSTpi, as pacientes foram separadas em três grupos de acordo com o tratamento recebido, apresentados anteriormente (Grupo I, II e III).

Nas pacientes que receberam quimioterapia e radioterapia adjuvante (Grupo I), não houve relação estatisticamente significativa entre a expressão da GSH com a ocorrência de recidiva tumoral local, metástase ou óbito ($p > 0,05$). No entanto, a expressão da GPX foi significativamente maior em pacientes que vieram a óbito ($p = 0,02$). Além disso, a expressão da GSTpi também foi significativamente maior em pacientes que apresentaram recidiva tumoral local ($p = 0,009$), que tiveram metástase ($p = 0,02$) e que vieram a óbito ($p = 0,02$) (Tabela 7).

Nas pacientes que receberam apenas quimioterapia adjuvante (Grupo II), a alta expressão da GSH foi relacionada estatisticamente com a ocorrência de metástase ($p = 0,03$), enquanto não foram encontradas relações significantes entre a expressão da GPX e GSTpi com esse grupo de pacientes (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição das pacientes de acordo com a evolução clínica e o tratamento recebido, e a comparação das médias da densidade óptica referente à expressão protéica de GSH, GPX e GSTpi entre os grupos estabelecidos.

	Grupo Total (N=63)	Grupo I: Quimioterapia e radioterapia adjuvante (N=37)	Grupo II: Apenas quimioterapia (N=19)	Grupo III: Sem tratamento adjuvante (N=7)
<u>GSH</u>				
Recidiva local				
Sim	179,7 ± 3,412 N=6	180,4 ± 4,082 N=5	N=1	N=0
Não	185,5 ± 2,778 N=57	184,1 ± 4,326 N=32	N=18	N=7
	p=0,50	p=0,74	---	---
Metástase				
Sim	186,8 ± 3,030 N=23	181,6 ± 4,223 N=14	196,8 ± 3,311 N=6	N=3
Não	183,9 ± 3,617 N=40	184,8 ± 5,556 N=23	179,0 ± 4,954 N=13	N=4
	p=0,59	p=0,68	p=0,03*	---
Óbito				
Sim	183,5 ± 3,549 N=20	179,3 ± 4,033 N=13	189,2 ± 8,789 N=5	N=2
Não	185,7 ± 3,354 N=43	185,9 ± 5,393 N=24	183,0 ± 4,555 N=14	N=5
	p=0,68	p=0,41	p=0,51	---
<u>GPX</u>				
Recidiva local				
Sim	196,3 ± 9,315 N=6	203,2 ± 6,111 N=5	N=1	N=0
Não	192,3 ± 2,004 N=57	192,3 ± 2,705 N=32	N=18	N=7
	p=0,56	p=0,14	---	---
Metástase				
Sim	196,5 ± 3,379 N=23	196,3 ± 4,908 N=14	200,2 ± 5,382 N=6	N=3
Não	190,9 ± 2,389 N=40	192,3 ± 2,808 N=23	187,2 ± 5,384 N=13	N=4
	p=0,17	p=0,44	p=0,15	---
Óbito				
Sim	199,1 ± 2,867 N=20	201,6 ± 3,362 N=13	190,0 ± 5,030 N=5	N=2
Não	190,1 ± 2,459 N=43	189,5 ± 3,163 N=24	191,7 ± 5,532 N=14	N=5
	p=0,03*	p=0,02*	p=0,86	---
<u>GSTpi</u>				
Recidiva local				
Sim	200,7 ± 12,69 N=6	212,2 ± 6,476 N=5	N=1	N=0
Não	190,9 ± 2,357 N=57	188,7 ± 3,212 N=32	N=18	N=7
	p=0,24	p=0,009*	---	---
Metástase				
Sim	196,9 ± 3,859 N=23	200,7 ± 5,591 N=14	191,8 ± 6,565 N=6	N=3
Não	188,9 ± 3,060 N=40	186,5 ± 3,300 N=23	190,4 ± 6,973 N=13	N=4
	p=0,11	p=0,02*	p=0,89	---
Óbito				
Sim	199,0 ± 4,165 N=20	201,5 ± 5,541 N=13	187,8 ± 6,351 N=5	N=2
Não	188,5 ± 2,880 N=43	186,6 ± 3,375 N=24	191,9 ± 6,637 N=14	N=5
	p=0,04*	p=0,02*	p=0,73	---

Valores apresentados em unidades arbitrárias (u.a.) referentes à densidade óptica média (D.O.M.) N= número de pacientes. GSH (glutationa); GPX (glutationa peroxidase); GSTpi (glutationa S transferase pi) * valor de p significativo para teste t de student. --- n insuficiente para análise estatística.

Para estabelecer o melhor ponto de corte referente à expressão imuno-histoquímica das proteínas analisadas foram construídas curvas ROC. Esta análise representa graficamente a sobreposição entre a distribuição da sensibilidade e da especificidade para cada fator, ou seja, a taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) *versus* a taxa de falsos positivos (especificidade). Neste estudo, os valores da expressão protéica das pacientes que vieram a óbito foram comparados com os das pacientes que continuaram vivas até o final do acompanhamento, tanto no grupo total, como no grupo de pacientes tratadas com quimioterapia e radioterapia após a cirurgia (Grupo I). Assim, os melhores pontos de corte para discriminar o risco de óbito elevado nas pacientes do grupo total, independente do tratamento, foram: D.O.M.= 170 u.a. para GSH (sensibilidade de 30% e especificidade de 88%), D.O.M.= 200 u.a. para GPX (sensibilidade de 60% e especificidade de 67%) e D.O.M.= 187 u.a. para GSTpi (sensibilidade de 85% e especificidade de 39%). Quando analisadas apenas as pacientes tratadas com quimioterapia e radioterapia adjuvantes (Grupo I) os pontos de corte estabelecidos foram: D.O.M.= 190 u.a. (sensibilidade de 92% e especificidade de 45%), D.O.M.= 203 u.a. para GPX (sensibilidade de 54% e especificidade de 87%) e D.O.M. = 189 u.a. para GSTpi (sensibilidade de 92% e especificidade de 50%).

Os gráficos da curva ROC e a especificidade e sensibilidade para cada proteína quando analisadas as pacientes do grupo total e as pacientes do grupo I estão apresentados na figura 5 e figura 6, respectivamente.

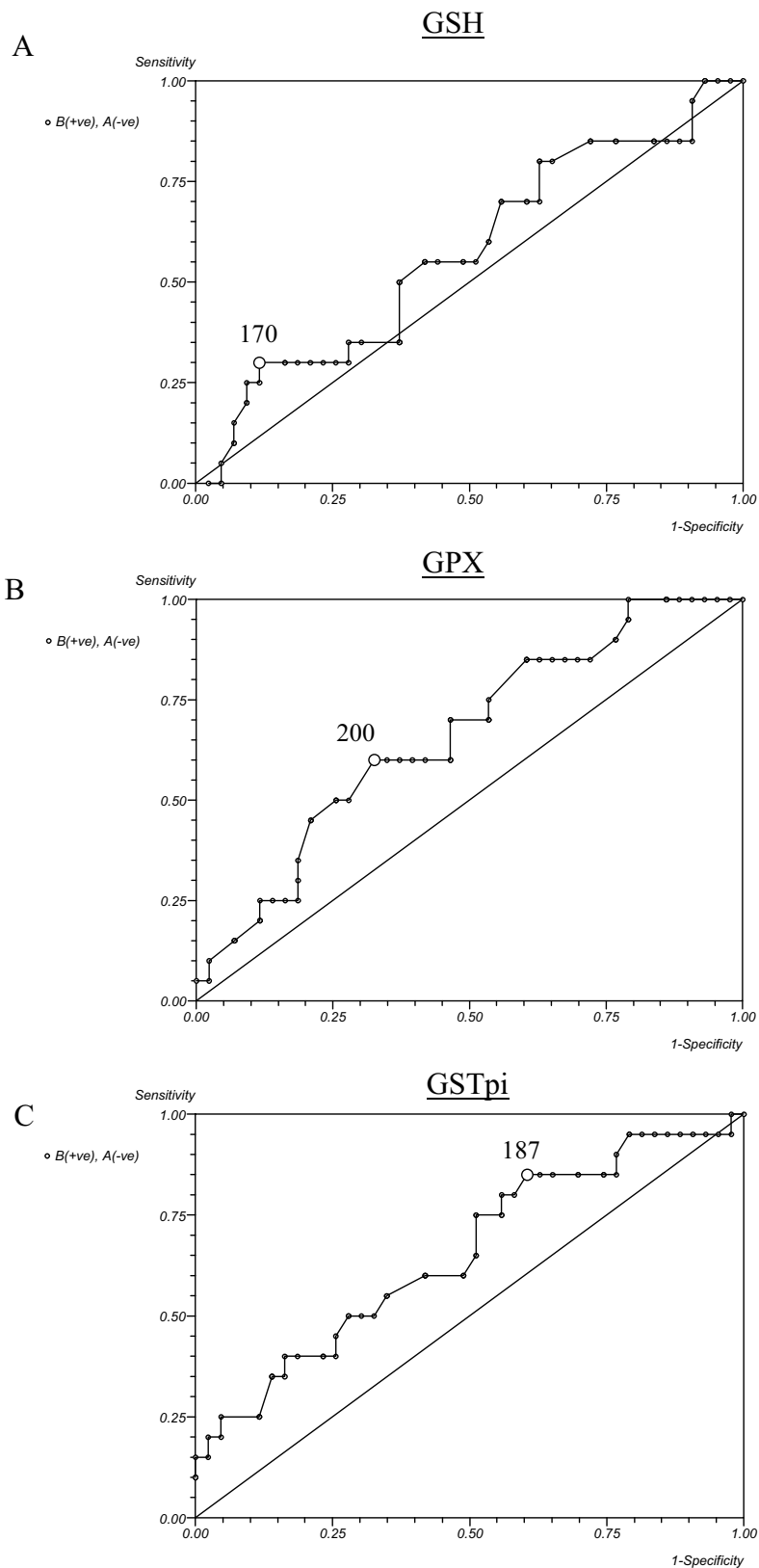


Figura 5: Valores de corte estabelecidos para ocorrência de óbito pela curva ROC no grupo total (n=63). **(A)** Valor de corte estabelecido para proteína GSH. Sensibilidade (95%IC) = 30%, Especificidade (95%IC) = 88%. **(B)** Valor de corte estabelecido para proteína GPX. Sensibilidade (95%IC) = 60%, Especificidade (95%IC) = 67%. **(C)** Valor de corte estabelecido para a proteína GSTpi. Sensibilidade (95%IC) = 85%, Especificidade (95%IC) = 39%. IC= Intervalo de confiança.

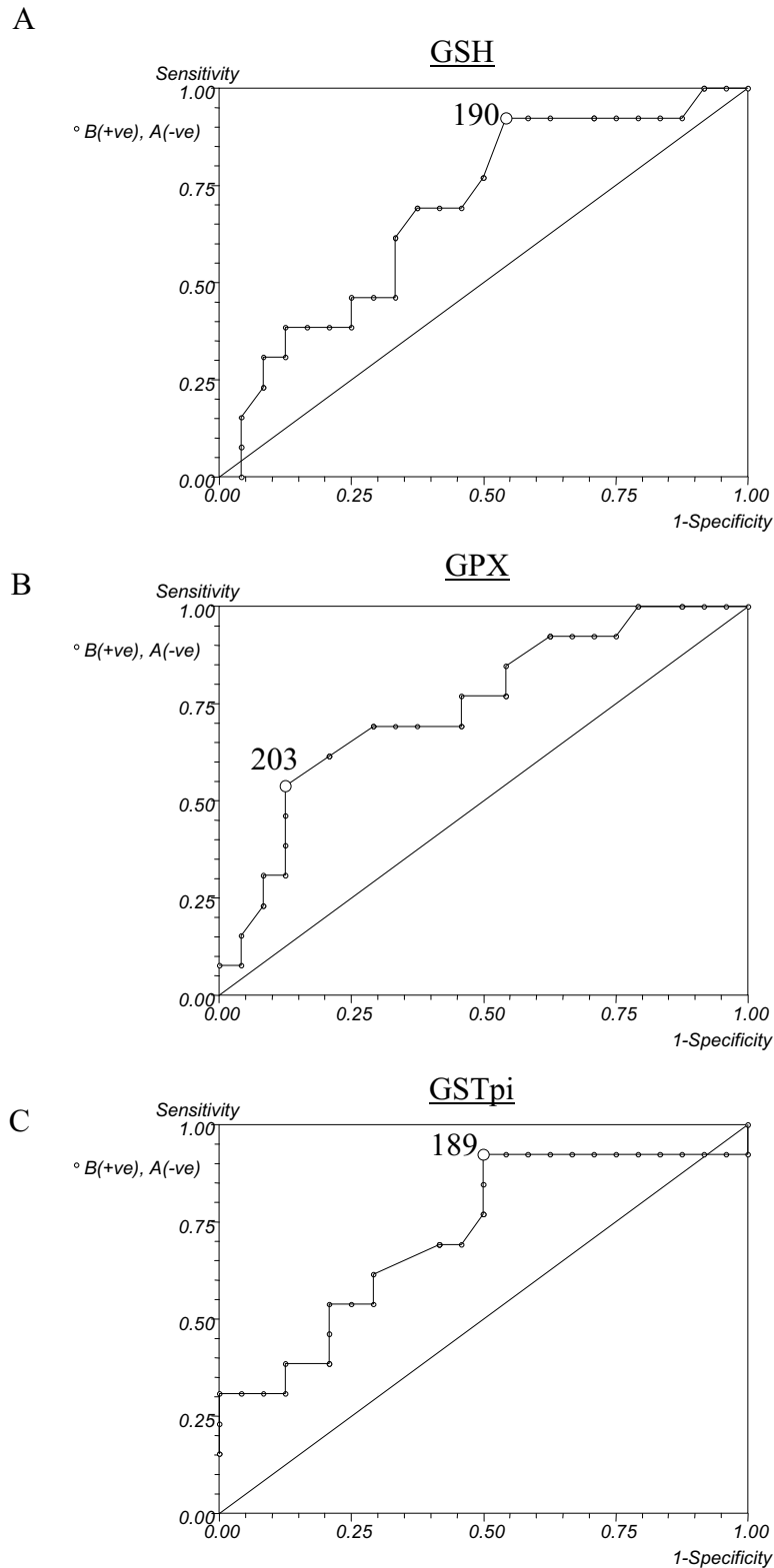


Figura 6: Valores de corte estabelecidos para ocorrência de óbito pela curva ROC no grupo I (n=37). **(A)** Valor de corte estabelecido para proteína GSH. Sensibilidade (95%IC) = 92%, Especificidade (95%IC) = 45%. **(B)** Valor de corte estabelecido para proteína GPX. Sensibilidade (95%IC) = 54%, Especificidade (95%IC) = 87%. **(C)** Valor de corte estabelecido para a proteína GSTpi. Sensibilidade (95%IC) = 92%, Especificidade (95%IC) = 50%. IC= Intervalo de confiança.

A regressão logística multivariada foi realizada para verificar a influência simultânea dos fatores prognósticos e da expressão imuno-histoquímica das proteínas analisadas, sobre o risco de óbito nas pacientes com câncer de mama.

Os resultados mostraram que o estadiamento clínico maior que II ($p=0,03$), a ocorrência de recidiva tumoral local ($p=0,04$) e de metástase ($p=0,001$) estão associadas a um maior risco de morte nas pacientes com câncer de mama. A alta expressão da GPX mostrou uma tendência significativa ($p=0,05$) e as outras variáveis como idade maior que 50 anos, comprometimento dos linfonodos regionais, receptor de estrógeno negativo, receptor de progesterona negativo, HER-2/neu negativo, alta proliferação celular (Ki-67) e p53 positivo, assim como a alta expressão da GSH e da GSTpi não foram associadas a um maior risco de morte em pacientes com câncer de mama ($p>0,05$) (Tabela 9).

Tabela 9: Resultados da análise da regressão logística multivariada nas pacientes com câncer de mama.

Variáveis	OR	IC 95%	p
Idade \geq 50 anos	96,50	0,69 – 13432,65	0,06
Linfonodo positivo	16,11	0,46 – 562,11	0,12
Estadiamento clínico maior que II	72,75	1,31 – 4016,26	0,03*
RE negativo	10,39	0,37 – 286,88	0,16
RP negativo	0,03	0,0009 – 1,59	0,08
HER-2/neu negativo	15,06	0,84 – 267,79	0,23
Alta proliferação celular (Ki-67 positivo)	15,06	0,84 – 267,79	0,06
p53 positivo	0,07	0,002 -1,87	0,11
Recidiva local	1247,09	1,05 – 1473116,59	0,04*
Metástase	324,46	8,83 – 11909,28	0,001*
Alta expressão da GSH	0,26	0,26 – 7,12	0,42
Alta expressão da GPX	1,36	0,09 – 19,54	0,05
Alta expressão da GSTpi	22,61	0,96 – 530,52	0,82

OR= odds ratio. IC= intervalo de confiança.* Valor significativo.

Para avaliar a relação entre a expressão das proteínas GSH, GPX e GSTpi e a sobrevida das pacientes foi realizado o teste Kaplan Meier. Os resultados mostraram que não houve relação entre a sobrevida global e a expressão da GSH ($p > 0,05$) (Figura 6A). A alta expressão da GPX teve relação significativa com o menor tempo de sobrevida global ($p = 0,03$) (Figura 6B) e o mesmo foi encontrado para GSTpi ($p = 0,02$) (Figura 6C).

A curva de sobrevida também foi realizada para o grupo de 37 pacientes que realizaram quimioterapia e radioterapia adjuvantes (Grupo I). Não houve associação com a expressão da proteína GSH (Figura 7A). No entanto, a mesma relação significativa do grupo total foi encontrada para as enzimas GPX ($p = 0,02$) (Figura 7B) e GSTpi ($p = 0,04$) (Figura 7C) nas pacientes do Grupo I. Nenhuma relação significativa foi encontrada quando avaliadas as pacientes dos grupos II e III ($p > 0,05$).

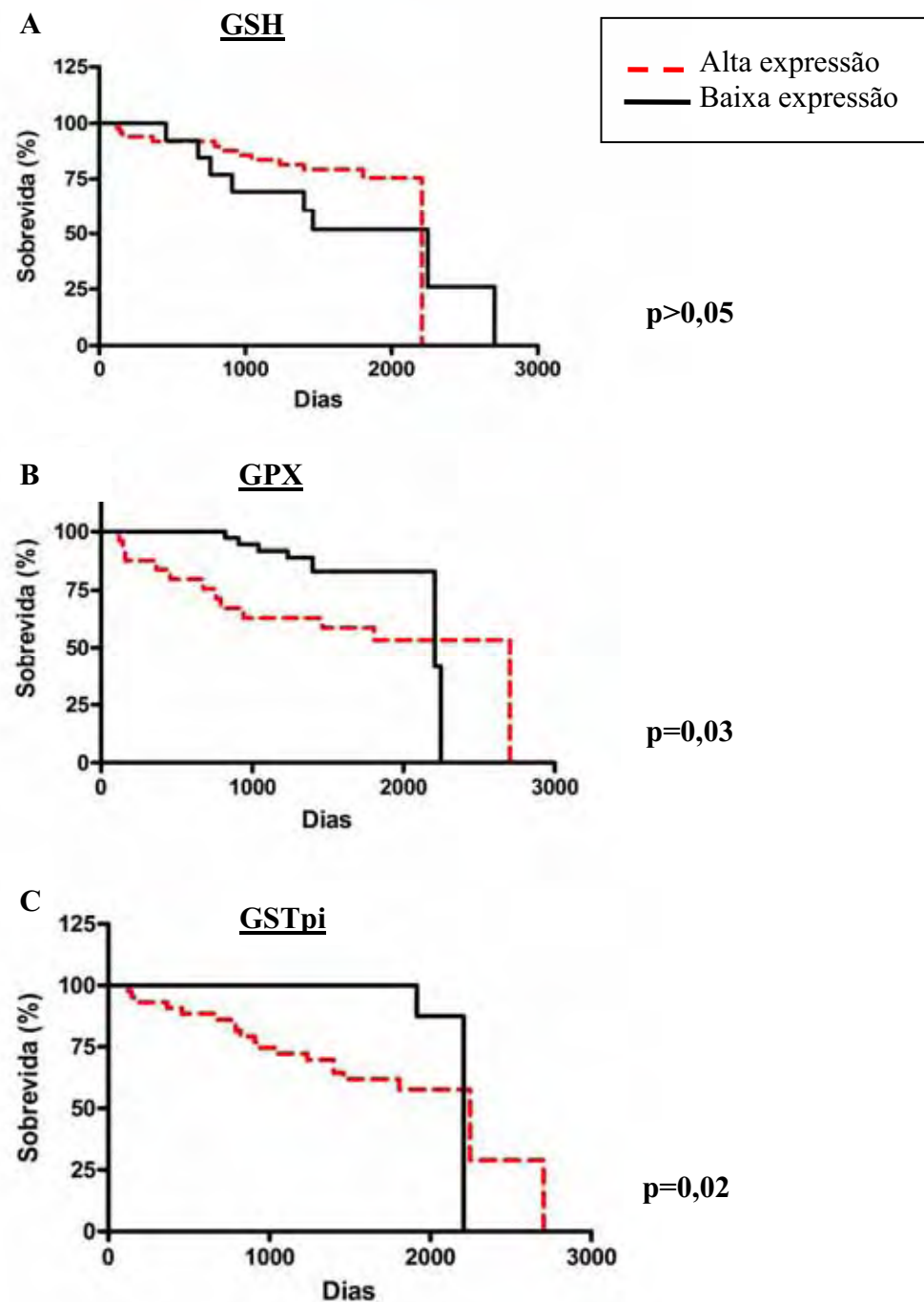


Figura 6: Sobrevida global das pacientes do grupo total (n=63). **(A)** Sobrevida das pacientes com relação a expressão da GSH (OR=0,63; IC 95%=0,15 – 1,56; p=0,23). **(B)** Sobrevida das pacientes com relação a expressão da GPX (OR=2,39; IC 95%=1,05 – 7,01; p=0,03). **(C)** Sobrevida das pacientes com relação a expressão da GSTpi (OR=4,49; IC 95%=1,16 – 7,72; p=0,02). OR=odds ratio; IC= intervalo de confiança.

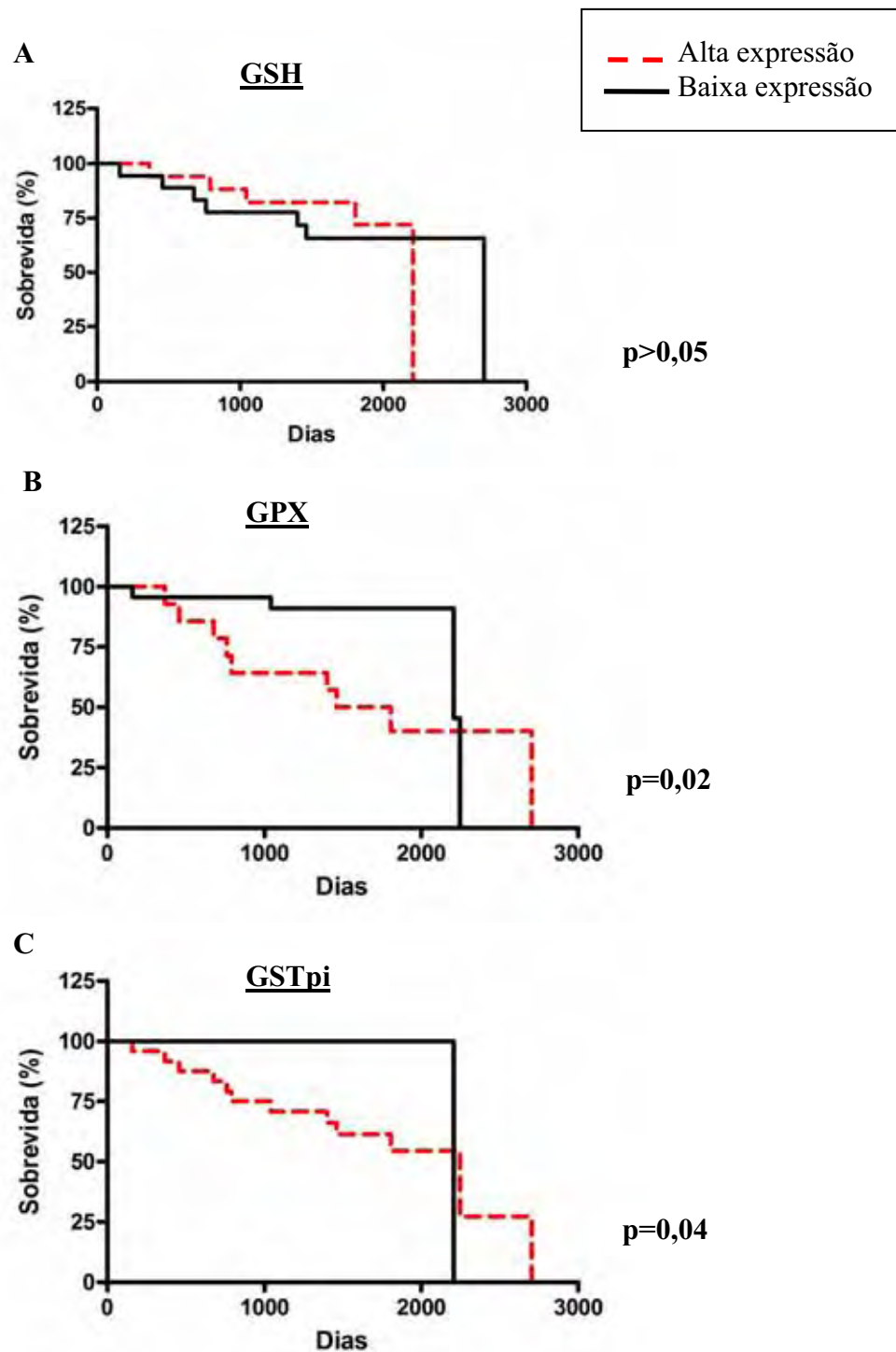


Figura 7: Sobrevida global das pacientes do grupo I (n=37). **(A)** Sobrevida das pacientes com relação a expressão da GSH (OR=0,81; IC 95%=0,24 – 2,61; $p=0,71$). **(B)** Sobrevida das pacientes com relação a expressão da GPX (OR=3,29; IC 95%=1,19 – 12,90; $p=0,02$). **(C)** Sobrevida das pacientes com relação a expressão da GSTpi (OR=5,82; IC 95%=1,03 – 11,87; $p=0,04$). OR=odds ratio; IC= intervalo de confiança.

2. Estudo Prospectivo

A análise da expressão relativa dos genes responsáveis pela síntese da GSH, GPX e GSTpi pela técnica de PCR quantitativo foi realizada a partir das células cultivadas, provenientes de fragmentos tumorais de 12 pacientes com câncer de mama. A expressão gênica foi verificada antes e após a exposição das células a um quimioterápico de rotina (doxorubicina).

2.1. Imunocitoquímica

Os resultados da imunocitoquímica das células tumorais *in vitro* mostraram que as células epiteliais estavam presentes (positivo para citoqueratina), assim como as mioepiteliais (positivo para calponina) e eventualmente alguns fibroblastos teciduais (positivo para vimentina) (Figura 8).

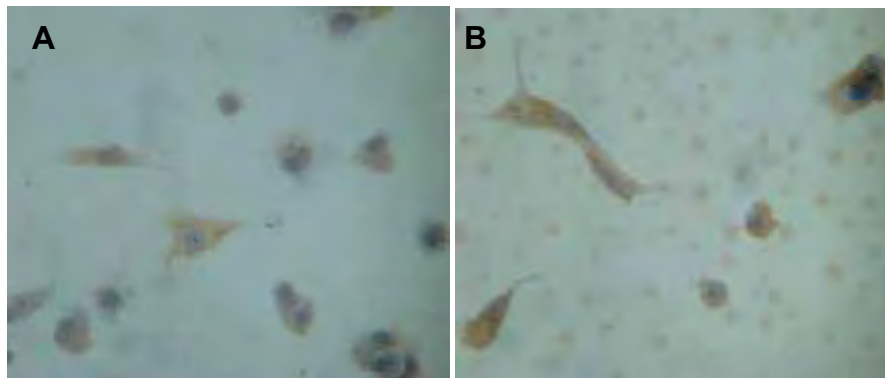


Figura 8: Fotomicrografia de cultivo celular de células de neoplasia mamária de mulheres. **(A).** Imunomarcção positiva para citoqueratina. **(B).** Imunomarcção positiva para calponina.

2.2. Curva de crescimento das células *in vitro*

Nas curvas de crescimento das 12 amostras tumorais cultivadas foi observada diferença significativa entre as placas controle (sem a aplicação do quimioterápico) e as placas com a aplicação da Doxorubicina. Nas placas controle as células se mantinham em crescimento a cada dia observado, enquanto nas placas com células expostas ao fármaco houve a diminuição do número de células a cada dia chegando à zero entre o quarto e sexto dia de observação, confirmando assim sua eficácia (Figura 9).

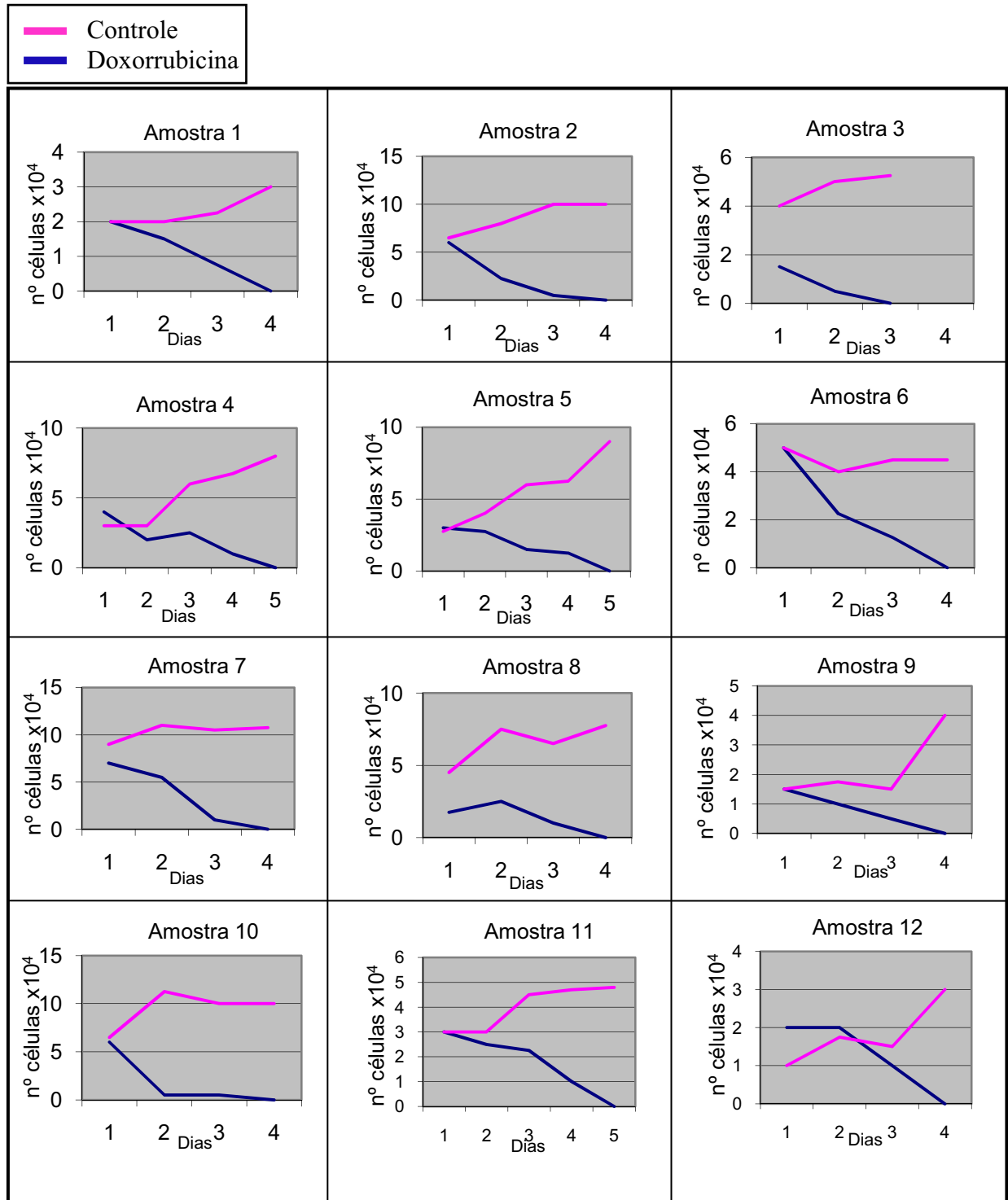


Figura 9: Curva de crescimento celular demonstrando a eficácia da doxorrubicina em eliminar a célula tumoral em relação às células que não foram agredidas com quimioterápico.

2.3. Integridade do RNA

A integridade do RNA foi constatada pela presença das subunidades ribossômicas 18S e 28S (Figura 10), sendo que amostras que apresentaram o RNA degradado foram desprezadas.

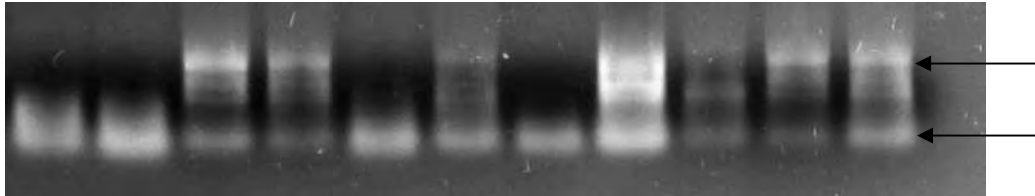


Figura 10: Padrão eletroforético das subunidades 18S e 28S do RNA em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Notar que há a separação das duas bandas do RNA ribossomal em algumas amostras (seta).

2.4. PCR em Tempo Real

Para melhor representação gráfica, os resultados foram apresentados em escala logarítmica de base 3 (Log_3), sendo considerado aumento ou redução significativo de expressão quando o valor de expressão estava acima ou abaixo de 1 em relação à amostra controle. O *pool* de células controle corresponde ao conjunto de células de uma co-cultura dos mesmos 12 tecidos que não receberam o quimioterápico, mantendo assim as expressões dos genes a níveis consideráveis idênticos aos níveis que poderiam ser encontrados ainda *in loco* no organismo humano sem tratamento. Os resultados de expressão gênica realizados no material extraído das culturas de células tumorais tratadas com doxorrubicina mostraram diferenças nas expressões para cada gene estudado conforme descrição individual que se segue:

Glutamato cisteína ligase (GCLC)

O gene GCLC mostrou-se subexpresso em 7 (58,3%) amostras de cultura tratadas com o quimioterápico. Apenas uma (8,3%) amostra apresentou maior expressão gênica e quatro (33,3%) amostras não atingiram o valor mínimo necessário na escala de Log_3 , para considerá-la diferencialmente expressa em relação ao *pool* de controles (Figura 11).

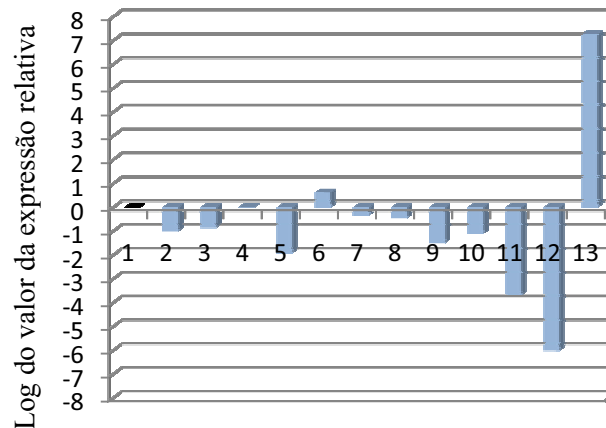


Figura 11: Expressão do gene GCLC nas células expostas a doxorrubicina em relação ao pool de células não expostas (representado como 1). Valor da expressão gênica em log_3 .

Glutathione sintetase (GSS)

O gene GSS foi superexpresso apenas em uma (8,3%) amostra em relação ao *pool* de células cultivadas e não tratadas com o quimioterápico. As outras 11 (91,6%) amostras não atingiram o valor mínimo necessário na escala de Log_3 (Figura 12).

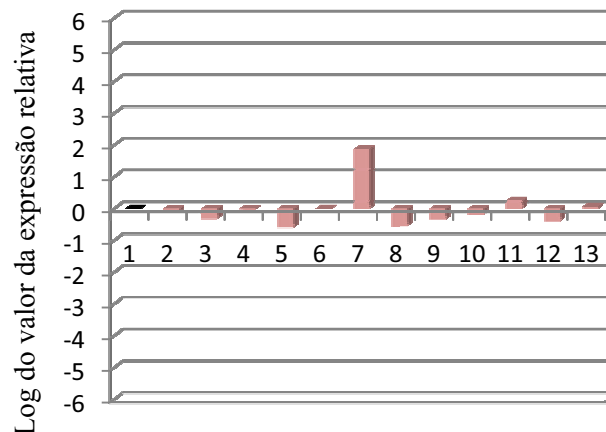


Figura 12: Expressão do gene GSS nas células expostas a doxorrubicina em relação ao pool de células não expostas (representado como 1). Valor da expressão gênica em log_3 .

Glutathione Peroxidase (GPX)

Das 12 amostras analisadas, seis (50%) apresentaram menor expressão do gene GPX em relação ao *pool* de células cultivadas e não tratadas com a droga. Apenas uma (8,3%) amostra apresentou superexpressão desse gene e cinco (41,66%) amostras não apresentaram diferença significativa na expressão gênica em relação as células controle (Figura 13).

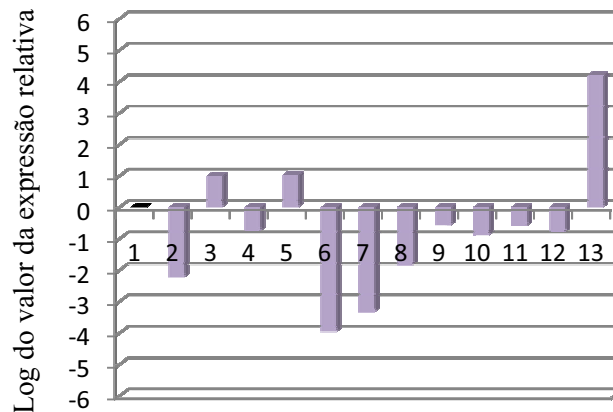


Figura 13: Expressão do gene GPX nas células expostas a doxorrubicina em relação ao pool de células não expostas (representado como 1). Valor da expressão gênica em \log_3 .

Glutathione S Transferase pi (GSTP1)

O gene GSTP1 mostrou-se subexpresso em nove (75%) amostras de cultura tratadas com o quimioterápico. Duas (16,6%) amostras apresentaram superexpressão desse gene e apenas uma (8,3%) não atingiu o valor mínimo necessário na escala de \log_3 , para considerá-la superexpressa em relação ao pool de controles (Figura 14).

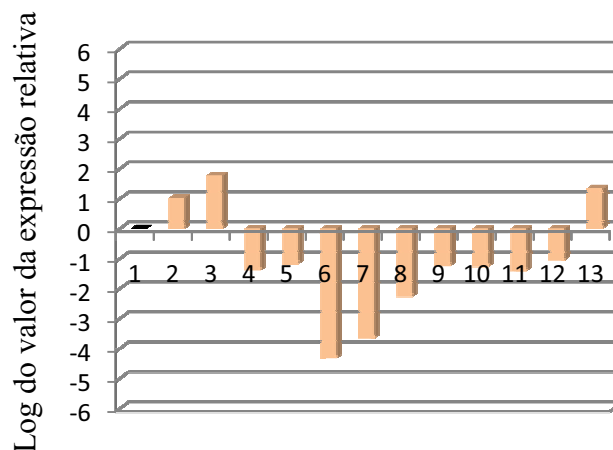


Figura 14: Expressão do gene GSTP1 nas células expostas a doxorrubicina em relação ao pool de células não expostas (representado como 1). Valor da expressão gênica em \log_3 .

Discussão

V. Discussão

Além do diagnóstico precoce, a introdução de tratamentos mais efetivos tem possibilitado o declínio das mortes e melhorado a qualidade de vida das pacientes com câncer de mama (GRALOW et al., 2008). Assim, é extremamente importante a identificação de novos fatores que possam prever a evolução clínica e as respostas à terapia sistêmica nas pacientes com câncer de mama. A mensuração de marcadores biológicos, tais como proteínas envolvidas na resistência aos medicamentos, pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais efetivas e com menor toxicidade (BUSER et al. 1997).

Neste estudo foi avaliada a expressão das proteínas GSH, GPX e GSTpi em pacientes com câncer de mama retrospectivamente.

Pesquisas que avaliam o valor prognóstico da GSTpi apresentam resultados controversos, os quais têm sido atribuídos aos vários métodos de avaliação utilizados, normalmente com natureza semiquantitativa, e ao pequeno número e a diversidade das pacientes estudadas. Essas divergências, apesar de válidas não comprovam o verdadeiro efeito clínico dos resultados (HAAS et al., 2006; HUANG et al., 2003; EL-RAYES et al., 2003; DUFFY et al. 2010). Dessa forma, a imuno-histoquímica foi eleita a melhor técnica para a análise da expressão da GSTpi, assim como de outros marcadores, pois permite a exata localização e a intensidade da expressão da proteína, especificando apenas as células tumorais (EL-RAYES et al., 2003; MOLINA et al., 1993).

Neste estudo todos os tumores apresentaram imunomarcagem positiva para as proteínas avaliadas. Do mesmo modo, a prevalência de casos positivos para GSH, GPX e GSTpi em tecidos neoplásicos da mama tem sido relatada na literatura (HUANG et al. 2003; BUSER et al., 1997; MURRAY et al., 1993).

No presente estudo, tumores considerados receptor de estrogênio positivo apresentaram maior expressão proteica da GSH quando comparados aos receptores de estrogênio negativo. Além disso, tumores com receptor de progesterona negativo apresentaram maior expressão da GPX quando comparados aos com receptor de progesterona positivo. Segundo Fernandes et al. (2009) a análise individual dos receptores hormonais não é conclusiva. De acordo com a avaliação conjunta da expressão dos receptores hormonais e da proteína HER-2/neu, os carcinomas mamários podem ser agrupados em três subtipos principais que estabelecem informações importantes quanto ao grau de malignidade e a resposta terapêutica a determinadas drogas (BASU et al. 2008; FERNANDES et al. 2009). Carcinomas triplo receptor negativos são considerados mais agressivos do que carcinomas com receptores hormonais positivos e os que superexpressam o HER-2/neu. Neste estudo, quando

relacionadas a expressão da GSH, GPX e GSTpi com esses subtipos de carcinomas não foi encontrada relação estatística. Outros estudos também não encontraram associação entre a expressão imuno-histoquímica das GSTs e os receptores hormonais (CLAPPER et al., 1991), ou com a proteína HER-2/neu em tumores de mama (CAIRNS et al. 1992).

Trabalhos que relacionam a expressão imuno-histoquímica da GSH, assim como da GPX, com os parâmetros clínico-patológicos de pacientes com câncer de mama são escassos na literatura. A maior parte dos estudos tem utilizado métodos bioquímicos para quantificar a atividade dessas proteínas, comparando pacientes com câncer de mama e pacientes controles saudáveis (YEH et al. 2006; KASAPOVIC et al., 2008; RAJNEESH et al., 2008; KASAPOVIC et al., 2010).

Neste estudo, a alta expressão da GSTpi associou-se com tumores p53 positivo. Vários estudos têm avaliado o valor prognóstico da p53 e encontram resultados conflitantes. Muitos destes estudos associam um pior prognóstico em casos p53 positivos, enquanto outros não mostraram associação (MALAMOU-MITSI et al., 2006). A expressão do p53 em ductos mamários normais ou hiperplásicos contribuiu para caracterizar morfológicamente a invasão tumoral (HSIAO et al. 2010).

Silvestrini et al. (1997) mostraram que pacientes com linfonodo negativo e expressão imuno-histoquímica das proteínas p53 e GSTpi, e que realizaram apenas a cirurgia, apresentaram maiores riscos de recorrência tumoral quando comparadas a pacientes com menor expressão destes marcadores. A expressão imuno-histoquímica da p53 e GSTpi foi também avaliada em pacientes com câncer de mama metastático a fim de relacionar a expressão dessas proteínas com o tratamento quimioterápico. A avaliação imuno-histoquímica da p53 caracterizou pacientes que não respondem ao tratamento, porém a expressão da GSTpi não mostrou relação (SCHMIDT et al., 2003).

Com relação às características patológicas do tumor, os resultados obtidos neste estudo mostraram que a maior expressão da GSTpi relacionou-se com características de pior prognóstico, como alto grau histológico e maior tamanho tumoral. Estes resultados estão de acordo com Frierson e colaboradores (1995) que associaram a maior expressão da GSTpi com o maior grau histológico de carcinomas ductais invasivos. Outros autores demonstraram uma relação contrária à encontrada neste estudo. Cairns et al. (1992) associaram a ausência da GSTpi no tecido tumoral com o maior grau histológico do câncer de mama. Buser et al. (1997) encontraram associação entre a alta expressão da GPX e GSTs com características clínicas favoráveis e bom prognóstico. Além disso, um estudo realizado por Haas et al. (2006), associou menores tamanhos tumorais com a alta expressão de GSTpi.

A expressão imuno-histoquímica da GSH, GPX e GSTpi também foi relacionada com a evolução clínica das pacientes com câncer de mama. Apesar de não ter sido encontrada relação entre a expressão da GSH e GPX com fatores prognósticos importantes, pacientes que realizaram apenas quimioterapia adjuvante (Grupo II) e que tiveram metástase apresentaram maior expressão da GSH. Ballatori e colaboradores (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.

A alta expressão da GPX foi associada com óbito na análise univariada e apresentou-se como um fator com tendência significativa ($p=0,05$) que contribuiu para o maior risco de óbito na análise multivariada. Além disso, pacientes com alta expressão da GPX apresentaram menor tempo de sobrevida global. A associação entre a alta expressão da GPX e óbito manteve-se significativa mesmo quando avaliadas apenas as pacientes restritas a um grupo de 37 mulheres tratadas com quimioterapia e radioterapia adjuvantes, inclusive com o mesmo protocolo quimioterápico (FEC) (Grupo I).

As relações encontradas neste estudo podem ser explicadas com base na reação enzimática catalisada pela GPX. Alguns protocolos quimioterápicos e radioterápicos potencializam o estresse oxidativo já existente em processos neoplásicos, causando danos no DNA e a morte celular (MURAWAKI et al., 2008). Sabe-se que os níveis de GPX são intimamente ligados a resposta celular ao estresse oxidativo. Assim, tratamentos citotóxicos podem diminuir a concentração de GPX intracelular, devido a alta concentração de GSSG no ambiente oxidante, ou, por outro lado induzir a expressão desta enzima antioxidante como uma resposta celular a alta concentração de H_2O_2 (LI et al., 2000; ESTRELA et al., 2006; BALLATORI et al., 2009; KASAPOVIC et al., 2010). O alto nível de GPX auxilia no combate aos danos oxidativos que levariam à morte das células tumorais devido aos tratamentos empregados (KUMARAGURUPARAM et al., 2005; RAJNEESH et al., 2008).

Da mesma forma, no presente estudo a enzima GSTpi foi mais expressa nas pacientes que morreram, tanto quando avaliado o grupo total ($n=63$), como quando avaliado o grupo que recebeu quimioterapia e radioterapia adjuvantes (Grupo I). Além disso, a alta expressão dessa enzima relacionou-se, ainda, com a ocorrência de recidiva tumoral local e de metástase nas pacientes do Grupo I. Ainda, a expressão da GSTpi parece influenciar na sobrevida global, uma vez que foi verificada maior expressão dessa enzima em pacientes que mostraram tempo de sobrevida menor (Grupo total e Grupo I).

A alta expressão da GSTpi em pacientes com pior evolução clínica pode estar associada aos mecanismos de resistência celular a múltiplos fármacos, caracterizando baixas respostas a tratamentos quimioterápicos e a radioterapia (TOWNSEND & TEW 2003; HUBER et al.2008). Células neoplásicas tendem a ser mais resistentes a apoptose, e embora esse mecanismo não seja claro, o papel da GSTpi tem sido proposto. Esta enzima pode detoxificar quimioterápicos dentro das células neoplásicas, tornando-as resistentes ao tratamento (SU et al., 2003; TOWNSEND & TEW 2003; LAPENSEE et al., 2009; LASABOVA et al., 2010).

De acordo com nossos resultados, outros autores associaram a maior expressão da GSTpi com um pior prognóstico, relacionando o menor intervalo livre da doença com a maior expressão da GSTpi (HUANG et al., 2003). Além disso, SU et al. (2003) demonstraram que a diminuição do tumor foi mais acentuada em tumores GSTpi negativos, em pacientes tratadas com quimioterapia neoadjuvante com o regime FAM (5-fluorouracil, adriamicina e mitomicina).

Similarmente, outro estudo demonstrou que a diminuição do tamanho tumoral após o uso dos quimioterápicos docetaxel e paclitaxel foi mais acentuada em tumores GSTpi negativos. Portanto, os autores concluíram que a expressão imuno-histoquímica dessa enzima pode ser considerada um bom marcador preditivo de resposta a esses fármacos (ARAI et al., 2008). Ao contrário, Arun et al. (2010) demonstraram tendência de associação entre maior expressão da GSTpi e melhor resposta adjuvante à quimioterapia. Em contrapartida, a expressão da GSTpi não teve influência na taxa de recidiva tumoral local em pacientes tratadas com radioterapia (SILVESTRINI et al., 1997).

Apesar dos reconhecidos avanços na identificação de genes envolvidos no crescimento, progressão e resistência de tumores aos medicamentos, o modo como esses genes participam, interagem e são regulados nesses processos ainda não estão esclarecidos. 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 & PARHAM, 1998).

A possibilidade de serem testados agentes quimioterápicos antes do uso nas 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. Têm se usado com sucesso culturas de células primárias a fim de obter respostas à exposição a quimioterápicos e apoiar o desenvolvimento de novos agentes anti-câncer (CREE et al., 2010).

Nesse estudo, foi verificada a influência da quimioterapia na expressão dos genes que sintetizam as enzimas precursoras da GSH, da GPX e da GSTpi. 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 o tratamento com o quimioterápico, o gene GCLC que sintetiza a enzima glutamato cisteína ligase que catalisa o primeiro passo da síntese da GSH, apresentou-se subexpresso em 58,3% das amostras, enquanto a expressão do gene GSS que sintetiza a enzima glutationa sintetase que catalisa o segundo e último passo da síntese da GSH, não apresentou alteração significativa. Ainda, os genes GPX e GSTP1 apresentaram-se subexpressos em 50% e 75% das amostras, respectivamente.

Diversos estudos demonstram que após a agressão *in vitro* com a doxorrubicina ou fármacos semelhantes, alterações na expressão dos genes responsáveis pela síntese dessas proteínas normalmente ocorrem. Ozkan & Fiskin (2006) demonstraram que a aplicação do quimioterápico epirrubicina em células neoplásicas da mama, diminuiu a atividade da GSH, GPX e GSTpi após 24 horas de exposição *in vitro*. Ao contrário, um estudo realizado por Ilvsova et al. (2009) mostrou que a concentração de GSH total no sangue de pacientes com câncer de mama aumentou significativamente após 24 horas da administração da doxorrubicina. 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 GPX 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. Vibet et al. (2008) aplicaram ácido docosahexaenóico, conhecido por potencializar o mecanismo oxidativo de quimioterápicos, em células neoplásicas da mama juntamente com a doxorrubicina e demonstraram que a alta concentração de ROS gerado pelo tratamento inibiu a atividade da GPX. O mesmo foi observado em modelos animais com câncer de mama. Da mesma forma, Sun et al. (2009) observaram que altas concentrações de H₂O₂ aumentam a sensibilidade das células tumorais *in vitro* e *in vivo* não só à doxorrubicina mas também ao tratamento com radiação ionizante. 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 dessa droga não está diretamente relacionada à produção de ROS.

A relação da resposta celular ao quimioterápico encontrada neste estudo, teve relação com a subexpressão do gene GSTP1 e está de acordo com a literatura. Diversos estudos demonstram que ocorre a superexpressão desse gene em linhagem de câncer de mama resistente a essa droga (WANG et al.1999; GEHRMANN et al. 2004; KALININA et al. 2007). Provavelmente, a relação entre altas concentrações de GSTpi e a resistência a drogas está associada à capacidade celular em promover a conjugação de quimioterápicos com a GSH reduzindo sua entrada 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 a doxorubicina ou a outras drogas semelhantes não está diretamente relacionada com a conjugação do quimioterápico com a GSH (GAUDIANO et al. 2000).

Nesse contexto, diversas pesquisas dedicam-se em 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. 2001). Não se sabe exatamente quais alterações intracelulares são responsáveis por essa resistência. Sugere-se que altas concentrações de GSH, GPX e GSTpi, independente de outras alterações intracelulares, não contribuem de modo decisivo para a MDR (LORUSSO ET AL. 2009; PEZZOLA et al. 2010).

A resistência a 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 terem levado à diminuição das concentrações intracelulares de GSH, a enzima gama glutamil transpeptidase hidrolisa a GSH sérica, provendo a célula dos aminoácidos necessários para a reposição da GSH intracelular (HANING & 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 & PILOT 1985).

Além disso, a GSTpi particularmente, pode atuar como inibidor endógeno da quinase JNK1 (c-jun N-terminal) (ADLER et al. 1999). Yu et al. (2009) demonstraram que a utilização de agentes que aumentam o estresse oxidativo em células neoplásicas resistentes a doxorubicina provocam a dissociação do complexo GSTpi:JNK e conseqüente ativação da apoptose mediada pela JNK (YU et al. 2009).

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, GPX 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).

De acordo com a literatura, fica clara a busca no melhor entendimento do envolvimento dessas proteínas na MDR e seu real valor prognóstico. Os resultados de estudos que correlacionam o prognóstico com a expressão da GSTpi em câncer de mama são controversos (HAAS et al. 2006), entretanto, a maioria dos autores sugere que a GSTpi pode ser adicionada à lista de novos e promissores marcadores prognósticos fornecendo informações importantes no manejo clínico de pacientes com câncer de mama (HUANG et al. 2003).

Além disso, o conhecimento da atividade da GSH e suas enzimas nos diversos processos biológicos a ela relacionados tende a se expandir. O avanço das técnicas de análise e localização dessas proteínas 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 permite concluir que:

1. A alta expressão das proteínas GPX e GSTpi associada ao RE negativo, grau histológico III, estadiamento clínico maior que II, ocorrência de recidiva local e metástase estão associados ao alto risco de morte, além de menor sobrevida global de pacientes com câncer de mama, mesmo em tratamento com quimioterápico e radioterapia, essas proteínas parecem exercer papel importante na progressão da doença, destacando-se como possíveis marcadores prognóstico nessas pacientes.
2. O teste diagnóstico confirma a associação entre valores elevados de GSTpi (D.O.M. > 187 u.a.) e mortalidade independente do tratamento ou mesmo em pacientes tratadas com quimioterapia e radioterapia adjuvantes, com alta sensibilidade (acima de 85%), enquanto valores reduzidos de GSH (abaixo de 170 u.a.) associam-se a maior probabilidade de sobrevivência, com alta especificidade (88%).
3. Há relação entre a aplicação do quimioterápico doxorrubicina e a expressão reduzida de genes associados com a produção de agente antioxidantes incluindo GCLC, GPX e GSTP1, tornando-se possíveis candidatos marcadores preditivos da resposta terapêutica ao câncer de mama, a ser confirmado em estudos mais amplos.

Referências

VII. Referências

- ADLER, V. Regulation of JNK signaling by GSTp. **EMBO J.**, v. 18, n. 5, p. 1321-34, 1999.
- AMBROSONE, C. B. Oxidants and antioxidants in breast cancer. **Antioxid Redox Signal**, v. 2, n. 4, p. 903-17, 2000.
- ARAI, T. et al. Association of GSTP1 expression with resistance to docetaxel and paclitaxel in human breast cancers. **Eur J Surg Oncol.**, v. 34, p. 734-8, 2008.
- ARUN, B. K. et al. Glutathione-s-transferase-pi expression in early breast cancer: association with outcome and response to chemotherapy. **Cancer Invest.**, v. 28, p. 554-9, 2010.
- BALLATORI, N. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol Chem.**, v. 390, n. 3, p. 191–214, 2009.
- BARGINEAR, M. F. et al. Implications of applied research for prognosis and therapy of breast cancer. **Crit Rev Oncol Hematol.**, v. 65, n. 3, p. 223-34, 2008.
- 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.
- BASU, S. et al. Comparison of triple-negative and estrogen receptor-positive/progesterone receptor-positive/HER2-negative breast carcinoma using quantitative fluorine-18 fluorodeoxyglucose/positron emission tomography imaging parameters: a potentially useful method for disease characterization. **Cancer**, v. 112, n. 5, p. 995-1000, 2008.
- 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.
- 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. 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, n. 3, p. 428-34, 2000.

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.

BODEY, B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. **Expert Opin Biol Ther.**, v. 2, n. 4, p. 371-93, 2002.

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

CAIRNS, J. et al. Immunohistochemical demonstration of glutathione S-transferases in primary human breast carcinomas. *J Pathol.*, v. 166, p. 19-25, 1992.

CARNICER, M. J. et al. Role of γ -glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS) gene expression as marker of drug sensitivity in acute myeloid leukemias. **Clinica Chimica Acta**, v. 365, p. 342-345, 2005.

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.

CIANFROCCA, M. GOLDTEIN L.J. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. **Oncologist**, v. 9, n. 6, p. 606-616, 2004.

CLAPPER, M.L. et al. Contribution of patient history to the glutathione S-transferase activity of human lung, breast and colon tissue. *Carcinogenesis*, v. 12, n. 10, p. 1957-61, 1991.

COLLEONI, M. et al. How to improve timing and duration of adjuvant chemotherapy. **The Breast**, v. 3, p. 101-5, 2001.

- 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, n. 4, p. 375-79, 2010.
- DI, X. et al. Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen in the response of human breast tumor cells to adriamycin. **Biochem Pharmacol.**, v.77, n. 7, p. 1139-50, 2009.
- DUFFY, M. J.; O'DONOVAN, N.; CROWN, J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. **Cancer Treat Rev.**, v.37, n.2, p. 151-59, 2010.
- EL-RAYES, B.F. et al. Cytochrome P450 and Glutathione Transferase Expression in Human Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 1705-09, 2003.
- ESTRELA, J. M.; ORTEGA, A.; OBRADOR, E. Glutathione in cancer biology and Therapy. **Crit Rev Clin Lab Sci.**, v. 43, p. 143-81, 2006.
- FERNANDES, R.C. et al. Coordinated expression of ER, PR and HER2 define different prognostic subtypes among poorly differentiated breast carcinomas. **Histopathology**, v. 55, n. 3, p. 346-52, 2009.
- FITZGIBBONS, P.L. et al. Prognostic Factors in Breast Cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med.**, v.124, p. 966-78, 2000.
- FRIERSON, H. F. et al. Immunohistochemical staining and Southern blot hybridization for glutathione S-transferase pi in mammary infiltrating ductal carcinoma. **Mod Pathol.**, v. 8, p. 643-7, 1995.
- 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, n. 12, p. 1915-23, 2000.
- GEHRMANN, M.L. et al. Highly altered protein expression profile in the adriamycin resistant MCF-7 cell line. **J Proteome Res.**, v. 3, n. 3, p. 403-9, 2004.

GONZALEZ-ÂNGULO, A. M.; MORAES-VASQUEZ, F.; HORTOBAGYL, G. N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. **Adv Exp Med Biol.**, v. 608, p. 1-22, 2007.

GRALOW, J. et al. Clinical cancer advances 2007: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening. A report from the American Society of Clinical Oncology. **J Clin Oncol.**, v. 26, n. 2, p. 313-325, 2008.

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 H₂O₂-mediated oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**, v. 48, p. 1024-33, 2010.

HAMILTON, A.; HORTOBAGYI, G. Chemotherapy: what progress in the last 5 years? **J Clin Oncol.**, v. 23, p. 1760-75, 2005.

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, n. 5, p. 770-4, 2007.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANING, M.H.; PILOT, H.C. Gamma-glutamyl transpeptidase - its role in hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 2, p. 165-72, 1985.

HICKS, D. G.; KULKARNI, S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast cancer. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 132, p. 1008-1015, 2008.

HOOD, C. J.; PARHAM, D. M. A simple method of tumour culture. **Pathol Res Pract.**, v. 194, n. 3, p. 177-81, 1998.

HSIAO, Y.H. et al. Breast cancer heterogeneity: mechanisms, proofs, and implications. **Journal of Cancer**, v. 1, p. 6-13, 2010.

HUANG, J. et al. Prognostic significance of glutathione S-transferase-pi in invasive breast cancer. **Mod Pathol.**, v. 16, n. 6, p. 558-65, 2003.

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, n. 34, p. 4316-21, 2009.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quím. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-79, 2008.

ILVASOVA, D. et al. Markers of oxidative status in a clinical model of oxidative assault: a pilot study in human blood following doxorubicin administration. **Biomarkers**, v. 14, n. 5, p. 321-5, 2009.

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.

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 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.

KALININA, E. V. et al. Expression of genes for redox-dependent glutathione S-transferase isoforms GSTP1-1 and GSTA4-4 in tumor cell during the development doxorubicin resistance. **Bull Exp Biol Med.**, v. 143, p. 328-30, 2007.

KANG, D.H. Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. **AACN Clin Issues**, v. 13, n. 4, p. 540-9, 2002.

KASAPOVIĆ, J. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. **Cell Biochem Funct.**, v. 26, n. 6, p. 723-30, 2008.

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.

KUMARAGURUPARAN, R.; KABALIMOORTHY, J.; NAGINI, S. Correlation of tissue lipid peroxidation and antioxidants with clinical stage and menopausal status in patients with adenocarcinoma of the breast. **Clin Biochem.**, v. 38, n. 2, p. 154-8, 2005.

LAPENSEE, E. W. et al. Prolactin confers resistance against cisplatin in breast cancer cells by activating glutathione-S-transferase. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 8, p. 1298-304, 2009.

LASABOVA, Z. et al. Hypermethylation of the GSTP1 promoter region in breast cancer is associated with prognostic clinicopathological parameters. **Neoplasma**, v. 57, n. 1, p. 35-40, 2010.

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.

LI, X. et al. ER, PgR, HER-2, Ki-67, topoisomerase IIa, and nm23-H1 proteins expression as predictors of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. **Med Oncol.**, 2010.No prelo.

LORUSSO, D. et al. Brostallicin (PNU-166196), a new minor groove DNA binder: preclinical and clinical activity. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 18, n. 12, p. 1939-46, 2009.

MALAMOU-MITSI, V. et al. Evaluation of the prognostic and predictive value of p53 and Bcl-2 in breast cancer patients participating in a randomized study with dose-dense sequential adjuvant chemotherapy. **Annals of Oncology**, v. 17, p. 1504-11, 2006.

- MARTINEZ, V. et al. Drug metabolism-related genes as potential biomarkers: analysis of expression in normal and tumour breast tissue. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 110, n. 3, p. 521-30, 2008.
- MECHETNER, E. et al. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-Glycoprotein expression by human breast cancer correlate with *in vitro* resistance to taxol and doxorubicin. **Clinical Breast Research**, v. 4, p. 389-98, 1998.
- MOLINA, R. et al. Glutathione transferase GST pi in breast tumors evaluated by three techniques. **Dis Markers**. v. 11, p. 71-82, 1993.
- 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, n. 1, p. 61-6, 2008.
- MURAWAKI, Y. et al. Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer. **Cancer Lett.**, v. 259, p. 218-30, 2008.
- MURALIKRISHNAN, G. et al. Effect of Vitamin C on Lipidperoxidation and Antioxidant Status in Tamoxifen-Treated Breast Cancer Patients. **Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 298-302, 1020.
- MURRAY, G. I. et al. Expression of xenobiotic metabolizing enzymes in breast cancer. **J Pathol.**, v. 169, p. 347-53, 1993.
- 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, n. 1, p. 38-8, 2006.
- PAGE, D. L.; JENSEN, R.A.; SIMPSON, J.F. Routinely available indicators of prognosis 10. in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 51, n. 3, p. 195-208, 1998.
- PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta.**, v. 333, p. 19-39, 2003.

- PARKIN, D.M. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin.**, v.55, p.74-108, 2005.
- PEDERSEN, L. et al. The prognostic influence of multifocality in breast cancer patients. **Breast**, v. 13, p. 188-93, 2004.
- PEZZOLA, S. et al. Role of glutathione transferases in the mechanism of brostallicin activation. **Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 226-35, 2010.
- PUGLIESE, M. et al. The clinical impact and outcomes of immunohistochemistry-only metastasis in breast cancer. **Am J Surg.**, v. 200, n. 3, p. 368-73, 2010.
- RAJNEESH, C.P. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. **Singapore Med J.**, v. 49, n. 8, 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.
- SCHMIDT, M.; BACHHUBER, A.; VICTOR, A. p53 expression and resistance against paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v. 129, p. 295-302, 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.
- SILVESTRINI, R. et al. Expression of p53, glutathione S-transferase-pi, and Bcl-2 proteins and benefit from adjuvant radiotherapy in breast cancer. **J Natl Cancer Inst.**, v. 89, p. 639-45, 1997.
- SNOUSSI, K. et al. Leptin and leptin receptor polymorphisms are associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. **BMC Cancer**, v. 6, n. 38, p. 1-10, 2006.
- SORLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **Eur J Cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667-75, 2004.

SU, F. et al. Glutathione S transferase pi indicates chemotherapy resistance in breast cancer. **J Surg Res.**, v. 113, n. 1, 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. No prelo.

SUN, W. et al. Enhancing the antitumor activity of adriamycin and ionizing radiation. **Cancer Res.**, v. 69, n. 10, p. 4292-300, 2009.

TAVASSOLI, F.A.; DEVILEE, P. **Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs.** Lyon: WHO/IARC; 2003.

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*, v. 22, n. 47, p. 7369-75, 2003.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 145-55, 2003.

UCHIDA, M. et al. Alternative RNA splicing in expression of the glutathione synthetase gene in human cells. **Mol Biol Rep.**, v. 37, n.4, p. 2105-9, 2010.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact.**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VANT'T VEER L. J.; PAIK, S.; HAYES, D. F. Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker. **J Clin Oncol.**, v. 23, p. 1631-5, 2005.

VIBET, S. et al. Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. **Free Radic Biol Med.**, v. 7, p. 1483-91, 2008.

WANG, K. et al. Glutathione S-transferases in wild-type and doxorubicin-resistant MCF-7 human breast cancer cell lines. **Xenobiotica**, v. 29, n. 2, p. 155-70, 1999.

YEH, C. C. et al. A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. **Cell Biochem Funct.**, v. 24, n. 6, p. 555-9, 2006.

YU, S.T. et al. Downregulation of GSTpi expression by tryptanthrin contributing to sensitization of doxorubicin-resistant MCF-7 cells through c-jun NH2-terminal kinase-mediated apoptosis. **Anticancer Drugs**, v. 20, n. 5, p. 382-8, 2009.

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, n. 2, p. 129-32, 2002.

Apêndice

VIII. Apêndice

Apêndice A: Protocolos de preparo das soluções.¹ **BSA** PBS----- 12 mL

BSA----- 0,5 g

² **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

³ **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

⁴ **Tampão TRIS / EDTA (pH 9,0)** EDTA ----- 1 g

TRIS -----12 g

Água destilada ----- 500mL

Solução de uso: 1/10

⁵ **Meio de transporte** Meio de cultura RPMI1640 ----- 100mL

Penicilina/Estreptomicina ----- 1,0mL

IX. Anexos

Anexo A: Modelo do Termo de Consentimento livre e esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)

Título da Pesquisa: **“Avaliação da glutatona e suas enzimas como marcadores prognósticos e preditivos do câncer de mama”**

Pesquisadores Responsáveis: Profa. Dra. Debora A. P. C. Zuccari – Coordenadora/ Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza – Geneticista/ Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos- Geneticista/ Dra. Célia Sebastiana de Jesus Fazzio- Patologista/ Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo- Geneticista -UPGEM/ Prof. Newton Antônio Bordin Junior – Oncologista clínico/ Profa. Sílvia Ap. Perea – Mastologista/ Prof. Alexandre Mansur Biscaro – Mastologista/ Prof. José Luiz Esteves Francisco - Mastologista

- A. Para obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama, os pesquisadores da FAMERP de São José do Rio Preto (SP) 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;
- B. O estudo tem como objetivo verificar a ação das novas drogas quimioterápicas utilizadas na rotina clínica, nas células mamárias tumorais cultivadas em laboratório e consequentemente, sua ação benéfica no tratamento das pacientes;
- C. Para isso, após a cirurgia para retirada do tumor será cortado deste material, um pedacinho que será enviado ao laboratório para cultivo celular. Não haverá mudança na técnica cirúrgica para esta coleta.
- D. Se eu concordar que um pedacinho do tumor retirado seja utilizado para a pesquisa não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes dela.
- E. Se eu não concordar ou decidir retirar meu consentimento em qualquer momento, minha decisão não influenciará, de nenhum modo, o meu tratamento nem a evolução da minha doença.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador sobre a utilização para estudo de 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 sem que tenha sido submetida a qualquer tipo de pressão:

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome do(a) participante:

Representante legal:

RG do prontuário médico:

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:

Prof. Newton Antônio Bordin Junior – Departamento de Ginecologia e Obstetria
 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 S.J. Rio Preto
 São José do Rio Preto, SP - CEP 15090-000
 Fone: (17) 3201-5907
 e-mails: debora.zuccari@famerp.br; newton_bordin@terra.com.br

Em caso de dúvidas contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, telefone: (0xx17) 3201-5700, ramal 5813.

Anexo B: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)


Parecer n.º 071/2009

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 2537/2009 sob a responsabilidade de Bruna Victorasso Jardim com o título "Avaliação da expressão da glutatona pela imuno-histoquímica e do estresse oxidativo pelo ensaio cometa como marcadores prognósticos e preditivos em neoplasias mamárias em mulheres" está de acordo com a resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 13 de abril de 2009.


Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP